

Charakterisierung Ionenkanal-bildender Substanzen aus dem Regurgitat von *Lepidoptera*-Larven

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologe Heiko Maischak
geboren am 12. 09. 1974 in Augsburg

Gutachter:

1. PD Dr. Axel Mithöfer, Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena.
2. Prof. Dr. Erika Kothe, Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
3. Prof. em. Dr. Friedrich-Wilhelm Bentrup, Universität Salzburg, Österreich.

Tag der öffentlichen Disputation:

25. Januar 2010

Inhalt

1. Einleitung	7
1.1. Prinzipien der Pflanzenabwehr	7
1.1.1. Mechanismen der Abwehr von Herbivoren	7
1.2. Das Erkennen von Herbivorie durch die Pflanze	8
1.2.1. <i>Herbivory-Associated Molecular Patterns</i> (HAMPs)	8
1.2.2. Signaltransduktion	10
1.2.3. Vergleich mit der Interaktion von Phytopathogenen und Pflanzen	12
1.3. Die ersten Sekunden und Minuten	13
1.3.1. Die cytosolische Calciumkonzentration	13
1.3.2. Reaktive Sauerstoffspezies	13
1.3.3. Depolarisation der Plasmamembran	14
1.4. Motivation dieser Studien	14
2. Material und Methoden	17
2.1. Tier und Pflanzenmaterial	17
2.1.1. Tiermaterial	17
2.1.2. Pflanzenmaterial	17
2.2. Regurgitat	18
2.2.1. Sammeln von Regurgitat	18
2.2.2. Extraktion von Regurgitat mit Dichlormethan	18
2.3. Elektrophysiologische Methoden	19
2.3.1. Nomenklatur	19
2.3.2. Planare Lipiddoppelschichten (BLM, <i>black lipid membranes</i>)	19
2.3.3. Messung apoplastischer Spannungsänderungen	25
2.3.4. <i>Patch-clamp</i> -Messungen	27
2.4. Chromatographische Methoden	29
2.4.1. Schnelle Proteinflüssigchromatographie (FPLC)	29
2.4.2. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und Massen-spektrometrie (LC/MS)	29
2.4.3. Gaschromatographie / Massenspektrometrie (GC/MS)	30
2.4.4. ZipTip _{C18} Pipettenvorsatzsäulen	30
2.5. Sammlung von Duft im geschlossenen Luftkreislauf (<i>closed-loop-stripping</i>)	30
2.6. Messung von intrazellulären Calciumionen durch Äquorin-Biolumineszenz	31
2.7. Ultrafiltration	31
2.8. Thermographie	32
2.9. Chemikalien	33
2.10. Software	33
3. Ergebnisse	35
3.1. Charakterisierung von Ionenkanal-bildenden Substanzen aus Regurgitat	35
3.1.1. Detaillierte Betrachtung der Ionenkanäle aus Regurgitat von <i>Spodoptera spec.</i> (<i>Noctuidae</i>)	35
3.1.2. Ionenselektivität	45

3.1.3. Konzentrationsabhängigkeit	45
3.1.4. Einfluss von unterschiedlichen Alkaliionen auf die Leitfähigkeit	46
3.1.5. Vergleich verschiedener Arten von <i>Lepidoptera</i>	47
3.1.6. Einfluss von Temperatur auf die Ionenkanal-bildende Aktivität im Regurgitat	53
3.1.7. Beständigkeit gegenüber Proteinase K	54
3.1.8. Vergleich verschiedener Futterquellen	55
3.1.9. Zusammenfassung der Eigenschaften der Ionenkanal-bildenden Substanzen aus dem Regurgitat von Lepidopterenlarven	56
3.2. Aufreinigung der Ionenkanal-bildenden Aktivität aus Regurgitat	58
3.2.1. Ultrafiltration	58
3.2.2. Auftrennung mittels Gelfiltration (FPLC)	59
3.2.3. Extraktion von Regurgitat mit Dichlormethan	64
3.2.4. Anionenaustausch	66
3.2.5. Aufreinigung mittels <i>reversed-phase</i> Pipettenvorsatzsäule	66
3.2.6. Aufreinigung mittels HPLC	67
3.2.7. Untersuchung des Dichlormethanextraktes und der Fraktionen der Gelfiltration mittels OrbiTrap-MS	71
3.2.8. Zusammenfassung der Aufreinigung der Ionenkanal-bildenden Substanzen aus Regurgitat von Spodopteralarven	71
3.3. Untersuchungen zu anderen Substanzen	72
3.3.1. <i>N</i> -Linolenoylglutamin	72
3.3.2. Inceptin	76
3.4. Physiologische Untersuchungen	78
3.4.1. Messung der Veränderung der zellulären Calciumkonzentration	78
3.4.2. Elektrophysiologische Messung der Potenzialänderung im Apoplast	81
3.4.3. Thermographische Aufnahmen während Herbivorie	84
4. Diskussion	87
4.1. Elektrophysiologische Charakteristika der Ionenkanal-bildenden Substanzen aus dem Regurgitat von <i>Lepidoptera</i> -Larven im Vergleich zu bekannten Ionenkanal-bildenden Substanzen	87
4.1.1. Vergleich mit antimikrobiellen Peptiden	89
4.1.2. Vergleich mit Ionenkanal-bildenden Peptiden aus Insekten	92
4.1.3. Vergleich mit Defensinen und Thioninen	93
4.1.4. Vergleich mit Messungen von verschiedenen Ionenkanälen pflanzlichen Ursprungs in <i>black lipid membranes</i>	95
4.1.5. Vergleich mit nicht-peptidogenen Ionenkanalbildnern	96
4.1.6. Zusammenfassung	99
4.2. Die Wirkung von Ionenkanalbildnern auf pflanzliche Zellen und Organismen	101
4.3. Die Rolle von Ionenkanal-bildenden Substanzen im Immunsystem von Insekten	105
4.4. Ausblick	105
5. Zusammenfassung	108

6. Summary	110
7. Anhang	113
7.1. Abbildungen	113
7.2. Tabellen	119
7.3. Abbildungsverzeichnis	120
7.4. Gleichungsverzeichnis	122
7.5. Tabellenverzeichnis	122
7.6. Abkürzungsverzeichnis	122
7.7. Literatur	124
8. Lebenslauf	140
9. Danksagung	142
Erklärung	145

1. Einleitung

1.1. Prinzipien der Pflanzenabwehr

1.1.1. Mechanismen der Abwehr von Herbivoren

Pflanzen stehen als primäre Produzenten auf der untersten Stufe der Nahrungskette und sehen sich einer Vielzahl von Angriffen von Pathogenen und Herbivoren ausgesetzt. Um diesen Angriffen nicht schutzlos gegenüber zu stehen, haben Pflanzen eine Reihe von direkten und indirekten, induzierbaren und konstitutiven Verteidigungsmechanismen entwickelt. Es sind mechanische Barrieren, auf die Angreifer zuerst treffen. Diese können aus Dornen, Stacheln oder Trichomen bestehen und gegen größere Pflanzenfresser wirksam sein, aber auch verholztes Gewebe verhindert den Fraß (Sitte *et al.* 2002).

Neben den mechanischen Barrieren verfügen viele Pflanzen auch über die Fähigkeit, sich durch toxisch wirkende Substanzen zu verteidigen. Beispiele für diese Art der direkten Verteidigung wären Glucosinolate, wie sie von Brassicaceen wie *Arabidopsis thaliana* oder *Brassica napus* produziert werden (Antonious *et al.* 2009; Reichelt *et al.* 2002) oder cyanogene Glucoside, wie sie beispielsweise von *Phaseolus lunatus* erzeugt werden (Ballhorn *et al.* 2009). Das als Nervengift wirksame Alkaloid Nikotin ist ein wirksames Mittel der Verteidigung von *Nicotiana attenuata* auch gegen adaptierte Spezialisten wie die Larven von *Manduca sexta* (Steppuhn *et al.* 2004). Aber auch Stoffe, die die Verwertbarkeit der pflanzlichen Nahrung herabsetzen sind ein verbreitetes Mittel, sich gegen Insekten zu wehren. So reduzieren Proteinase-Inhibitoren in *N. attenuata* den Befall durch *M. sexta*-Larven (Zavala *et al.* 2004).

Komplexer sind die Interaktionen bei der indirekten Verteidigung. Es handelt sich dabei um tritrophische Systeme aus Pflanze, Herbivor und Prädator, bzw. Parasitoid. So produziert eine von Herbivoren befallenen Pflanze flüchtige, organische Verbindungen (VOCs, *volatile organic compounds*). Diese bestehen zu einem Großteil aus Verbindungen, welche aus dem Fettsäurestoffwechsel kommen, wie *green leaf volatiles* GLVs, aus dem Phenylpropan-Biosyntheseweg stammen, wie Methylsalicylat oder sie sind Terpene. Gerade die Terpene zeigen eine große Vielfalt verschiedener Substanzen (Dewick 2002). So produziert beispielsweise *Medicago truncatula* über 20 verschiedene Terpene (Leitner *et al.* 2005), die durch verschiedene biotische Faktoren beeinflusst und differenziert produziert werden, was einen Rückschluss von der Duftzusammensetzung auf die Art der biotischen Interaktion zulässt (Leitner *et al.* 2009).

Für GLVs, meist gesättigte oder ungesättigte C₆-Aldehyde oder -Alkohole und deren Acetatester, konnte gezeigt werden, dass diese auf parasitoide Wespen und prädatorische Insekten anziehend wirken (James 2003; James 2005). Extrafloraler Nektar wirkt anziehend auf Ameisen, welche zum Beispiel die Limabohne *P. lunatus* gegen Fressfeinde verteidigen und in diesem Fall die Wirksamkeit von VOCs übertreffen (Kost und Heil 2008). Auch unter der Erde gibt es ein vergleichbares tritrophisches System. Es wurde gezeigt, dass Maiswurzeln, wenn sie

von *Diabrotica virgifera virgifera*-Larven, einer Käferart, befallen sind, (E)- β -Caryophyllen produzieren und entomopathogene Nematoden anlocken (Rasmann *et al.* 2005).

Aber auch Pflanzen können auf VOCs reagieren. So konnte nachgewiesen werden, dass dieselben Duftstoffe, die bei Herbivorie von der Limabohne erzeugt werden, in Limabohne auch zu einer Induktion von Abwehrgenen führen (Arimura *et al.* 2000; Arimura *et al.* 2000). Und auch im Feld führen diese Duftstoffe zu einer „priming“ genannten Reaktion, durch die noch nicht befallenen Pflanzen sich auf bevorstehende Angriffe vorbereiten und dann zum Beispiel durch eine größere Produktion von extrafloralem Nektar eine effizientere Verteidigung aufweisen (Heil und Kost 2006). Daneben konnte für Limabohne gezeigt werden, dass VOCs auch für die systemische Signaltransduktion innerhalb der Pflanze von Bedeutung sind (Heil und Silva Bueno 2007).

1.2. Das Erkennen von Herbivorie durch die Pflanze

Wenn Pflanzen das Opfer von Herbivorie sind, dann ist gerade bei kauend fressenden Insekten wie Raupen die mechanische Verwundung ein untrennbar mit dem Fressen verbundenes Merkmal. Daher liegt es nahe, dass diese wiederkehrende mechanische Beeinträchtigung auch Signalwirkung auf die Pflanze hat. Durch eine „MecWorm“ genannte Maschine, die durch rasches Absenken eines Stößels auf die Blattoberfläche die wiederkehrende Verwundung eines fressenden Insekts, beispielsweise einer *Lepidoptera*-Larve, nachahmt, ist es möglich, Raupenfraß zu simulieren. Es ist dadurch gelungen nachzuweisen, dass die alleinige wiederkehrende Verletzung ausreicht, um bei *P. lunatus* die Emission von Duftstoffen hervorzurufen, wie es auch bei Herbivorie durch Larven von *Spodoptera littoralis* der Fall ist (Mithöfer *et al.* 2005). Eine molekulare Grundlage für die Perzeption der mechanischen Verwundung wurde aber noch nicht gefunden.

Die mechanische Verwundung ist aber nicht die einzige Informationsquelle der Pflanzen, wenn es um die Wahrnehmung von Herbivorie geht. Es gibt bereits eine ganze Reihe von Elizitoren, die mit Herbivorie assoziiert sind. Diese werden im Folgenden vorgestellt.

1.2.1. Herbivory-Associated Molecular Patterns (HAMPs)

Im Regurgitat, das ist die Spucke und der Vorderdarminhalt von Raupen, wurden die meisten der Elizitoren gefunden, die bei Herbivorie der Pflanze zur Erkennung von Fressfeinden dienen. Dass diese auch bei Raupenfraß tatsächlich in die verwundete Stelle gelangen, wurde durch radioaktiv markierte Fettsäure-Aminosäurekonjugate nachgewiesen (Truitt und Pare 2004). Die Gruppe der Fettsäure-Aminosäurekonjugate ist eine Gruppe mit zahlreichen Vertretern, unter denen das Volicitin der vielleicht prominenteste ist (Abbildung 1.1). Volicitin (*N*-(17-Hydroxylinolenoyl)-L-Glutamin) wurde im Regurgitat von *Spodoptera exigua* als erste Substanz dieser Klasse identifiziert (Alborn *et al.*, 1997). Als Aminosäure kommt meistens Glutamin, bei *Manduca sexta* Glutamat, vor und die Fettsäure ist häufig Linolensäure, aber auch Linolsäure und Derivate dieser beiden Fettsäuren wurden gefunden (Alborn *et al.*, 1997, (Paré *et al.* 1998; Pohnert *et al.* 1999; Spiteller 2004). Fettsäure-Aminosäurekonjugate von Glutamat mit

Linolensäure und Linolsäure sind aber nicht nur in der Spucke von Lepidopteren-Larven gefunden worden, sondern auch in Larven von Grillen (*Teleogryllus taiwanemma* und *Teleogryllus emma*) und *Drosophila melanogaster* (Yoshinaga *et al.* 2007).

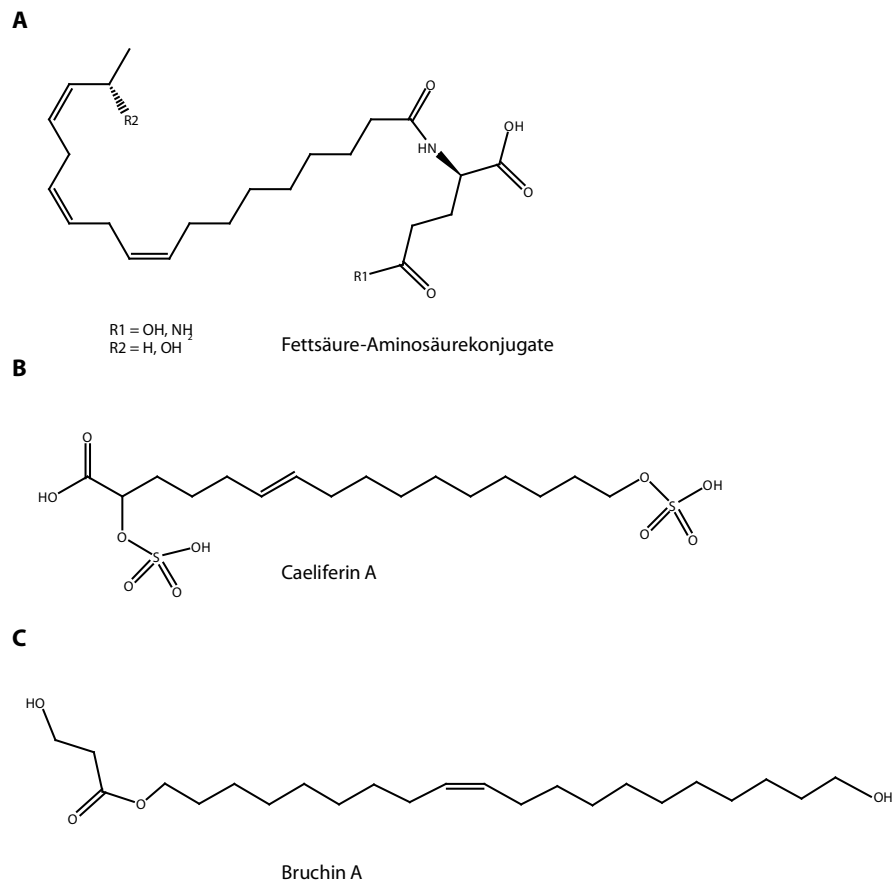


Abbildung 1.1: Beispiele für die Struktur einiger HAMPs. **A:** Fettsäure-Aminosäurekonjugate, R1= OH, R2=H: N-Linolenoylglutamat, R1= NH₂, R2= H: N-Linolenoylglutamin, R1= NH₂, R2= OH: Volicitin. **B:** Caeliferin A, **C:** Bruchin A.

Bei Vertetern der Kurzfühlerschrecken (*Caelifera*) wurde das Caeliferin (Abbildung 1.1) als Elizitor identifiziert. Dabei handelt es sich um α , ω -hydroxylierte, zum Teil einfach ungesättigte Fettsäuren mit 15 bis 20 Kohlenstoffatomen, deren Hydroxylgruppen mit Sulfatgruppen verestert sind, es gibt aber auch Vertreter, bei denen sich statt des endständigen Schwefelsäureesters eine Carboxylgruppe findet, die ihrerseits mit Glycin durch eine Amidbindung verbunden ist (Alborn *et al.* 2007).

Aus den Rüsselkäfern *Bruchus pisorum* und *Callosobruchus maculatus* wurden die Bruchine isoliert (Abbildung 1.1). Diese sind langkettige α , ω -Dirole, welche einfach oder doppelt mit 3-Hydroxypropansäure verestert sind (Doss *et al.* 2000). Bruchine werden bei der Oviposition der Käfer auf den Schoten von Erbsen (*Pisum sativum*) mit der Pflanze in Kontakt gebracht. Dabei lösen die Bruchine die Bildung von Neoplasmen aus, die die Larven daran hindern, in das Gewebe der Schote einzudringen (Doss *et al.* 2000).

Neben den hier vorgestellten HAMPs (*herbivory associated molecular patterns*, (Mithöfer und Boland 2008)) wurden auch eine Reihe proteinogener Elizitoren beschrieben. So löst die β -

Glucosidase aus dem Regurgitat von *Pieris brassicae* die Emission von VOCs bei Kohl aus (Mattiacci *et al.* 1995) und auch Glucose-Oxidase (Eichenseer *et al.* 1999) und alkalische Phosphatase (Funk 2001) wirken als Elizitoren.

Auch ein proteinogener Elizitor, aber pflanzliche Ursprungs, ist Inceptin. Dabei handelt es sich um ein Peptid mit 11 Aminosäuren und einer Disulfidbrücke. Es stammt aus einem regulatorischen Bereich der γ -Untereinheit der F_1F_0 -ATP-Synthase aus Chloroplasten. Inceptin entsteht daraus durch Proteolyse bei der Verdauung durch das Insekt. Zuerst wurden Inceptine im Regurgitat von *Spodoptera frugiperda* entdeckt, welche auf *Vigna unguiculata* oder *Zea mays* gefressen hatten, es gibt aber auch abgewandelte, aktive Formen (Schmelz *et al.* 2006; Schmelz *et al.* 2007). Inceptine wirken bei sehr niedrigen Konzentrationen und führen zur Produktion von Ethylen, VOCs und erhöhen die Konzentration von Jasmonsäure und Salicylsäure (Schmelz *et al.* 2006).

Wenn man die hier beschriebenen Elizitoren mit Pflanzen aus verschiedenen Familien auf ihre Wirksamkeit bei der Induktion von Jasmonsäure, Ethylen und Salicylsäure testet, stellt man fest, dass Fettsäure-Aminosäurekonjugate von vielen Pflanzenarten wahrgenommen werden. Es reagieren sowohl Mais (*Poaceae*) als auch Vertreter von Fabaceae (Sojabohne) und Solanaceae (Aubergine). Deutlich beschränkter ist das Wirkungsspektrum von Caeliferin, welches nur *A. thaliana* induziert und Inceptine wirken nur auf Fabaceae (Schmelz *et al.* 2009). Dies legt eine Rezeptor-vermittelte Perzeption für diese Klassen von Elizitoren nahe.

1.2.2. Signaltransduktion

Rezeptoren

Bis heute gibt es nur wenige Hinweise auf Rezeptoren für HAMPs. Zwar deuten die niedrige wirksame Konzentration im femtomolaren Bereich bei Inceptinen und auch Deletionsstudien mit verkürzten Peptiden deuten auf eine Rezeptor-vermittelte Perzeption hin, jedoch wurde bislang kein Rezeptor gefunden (Schmelz *et al.* 2006; Schmelz *et al.* 2007).

Für die Fettsäure-Aminosäurekonjugate jedoch gibt es experimentelle Hinweise auf ein Protein aus der Plasmamembran von *Zea mays*, das in der Lage ist, Volicitin zu binden, es wurde aber bislang nicht näher charakterisiert (Truitt *et al.* 2004).

MAP-Kinasen

MAP-Kinasen (MAPK, *mitogen activated protein kinase*) und die von ihnen ausgelösten Signalwege sind unter den Eukaryoten ein sehr verbreiteter Mechanismus der Signaltransduktion (Chang und Karin 2001; Herskowitz 1995).

Dass dieser Mechanismus auch bei Pflanzen, welche von Herbivoren befallen sind, eine wichtige Rolle spielt, wurde anhand von *N. attenuata* gezeigt. Es wurden zwei MAPKs identifiziert, wovon die eine durch Salicylsäure (SIPK), die andere durch Verwundung (WIPK) induziert wurde (Wu *et al.* 2007). Auch die Konzentrationsanstiege der Phytohormone Ethylen, Jasmonsäure und Salicylsäure nach Zugabe von Regurgitat werden von MAP-Kinasen reguliert (Wu *et al.* 2007). Bei Tomaten, bei denen die orthologen Proteine der genannten MAP-Kinasen

durch *gene silencing* deaktiviert wurden, kam es durch die verringerte Produktion von Proteinase-Inhibitoren zu einem gesteigerten Wachstum von *M. sexta*-Raupen (Kandoth *et al.* 2007).

Phytohormone

Bei der Interaktion zwischen Pflanze und fressendem Insekt spielen drei Phytohormone bedeutende Rollen. Diese sind Ethylen, Jasmonsäure und Salicylsäure.

Die Salicylsäure wird entweder aus Phenylalanin mit dem Schlüsselenzym PAL (Phenylalanin-Ammonium-Lyase) synthetisiert oder direkt aus Chorismat über Isochorismat mit dem Schlüsselenzym ICS (Isochorismat-Synthase) produziert (Verbene *et al.* 1999; Wildermuth *et al.* 2001). Die Rolle von Salicylsäure bei der Herbivorie von kauenenden Insekten wie Raupen scheint von untergeordneter Bedeutung zu sein. Jedoch wurde nach dem Befall von *A. thaliana* mit Blattläusen (*Myzus persicae*) ein erhöhter Salicylat-Spiegel gemessen (De Vos *et al.* 2005; Walling 2000). Auch in Tomatenpflanzen trägt Salicylsäure zur Resistenz gegen Aphiden bei (Li *et al.* 2006).

Ethylen wird aus *S*-Adenosyl-L-Methionin über die Zwischenstufe ACC, 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure, (durch die ACC-Synthase ACS) und anschließender Oxidation (ACOs, ACC-Oxidase) synthetisiert (Bleecker und Kende 2000; Wang *et al.* 2002)). Die Stabilität und damit die Aktivität der normalerweise rasch abgebauten ACS2 von *A. thaliana* wird durch Phosphorylierung durch MPK6 (ortholog zu SIPK, siehe oben) reguliert (Liu und Zhang 2004). Es gibt aber auch Hinweise auf eine Calcium-abhängige Protein-Kinase (CDPK), die ebenfalls Einfluss auf die Produktion von Ethylen haben soll (Tatsuki und Mori 2001). Die Transkription der beiden für die Biosynthese wichtigen Enzyme wird durch Herbivorie induziert (von Dahl *et al.* 2007). Für Ethylen sind in *A. thaliana* fünf Rezeptoren bekannt, ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 und EIN4 sowie eine Kinase, CTR1, und einige Regulatoren der Signaltransduktionskette wie EIN2 (Alonso *et al.* 1999; Chao *et al.* 1997; Chen *et al.* 2005; Huang *et al.* 2003). EIN3 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Transkription weiterer Transkriptionsfaktoren wie ERF1 reguliert, welche dann positiv oder negativ die Transkription der Ethylen-regulierten Gene beeinflussen. (Ohme-Takagi und Shinshi 1995; Solano *et al.* 1998). Ethylen reguliert die Produktion von Abwehr-relevanten Verbindungen wie Proteinase-Inhibitoren in Tomate (O'Donnell *et al.*, 1996) und Nikotin in *N. attenuata* (von Dahl *et al.* 2007).

Die Jasmonsäure ist wohl das wichtigste Phytohormon in der Interaktion zwischen kauenenden Herbivoren und Pflanzen. Es handelt sich bei der Jasmonsäure um ein Oxilipin, welches aus α -Linolensäure durch Umsetzung im Chloroplasten mit einer Lipoxygenase (LOX), einer Allenoxid-Synthase (AOS) und einer Allenoxid-Cyclase (AOC) zu 12-Oxophytodiensäure (OPDA) umgesetzt wird. Anschließend wird Jasmonsäure aus OPDA in Peroxisomen durch die OPDA-Reduktase (OPR3) und dreier β -Oxidationen Jasmonsäure synthetisiert (Wasternack 2007). Viele der biosynthetisch wichtigen Gene der Jasmonsäureproduktion werden durch MAP-Kinasen, im Falle von *N. attenuata* WIPK und SIPK, transkriptionell reguliert (Wu *et al.* 2007).

Nach Verwundung oder Herbivorie steigt die Konzentration von Jasmonsäure rasch an. In der Limabohne wurden die ersten Reaktionen bereits nach 10 min festgestellt und nach etwa 90

min ein Maximum erreicht, das mit etwa 40 ng/g Frischgewicht etwa 10 bis 15-mal höher als das Ruheniveau ist. Die Konzentration nahm mit zunehmendem Abstand von der Stelle des Raupenfraßes ab (Schulze *et al.* 2007). Die Konjugate der Jasmonsäure mit Isoleucin sind die eigentlich aktiven Verbindungen in der Signaltransduktion (Fonseca *et al.* 2009; Krumm *et al.* 1995; Staswick und Tiryaki 2004; Thines *et al.* 2007; Walter *et al.* 2007). Pflanzen von *N. attenuata*, bei denen die Produktion von Jasmonsäure unterdrückt ist, sind stärker anfällig für die Angriffe von *M. sexta* (Kessler *et al.* 2004). Die Wirkungsweise von Jasmonsäure beruht auf der Bindung von Jasmonsäure-Isoleucin an das F-Box-Protein CO11 welches dann zusammen mit den JAZ-Proteinen als Teil des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes SCF^{CO11} die Repressoren der Jasmonsäure-induzierten Gene abbaut (Chini *et al.* 2009; Kessler *et al.* 2004; Thines *et al.* 2007). Die *jar*-Mutanten (*jasmonate resistant*) von *A. thaliana* und *N. attenuata* sind nicht in der Lage, Jasmonsäure mit Isoleucin zu konjugieren. Da ihnen das biologisch aktive Molekül fehlt, sind diese ebenfalls anfälliger für Raupenfraß (Kang *et al.* 2006; Suza und Staswick 2008; Wang *et al.* 2007).

Methyljasmonat, obwohl flüchtig, oder freie Jasmonsäure wird auch als systemisches Signal in der Induktion der Pflanzenabwehr diskutiert, da es auch über das Gefäßsystem von Pflanzen transportiert werden kann (Lee *et al.* 2001; Thorpe *et al.* 2007).

1.2.3. Vergleich mit der Interaktion von Phytopathogenen und Pflanzen

Wenn man die Interaktion von herbivoren Insekten und Pflanzen mit Pflanze-Phytopathogen-Interaktionen vergleicht, fallen einige Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede auf.

So unterscheidet man zwischen sehr speziellen kompatiblen Interaktionen, wobei die zusammengehörigen Pflanzen und Phytopathogene durch stark aufeinander abgestimmte Gen-für-Gen-Interaktionen gekennzeichnet sind, und daher hier nicht besprochen werden, und einer *non-host disease resistance*, bei der allgemeinere Liganden-Rezeptor-Interaktionen die Regel sind (Jones und Dangl 2006). So sind für diese phytopathologischen Systeme sehr viel mehr Elizitoren bekannt als es für die Herbivorie der Fall ist. In Fall der Phytopathogene spricht man von PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) oder MAMPs (*microbe associated molecular patterns*, (Bittel und Robatzek 2007)). Strukturell handelt es sich sehr diverse Verbindungen, wobei für viele davon auch die zugehörigen Bindestellen (PRR, *pattern recognition receptor*) identifiziert wurden. So binden β -Glucane an ein extrazelluläres Bindeprotein (Fliegmann *et al.* 2004; Mithöfer *et al.* 2000) und flg22, ein Peptid des bakteriellen Flagellums, bindet an eine transmembrane LRR-RLK FLS2 (*leucine rich repeat – receptor like kinase*; Boller und Gomez, 2000, (Chinchilla *et al.* 2006)). Chitin aus der Zellwand von phytopathogenen Pilzen wird durch ein LysM-enthaltendes Rezeptor-ähnliches Protein, CEBiP, gebunden (Kaku *et al.* 2006).

Auch bei der Abwehr von Phytopathogenen sind MAP-Kinasen von Bedeutung (Pedley und Martin 2005) und regulieren Transkriptionsfaktoren der WRKY-Gruppe (Kim und Zhang 2004). Als dominierendes Phytohormon in der Pathogenabwehr gilt Salicylsäure. Salicylsäure-defiziente Mutanten sind anfälliger für Pathogene und sind nicht in der Lage, eine systemische

Abwehr (SAR, *systemic acquired resistance*) zu etablieren (Halim *et al.* 2006). Als systemisches Signal der SAR in Tabak gilt Methylsalicylat (Park *et al.* 2007), wobei bei *A. thaliana* auch Mutanten ohne die Fähigkeit, Methylsalicylat zu bilden, SAR entwickeln können (Attaran *et al.* 2009).

1.3. Die ersten Sekunden und Minuten

1.3.1. Die cytosolische Calciumkonzentration

In den ersten Sekunden und Minuten nachdem ein Insekt angefangen hat, an einer Pflanze zu fressen, reagiert diese bereits auf den Angriff. Mit zu den ersten messbaren Veränderungen in der pflanzlichen Zelle gehört der Anstieg der cytosolischen Calciumionenkonzentration. In ruhendem Gewebe ist die cytosolische Calciumionenkonzentration etwa 100 nM, während im Apoplast und der Vakuole mikro- bis millimolare Konzentrationen herrschen. Dieser Gradient dient als Triebfeder des Calciumeinstroms in das Cytosol und den Nucleus, wo Calcium als *second messenger* wirkt (Lecourieux *et al.* 2006). Abhängig von Zeit, Ort, Zelltyp, subzellulärer Lokalisation und Verlauf als einmaligem Anstieg oder Oszillation mit verschiedenen Frequenzen kann das scheinbar undifferenzierte Signal eine Reihe von verschiedenen Informationen transportieren (Evans *et al.* 2001). Diese Informationen werden von verschiedenen Calcium-bindenden Proteinen, zum Beispiel Calmodulin, verarbeitet und in eine Signalkaskade eingebracht, die letztlich zu veränderter Genexpression führt (Jonak *et al.* 2002; Sanders *et al.* 2002). Einen wichtigen Beitrag in der Kontrolle der cytosolischen Calciumkonzentration trägt der langsame vakuoläre (SV, *slow vacuolar*) Ionenkanal TCP1. Eine Punktmutation (D454N) führt zu einer veränderten Calciumtoleranz (Beyhl *et al.* 2009; Bonaventure *et al.* 2007; Bonaventure *et al.* 2007). Während der Wildtyp bei einer vakuolären Calciumkonzentration von 100 µM bereits keine Kaliumionen mehr leitet, führt die Mutation auch bei 1 mM Calciumionen weiterhin zu dem Transport von Kaliumionen. Dadurch wird die Kaliumhomöostase der Vakuole gestört und führt zu einem Phänotyp, der Ähnlichkeit mit den Folgen von Kaliummangel aufweist (auch auf Transkriptionsebene). Man vermutet, dass hier, wie bei Kaliummangel, ein Calcium-Protonen-Antiporter (CAX3), welcher für den Calciumimport in die Vakuole zuständig ist, induziert wird (Armengaud *et al.* 2004). Dies führt letztlich zu einer erhöhten Calciumionenkonzentration in der Vakuole (Beyhl *et al.* 2009; Bonaventure *et al.* 2007; Bonaventure *et al.* 2007). Diese erhöhte Calciumionenkonzentration erklärt letztlich, dass bei einem verwundungsinduziertem Calciumfluss von der Vakuole in das Cytosol die Oxilipin-Biosynthese ansteigt (Bonaventure *et al.* 2007).

1.3.2. Reaktive Sauerstoffspezies

Direkt im Anschluss an den Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration nach Herbivorie von *Spodoptera littoralis* an Limabohne wurde gezeigt, dass es zur Bildung von Wasserstoffperoxid H₂O₂ kommt (Maffei *et al.* 2006)). Die Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS, *reactive oxygen species*) in Folge von Herbivorie ist keine Seltenheit. Ähnliches wurde

auch bei Tomatenpflanzen und Süsskartoffelpflanzen nach Verwundung (Jih *et al.* 2003; Orozco-Cardenas und Ryan 1999) sowie bei *Medicago truncatula* und Sojabohnenpflanzen bei Herbivorie (Leitner *et al.* 2005) nachgewiesen. Dies könnte dazu dienen, dass es Phytopathogenen, die versuchen, über die Verwundung in die Pflanze einzudringen, nicht gelingt, die Pflanze sekundär zu infizieren. Daneben dient Wasserstoffperoxid auch als *second messenger* in Pflanzen und induziert Abwehrgene wie Proteinase-Inhibitoren und Polyphenoloxidasen (Orozco-Cardenas und Ryan 1999).

Bei der Interaktion mit Phytopathogenen werden diese ROS von NADPH-Oxidasen produziert (Torres und Dangl 2005), und auch bei Pflanzen führt das *gene-silencing* einer NADPH-Oxidase zu einer stark reduzierten ROS-Produktion nach Induktion mit Regurgitat oder Fettsäure-Aminosäurekonjugaten in *N. attenuata* (Wu und Baldwin 2009), Wu und Baldwin, noch nicht publiziert). Außerdem sind manche pflanzlichen NADPH-Oxidasen direkt durch Calciumionen aktivierbar (Sagi und Fluhr 2001) und auch Calcium-abhängige Protein-Kinasen (CDPKs, *calcium-dependent protein kinases*) aktivieren NADPH-Oxidasen durch Phosphorylierung und führen zur Produktion von ROS (Kobayashi *et al.* 2007).

1.3.3. Depolarisation der Plasmamembran

Als erste Reaktion auf Herbivorie ist eine Depolarisation der Plasmamembran zu messen (Maffei *et al.* 2004). Die Ursachen hierfür können vielfältig sein.

Zum einen kann durch ROS eine Membrandepolarisation ausgelöst werden (Maffei *et al.* 2006), da diese die Aktivität von Ionenkanälen verändern können (Overmyer *et al.* 2003).

Aber auch Regurgitat von Raupen kann diesen Effekt haben (Maffei *et al.* 2004). Dieses enthält ebenfalls Wasserstoffperoxid (Musser *et al.* 2006) welches zumindest zum Teil aus einer Glucose-Oxidase stammt (Eichenseer *et al.* 1999).

Fettsäure-Aminosäure-Konjugate können auch zu einer Depolarisation der Zellmembran führen (Maffei *et al.* 2004). Ob es sich dabei um eine Rezeptor-vermittelte Reaktion der Zelle handelt, wie die Hinweise auf eine Volicitin-Bindestelle vermuten lassen (Truitt und Pare 2004), oder ob andere Mechanismen ursächlich sind, ist unklar. Es ist bekannt, dass einige Elizitoren aus Phytopathogenen zu einer Depolarisation führen, wie beispielsweise das Peptid pep13 (Nürnberg *et al.* 1994) oder β -Glucane (Mithöfer *et al.* 2005).

Aber auch direkte Mechanismen wären denkbar, zum Beispiel durch Ionenkanalbildende Substanzen. So können verschiedene *pore forming toxins*, wie Melittin, Cecropin A, und Alamethicin, eine Depolarisation des Membranpotenzials in *Spiroplasma melliferum* auslösen (Beven und Wroblewski 1997).

1.4. Motivation dieser Studien

Die Membrandepolarisation ist eine der ersten messbaren Folgen von Herbivorie durch Raupen bei Pflanzen (Maffei *et al.* 2004). Zwar gibt es einige Erklärungsansätze, jedoch gibt es auch offene Fragen (Maffei *et al.* 2004; Maffei *et al.* 2006). Bislang war unklar, ob sich in dem Regurgitat von Raupen Stoffe befinden, die durch Wechselwirkung mit Membranlipiden die

Leitfähigkeit der Membran direkt und ohne mittelbare Wirkung von Membranproteinen erhöhen.

Um den Nachweis der Fähigkeit zur Ionenkanalbildung ohne Fremdproteine zu erbringen, wurde ein System gewählt, welches es gestattet, die Leitfähigkeit von Lipiddoppelschichten vor und nach Zugabe von zu testenden Substanzen zu messen. Als solches System wurde das BLM-System (BLM, *black lipid membrane*) gewählt. Es erlaubt im *voltage clamp*-Modus die Messung der Leitfähigkeit einer künstlichen, aus Lipiden aufgebauten planaren Membran bei einstellbarer, konstanter Spannung. Dies ist bei einem überschaubaren experimentellen und apparativen Aufwand möglich (Kagan und Sokolov 1994; Ti Tien und Ottova-Leitmannova 2000; Ti Tien und Ottova-Leitmannova 2003). Die BLM-Technik erlaubt, durch den Einsatz von käuflich erwerbbaaren Lipiden in einem Protein-freien Umfeld zu messen. Die freie Auswahl des Lipids gestattet es darüberhinaus, die künstliche Lipiddoppelschicht entsprechend den Lipiden der pflanzlichen Membran zu gestalten.

Aufgrund ihrer Sensibilität und der Fähigkeit, Einzelkanalmessungen durchzuführen, ist diese Technik auch geeignet, die Ionenkanal-bildenden Substanzen bezüglich ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften wie Leitfähigkeit, Spannungsabhängigkeit oder Ionenselektivität zu charakterisieren (Kagan und Sokolov 1994; Ti Tien und Ottova-Leitmannova 2000; Ti Tien und Ottova-Leitmannova 2003).

Durch diese Eigenschaften ist die BLM-Technik auch geeignet, um bei der sich an die Charakterisierung anschließende Aufreinigung der Ionenkanal-bildenden aus dem komplexen Stoffgemisch Regurgitat als Nachweis zu dienen und die Ionenkanal-bildende Aktivität zu verfolgen (Kagan und Sokolov 1994).

Die Larven von *S. littoralis* sind ein etabliertes System beim Studium von Herbivor-Pflanzen-Interaktionen, auch gerade im Kontext der frühen Signalwirkung bei Herbivorie und der Membrandepolarisation (Maffei *et al.* 2004; Maffei *et al.* 2006). Die Larven lassen sich saisonunabhängig im Labor züchten und bieten sich daher als tierisches Modell zur Gewinnung von Regurgitat an. Jedoch sollte auch die Frage beantwortet werden, ob die Erkenntnisse von *S. littoralis* auf andere *Lepidoptera*-Arten übertragbar sind.

Bislang ist bekannt, dass Pflanzen einerseits mit Depolarisation auf Herbivorie reagieren (Maffei *et al.* 2004) und dass andererseits in anderen Systemen Ionenkanal-bildende Substanzen wie Melittin, Cecropin A, und Alamethicin, eine Depolarisation des Membranpotenzials in *Spiroplasma melliferum* auslösen können (Beven und Wroblewski 1997). Es wurde bislang aber nicht gezeigt, dass Pflanzen auf Ionenkanal-bildende Substanzen ebenfalls mit einer Depolarisation der Plasmamembran antworten. Dieser Nachweis ist aber von immenser Bedeutung für die Argumentationskette, dass Ionenkanal-bildende Substanzen aus dem Regurgitat, neben anderen Substanzen (Maffei *et al.* 2004; Maffei *et al.* 2006), einen Beitrag zur beobachteten Membrandepolarisation bei Herbivorie leisten. Dann lässt sich auch die Frage angehen, ob denn diese Depolarisation durch Ionenkanal-bildende Substanzen nicht nur lokal wirken, sondern auch systemische Reaktionen auf elektrophysiologischer Ebene hervorrufen (Davies 2006), und somit als weiteres systemisches Signal neben den systemisch wirksamen Signalmolekülen Methyljasmonat oder Methylsalicylat dienen.

2. Material und Methoden

2.1. Tier und Pflanzenmaterial

2.1.1. Tiermaterial

Spodoptera littoralis und *Spodoptera exigua*:

Eier der beiden *Spodoptera*-Arten wurden von Bayer Cropscience (Monheim, Deutschland) erhalten und nach dem Schlüpfen auf einer künstlichen Diät bei 23-25 °C und in einem 16 / 8 h hell-dunkel Rhythmus gehalten.

Die künstliche Diät bestand aus 500 g gemahlener weißen Bohnen, welche über Nacht in 1,2 l Wasser eingeweicht wurden. Dazu wurden 9 g Vitamin C, 9 g Paraben, 4 g Formalin sowie 75 g Agar, der in 1 l Wasser aufgekocht wurde, gegeben ((Bergomaz und Boppré 1986) modifiziert).

Vor den Versuchen wurden Raupen für wenigstens einen Tag auf Limabohnen gesetzt um Regurgitat zu erhalten, welches der natürlichen Zusammensetzung entspricht.

Die Larven weiterer Arten, bzw. deren Regurgitat, wurden von anderen Arbeitsgruppen des MPI für Chemische Ökologie freundlicherweise zur Verfügung gestellt: Prof. Jonathan Gershenzon, Abteilung Biochemie (*Pieris rapae*), Prof. Ian Baldwin, Abteilung Molekulare Ökologie (*Manduca sexta*) und Prof. David Heckel, Abteilung Entomologie (*Pieris rapae*, *Pieris brassicae*, *Helicoverpa armigera*, *Trichoplusia ni*, *Plutella xylostella*).

2.1.2. Pflanzenmaterial

Phaseolus lunatus (Limabohne)

Limabohnen wurden in sterilisierter Erde bei 21 – 23 °C und 14 h Licht und 10 h Dunkelheit angezogen. Für Versuche wurden 10 – 14 Tage alte Pflanzen benutzt, welche über voll entwickelte Primärblätter verfügten.

Arabidopsis thaliana Col0 (Ackerschmalwand)

Pflanzen von *A. thaliana* Col0 wurden bei 21 °C unter Kurztagbedingungen, d. h. 8 h Licht und 16 h Dunkelheit, angezogen. Für die Präparation von Protoplasten wurden Pflanzen im Rosettenstadium kurz vor der Elongation (etwa 3-4 Wochen alt) benutzt.

Glycine max (Sojabohne), transgene Kalluskultur 6.6.12

Die hierfür verwendete Zellkulturlinie war in der Arbeitsgruppe vorhanden.

Die transgene Kalluskultur 6.6.12. trägt das stabil integrierte Plasmid *pGNAequ/neo2*. Dieses Plasmid trägt die Apoäquorin-cDNA unter der Kontrolle eines doppelten Blumenkohlmosaikvirus (CaMV, *cauliflower mosaic virus*)-35S-Promotors welcher mit dem *omega*-Element fusioniert war, das für die cytosolische Lokalisierung verantwortlich ist. Als

Selektionsmarker dient die cDNA der Neomycinphosphotransferase II unter Kontrolle des CaMV-35S-promotors. Die Sojabohnen-Zellsuspensionskultur wurde durch Partikelbombardement transformiert (Mithöfer und Ebel 1999).

Die Zellkultur wurde auf Agarplatten mit KN 10-Medium kultiviert. KN 10 Medium: 4,5 g MS-Salze (Murashige und Skoog, JAHR), 10 g Saccharose, 7 g Agar-Agar (Kobe), 100 µl α -Naphthylethylsäurestammlösung (10 mg/ml in Ethanol), 100 µl Kinetinstammlösung (2 mg/ml in 0,1 M Natronlauge), 100 µl Kinetinstammlösung (1 mg/ml) mit bidestilliertem Wasser zu einem Liter auffüllen, pH 5,8. Stammlösungen wurden steril filtriert und Aliquots bei -20 °C gelagert. Wenn nötig, wurden 20 mg/ml Kanamycin zugesetzt.

Die Kalli wurden bei 25 °C in Dauerlicht gehalten und etwa alle 4 Wochen auf frisches Medium umgesetzt.

Hordeum vulgare cv. Ingrid mlo5 (Sommergerste)

Die Gerste wurde bei 20 – 25 °C und 12 h Licht und 12 h Dunkelheit angezogen. Für die Versuche wurden Pflanzen mit 3 – 4 Blättern (ca. 40 – 50 cm Länge) benutzt.

2.2. Regurgitat

2.2.1. Sammeln von Regurgitat

Um das Regurgitat, den Vorderdarminhalt, von Lepidopterenlarven zu sammeln, wurden die Larven einige Millimeter hinter dem Kopf durch leichtes Pressen mit einer weichen Federstahlpinzette gereizt. Die Larven gaben daraufhin ihren Vorderdarminhalt ab. Dieser wurde mit Glaskapillaren (100 mm Länge, 1 mm Außendurchmesser, 0,1 mm Wandungsstärke, bezogen von Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland) aufgefangen. Vor dem Gebrauch in Experimenten wurde das Regurgitat in einer auf 4°C gekühlten Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit für 10 min zentrifugiert und der klare Überstand verwendet. Wenn nötig, wurde das Regurgitat bei -80°C bis zum Versuch gelagert.

Es wurden Larven mit einer Länge von etwa 2 bis 3,5 cm benutzt (etwa 2.-4. Larvenstadium), um deren Regurgitat zu sammeln.

2.2.2. Extraktion von Regurgitat mit Dichlormethan

Regurgitat wurde wie oben beschrieben gesammelt und vorbehandelt bevor es dreimal mit dem 4-fachen Volumen an Dichlormethan (DCM) extrahiert wurde. Dies geschah bei größeren Volumina, ab ca. 5 ml, in einem Scheidetrichter. Kleinere Mengen wurden in Greiner-Röhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) extrahiert und die DCM-Fraktion mit Hilfe einer Pasteurpipette vorsichtig entnommen. Die Lösungsmittelfractionen wurden vereinigt und unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockne eingeeengt. Um eine wassermischbare Lösung für Analysen in HPLC oder BLM-Assay zu erhalten, wurde der Rückstand in 50 – 100 µl Acetonitril aufgenommen.

2.3. Elektrophysiologische Methoden

2.3.1. Nomenklatur

Die Nomenklatur von Ionenkanal und Ionenpore ist in der Literatur nicht einheitlich. Entgegen dem allgemeinen Sprachgebrauch werden in der Regel in der Literatur alle Veränderungen der Membranleitfähigkeit für Ionen als *channel* oder *ion channel* bezeichnet, wenn diese durch gemessenen Stromfluss belegt werden. Der molekulare Hintergrund bleibt dabei unbeachtet. Dieser kann aus Proteinen, Peptiden, Naturstoffen, Detergenzien oder auch Lipiden bestehen. Führen diese Veränderungen der Membran zu einer Lyse von Zelle oder wird detailliert über die räumliche Struktur der Öffnung in der Membran gesprochen, so wird der Begriff *pore* häufiger verwendet (Antonov *et al.* 1980; Gordon und Haydon 1975; Hinnah *et al.* 1997; Kleinberg und Finkelstein 1984; Lockey und Ourth 1996; Schlieper und De Robertis 1977).

Da in dieser Arbeit ausschließlich elektrophysiologisch gemessene Leitfähigkeitsänderungen in Lipiddoppelschichten betrachtet werden, wird bei der Nomenklatur entsprechend des üblichen Gebrauchs in Literatur verfahren und von Ionenkanälen gesprochen.

2.3.2. Planare Lipiddoppelschichten (BLM, *black lipid membranes*)

Es wurden planare Lipiddoppelschichten, auch Bilayer-Technik genannt, als Nachweismethode von Ionenkanal- bzw. Ionenporen-formenden Substanzen in Regurgitat sowie zu deren elektrophysiologischer Charakterisierung genutzt. Während planare Lipiddoppelschichten die exakte Bezeichnung ist, hat sich die Bezeichnung BLM für *black lipid membranes* oder *bilayer lipid membranes* in der Literatur etabliert und wird im Folgenden als Synonym benutzt.

Messprinzip

Diese Technik basiert auf zwei mit Elektrolyt gefüllten Kammern, welche durch eine kleine kreisförmige Öffnung verbunden sind. In jeder der Kammern befindet sich eine Elektrode, die mit dem Messverstärker verbunden ist. In der kleinen Öffnung zwischen den Kammern wird eine künstliche Lipidmembran erzeugt (Abb. 2.1.A). In diesem Zustand kann der Messverstärker nur Leckströme messen (Abb. 2.1.B). Die Zugabe der zu testenden Substanzen erfolgte auf der *cis*-Seite der Membran. Auf der *cis*-Seite der Membran liegt die an der Spannungsquelle angelegte Spannung relativ zur Referenz an (hier definiert). Nach der Insertion der Substanz in die Membran und Öffnung von Poren in der Membran steigt die Leitfähigkeit und es wird ein erhöhter Stromfluss gemessen (Abb. 2.1.C und D).

Die Abbildung 2.1 zeigt ein vereinfachtes Schaltbild des Versuchsaufbaus. Die Spannungsquelle ermöglicht es definierte Spannungen oder Spannungsverläufe zwischen den beiden Seiten der BLM anzulegen. Änderungen im Stromfluss werden mit Hilfe des Messverstärkers gemessen und mittels eines A/D-Wandlers von einem Computer aufgezeichnet. Die Widerstände der Elektroden, Leitungen, Messverstärker etc. werden im Widerstand R_E zusammengefasst. Die Kapazität der BLM wird durch den Kondensator C_M dargestellt. Daneben besitzt die Membran noch einen eigenen Widerstand von etwa

$10^9 \Omega/\text{cm}^2$ (Ti Tien und Ottova-Leitmannova 2003), welcher jedoch um Größenordnungen größer ist als der Widerstand der Ionenpore selbst, sodass der Membranwiderstand im vereinfachten Schaltbild nicht berücksichtigt ist. Der Porenwiderstand ist durch R_p dargestellt. Das Öffnen von Poren kann man sich als Schließen eines Schalters S vorstellen, woraufhin ein Stromfluss ermöglicht wird. Entsprechend wird das Schließen einer Pore durch das Öffnen des Schalters versinnbildlicht, was den Stromfluss unterbricht.

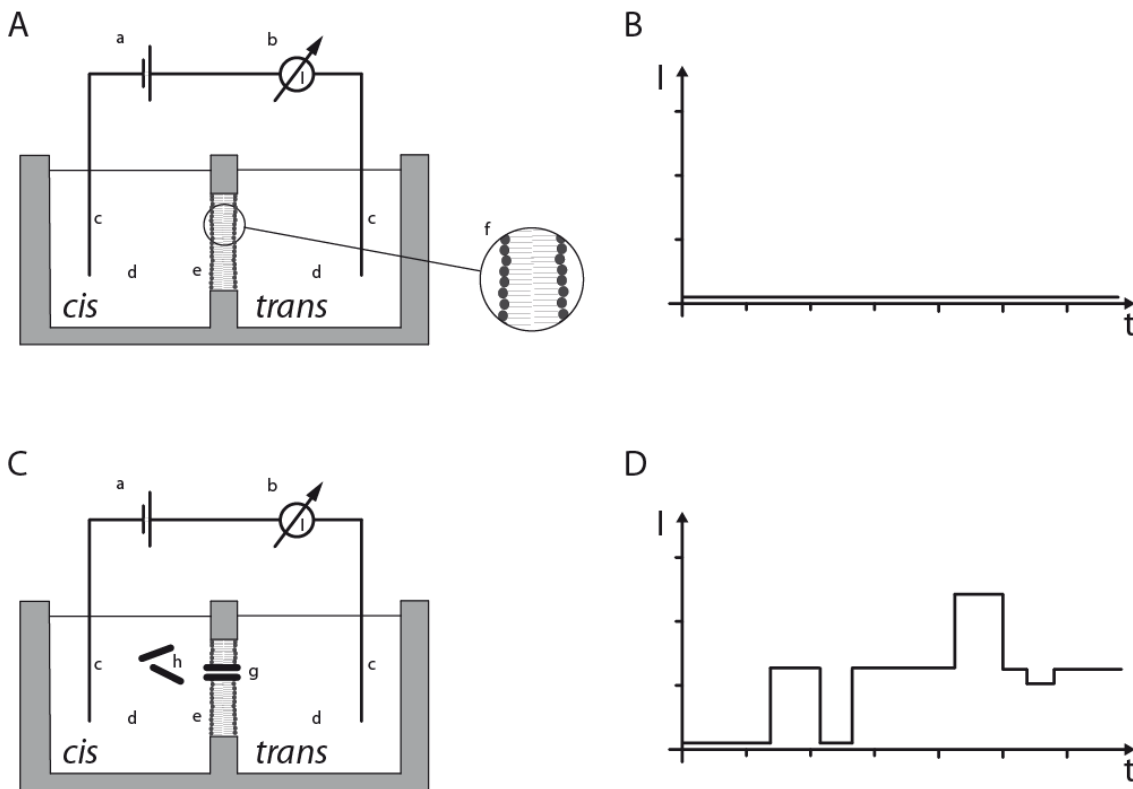


Abbildung 2.1. Schematische Darstellung des Messprinzips von BLM. **A:** Schema der Messanordnung ohne Ionenpore; **B:** Zu A gehörige Aufzeichnung der Stromflusses (I/t - Diagramm); **C:** Schema der Messanordnung mit geöffneter Ionenpore; **D:** Zu C gehörige Aufzeichnung des Stromflusses mit mehreren Öffnungs- und Schliessvorgängen von Ionenporen (I/t - Diagramm). Legende: a: Spannungsquelle; b: Messverstärker; c: Elektrode; d: Messkammer gefüllt mit Elektrolyt; e: Membran, Lipiddoppelschicht; f: Detail der Membran; g: Ionenpore in Membran; h: Gelöste Peptide.

Spannungsklammernmessungen (*voltage-clamp*)

Die Versuche wurden als Spannungsklammernmessungen durchgeführt. Das bedeutet, dass während des gesamten Versuches die Spannung über der BLM konstant gehalten wird. Dies wird erreicht indem der Messverstärker stets den Stromfluss über der Membran misst. Kommt es in Folge der Öffnung einer Pore zu einem erhöhten Stromfluss, so sinkt die Spannung. Der *voltage-clamp*-Verstärker legt nun einen entgegengesetzten Stromfluss an, wodurch die Spannung über der Membran konstant gehalten wird. Der Verstärker gibt nun eine diesem Strom proportionale Spannung aus, welche vom A/D-Wandler umgewandelt und im Computer gespeichert wird.

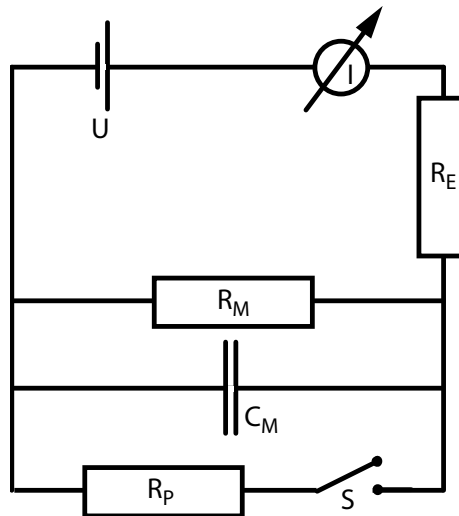


Abbildung 2.2.: Vereinfachtes Ersatzschaltbild. I: Messverstärker; U: Spannungsquelle; R_E : Widerstand von Elektroden, Leitungen, etc.; R_P : Widerstand der geöffneten Pore; S: Schalter, veranschaulicht Schließ- und Öffnungsvorgänge der Pore; C_M : Kondensator als Ersatz für die Membrankapazität; R_M : Membranwiderstand, $R_M \gg R_P$.

Aufbau des Messstandes

Der Messstand befindet sich in einem Faraday-Käfig und steht in einem mit Sand gefüllten Becken um mechanische und elektrische Störungen von außen zu vermeiden. In diesem Käfig befindet sich ein zweiter, kleinerer Faraday-Käfig, welcher sich komplett verschließen lässt. Darin befindet sich die eigentliche BLM-Vorrichtung mit einem Halter für die Glasküvette, in welche die Teflonküvette mit der Öffnung gebracht wird. Darin wird dann die BLM erzeugt. Außerdem befinden sich in dem kleinen Faradaykäfig die Halterungen für die Elektroden sowie ein Anschluss für einen Rührer.

Bei den Elektroden handelt es sich um Silber/Silberchlorid-Elektroden welche aus Silberdraht von 1 mm Stärke durch Chlorieren in 2 M Kaliumchloridlösung und 5 V für 1 h hergestellt wurden. Als Ionenbrücke und um Elektrodenpotenziale, welche aus den unterschiedlichen Ionenaktivitäten entstehen, zu vermeiden, wurden die Elektroden in Agar-gefüllte Pipettenspitzen gesteckt. Diese Pipettenspitzen waren mit 200 mM Kaliumchlorid und 10 mM Tris, pH 9,2, 1,5 % Agarose gefüllt. Dazu wurde der Puffer mit Agarose aufgeköcht und dieser dann mit einer 8-Kanal-Pipette in die Pipettenspitzen aufgezogen. Anschließend wurden die Spitzen der Pipettenspitzen in Eiswasser abgekühlt, bis die Öffnung verschlossen war (etwa 10 s) und dann bis zum völligen Erstarren der Agarose bei 4 °C gelagert (etwa 20 min).

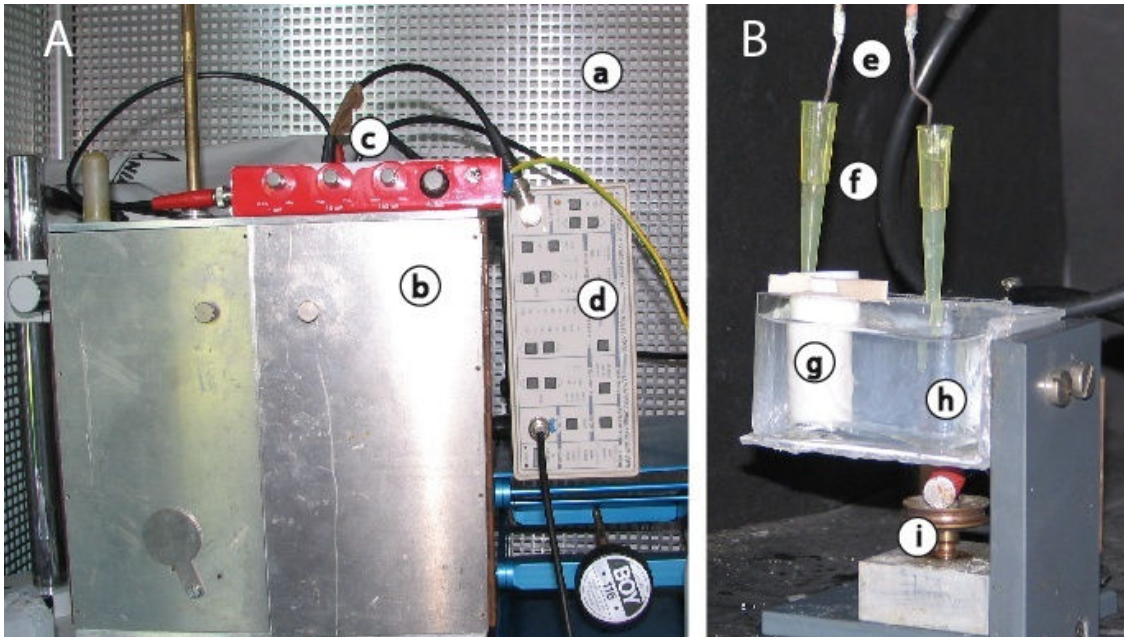


Abbildung 2.3: Aufbau des Messstandes: **A:** Geerdeter Faradaykäfig (a) mit: b: Kleinerer, geerdeter Faradaykäfig, enthält Messkammer; c: Referenzspannungsquelle; d: Messverstärker; **B:** Messzelle mit e: Silber/Silberchlorid-Elektroden; f: Ionenbrücke, 1,5 % Agarose in 200 mM Kaliumchlorid und 10 mM Tris, pH 9,2, in 200 μ l-Pipettenspitzen; g: Teflonküvette mit Öffnung für BLM, cis-Seite; h: Glasküvette, trans-Seite; i: Magnetrührer.

Außerhalb des kleineren Faraday-Käfig befinden sich die Referenzspannungsquelle (keine nähere Produktbezeichnung vorhanden) erlaubt Spannungen von 1 mV bis 1,11 V in 1 mV-Schritten sowie Rechteck- und Dreieckspannungen in diesem Spannungsbereich) und der Messverstärker SR 570 *low noise current preamplifier* (Stanford Research Systems, Sunnyvale, USA).

Durch den A/D-Wandler SCB-68 und die Computersteckkarte PCI-6024E (beide National Instruments, Austin, USA) wurden die Ströme digitalisiert und mit der Software Strathclyde Electrophysiology Software WinEDR V 2.4.9 und V 2.5.9 (John Dempster, University of Strathclyde, Glasgow, UK) aufgezeichnet und bearbeitet. Die aktuellen Versionen von WinEDR sind für diese Hardwarekombination nur bedingt geeignet und alte Aufnahmen lassen sich damit nicht oder nur eingeschränkt bearbeiten.

Präparation der Membran

Die BLM wurde in angepasster Form nach der von (Müller und Rudin 1969) beschriebenen Methode erzeugt. Dazu wurden die Glasküvette und die Teflonküvette (Abbildung 2.3) mit Puffer gefüllt, soweit nicht anders erwähnt 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. Es wurde darauf geachtet, dass der Flüssigkeitsspiegel in beiden Gefäßen gleich hoch war. In der Wandung der Teflonküvette war eine kreisförmige Öffnung mit entweder ca. 500 μ m oder ca. 800 μ m Durchmesser.

Als Lipid wurde 1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin Typ II (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) aus Sojabohne verwendet. Davon wurde stets eine frische Arbeitslösung mit 20 mg/ml Lipid in Heptan angefertigt.

Um die Membran in der Öffnung der Teflonküvette zu erzeugen, wurde in eine leicht gebogene Pipettenspitze 3 – 5 µl der Lipidlösung aufgezogen und die Lösung unterhalb der Öffnung vorsichtig ausgebracht. Die Bildung der BLM wurde über den Entwicklungsverlauf der Membrankapazität über den Computer verfolgt. Dazu wurde eine Dreiecksspannung mit 10 mV angelegt und über die Form und Amplitude des entstehenden rechteckigen Stromflusses konnte die Größe der Membran abgeschätzt werden, indem die Kapazität der Membran mit der eines definierten Kondensators verglichen wurde. Wenn nötig wurde bei Lipidüberschuss ein Teil des Lipids vorsichtig mit Hilfe von pipettierten Luftbläschen entfernt.

Standardexperiment

Das Standardexperiment wurde mit symmetrischen Pufferbedingungen (200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2) durchgeführt. Als Spannung wurden 30 mV angelegt und die Aufzeichnung erfolgte mit einer Verstärkung von 1 nA/V und einem Messbereich von ± 0,05 V. Als Kontrolle wurde der Stromfluss einer Membran für mindestens 10 min ohne Zugabe von Testsubstanzen aufgezeichnet. Nur wenn in diesem Zeitraum keine Zunahme der Leitfähigkeit oder Öffnungsvorgänge von Poren verzeichnet wurden, galt die Kontrollmessung als erfolgreich und es wurde Testsubstanz zugegeben. Im Normalfall wurden 1 – 5 µl Regurgitat je ml Puffer auf der *cis*-Seite der Membran eingesetzt. Die Lösung wurde mit einem Magnetrührer gemischt und anschließend der Stromfluss der Membran aufgezeichnet.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit der Software WinEDR (s.o.), welche auch die I/t-Verläufe aufzeichnete (Abb. 2.4.). Es wurde die Leitfähigkeit G von Hauptleitwert und Unterleitwerten (*substates*), sofern vorhanden, nach dem Ohmschen Gesetz (Gleichung 2.1) berechnet. Dazu wurde vom Stromfluss des Hauptleitwerts der Wert der Leckströme abgezogen und entsprechend in Gleichung 2.1. eingesetzt. U entsprach der angelegten Spannung.

$$R = \frac{U}{I}$$

Gleichung 2.1: Ohmsches Gesetz. R: Elektrischer Widerstand; U: Spannung; I: Stromstärke.

Die Leitfähigkeit entspricht dem reziproken Wert des Membranwiderstands (Gleichung 2.2).

$$G = \frac{1}{R}$$

Gleichung 2.2: Leitfähigkeit. G: Leitfähigkeit; R: Elektrischer Widerstand.

Desweiteren wurde ein Amplitudenhistogramm der Leitfähigkeiten angefertigt sowie Diagramme erstellt, welche die Zeitenverteilung des offenen und geschlossenen Zustands darstellen (*open- bzw closed-time* Histogramme).

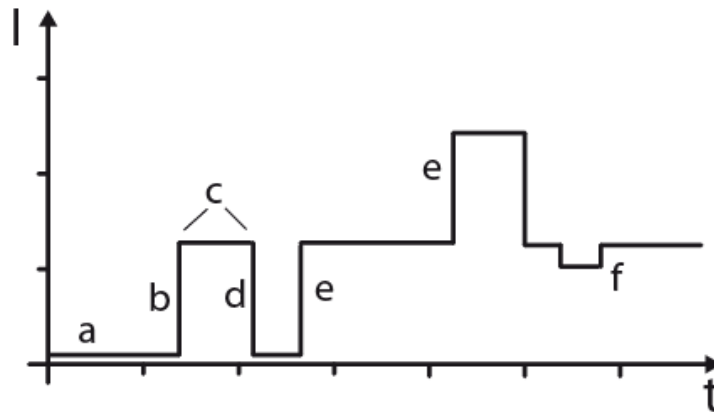


Abbildung 2.4.: Schema einer Aufzeichnung eines *voltage clamp*-Experiments. a: Leckströme; b: Öffnen eines Einzelkanals, Hauptleitwert; c: Öffnungszeit τ ; d: Schließvorgang eines Einzelkanals; e: aufeinander folgende Öffnung zweier Hauptleitwerte; f: Unterleitwert (*substate*).

Bestimmung der Selektivität

Um die Selektivität der Ionenporen zu bestimmen, wurden auf beiden Seiten der Membran verschiedene Pufferkonzentrationen angelegt. Das hat zur Folge, dass im Falle der unterschiedlichen Permeabilität für Kationen und Anionen, in diesem Fall Kalium- und Chloridionen, es selbst ohne angelegte Spannung zu einem Stromfluss kommt, wenn sich eine Pore öffnet. Sollte die Pore nicht selektiv sein, würde sich kein Strom messen lassen, da sich positive und negative Ladungen aufheben, welche in gleichem Maße vom Konzentrationsgefälle getrieben durch die Pore fließen. Bei selektiven Poren lässt sich ein Strom messen, da verschieden viele Anionen und Kationen durch die Poren strömen. Dies führt zu einer Ladungstrennung und einem Potenzial über der Membran. Um dieses aufzuheben und den Nettostromfluss durch die Pore zu unterbinden, kann ein Potenzial angelegt werden, das Umkehrpotenzial U_{rev} . Dieses wird benötigt, um die Ionenselektivität zu berechnen. Die Berechnung erfolgt aus der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (Gleichung 2.3)

$$U_{rev} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{p_K [K^+]_{trans} + p_{Cl} [Cl^-]_{cis}}{p_K [K^+]_{cis} + p_{Cl} [Cl^-]_{trans}}$$

Gleichung 2.3.: Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung, angepasst. U_{rev} : Umkehrpotenzial; R: allgemeine Gaskonstante; T: Absolute Temperatur; F: Faraday-Konstante; z: Anzahl der Ladungen der Ladungsträger, hier 1; p: Permeabilität der Ionen.

Das Verhältnis der Ionenpermeabilitäten folgt aus Gleichung 2.3:

$$\frac{p_K}{p_{Cl}} = \frac{[Cl^-]_{cis} - e^{\frac{U_{rev}zF}{RT}} [Cl^-]_{trans}}{e^{\frac{U_{rev}zF}{RT}} [K^+]_{cis} - [K^+]_{trans}}$$

Gleichung 2.4: Permeabilitätsverhältnis nach Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung, angepasst. Symbole siehe oben.

Durch Einsetzen der Werte für Standardbedingungen und Umwandeln der Potenz von e in die Zehnerpotenz erhält man eine vereinfachte Formel:

$$\frac{p_K}{p_{Cl}} = \frac{[Cl^-]_{cis} - 10^{\frac{U_{rev}}{59\text{mV}}} [Cl^-]_{trans}}{10^{\frac{U_{rev}}{59\text{mV}}} [K^+]_{cis} - [K^+]_{trans}}$$

Gleichung 2.5: Bestimmung des Permeabilitätsverhältnisses nach Goldman-Hodgkin-Katz. Symbole siehe oben, U_{rev} in mV.

Durch Einsetzen der verwendeten Pufferkonzentrationen und des Messwerts für das Umkehrpotenzial in Gleichung 2.5 erhält man das Verhältnis, in dem sich die Ionen durch die Pore bewegen.

2.3.3. Messung apoplastischer Spannungsänderungen

Diese Versuche wurden an der Universität Gießen bei Prof. Dr. H. Felle durchgeführt.

Die Messungen von apoplastischen Spannungsänderungen wurden an intakten Pflanzen durchgeführt. Die Pflanzen wurden entweder im Topf belassen (Limabohne) oder ausgetopft und in Wasser gestellt (Gerste).

Das Blatt, an dem der Stimulus gesetzt wurde, wurde im Fall von Gerste in eine Halterung gespannt, welche es erlaubte an drei verschiedenen Stellen zu reizen. Bei der Limabohne wurden vom Blatt an der Spitze etwa 2 cm abgeschnitten und dann in die Lösung mit der zu testenden Substanz gehalten.

Die Blätter, an denen die apoplastische Spannung abgegriffen wurde, wurden mit doppelseitigem Klebeband auf einem Träger fixiert, um Bewegungen während des Versuches zu verhindern. Das Blatt wurde mit einer Kaltlichtlampe (Leica KL-1500, Wetzlar, Deutschland) beleuchtet, um die Öffnung der Spaltöffnungen zu induzieren. Unter dem Mikroskop wurden die Elektroden mit Hilfe eines Mikromanipulators in die geöffneten Stomata eingeführt und im substomatären Raum plziert. Bei den Elektroden handelte es sich um Kapillarelektroden, gefüllt mit 0,5 M Kaliumchloridlösung. Die Spitze des Blattes zur Spannungsmessung wurde abgeschnitten und das Blatt in ein Bad mit 10 mM Kaliumchlorid, 1 mM Calciumchlorid und 1 mM Tris/MES-Puffer, pH 5, gebracht. In diesem Bad wurde ebenfalls die Referenzelektrode plziert (Felle *et al.* 2000; Felle und Zimmermann 2007).

Sobald die Elektrode im substomatären Raum in Kontakt mit der apoplastischen Flüssigkeit war, wurde der Stromkreis geschlossen. Der Betrag der gemessenen Spannungen hängt vom

Abstand der Messelektrode zur Referenzelektrode und dem Widerstand des apoplastischen Netzwerks ab. Aus diesem Grund werden für apoplastische Spannungsänderungen keine Absolutwerte angegeben, sondern nur relative Spannungsänderungen und deren Polarität. Im Gegensatz zu intrazellulären Messungen, bei denen eine Spannungsänderung zum weniger Negativen hin als Depolarisation definiert ist, gilt bei extrazellulären Messungen in der apoplastischen Flüssigkeit das Gegenteil. Um nicht für den selben physiologischen Vorgang zwei entgegengesetzt lautende Bezeichnungen zu benutzen, werden extrazelluläre Hyperpolarisationen hier ebenfalls als Depolarisationen bezeichnet, da dieses den Vorgängen im Zellinneren gemäß obiger Definition entspricht.

Die Spannungsänderungen wurden mit einem Verstärker WPI FD223 (World Precision Instruments, Sarasota, USA) gemessen und mit einem Schreiber (Linseis L2200, Selb, Deutschland) aufgezeichnet.

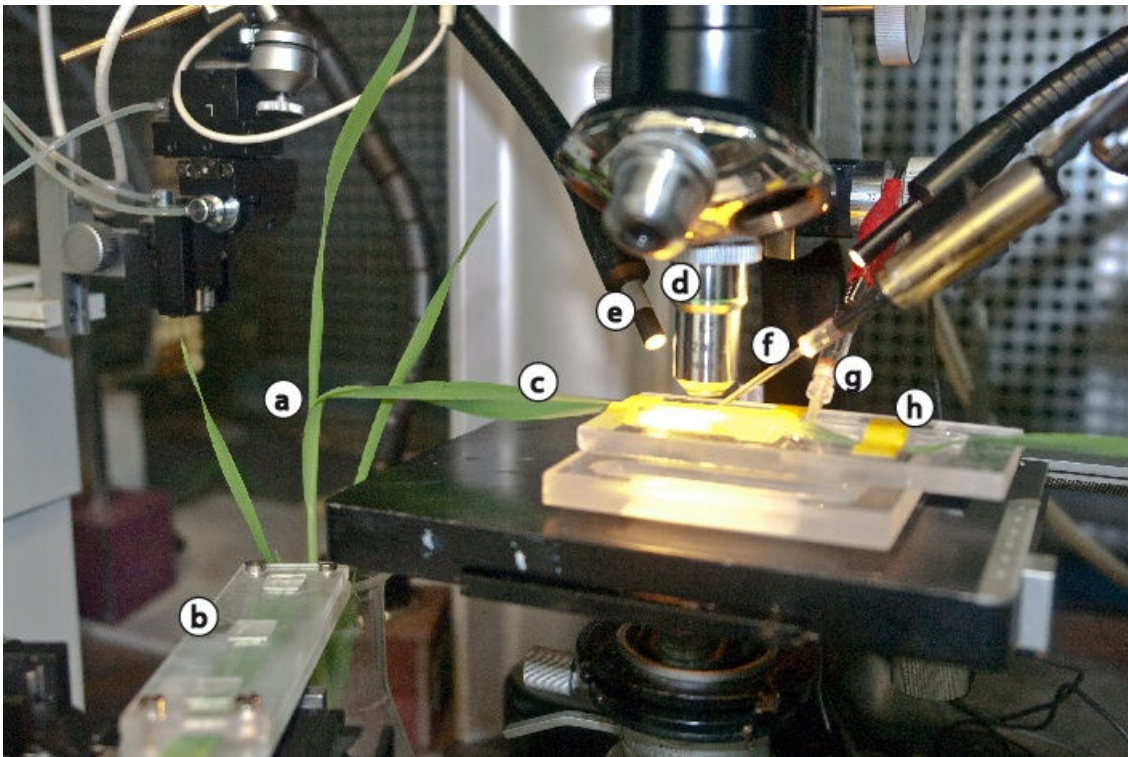


Abbildung 2.5.: Apparatur zur Messung apoplastischer Spannungsänderungen: a: Versuchspflanze, hier Gerste; b: Halterung für das Blatt an dem der Stimulus gesetzt wurde; c: Blatt an dem die apoplastischen Spannungsänderungen abgegriffen wurden; d: Mikroskop; e: Kaltlichtlampe; f: Messelektrode; g: Referenzelektrode; h: Bad mit Kaliumchloridpuffer.

Anfertigen der Elektroden

Die Elektroden wurden aus Borosilikatglasröhren mit 1,5 mm Außendurchmesser hergestellt. Die Kapillaren wurden auf einem zweistufigem Kapillarzyehler List L/P-3P-A (Darmstadt, Deutschland) gezogen und vor der Benutzung mit 0,5 M Kaliumchloridlösung befüllt (Felle *et al.* 2000; Felle und Zimmermann 2007).

2.3.4. Patch-clamp-Messungen

Prinzip

Beim *Patch-clamp*-Verfahren werden ganze Zellen, bei Pflanzen Protoplasten, oder Organellen, zum Beispiel Vakuolen, verwendet um Stromflüsse über deren natürlichen Membranen zu messen. Dies kann geschehen, indem mit den ganzen Zellen gearbeitet wird oder mit der Kapillarelektrode Stücke (*patches*) aus der Membran gerissen werden.

Wird mit ganzen Zellen gearbeitet, unterscheidet man zwischen *cell-attached*-Messungen und *whole-cell*-Messungen. Bei *cell-attached*-Messungen schließt die Membran mit der Elektrode dicht ab, jedoch besteht kein Kontakt zwischen Cytosol und Elektrodenflüssigkeit. Der Stromkreis zur Referenzelektrode wird hierbei über zwei Membranen geschlossen. Durch Anlegen eines Unterdrucks innerhalb der Kapillarelektrode kann man die Membran lokal brechen und man erhält die *whole-cell*-Konfiguration. In dieser Anordnung wird der Stromfluss nur über eine Membran gemessen, jedoch wie bei der *cell-attached*-Konfiguration werden sämtliche Kanalöffnungen der Zelle aufgezeichnet. Zieht man die Kapillarelektrode zurück, so erhält man *patches*, im Falle der *cell-attached*-Konfiguration *inside-out-patches*, bei *whole-cell*-Konfiguration werden *outside-out patches* erhalten (Abbildung 2.6.).

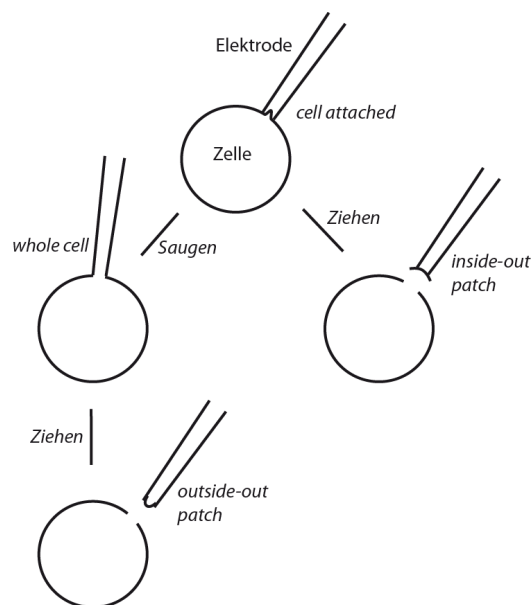


Abbildung 2.6.: Verschiedene patch-clamp-Methoden.

Versuchsdurchführung

Diese Versuche wurden am MPI für Chemische Ökologie in der Abteilung von Prof. Bill Hansson mit Unterstützung von PD Dr. D. Wicher durchgeführt.

Für die *Patch-clamp*-Versuche wurden die Ionenströme von *A. thaliana*-Protoplasten (Präparation siehe unten) in der *whole-cell*-Konfiguration gemessen. Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur (~ 23 °C). Als Verstärker diente ein EPC-9 *patch-clamp*-Verstärker (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland) und die Daten wurden mit der Software

PatchMaster (ebenfalls HEKA Elektronik) aufgezeichnet. Der serielle Widerstand und Leckstrom wurden entsprechend den Umständen kompensiert. Die *patch-clamp*-Pipetten wurden aus Borosilikatglaskapillaren gezogen und hitzepoliert. Während der Versuche stellte sich heraus, dass kleinere Pipettendurchmesser besser geeignet waren. Daher wurden Pipetten mit einem Widerstand von 5 – 10 M Ω benutzt.

Die Badlösung bestand aus folgendem Puffer: 150 mM Kaliumchlorid, 10 mM Calciumchlorid, 2 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Tris/MES pH 5,5.

Der Pipettenpuffer enthielt: 150 mM Kaliumchlorid, 10 mM Calciumchlorid, 5 mM EGTA, 2 mM Magnesiumchlorid, 2 mM Mg-ATP, 10 mM Tris/MES pH 7,2.

Präparation von Protoplasten

Die Blätter von *A. thaliana* im Rosettenstadium wurden vorsichtig mit einem Skalpell in kleine Stücke von 2-3 mm Kantenlänge geschnitten. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Stückchen in 500 mM Mannitlösung gelagert.

Anschließend wurden die Blattstückchen in Enzympuffer überführt und bei 37 °C für 2 – 3 h unter sehr leichtem Schütteln inkubiert. Enzympuffer: 400 mM Mannit, 8 mM Calciumchlorid, 5 mM MES, pH 5,6, 10 mg/ml Onozuka R-10-Cellulase (Serva) und 2,5 mg/ml Maceroenzym R-10 (Serva).

Die Protoplastensuspension wurde durch ein feinmaschiges Nylonnetz filtriert, um Blattreste zu entfernen. Anschließend wurde mit dem halben Volumen der Enzymlösung mit 200 mM Calciumchloridlösung gewaschen und die Suspensionen vereinigt.

Die Reinigung der Protoplasten erfolgte durch Zentrifugation bei 40 x *g* für 5 min und der vorsichtigen Abnahme des Überstandes mit einer Plastikpasteurpipette. Der Niederschlag aus Protoplasten wurde vorsichtig mit 10 ml 500 mM Mannitlösung resuspendiert und mit 5 ml 200 mM Calciumchloridlösung gemischt. Wichtig: Stets zuerst Mannitlösung und dann erst Calciumchloridlösung zugeben, da sonst die Protoplasten platzen.

Dieser Schritt wurde wiederholt, jedoch mit 5 ml Mannitlösung und 10 ml Calciumchloridlösung. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Protoplasten in W5-Puffer resuspendiert. W5-Puffer: 154 mM Natriumchlorid, 125 mM Calciumchlorid, 5 mM Kaliumchlorid, 5 mM Glucose, 1,5 mM MES pH 5,6 (Abel und Theologis 1998).

Um die Protoplasten auf Intaktheit zu untersuchen wurde eine sogenannte Lebendfärbung mit Fluoresceindiacetat FDA durchgeführt.

Dazu wurde aus einer 5 mg/ml (FDA) in Aceton Stammlösung eine Arbeitslösung mit 1 μ l Stammlösung auf 10 ml W5 Puffer hergestellt. Es wurde ein Tropfen Protoplastensuspension auf einen Objektträger gegeben und mit einem Tropfen FDA-Arbeitslösung versetzt. Nach 10 min Inkubation wurde unter einem Fluoreszenzmikroskop die Fluoreszenz betrachtet. Chlorophyll-Autofluoreszenz: Anregung bei 546 nm (Bandpass), Emission wurde bei 590 nm (*long pass* Filter) aufgenommen. Fluorescein-Signal: Anregung 450- 490 nm, Emisissionsfilter 515-565 nm.

2.4. Chromatographische Methoden

2.4.1. Schnelle Proteinflüssigchromatographie (FPLC)

Aufreinigungen von Regurgitat mittels FPLC wurden auf einem SMART-System (Pharmacia Biotech, München (GE Healthcare)) bestehend aus μ Separation Unit, μ Precision Pump und μ Peak Monitor durchgeführt.

Als Säule wurde eine Superdex Peptide Gelfiltrationssäule desselben Herstellers verwendet (Länge: 30 cm, Volumen 2,4 ml). Fraktionen von 400 μ l Volumen wurden mit dem integrierten Fraktionssammler des SMART-Systems gesammelt.

Software: SMART Manager 1.51 unter dem Betriebssystem OS/2 Warp Version 4.

2.4.2. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und Massenspektrometrie (LC/MS)

Aufreinigungen von Regurgitat mittels HPLC wurden mit einer Agilent Series 1100 durchgeführt. Als Säule dienten, sofern nicht anders erwähnt, RP-18-Säulen der Marke Alltech GromSil ODS-7 verwendet. Betreffende Säulen hatten die Dimension 125 mm x 2 mm, die Flussrate betrug 200 μ L/min. Laufmittel waren bidestilliertes Wasser und Acetonitril in veränderlichen Anteilen, jeweils mit 0,5 % Essigsäure versetzt. Die Chromatogramme wurden mit einem Diodenarraydetektor (DAD) aufgezeichnet (sowohl einzelne Wellenlängen als auch Spektren). Daneben wurden auch Chromatogramme mittels Massenspektrometrie aufgezeichnet. Details siehe unten.

Chromatographieprogramm:

Zeit/min	% Acetonitril, 0,5 % Essigsäure
0 – 5	0
5 – 11	0 - 82
11 – 36	82 - 92
36 – 40	92 - 100
40 – 45	100
45 – 50	100 - 0
50 – 55	0

Als Fraktionensammler diente ein Abimed 206 Fraction Collector von Gilson, Villiers le Bel, Frankreich.

Software: HP Chemstations for LC 3D Rev. A. 10.02 [1757].

Massenspektrometrie (MS)

Massenspektren aus HPLC oder Direkteinspritzung wurden mit den Geräten LCQ (Finnigan MAT, San Jose, USA) und LTQ (Thermo Finnigan, San Jose, USA) aufgezeichnet. Ionenquellen waren in der Regel eine ESI-Quelle am LCQ und eine APCI-Quelle am LTQ.

Software: Finnigan Navigator 1.2 (LCQ), Xcalibur 2.0 SR2 (LTQ).

2.4.3. Gaschromatographie / Massenspektrometrie (GC/MS)

Duftproben wurden mittels des GC/MS Finnigan Trace GC Series 2000 und Trace MS (Thermoquest Finnigan, San Jose, USA) gemessen. Die Ionisationsenergie des MS betrug 70 eV, die Detektorspannung 350 V. Als Säule wurde eine GC-Säule von Alltech EC-5 (15 m x 0,25 µm; Alltech, Unterhaching, Deutschland) verwendet. Die Flussrate des Trägergases betrug konstant 1,5 ml min⁻¹. Proben von 1 µl wurden von einem automatischen Probennehmer A200S (CTC-Analytics CE Instruments, Zwingen, Schweiz) in den Gaschromatographen injiziert. Der Split war 1:10, und der Injektor hatte eine Temperatur von 220 °C. Das Programm für die Messung von Duftproben war wie folgt: 2 min bei 40 °C, auf 200 °C mit 10 °C min⁻¹, auf 280 °C mit 30 °C min⁻¹ und dann für 1 min bei 280 °C.

Die Substanzen wurden anhand ihrer Retentionszeit und dem Vergleich der Massenspektren mit Massenspektren von Referenzsubstanzen identifiziert.

Software: Finnigan Xcalibur 1.1.

2.4.4. ZipTip_{C18} Pipettenvorsatzsäulen

Bei ZipTips (Millipore, Billerica, USA) handelt es sich um Pipettenspitzen mit integrierter C₁₈-Säule, welche durch Auf- und Abpipettieren von zuerst Probelösung und anschließend Elutionslösung das Abtrennen von Stoffen aus der Lösung erlauben.

Die ZipTip_{C18} wurden entsprechend der Herstellervorschrift verwendet.

Zum Äquilibrieren wurde zweimal 10 µl Acetonitril auf- und abpipettiert und anschließend zweimal 10 µl bidestilliertem Wasser mit 0,1% Trifluoressigsäure. Um Proteine oder Peptide an die Säule zu binden, wurden 10 µl der Probe 7- bis 10-mal auf- und abpipettiert, anschließend zweimal 10 µl bidestilliertes Wasser mit 0,1% Trifluoressigsäure.

Die Proben wurden mit 5 µl 50 % Acetonitril, 0,1 % Trifluoressigsäure in bidestilliertem Wasser eluiert und dem BLM-Test unterzogen.

2.5. Sammlung von Duft im geschlossenen Luftkreislauf (*closed-loop-stripping*)

Um Substanzen auf ihre Fähigkeit zur Induktion der Duftproduktion hin zu untersuchen, wurde ein Biotest durchgeführt. Dazu wurden Limabohnen im Zweiblattstadium knapp oberhalb der Erde abgeschnitten und in ein Gläschen mit 10 ml Leitungswasser gestellt. Dieses wurde in einen Exsikkator mit 1,5 l Volumen gestellt. Die zu testenden Substanzen wurden entweder in das Gläschen gegeben oder mit einer Pipette behutsam auf die Blätter

aufgebracht, nachdem diese vorher mit einem Rändelrad vorsichtig verletzt wurden. Die Exsikkatoren wurden mit Teflonstopfen verschlossen. Durch Löcher in den Teflonstopfen wurden die Luftzu- und ableitung der Pumpen (Fürgut, Aitrach, Deutschland) gesteckt. In den Luftzuleitungen der Pumpen befanden sich Aktivkohlefilter (CLSA-Filter, Le Ruisseau de Montbrun, Daumazan sur Arize, Frankreich) mit 1,5 mg Aktivkohle. Die Duftstoffe wurden im Zeitraum von 24 h durch permanente Luftumwälzung gesammelt. Anschließend wurden die gesammelten Duftstoffe von den Filtern mit 2 x 20 µl Dichlormethan mit 200 µg ml⁻¹ 1-Bromdekan als interner Standard desorbiert und mittels GC/MS (Donath und Boland 1995).

2.6. Messung von intrazellulären Calciumionen durch Äquorin-Biolumineszenz

Bei der Äquorintechnik werden Änderungen der Calciumkonzentration im Cytosol gemessen. Dazu wurden transgene Zelllinien benötigt, welche das Gen für Apoäquorin aus *Aequorea victoria* exprimieren. Diese Zellen werden mit Coelenterazin inkubiert und dadurch Äquorin rekonstituiert. In Anwesenheit von Calciumionen wird Licht der Wellenlänge 470 nm emittiert, das im Luminometer gemessen wird. Die emittierte Lichtmenge ist proportional zur Calciumionenkonzentration.

Für die hier durchgeführten Messungen wurde die transgene Sojazelllinie 6.6.12 verwendet, welche im Labor vorhanden war. Dafür wurde ca. 1 cm³ Kalluskultur vorsichtig mit einem Spatel zerkleinert und mindestens über Nacht mit 5 µM Coelenterazin (Biosynth AG, Staad, Schweiz) unter leichtem Schütteln im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze 100 µl der Zellsuspension in die Küvette eines Luminometers (Bio-Orbit 1250, Turku, Finnland, bzw. Luminoscan TL, Labsystems, jetzt bei Thermo Scientific, Dreieich, Germany) gefüllt und in diesem für 1 min inkubiert. Dann wurden 5 µl der zu testenden Lösung zugegeben und gemischt (Dauer etwa 5 – 7 s). Die Menge an Äquorin war nicht limitierend für die Reaktion auf die Testlösung, der maximale Äquorinverbrauch betrug weniger als 10 % der Gesamtmenge. Am Ende jedes Versuches, nach 8 min, wurde die verbleibende Äquorinmenge vollständig entladen durch die Zugabe von 100 µl einer Lösung von 100 mM Calciumchlorid in 10 % Ethanol (Endkonzentration in der Küvette war 50 mM Calciumchlorid und 5 % Ethanol). Dies war nötig um die Gesamtmenge an Äquorin abzuschätzen um daraus die Rate des Äquorinverbrauchs zu bestimmen, welche es erlaubt die cytosolische Calciumkonzentration zu berechnen (Mithöfer und Mazars 2002).

2.7. Ultrafiltration

Um eine grobe Abschätzung der Molekülgröße der Ionenporen-bildenden Substanzen zu erhalten, wurde Regurgitat durch Ultrafiltration größenfraktioniert. Für die Ultrafiltration von Regurgitat wurden Viva-Spin-Zentrifugationssäulen von Sartorius (Göttingen, Deutschland) verwendet. Es wurden 100 µl Regurgitat in die obere Kammer gefüllt und entsprechend den Herstellerangaben bei 4 °C in einer Tischzentrifuge mit 15.000 x g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss im BLM-Test untersucht.

2.8. Thermographie

Um durch Herbivorie induzierte Veränderungen der Blattoberflächentemperatur zu untersuchen, wurden Versuche mit einer digitalen Infrarotkamera des Typs VARIOSCAN 3201 ST (Jenoptik Laser, Jena, Deutschland) durchgeführt (Abbildung 2.7). Die Kamera ist in der Lage Wellenlängen von 8 bis 12 μm aufzuzeichnen, was dem mittleren Infrarotbereich entspricht. Wärmestrahlung in diesem Wellenlängenbereich wird von Körpern mit Temperaturen von $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $1200\text{ }^{\circ}\text{C}$ emittiert. Temperaturdifferenzen können mit einer Empfindlichkeit von $0,03\text{ K}$ unterschieden werden. Es können Bilder mit einer Auflösung von 360×240 Bildpunkten in einem zeitlichen Abstand von mindestens einer Sekunde aufgenommen werden.

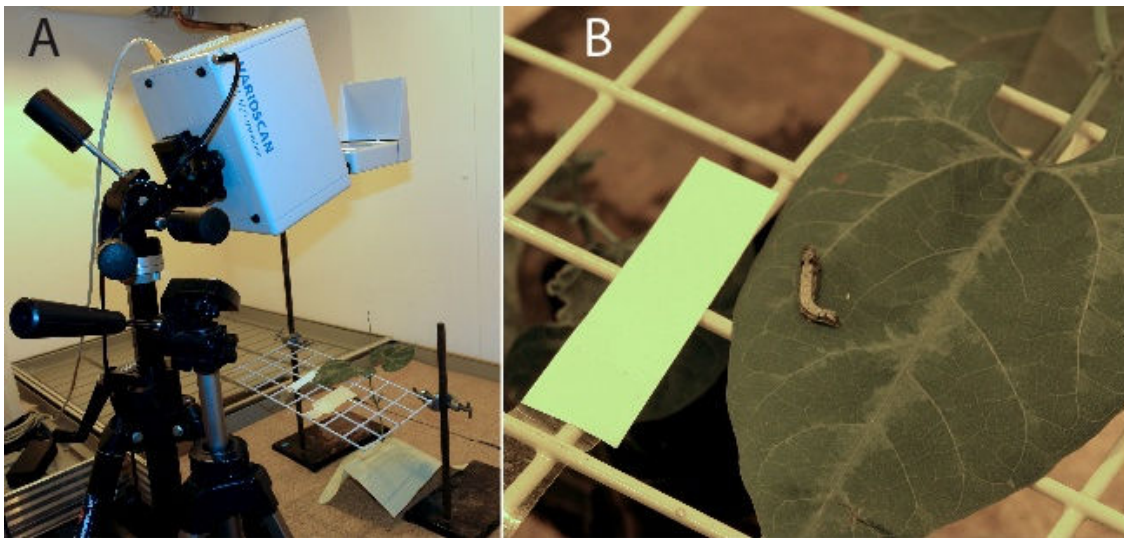


Abbildung 2.7.: Versuchsaufbau Thermographie: A: Wärmebildkamera über der Versuchspflanze. **B:** Ein Blatt einer Limabohnenpflanze wurde auf ein Gitter gelegt um es parallel zur Bildebene zu halten. Zu sehen ist ebenfalls eine *Spodoptera littoralis*-Larve und ein Stück Papier, welches als Temperaturreferenz diente.

Um die aufgenommenen digitalen Bilder auszuwerten, wurde die Software IRBIS plus, Version 2.2, benutzt. Diese Software erlaubt es innerhalb des Bildes Schnitte und Flächen in Form von Kreisen, Rechtecken und Polygonen zu markieren und die Temperaturwerte (Extremwerte und Durchschnittstemperatur der Fläche) innerhalb dieser Flächen in tabellarischer Form auszugeben. Ebenso lassen sich diese Werte in Zeitreihen von Bildern ermitteln und zusammenführen. Die exportierten Wertetabellen wurden mit Microsoft Excel weiterbearbeitet.

Die Pflanzen und Tiere für den Versuch wurden während des gesamten Versuchszeitraumes in einer Klimakammer bei einer Temperatur von $26,5 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Tag) und $17,5 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Nacht) gelagert, in der auch die Experimente durchgeführt wurden. Der Tag/Nacht-Rhythmus war 12h/12h, die relative Luftfeuchte betrug 45 bis 56 %. Die Versuchblätter der Pflanzen wurden während der Versuche in einem Abstand von etwa 30 – 40 cm zur Linse der Infrarotkamera platziert und durch ein beschichtetes Metallgitter mit Löchern von 4 cm Kantenlänge parallel zur Bildebene gehalten. Als Temperaturreferenzpunkte dienten weiße und grüne Zellstoffpapiere.

Diese Versuche wurden an der Universität Bonn mit Hilfe von PD Dr. E. C. Oerke in den Räumen seiner Arbeitsgruppe durchgeführt.

2.9. Chemikalien

Sämtliche Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Deutschland) bzw. deren Tochterunternehmen Fluka oder Riedel-de-Haen bezogen. Wenn möglich wurde die Qualitätsstufe „p.a.“ oder besser benutzt.

2.10. Software

Neben der oben bereits erwähnten Software zu den genannten Geräten wurden alle Teile der Arbeit mit der Software Microsoft Office 2003 und 2007 (Excel, Word, Outlook) angefertigt. Literaturzitate und -anhang wurde mit Hilfe von Endnote 9 erzeugt und eingefügt. Illustrationen und Abbildungen wurden mit Adobe Illustrator, Adobe Photoshop und Corel Paint Shop Pro X erzeugt bzw. bearbeitet. Die Bildbearbeitungsprogramme wurden zum Zuschneiden von Bildern benutzt. Korrekturen von Kontrast oder Weissabgleich wurden für alle verglichenen Bilder gleichermaßen und auf die gesamte Bildfläche angewandt.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung von Ionenkanal-bildenden Substanzen aus Regurgitat

3.1.1. Detaillierte Betrachtung der Ionenkanäle aus Regurgitat von *Spodoptera spec. (Noctuidae)*

Regurgitat ist der Vorderdarminhalt von Insektenlarven, in diesem Fall von Raupen. Da *Spodoptera exigua* und *Spodoptera littoralis* als Modellorganismen für polyphage Lepidopterenlarven im Kontext der Herbivorie dienen, wurden die meisten Untersuchungen am Oralsekret dieser beiden Arten durchgeführt. Regurgitat ist ein komplexes Gemisch aus Stoffen verschiedenen Ursprungs. Es enthält Proteine und Naturstoffe aus der Larve selbst und aus der Pflanze sowie deren Abbauprodukte. Daneben enthält es Bakterien und potenziell von diesen sezernierte Stoffe (Spiteller 2004).

In diesem ersten Teil der Ergebnisse wird die elektrophysiologische Charakterisierung dieses Gemisches mittels *black lipid membrane* assay (BLM-Assay) dargestellt. Um ein komplettes Bild der gemessenen Kanäle darzustellen, werden auch seltene Ereignisse gezeigt, deren Ursache in der Komplexität des Regurgitats begründet ist.

Einzelkanalmessungen mit Regurgitat von *Spodoptera exigua*

Wird Regurgitat, in diesem Fall von Larven von *S. exigua*, zu planaren Lipiddoppelschichten gegeben, so beobachtet man bei *voltage clamp*-Messungen das Öffnen von Einzelkanälen.

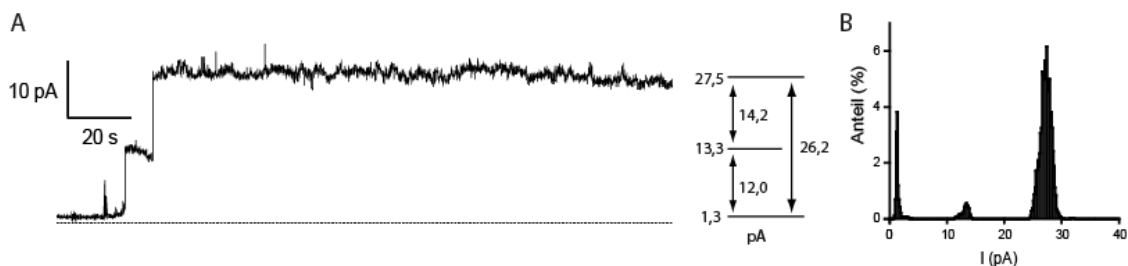


Abbildung 3.1: Einzelkanalmessung mit Regurgitat von *S. exigua*. **A:** Aufnahme, +30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. Zwei sequentielle Öffnungsereignisse von Einzelkanälen. Leitfähigkeitsniveaus abgeleitet aus dem Amplitudenhistogramm. **B:** Amplitudenhistogramm.

Die Abbildung 3.1.A zeigt beispielhaft das aufeinanderfolgende Öffnen zweier Einzelkanäle. Nach dem Öffnen des ersten Kanals nimmt der Stromfluss über die Membran um 12 pA zu. Aus dem Amplitudenhistogramm (Abbildung 3.1) kann man die Leitwerte exakt entnehmen.

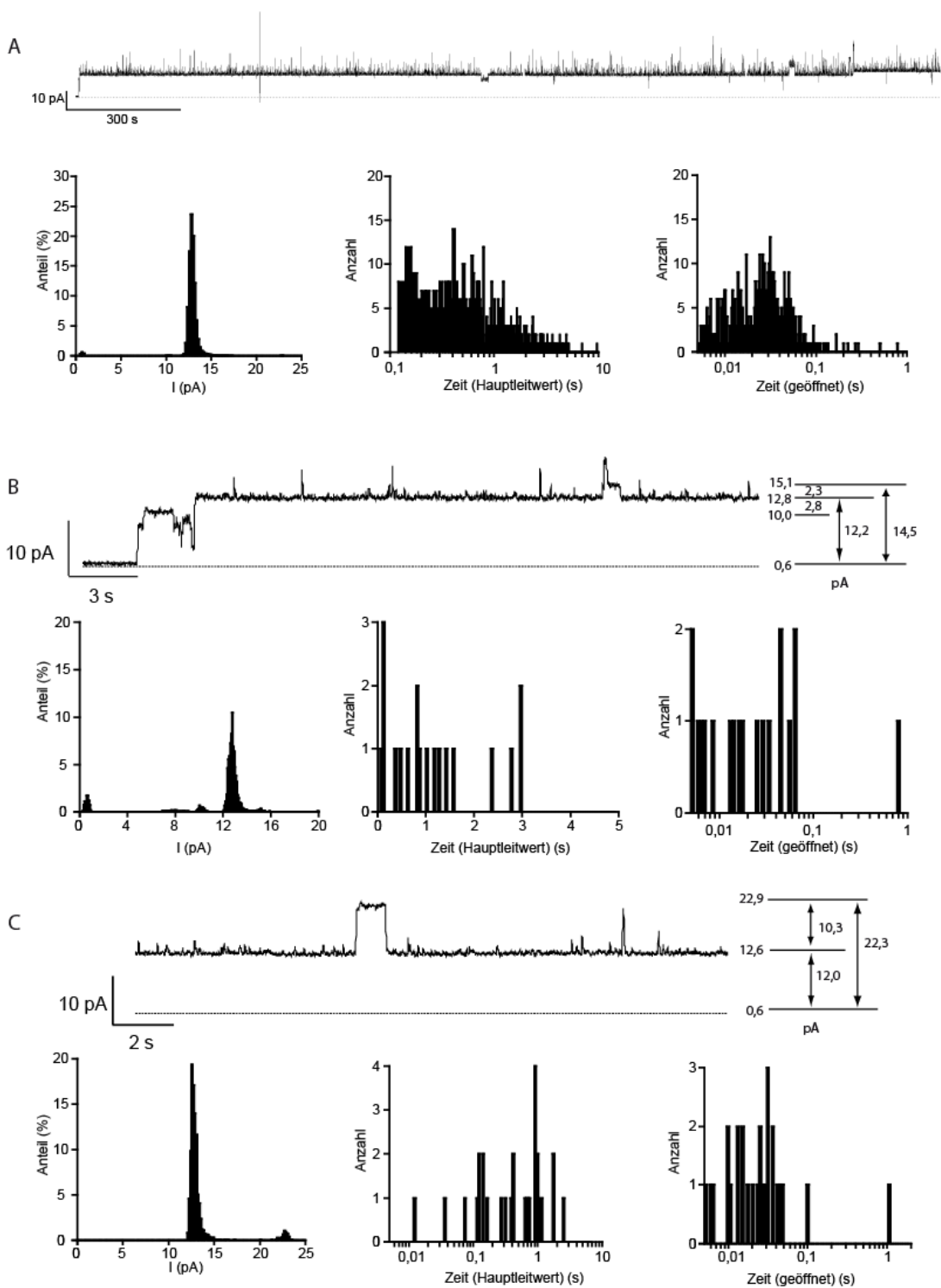


Abbildung 3.2: Langzeitaufnahme eines Einzelkanals von *S. exigua*-Regurgitat: A: Überblick. Aufnahme aus vier aufeinander folgenden Einzelaufnahmen zusammengesetzt, Gesamtlänge etwa 2000 s; +30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. Amplitudenhistogramm und Histogramme für die Verweildauer von Öffnungen ausgehend vom Hauptleitwert. **B:** Detail von A mit *substates*. **C:** Detail von A mit Öffnung eines zweiten Ionenkanals.

Die Leitfähigkeit entspricht dem reziproken Wert des elektrischen Widerstands, welcher nach dem Ohmschen Gesetz aus dem Stromfluss (12 pA) und der Spannung (+30 mV) ermittelt wurde. Die Leitfähigkeit dieser beiden Ereignisse beträgt etwa 400 pS für den ersten Kanal und etwa 473 pS für den zweiten. Zukünftig werden nur die Leitfähigkeitswerte als vergleichbare Größe benutzt.

Beide Kanäle blieben für über 200 s geöffnet und die Messung wurde erst durch das Brechen der Membran beendet, so dass sich keine Angaben über die Öffnungszeiten machen lassen. Die Beobachtung, dass die Kanäle sehr lange offen bleiben ist beinahe schon als charakteristisch für Ionenkanäle aus Regurgitat zu sehen, da dieses häufig auftritt und sich schließende Kanäle die Ausnahme darstellen. In Abbildung 3.1 lassen sich während des Verweilens auf dem geöffneten Niveau zahlreiche, nicht aufgelöste Ereignisse feststellen, die sich jedoch nicht näher analysieren lassen.

Die charakteristisch lange Öffnungszeit zeigt auch Abbildung 3.2. Die in A dargestellte Übersicht der Aufnahme zeigt eine Verweilzeit auf dem Hauptleitwert von etwa 2000 s. Ausgehend von diesem Leitwert sind sehr viele weitere Öffnungsprozesse zu sehen, welche jedoch zeitlich nicht aufgelöst sind.

Betrachtet man diese Ereignisse genauer, so lassen sich Zeiten auf dem Hauptleitwert von 1,041 s ($\pm 1,131$ s) ermitteln, mit einem Maximalwert von etwa 9 s. Die vom Hauptleitwert ausgehenden Öffnungsereignisse betragen mit 35 ms (± 64 ms Stabw., Maximalwert 1,045 s) in etwa nur 1/30 der Zeit auf dem Hauptleitwert.

Die Abbildung 3.2 B zeigt detailliert den Anfang der Aufnahme. Zu sehen ist zu Beginn ein Leitwert mit 313 pS etwa 93 pS unterhalb des späteren Hauptleitwerts von 406 pS. Man kann jedoch nicht sagen, ob es sich bei diesem Leitwert um einen Kanal wie den später beobachteten Hauptleitwert handelt, welcher lediglich im *substate* geöffnet ist, oder ob es sich um einen anderen Kanaltyp handelt. Der Hauptleitwert wird nach einigen Schaltvorgängen erreicht und schließlich für etwa 2000 s gehalten wird. Während dieser Zeit sind keine Schließvorgänge zu beobachten, jedoch die oben bereits angesprochenen, nicht aufgelösten, „Flickern“ genannten Schaltvorgänge auf höhere Leitwerte.

In Abbildung 3.2 B und C sind auch längere Verweildauern auf höherem Niveau zu sehen. In B ist ein zusätzlicher Kanal mit etwa 77 pS zu sehen und C zeigt einen zusätzlichen Leitwert von 343 pS. Es ist jedoch nicht klar, ob der in C zu sehende zusätzliche Leitwert von derselben Natur ist wie der zu Beginn der Aufnahme in B beschriebene.

Ein eindeutiges Beispiel für einen Unterleitwert oder *substate* ist in Abbildung 3.3 zu sehen. Ausgehend von einem Hauptleitwert mit 397 pS schaltet der Kanal auf den Unterleitwert mit 293 pS, also etwa 74 % des Hauptleitwertes. Bemerkenswert an dieser Aufnahme ist außerdem, dass mehrere vollständige Schließvorgänge zu sehen sind, wobei die Verweilzeiten im jeweiligen Zustand sich im Sekundenbereich befinden. Die Verweilzeit auf dem Unterleitwert beträgt ebenfalls einige Sekunden. Auch in dieser Aufzeichnung sind, wie schon oben beschrieben, flickernde Kanalereignisse auf ein höheres Niveau zu sehen.

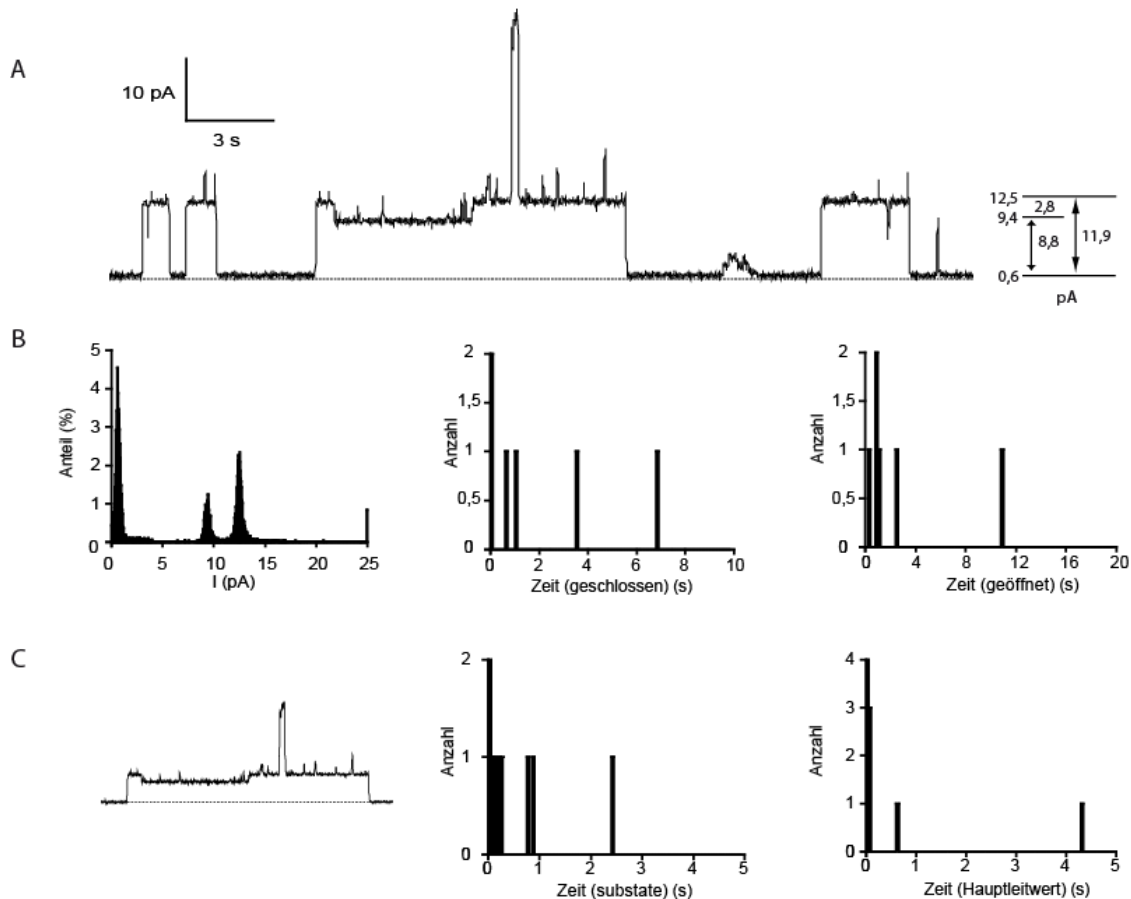


Abbildung 3.3: Einzelkanalmessung mit Regurgitat von *S. exigua* mit *substate*: A: Aufnahme, + 30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. B: Amplitudenhistogramm und Histogramme für die Verweilzeiten vollständig aufgelöster Kanalereignisse. C: Detail von A und Histogramme für die Verweilzeiten des Unterleitwertes und Hauptleitwertes.

Ebenfalls voll aufgelöste Schaltvorgänge sind in der Aufnahme in Abbildung 3.4 sehen. In diesem Fall sind über einen Zeitraum von 60 s Ereignisse mit durchschnittlichen Öffnungszeiten von 1,33 s ($\pm 1,4$ s, max. 6,0 s, min. 93 ms) und geschlossen Zeiten von 322 ms (± 435 ms, max. 2,4 s, min. 23 ms), also etwa viermal solange im offenen wie geschlossenen Zustand, beobachtet worden. Die Leitfähigkeit der Kanäle betrug 410 pS, also im Bereich der üblichen Werte für den Hauptleitwert.

Bemerkenswert an dieser Aufnahme ist darüber hinaus, dass am Ende des in Abbildung 3.4. B gezeigten Teiles das Niveau der Basislinie und des Hauptleitwertes absinkt, um dort mit unveränderter Charakteristik fortzufahren. In der Überblicksdarstellung in Abbildung 3.4. A ist dies gut zu erkennen. Die Ursache dafür könnte ein anderer Kanal von geringer Leitfähigkeit sein, der zu diesem Zeitpunkt geschlossen hat.

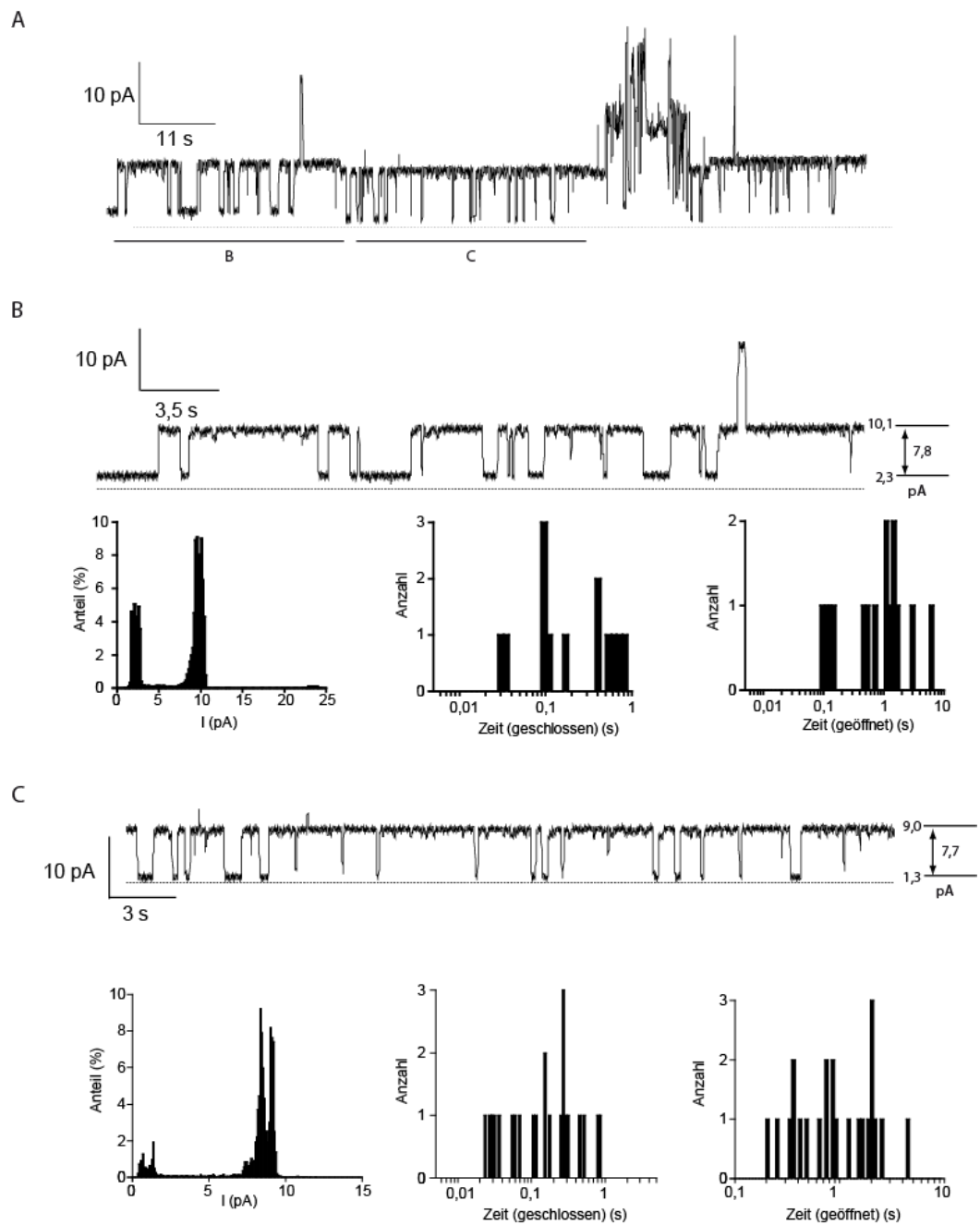


Abbildung 3.4: Einzelkanalmessung mit Regurgitat von *S. exigua* mit voll aufgelösten Kanalereignissen. A: Überblick, Messung mit +19 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. **B:** Detail von A mit Amplitudenhistogramm und Histogrammen für die Verweilzeiten im geöffneten bzw. geschlossenen Zustand. **C:** Detail von A mit Amplitudenhistogramm und Histogrammen für die Verweilzeiten im geöffneten bzw. geschlossenen Zustand.

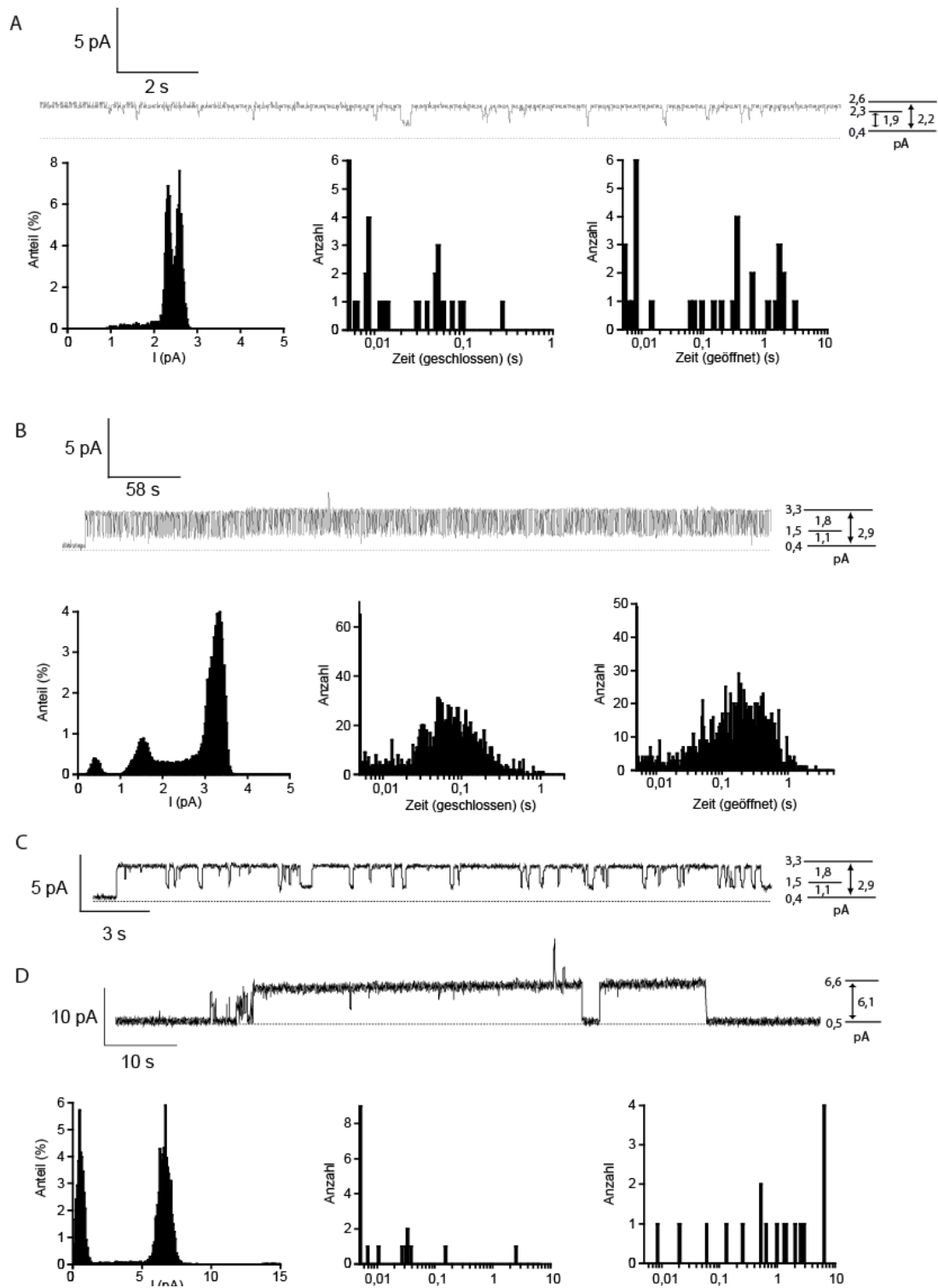


Abbildung 3.5: Aufnahmen von Einzelkanälen mit geringer Leitfähigkeit von *S. exigua*. **A:** Aufzeichnung eines Einzelkanals, +19 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. Amplitudenhistogramm und Histogramme für die Verweilzeiten im geöffneten bzw. geschlossenen Zustand. **B:** Aufzeichnung eines Einzelkanals, +30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. Amplitudenhistogramm und Histogramme für die Verweilzeiten im geöffneten bzw. geschlossenen Zustand. **C:** Detail von B. **D:** Einzelkanal mit mittlerer Leitfähigkeit. Aufnahme bei 25 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. Amplitudenhistogramm und Histogramme für die Verweilzeiten im geschlossenen bzw. geöffneten Zustand.

Dieser öffnete bereits vor dem in Abbildung 3.4. A dargestellten Ausschnitt während derselben Aufnahme und ist in Abbildung 3.5 A dargestellt. Die Leitfähigkeit dieses Kanals beträgt lediglich 116 pS. Desweiteren sind ebenfalls nicht aufgelöste Schaltereignisse auf einen *substate* von 100 pS und für aufgelöste Schaltereignisse auf einen *substate* mit 32 pS zu sehen. Die Verweilzeiten betragen 630 ms (± 794 ms, max. 3,0 s, min. 4 ms) im Hauptleitwert und 31 ms (± 47 ms, max. 236 s, min. 1 ms) auf dem Unterleitwert.

Eine weitere Aufzeichnung eines Kanals mit ähnlich geringer Leitfähigkeit zeigt die Abbildung 3.5 B und C. Der Hauptleitwert hat eine Leitfähigkeit von 97 pS und einen Unterleitwert von 37 pS. Die Verweilzeiten auf dem Hauptleitwert betragen im Mittel 243 ms (± 259 ms, max. 2,6 s, min. 0,9 ms), für den *substate* im Mittel 93 ms (± 112 ms, max. 1,1 s, min. 0,5 ms). Da von dem ersten Kanal mit geringer Leitfähigkeit nur eine Aufzeichnung von 20 s vorliegt, kann man nicht definitiv entscheiden, ob es sich bei diesen beiden Beobachtungen um denselben Kanaltyp handelt.

Zwar unterscheiden sich die durchschnittlichen Verweilzeiten, sind aber in derselben Größenordnung und die Werte der Leitfähigkeit sind nahezu identisch, daher liegt es nahe, dass sie von identischem Ursprung sind. Darüber hinaus wurden Kanäle von diesem Typ nur in diesen zwei Aufnahmen beobachtet. Daraus lässt sich schließen, dass dieser Typ entweder nur sehr selten oder in zu geringer Konzentration im Regurgitat von *S. exigua* zu finden ist. Außerdem deuten die unabhängigen Schaltereignisse der Kanäle mit großer bzw. kleiner Leitfähigkeit aus Abbildung 3.4 A und Abbildung 3.5 A darauf hin, dass beide Kanaltypen einen unterschiedlichen molekularen Ursprung haben und sich unabhängig voneinander verhalten. Eine weitere singuläre Aufnahme eines Kanals mit ungewöhnlichen Werten der Leitfähigkeit zeigt Abbildung 3.5 D. Diese beträgt mit 244 pS nur etwas mehr als die Hälfte des Mittels der üblichen Leitfähigkeiten auf dem Hauptleitwert von 413 pS (± 23 pS Stabw.). Ansonsten kann man in der Aufnahme lediglich einige nicht aufgelöste Schaltvorgänge sowohl nach oben als auch nach unten sehen und ein etwa 2,5 s langes Verweilen auf dem geschlossenen Niveau mit anschließendem erneutem Öffnen des Kanals. Bis auf die Abwesenheit von *substates* und die geringere Leitfähigkeit ähnelt dieser Kanal in seinem Verhalten dem in Abbildung 3.3.

Einzelkanalmessungen mit Regurgitat von *Spodoptera littoralis*

Die Ionenkanäle aus dem Regurgitat von *S. littoralis*-Larven weisen große Ähnlichkeit zu denen im Regurgitat von *S. exigua* auf. Die durchschnittliche Leitfähigkeit beträgt 401 pS (± 18 pS Stabw.).

Wie in Abbildung 3.6 zu sehen ist, treten auch hier sehr lange Öffnungszeiten auf und auch die oben erwähnten flickernden, nicht vollständig aufgelösten Schaltereignisse sind hier zu beobachten. Im Falle von Abbildung 3.6 A beträgt die durchschnittliche Verweilzeit auf dem geöffneten Niveau mit 357 ms (± 376 ms Stabw., max. 2,3 s) etwa das Zehnfache des Wertes für den geschlossenen Zustand (Mittelwert 38 ms ± 60 ms Stabw., Max. 980 ms).

Bei der Aufnahme in Abbildung 3.6 B zeigt im geöffneten Zustand sowohl lange Schaltzeiten mit durchschnittlich 8,2 s ($\pm 6,2$ s Stabw., Max. 26,4 s) als auch kurze Schaltzeiten (Durchschnitt

2,7 ms \pm 4,1 ms, max. 20 ms) und die Zeit im geschlossenen Zustand nur 18 ms (\pm 26,7 ms Stabw., max. 124 ms), also weniger als 0,5 % der Zeit.

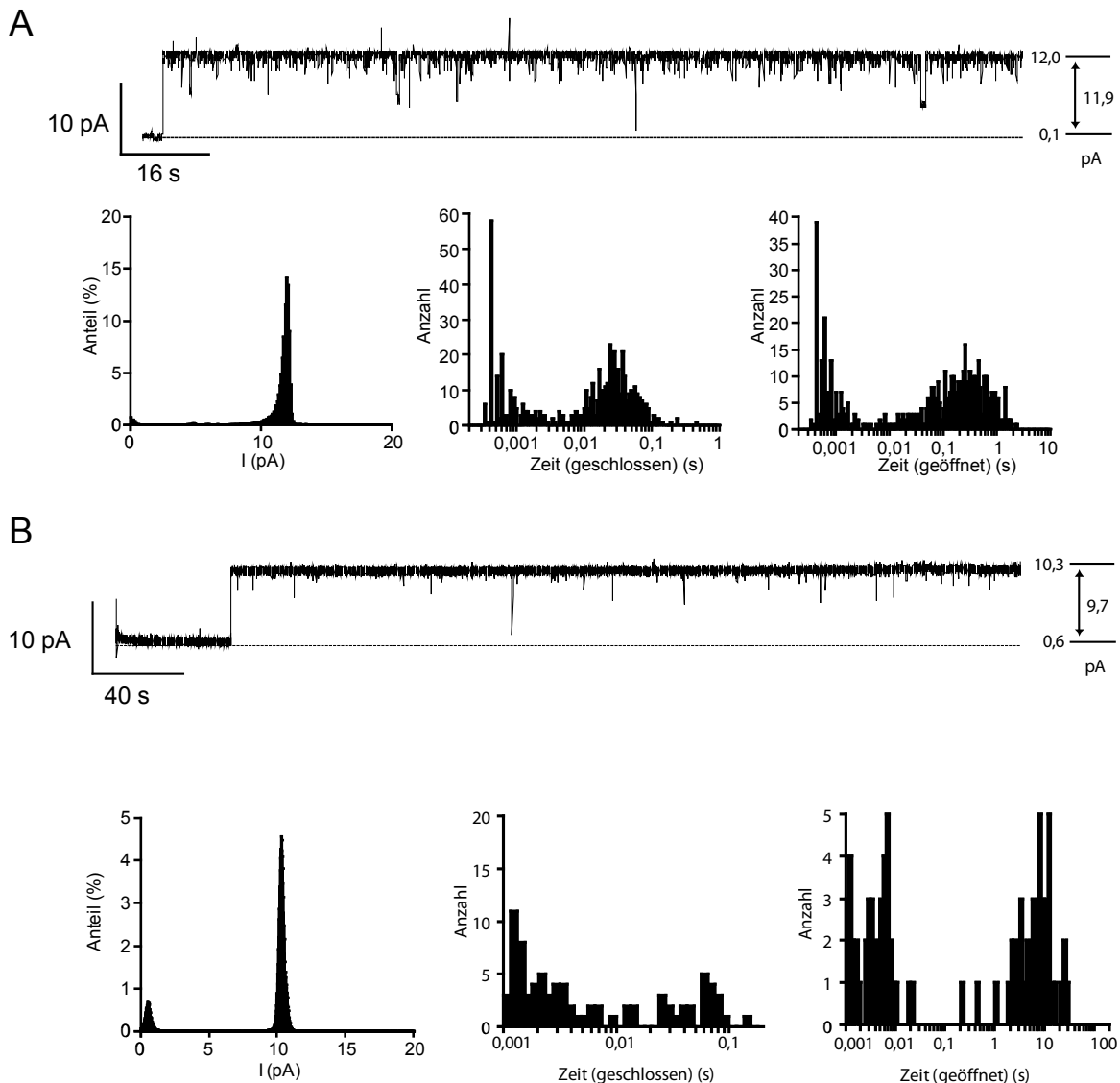


Abbildung 3.6: Aufnahmen typischer Einzelkanäle mit *S. littoralis*-Regurgitat. A: Aufzeichnung eines Einzelkanals, +30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. Amplitudenhistogramm und Histogramme für die Verweilzeiten im geöffneten bzw. geschlossenen Zustand. **B:** Weitere Aufzeichnung eines Einzelkanals, +25 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. Amplitudenhistogramm und Histogramme für die Verweilzeiten im geöffneten bzw. geschlossenen Zustand.

Wie schon bei *S. exigua* beschrieben, sind auch bei der Analyse des Regurgitats von *S. littoralis* Ionenkanäle mit unterschiedlichen Leitfähigkeiten zu beobachten. In Abbildung 3.7 ist eine Aufnahme zu sehen, in welcher zusätzlich zum Hauptleitwert von 400 pS ein weiterer Kanal mit einer Leitfähigkeit von 200 pS wiederholt öffnet und schließt. Dieser hat mit einer durchschnittlichen Öffnungszeit von 0,38 s (\pm 1,6 s Stabw., Max. 22,9 s) nur etwa 1/5 der mittleren Verweildauer auf dem Hauptleitwert (2,1 s \pm 2,6 s Stabw., Max. 23,8 s). Durch diese Verweilzeiten und die Beobachtung, dass in Abbildung 3.7 B ein Unterleitwert von etwa 67 pS

unterhalb des Hauptleitwertes zu sehen ist, lässt sich schließen, dass 400 pS tatsächlich der Hauptleitwert ist und nicht die gemessene Gesamtleitfähigkeit von 600 pS.

Da es sich in Abbildung 3.7 nur um eine einmalige Aufnahme handelt und der Kanal mit 200 pS nicht ohne den Kanal mit 400 pS gemessen wurde, ist unklar, ob es sich dabei um eine Eigenschaft des Kanals mit 400 pS handelt oder ob es ein unabhängiges Kanalereignis darstellt, wie in Abbildung 3.5 D mit Regurgitat von *S. exigua*.

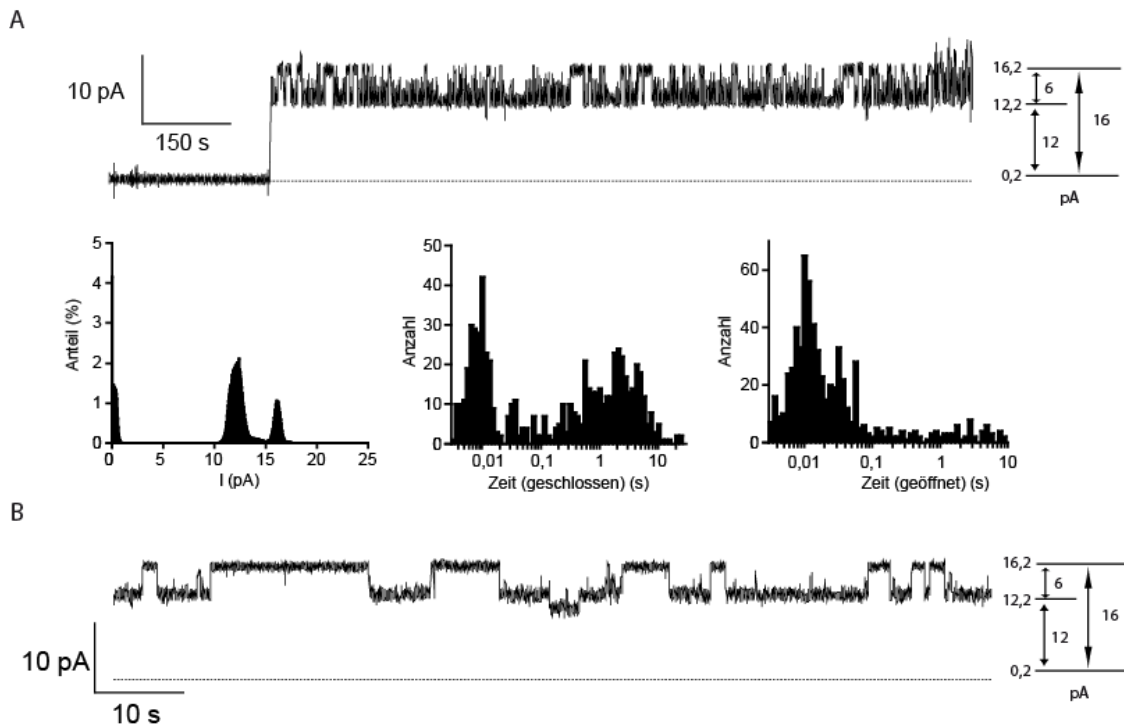


Abbildung 3.7: Aufnahme eines Kanals mit zusätzlichen Öffnungen von *S. littoralis*. **A:** Aufzeichnung eines Einzelkanals, +30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. Amplitudenhistogramm und Histogramme für die Verweilzeiten im geöffneten bzw. geschlossenen Zustand des zusätzlichen Kanals. **B:** Detail von A.

Die Abbildung 3.8 zeigt eine komplexe Aufnahme mit mehreren Leitfähigkeitsstufen und Unterleitwerten. In A sieht man den Verlauf der Messung im Überblick und man kann erkennen, dass der erste Hauptleitwert mit 864 pS etwa die doppelte Leitfähigkeit der üblicherweise gemessenen Leitfähigkeit besitzt und auch das Doppelte des zweiten Hauptleitwertes mit 388 pS. Man kann vermuten, dass es sich hierbei um ein simultanes Öffnen zweier Kanäle handelt.

Im zugehörigen Amplitudenhistogramm kann man neben den Hauptleitwerten noch eine Reihe von Unterleitwerten erkennen. Der erste Teil der Aufnahme wird in Abbildung 3.8 B detailliert gezeigt. Zu sehen sind Unterleitwerte mit 132 pS und seltener mit 184 pS weniger als der Hauptleitwert. Diese beiden Unterleitwerte wurden in dieser Form bei einem Einzelkanal nicht erfasst, was ein weiterer Hinweis auf das simultane Vorhandensein zweier Kanäle ist. Die Verweilzeiten betragen für den Hauptleitwert 16,9 s ($\pm 14,7$ s Stabw., max. 55,5 s) im Mittel und für den *substate* 3,1 s ($\pm 3,0$ s Stabw., max. 11,2 s).

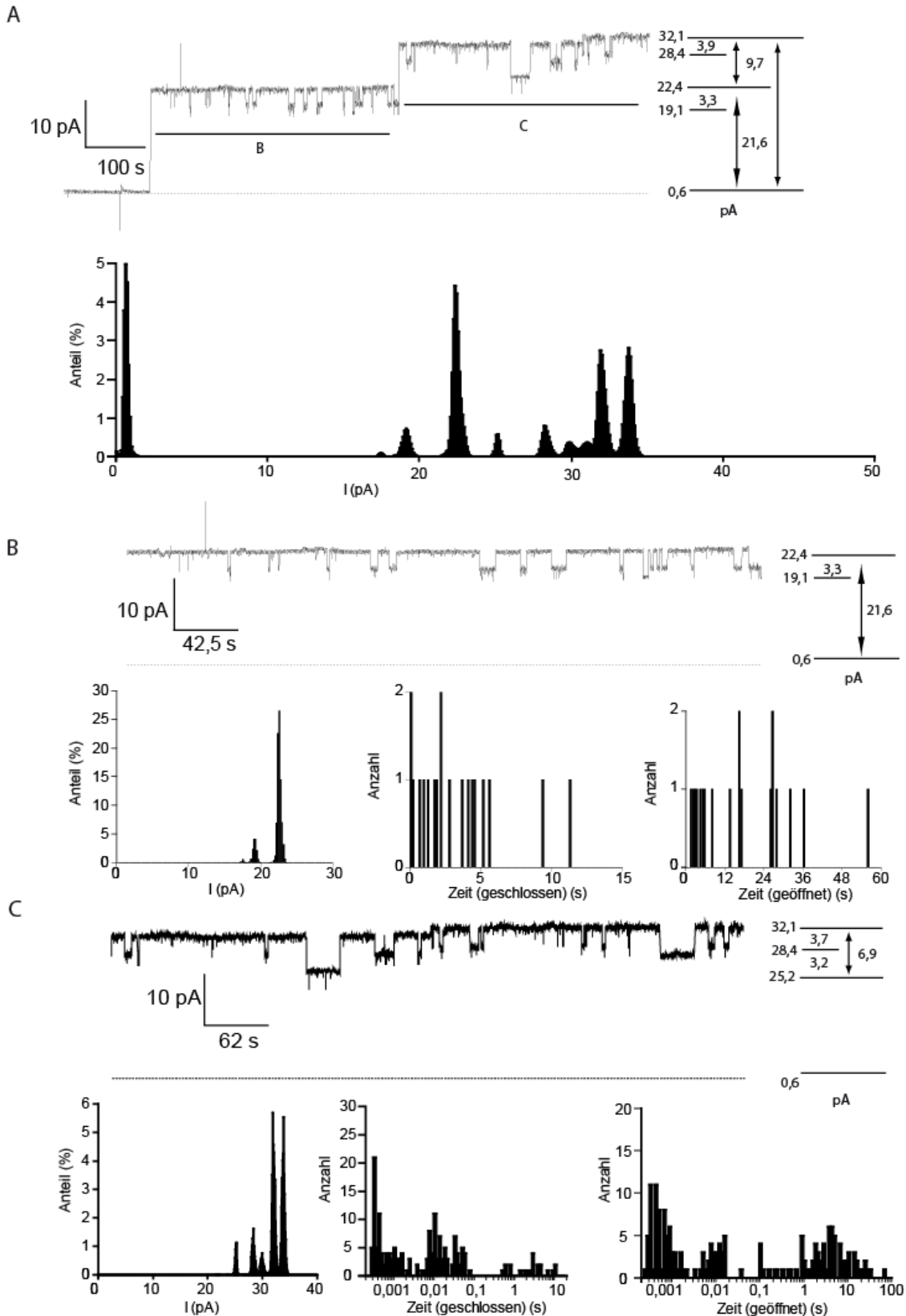


Abbildung 3.8: Aufnahme von multiplen Öffnungen aus Regurgitat von *S. littoralis*. **A:** Aufzeichnung eines Kanals, +25 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. Amplitudenhistogramm. **B und C:** Detail von A. Amplitudenhistogramm und Histogramme für die Verweilzeiten im geöffneten bzw. geschlossenen Zustand.

Im zweiten Teil der Aufnahme (Abbildung 3.8 B) sieht man eine Zunahme der Schaltvorgänge auf eine ganze Reihe von Unterleitwerten, welche sich aus den jeweiligen, vermutlich drei, Hauptleitwerten ableiten. Eine Zuordnung der Leitwerte ist nicht immer zweifelsfrei möglich. Die mittlere Verweildauer auf dem Hauptleitwert nimmt der Erwartung entsprechend mit 4,3 s ($\pm 7,9$ s Stabw., max. 59 s) ebenso ab wie die der Unterleitwerte mit im Mittel 1,4 s ($\pm 5,0$ s Stabw., max. 34,3 s).

3.1.2. Ionenselektivität

Die Bestimmung der Ionenselektivität wurde durch asymmetrische Ionenkonzentrationen auf beiden Seiten der BLM durchgeführt. Durch Messung der Leitwerte bei verschiedenen Spannungen und linearer Regression dieser Werte wurde das Umkehrpotenzial ermittelt, es beträgt -21,5 mV (Abbildung 3.9 B). Das daraus durch die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (Gleichung 2.4) ermittelte Verhältnis von Kationen zu Anionen beträgt 4,9. Der vorherrschende Kanal in Regurgitat von *S. exigua* ist damit moderat selektiv für Kalium gegenüber Chlorid. Aus dem linearen Verlauf des I/U-Plots bei symmetrischen Pufferbedingungen (Abbildung 3.9 A) geht hervor, dass der aus Regurgitat von *S. exigua* stammende Kanal weder spannungsabhängig noch gleichrichtend ist.

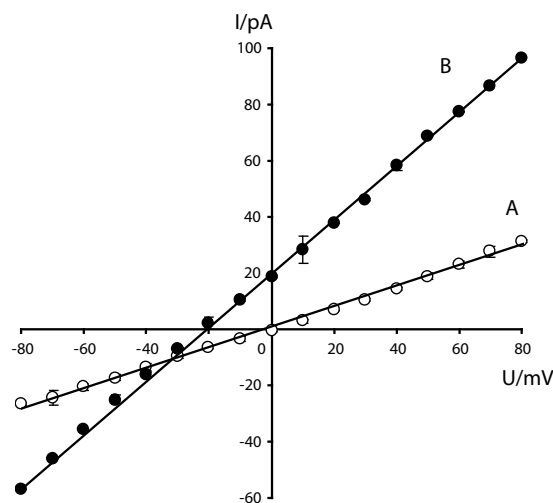


Abbildung 3.9: I/U-Plot und Umkehrpotenzial. **A:** Weiße Kreise, symmetrische Pufferbedingungen: 100 mM Kaliumchlorid, 10mM Tris, pH 9,2, n=3. **B:** Schwarze Kreise, asymmetrische Pufferbedingungen: *cis*: 400 mM Kaliumchlorid, 10mM Tris, pH 9,2, *trans*: 100 mM Kaliumchlorid, 10mM Tris, pH 9,2, n=3.

3.1.3. Konzentrationsabhängigkeit

Es wurden BLM-Messungen mit Regurgitat von *S. littoralis* mit verschiedenen Konzentrationen von Kaliumchlorid durchgeführt, um die Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Elektrolytkonzentration zu untersuchen. In Abbildung 3.10 A sind die Leitwerte bei 10, 200, 600 und 1000 mM Kaliumchlorid zu sehen. Um die maximale Leitfähigkeit zu bestimmen, wurden

die Messwerte in doppelt reziproker Weise dargestellt (Abbildung 3.10 B). Aus dem Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Ordinate lässt sich die maximale Leitfähigkeit ermitteln, sie ist der Kehrwert des Schnittpunktes, hier $1/0,003$. In diesem Fall beträgt die maximale Leitfähigkeit 333 pS.

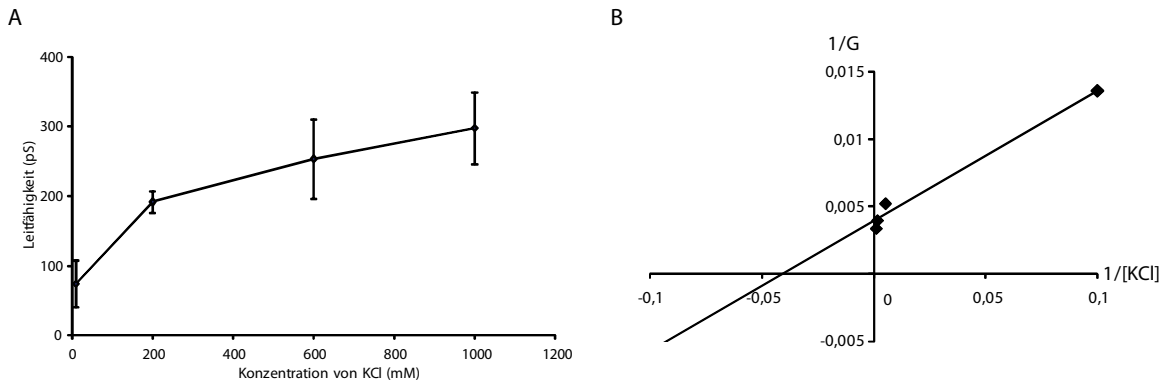


Abbildung 3.10: Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Elektrolytkonzentration. + 30 mV Spannung. Regurgitat von *S. littoralis*, Puffer: Kaliumchlorid entsprechend Grafik, 10 mM Tris, pH 9,2, n=3-7. **A:** Klassische Darstellung mit Mittelwert und Standardabweichung. **B:** Doppelt reziproke Darstellung zur Bestimmung der maximalen Leitfähigkeit, ($y=0,096x+0,003$).

3.1.4. Einfluss von unterschiedlichen Alkaliionen auf die Leitfähigkeit

Um den Einfluss des Kations auf die Leitfähigkeit von Ionenkanälen aus dem Regurgitat von *S. littoralis* zu untersuchen, wurden die Chloride von Natrium, Kalium, Rubidium und Cäsium als Elektrolyt im Puffer eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Zu sehen ist eine tendenzielle Abnahme des Leitwerts, welche aber nicht statistisch signifikant ist. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass es häufig zu Kanalereignissen gekommen ist, bei denen die doppelte bzw. halbe Leitfähigkeit zu sehen war, was zur Folge hat, dass sowohl der Mittelwert ansteigt als auch die Standardabweichung zunimmt.

Mit Calciumchlorid-Lösung wurde keine Leitfähigkeit beobachtet (n=9).

Tabelle 3.1: Vergleich der Leitfähigkeit bei verschiedenen Alkaliionen. Regurgitat von *S. littoralis*; +30 mV Spannung. Konzentration jeweils 200 mM, 10 mM Tris/HCl, pH 9,2, n=14-23.

	Leitwert (\pm Stabw.)
Natriumchlorid	309 \pm 67
Kaliumchlorid	256 \pm 108
Rubidiumchlorid	230 \pm 71
Cäsiumchlorid	249 \pm 72

3.1.5. Vergleich verschiedener Arten von *Lepidoptera*

Die bisher gezeigten Messungen von Ionenkanälen wurden mit Regurgitat von Larven der Gattung *Spodoptera* aus der Familie der *Noctuidae* durchgeführt. Bei den beiden verwendeten Arten *S. littoralis* und *S. exigua* handelt es sich um polyphage Arten. Ob es sich bei den beobachteten Ionenkanälen aus Regurgitat um eine Eigenschaft ausschließlich dieser Arten oder polyphager Raupen im Allgemeinen handelt, oder ob es ein Phänomen mit größerer Verbreitung ist, wurde durch die Untersuchung von Regurgitat von Larven verschiedener Arten von Lepidopteren untersucht. Dazu wurde Regurgitat von Larven von *Helicoverpa armigera* Hübner, *Trichoplusia ni* Hübner (beide *Noctuidae*, polyphag) sowie *Manduca sexta* (*Sphingidae*, Futterspezialist mit bevorzugter Nahrung *Nicotiana spec.*) verwendet. Neben diesen relativ abgeleiteten Arten von Faltern wurde auch das Regurgitat von *Plutella xylostella* Linnaeus, einem Vertreter der vergleichsweise ursprünglichen Familie der *Plutellidae* untersucht. *P. xylostella* ist auf Futterpflanzen der Familie *Brassicaceae* spezialisiert. Als weiteren Vertreter von Spezialisten dieser Pflanzenfamilie wurden die Regurgitate von Larven von *Pieris rapae* und *Pieris brassicae* mit dem BLM-Assay auf Ionenkanal-bildende Substanzen untersucht. Als Mitglieder der Familie *Piridae* stellen sie als echte Schmetterlinge die am stärksten abgeleiteten Arten in dieser Untersuchung dar.

Im Regurgitat aller untersuchten Arten lassen sich Ionenkanal-bildende Substanzen finden, die denen von *Spodoptera* in ihrer Erscheinung ähneln (Abbildung 3.11).

Helicoverpa armigera und *Trichoplusia ni* (beide *Noctuidae*)

Aus der Familie der *Noctuidae* wurden neben *S. littoralis* und *S. exigua* auch noch das Regurgitat der Larven von *T. ni* und *H. armigera* untersucht. Die Aufnahme von *H. armigera* in Abbildung 3.11 und Abbildung 7.1 zeigt einen Leitwert von 870 pS, was in etwa dem Doppelten der ansonsten gemessenen Werte für *Spodoptera*-Arten entspricht. Da keine weiteren Schaltvorgänge aufgezeichnet wurden, kann man nicht beurteilen, ob es sich um das simultane Öffnen zweier Kanäle handelt oder ob es sich um einen Hauptleitwert besagter Leitfähigkeit handelt. Zu sehen ist außerdem, dass es sowohl vor dem Öffnen des Ionenkanals als auch danach zu flickernden Zunahmen der Leitfähigkeit kam. Diese erfolgen jedoch nicht auf ein einheitliches Niveau und es ist auch keine erhöhte Leitfähigkeit auf einem definierten Niveau über eine längere Zeit zu sehen. Daher und aus der Beobachtung, dass es bereits vor der Kanalöffnung zu diesen Vorgängen kommt, kann man schließen, dass es sich nicht um eine Eigenschaft des Kanals handelt, sondern um Ereignisse, die von anderen Substanzen herrühren, wie es zum Beispiel mit *N*-Linolenoylglutamin gemessen wurde (siehe dort).

Die in den Abbildung 3.11 und Abbildung 7.2 gezeigten Aufnahmen von Kanalereignissen von *T. ni* zeigt einen sehr komplexen Verlauf der Leitfähigkeit. In der Übersicht ist zu sehen, dass es zunächst zu einer Öffnung eines Kanals mit einem Leitwert von etwa 730 pS kommt. Ausgehend von diesem Wert nimmt die Leitfähigkeit um 50 pS zu und verweilt auf diesem Niveau für durchschnittlich 0,15 s ($\pm 0,17$ s Stabw., max. 0,6 s). Gelegentlich kam es auch zu kurzzeitigen Öffnungsereignissen mit einem Anstieg der Leitfähigkeit um 250 pS, dies auch aus dem Niveau des zusätzlichen Leitwerts heraus. Diese beiden Arten von zusätzlichen

Kanalereignissen haben Ähnlichkeit zu bereits beschriebenen Beobachtungen bei den Kanälen mit Regurgitat der beiden *Spodoptera*-Arten.

In Abbildung 7.2. B ist zu sehen, dass die Leitfähigkeit um 400 pS auf 416 pS ansteigt. Wie schon in der Aufnahme von *H. armigera*, ist auch in dieser Aufnahme von *T. ni* ein sehr großer Hauptleitwert zu sehen. In diesem Fall aber wurde jedoch beobachtet, wie es zu einer Verringerung der Leitfähigkeit kommt, die die Hälfte des Hauptleitwerts beträgt. Das Fehlen von Durchschaltvorgängen auf das komplett geschlossene Niveau, legt den Schluss nahe, dass es sich nicht um zwei Kanäle, die unabhängig voneinander schalten, handelt, sondern um einen Kanal mit Unterleitwerten. Da es sich bei den Kanälen aber meist um Kanäle mit sehr langen Öffnungszeiten handelt, kann keine endgültige Entscheidung gefällt werden, ob es von zwei oder nur einem Kanal hervorgerufen wurde.

Auf dem Niveau des Unterleitwerts (416 pS) sind weitere Öffnungsereignisse zu sehen (Abbildung 7.2 B). Diese haben mittlere Öffnungszeiten von 0,36 s ($\pm 0,25$ s Stabw., max. 1,3 s), während die Verweildauer auf dem Niveau des Unterleitwerts mit durchschnittlich 1,8 s ($+2,3$ s Stabw., max. 10,0 s) in etwa fünfmal so lang ist. Diese zusätzlichen Leitwerte erreichen auch nicht das ursprüngliche Niveau des Hauptleitwerts, sondern tragen lediglich mit 200 pS zum Gesamtleitwert bei. Aufgrund der kürzeren Öffnungszeiten und dem geringeren Leitwert erscheint es unwahrscheinlich, dass der Hauptkanal und diese Leitwerte denselben molekularen Ursprung haben. Ähnliche Ereignisse wurden auch ausgehend vom Hauptleitwert aufgezeichnet, jedoch sehr viel seltener. Ausgehend von Unterleitwert sind aber keine Öffnungsereignisse aufgezeichnet worden, die, wie oben beschrieben, nur 50 pS betragen.

Daneben ist in Abbildung 7.2 B zu sehen, dass in den letzten Sekunden, bevor der Kanal auf den Unterleitwert schaltet, es zu sehr schnellen, nicht mehr aufgelösten Leitfähigkeitsänderungen kommt. Innerhalb des Unterleitwerts kommt es nach etwa 15 s zu einer dauerhaften erneuten Absenkung der Leitfähigkeit um etwa 30 pS.

Nachdem der Unterleitwert wieder auf den Hauptleitwert geschaltet hat, ist im weiteren Verlauf der Messung zu sehen, dass es zu einer weiteren Absenkung der Leitfähigkeit kommt (Abbildung 7.2. C). Dabei schaltet der Kanal dauerhaft von etwa 740 pS auf etwa 655 pS. Auf diesem neuen Unterleitwert verbleibt der Kanal mit einer Ausnahme für den Rest der Messung. Jedoch lassen sich, wie auch auf dem Hauptleitwert, sowohl kurze, flickernde Schaltereignisse beobachten, sowie die zuvor beschriebenen, längeren (0,1 – 1 s) Kanalereignisse mit Beiträgen zum Gesamtleitwert von etwa 50 pS bzw. 200 pS ähnliche Leitwerte. Die Anzahl der flickernden Ereignisse überwiegt nun aber bei weitem und resultiert in einer mittleren Verweildauer im geöffneten Zustand (flickernd und länger offene *substates* zusammen) von 0,06 s ($\pm 0,12$ s Stabw., max. 0,7 s). Die Verweilzeit auf dem Unterleitwert ist etwa dreimal so lang (Mittel: 0,19 s $\pm 0,21$, max. 1,3 s).

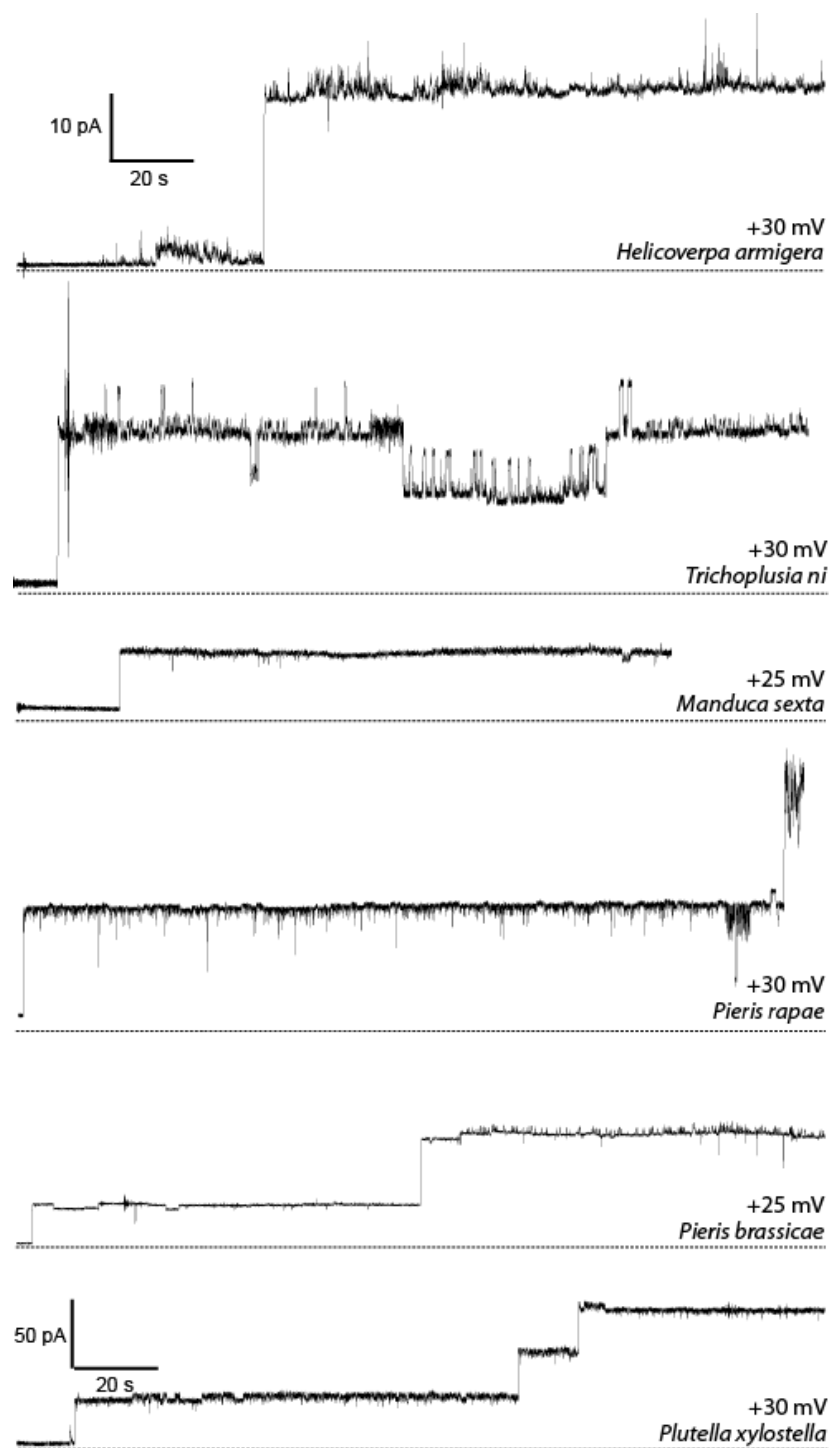


Abbildung 3.11: Vergleich der Ionenkanäle aus Regurgitat verschiedener Arten. 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. Aufnahme von *P. xylostella* mit eigenem Maßstab, andere Aufnahmen im selben Maßstab wie *H. armigera*. Die Spannung ist jeweils in der Abbildung angegeben.

Manduca sexta (Sphingidae)

Die Larven von *Manduca sexta*, dem Tabakswärmer, gehören zur Familie *Sphingidae* und sind spezialisiert auf Futterpflanzen der Gattung *Nicotiana*. Ionenkanäle, welche aus dem

Regurgitat der Larven dieser Art stammen (Abbildung 7.3) und in BLM inserieren, zeigen eine durchschnittliche Leitfähigkeit von 274 pS (\pm 63 pS Stabw.). Jedoch ist, wie auch bei *H. armigera* und *T. ni* oben beschrieben, nicht eindeutig zu klären, ob es sich hierbei tatsächlich um die Hauptleitwerte handelt oder diese womöglich bereits aus mehreren Einzelkanälen bestehen. So ist in Abbildung 7.3 D zu sehen, dass sich der Hauptleitwert von 332 pS aus zwei Leitwerten mit jeweils 148 pS, bzw. 184 pS zusammensetzt. Auch die Aufnahme in Abbildung 7.3 C setzt sich aus mehreren Schaltvorgängen zusammen. Diese ergeben nach zwei Öffnungen einen maximalen Leitwert von 708 pS und einem Schließvorgang einen kombinierten Leitwert von 504 pS, vermutlich eine Kombination zweier Kanäle. Die Leitfähigkeitsänderung des ersten Öffnens eines Kanals (196 pS) und dem Schließen ausgehend vom Maximalwert um 204 pS könnten aufgrund der ähnlichen Leitfähigkeit dieselbe molekulare Ursache haben. Bleibt ein durch Subtraktion erhaltener Leitwert von 308 pS, der aufgrund höherer Leitfähigkeit wohl anderen Ursprungs ist.

Daneben ist in den Aufnahmen von *M. sexta* zu sehen, dass es verglichen mit Kanälen anderer Arten nur sehr wenige flickernde Schaltereignisse gibt und kaum aufgelöste Schaltereignisse von kurzer Dauer im niedrigen Sekundenbereich. In Abbildung 7.3 B sind einige dieser flickernden Schließvorgänge analysiert. Die mittlere Zeit auf dem Hauptleitwert beträgt etwa 1 s, die im (nicht aufgelösten) geschlossenen Zustand nur 25 ms. Außerdem sind auch *substates* beobachtet wurden. Diese sind nicht so häufig zu sehen wie bei den Kanälen von anderen Arten und auch die Zeit auf dem Unterleitwert ist mit weniger als einer Sekunde sehr viel geringer. Die Leitfähigkeitsabnahme während der Zeit auf dem *substate* beträgt etwa 50 pS (Abbildung 7.3 A und D).

Plutella xylostella (Plutellidae)

Das Regurgitat von Larven von *Plutella xylostella* wurde ebenfalls auf Ionenkanal-bildende Substanzen im BLM-Assay untersucht. Die gemessenen Kanäle (Abbildung 3.11 und 7.4) zeichneten sich durch eine bemerkenswert hohe Leitfähigkeit aus. So betrug die mittlere Leitfähigkeit 1161 pS (\pm 84 pS Stabw.), das ist etwa das Vier- bis Sechsfache der ansonsten gemessenen Leitwerte. Da diese Werte wiederholt und auch bei sequentiellen Öffnungsereignissen stets erhalten wurden, ist es als ausgeschlossen anzusehen, dass diese hohen Leitwerte stets durch simultanes Öffnen von kleineren Einzelkanälen entstehen. Daher handelt es sich bei diesen hohen Leitwerten wohl um Einzelkanäle. Wie auch schon bei anderen Arten beobachtet, tritt auch bei den Ionenkanälen aus dem Regurgitat von *P. xylostella* ein Unterleitwert mit einer Absenkung der Leitfähigkeit von 233 pS auf. Dieser *substate* blieb für mehr als 38 s offen (Abbildung 7.4. B). Die bei anderen Arten gemessenen flickernden Ereignisse oder kurzzeitiges Öffnen und Schließen von Kanälen wurde nicht beobachtet.

Pieris brassicae und *Pieris rapae*

Neben den bisher behandelten Arten von Faltern wurden auch zwei Arten von echten Schmetterlingen untersucht, *Pieris brassicae* und *Pieris rapae*. Bei den Vertretern dieser Arten

handelt es sich um Nahrungsspezialisten die sich von Pflanzen der Familie der Brassicaceen ernähren. In Abbildung 3.12 sind verschiedene Aufnahmen von Ionenkanälen zu sehen, die durch Regurgitat in BLM erzeugt wurden. Dabei wurden Leitwerte gemessen, die im Mittel eine Leitfähigkeit von 394 pS (± 63 pS) aufweisen. Wie bei den anderen untersuchten Arten sind auch hier die Ionenkanäle durch sehr lange Öffnungszeiten gekennzeichnet, die 800 s und mehr betragen können.

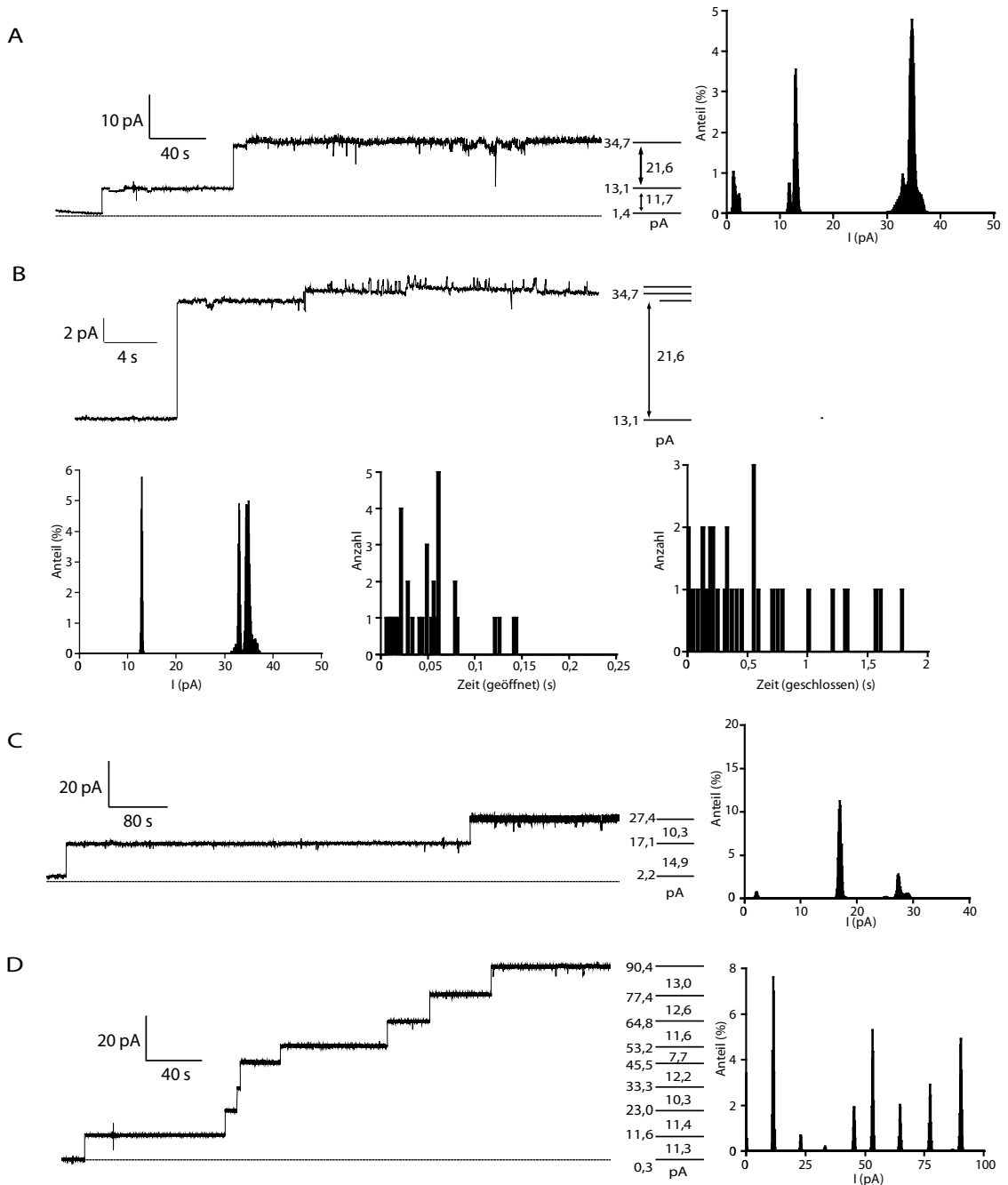
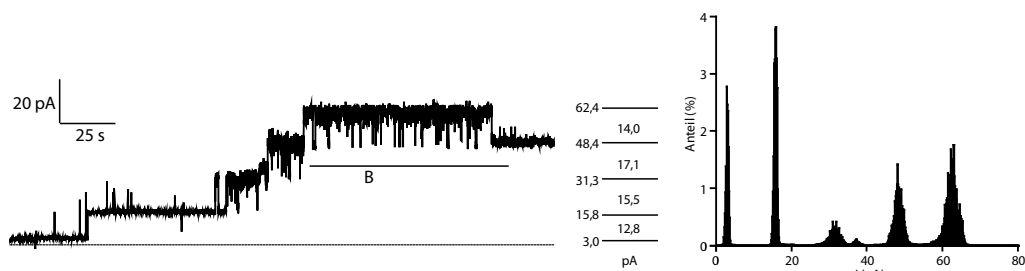


Abbildung 3.12: Aufnahmen von Ionenkanälen aus Regurgitat von *Pieris brassicae*. 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. **A:** Aufnahme und Amplitudenhistogramm, +25 mV. **B:** Detail von A, Amplitudenhistogramm und Histogramme der Zeiten im geöffneten und geschlossenen Zustand, bezogen auf nicht aufgelöste Schaltereignisse ausgehend vom obersten Leitwert. **C** und **D:** Aufnahmen mit mehrfachen Kanalöffnungen, Amplitudenhistogramm, +30 mV.

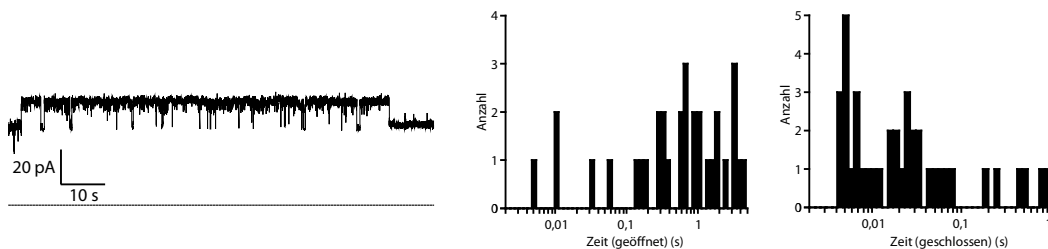
Bei den gezeigten Aufnahmen wurden darüberhinaus auch mehrere sequentielle Öffnungen von Einzelkanälen zu sehen, welche aber nicht wieder auf den ursprünglichen Leitwert zurückschalten. In Abbildung 3.12 B ist ein Detail der Aufnahme aus Abbildung 3.12 A zu sehen, in dem sich nach dem Schalten auf den höheren Leitwert noch zwei weitere Erhöhungen der Leitfähigkeiten ereignen, diese aber nur um 40, bzw 80 pS. Außerdem gibt es eine Reihe nicht aufgelöster Schaltereignisse mit einer mittleren Verweildauer von 50,4 ms (\pm 36,7 ms, max. 142 ms) im geöffneten Zustand und 530 ms (\pm 504 ms, max. 1,78 s) auf dem Hauptleitwert.

In Abbildung 3.13 sind zwei Aufnahmen von Ionenkanälen aus dem Regurgitat von *P. rapae* dargestellt. In der ersten Aufnahme wurde ein Kanal mit langer Öffnungszeit, ähnlich denen von *P. brassicae*, beobachtet. Zu einem späteren Zeitpunkt treten noch Leitwerte auf, die im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Kanälen, häufige Schaltvorgänge aufweisen (Abbildung 3.13 B). Diese Kanäle verbleiben durchschnittlich 1,9 s (\pm 2 s) auf dem Hauptleitwert und schließen sich für durchschnittlich 87 ms (\pm 187 ms, max. 808 ms). Daneben gibt es noch eine Reihe nicht aufgelöster Schaltvorgänge.

A



B



C

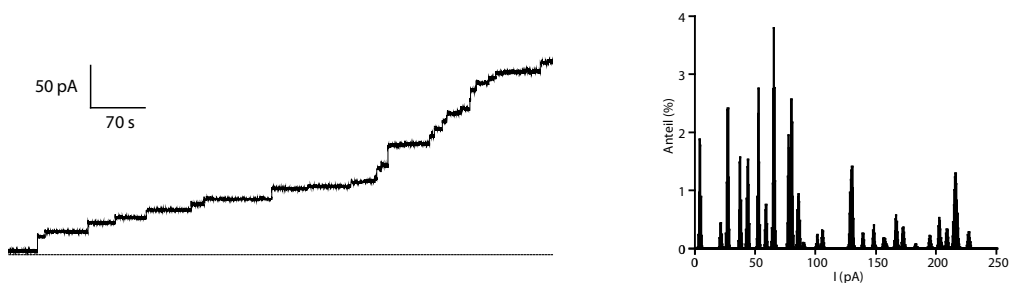


Abbildung 3.13: Aufnahmen von Ionenkanälen aus Regurgitat von *Pieris rapae*. 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. **A:** Aufnahme und Amplitudenhistogramm, +25 mV. **B:** Detail von A, Histogramme der Zeiten im geöffneten und geschlossenen Zustand, bezogen auf zum Teil nicht aufgelöste Schaltereignisse ausgehend vom obersten Leitwert. **C** Aufnahme mit zahlreichen Kanalöffnungen, Amplitudenhistogramm.

Eine außergewöhnliche Aufnahme zeigt die Abbildung 3.13 C, in welcher zahlreiche Öffnungsereignisse zu sehen sind. Insgesamt beträgt die Leitfähigkeit der Ionenkanäle von *P. rapae* 458 pS (± 124 pS), es wurden aber auch Leitwerte gemessen, die mit einem Leitwert von 213 pS (± 74 pS) nur etwa die halbe Leitfähigkeit aufweisen.

3.1.6. Einfluss von Temperatur auf die Ionenkanal-bildende Aktivität im Regurgitat

Beständigkeit gegenüber Zimmertemperatur

Regurgitat zeigte sich gegenüber der Exposition von Zimmertemperatur (etwa 23 °C) als sehr beständig und so konnte auch nach sechs Stunden kein Verlust der Ionenkanal-bildenden Aktivität festgestellt werden.

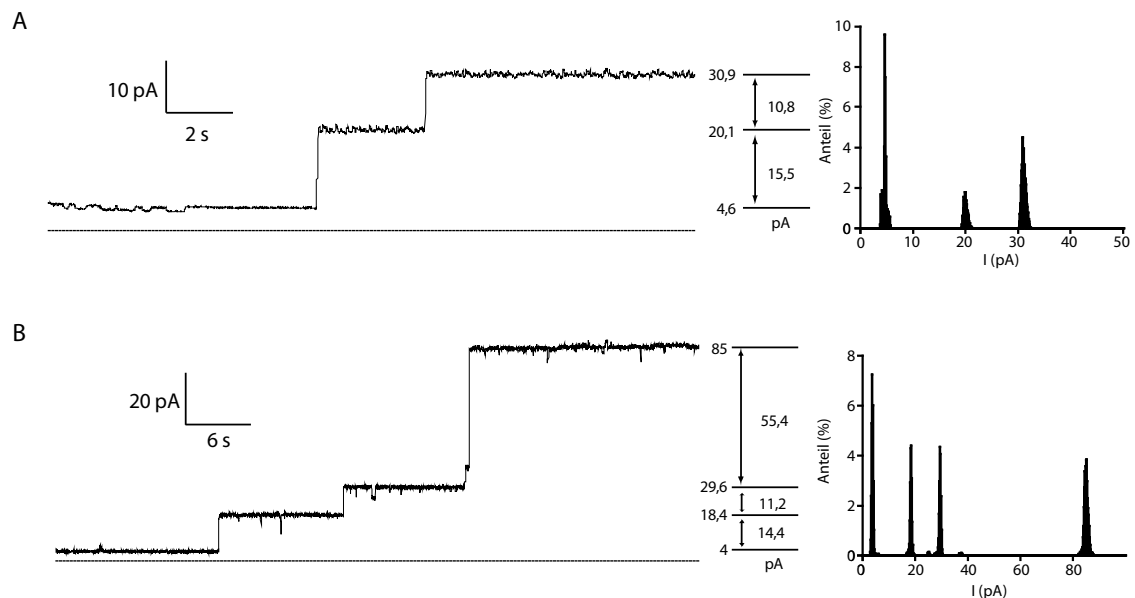


Abbildung 3.14: Einzelkanal nach 6 h bei Zimmertemperatur. A und B: Aufzeichnung mit Regurgitat von *S. littoralis*, Amplitudenhistogramm. +30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris/HCl, pH 9,2.

Die Abbildung 3.14 zeigt zwei Aufnahmen von Ionenkanälen die aus Regurgitat von *S. littoralis* stammen, welches bei etwa 23 °C für sechs Stunden gelagert wurde. Die mittlere Leitfähigkeit der gemessenen Ionenkanäle beträgt 433 pS (± 78 pS Stabw.). In Teil B derselben Abbildung ist darüberhinaus noch ein Sprung in der Leitfähigkeit von 1846 pS zu erkennen, wobei es sich hierbei wohl aber um ein simultanes Öffnen mehrerer Kanäle zu handeln scheint.

Aus der Beständigkeit der Ionenkanal-bildenden Substanz gegenüber Zimmertemperatur lässt sich schließen, dass die Substanzen nicht schnell abgebaut werden oder stets neu gebildet werden, was möglich wäre, wenn diese bakteriellen Ursprungs wären.

Empfindlichkeit gegenüber hohen Temperaturen

Es wurden etwa 30 μ l Regurgitat von *S. exigua* für 3 min bei 100 W in der Mikrowelle gekocht und anschließend im BLM-Assay auf die Fähigkeit zur Kanalbildung untersucht.

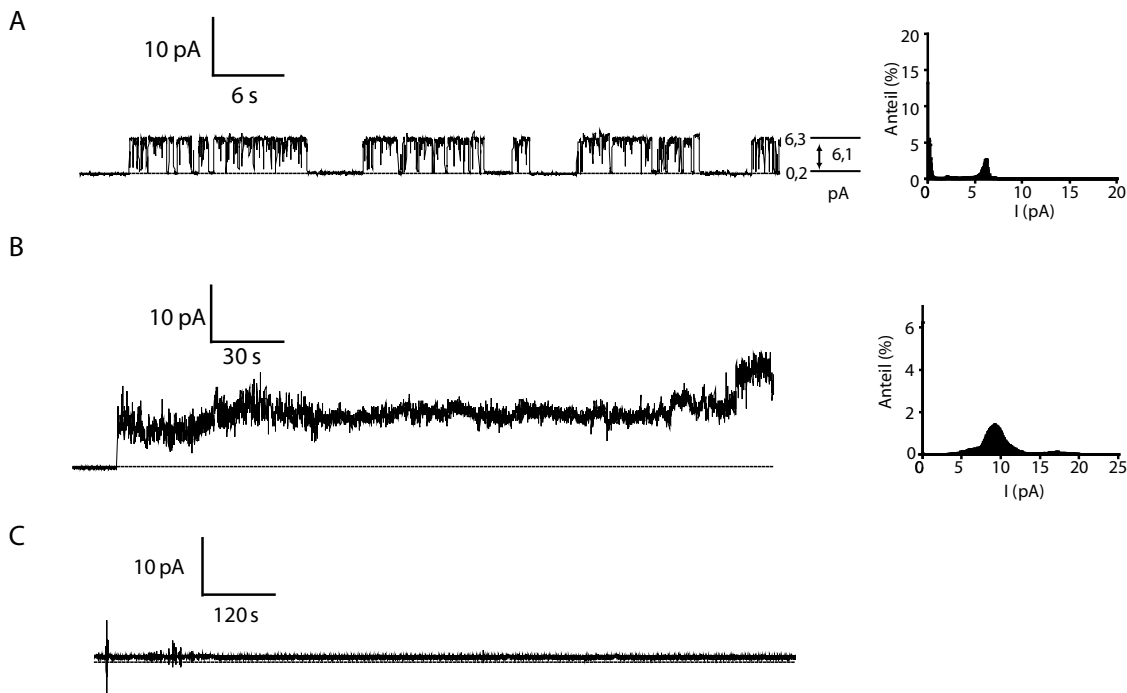


Abbildung 3.15: BLM-Messung mit gekochtem Regurgitat von *S. exigua* und *P. brassicae*. **A** und **B**: 3 min in Mikrowelle gekocht, Regurgitat von *S. exigua*, + 30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2, Amplitudenhistogramm. **C**: 3 min in Mikrowelle gekocht, Regurgitat von *P. brassicae*, + 30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2.

In Abbildung 3.15 ist das Ergebnis von Messungen mit gekochtem Regurgitat zu sehen. Zum einen lassen sich Ionenkanäle mit einer vergleichsweise geringen Leitfähigkeit von 203 pS sehen (Abbildung 3.15 A), wie sie bereits oben beschrieben wurden. Diese Kanäle schalten sehr häufig mit einer mittleren Verweildauer im geöffneten Zustand von 0,34 s ($\pm 0,4$ s, max. 2,4 s) und einer mittleren Zeit von 0,37 s auf dem geschlossenen Niveau, wobei zum Teil sehr lange Zeiten (bis zu 36 s) in diesen Zustand aufgezeichnet wurden, so dass nicht zweifelsfrei gesagt werden kann, ob es sich dabei um denselben Kanal handelt. Die ansonsten üblichen Kanäle mit sehr langen Öffnungszeiten wurden allerdings nicht beobachtet. Am ehesten kommt noch die in Abbildung 3.15 B gezeigte Aufzeichnung den üblichen Kanälen nahe, wobei hier zwar viele nicht aufgelöste Schaltereignisse zu sehen sind, aber kein einheitlicher Leitwert über längere Zeit hinweg gehalten wird. Dies wird durch das sehr breite Amplitudenhistogramm um den mittleren Leitwert von 9,3 pA (entspricht 310 pS) herum noch unterstrichen. Bei gekochtem Regurgitat von Larven von *P. brassicae* wurde hingegen keine Änderung der Leitfähigkeit der BLM festgestellt (Abbildung 3.15 C).

Aus diesen Beobachtungen lässt sich nicht ausschließen, dass es sich bei den üblichen Kanälen um Proteine handeln könnte. Die Kanäle mit geringer Leitfähigkeit scheinen sich nicht durch Hitze inhibieren zu lassen.

3.1.7. Beständigkeit gegenüber Proteinase K

Um eine weitere Information über die Natur der Ionenkanal-bildenden Substanz(en) zu erhalten, wurde Regurgitat von Larven von *S. littoralis* für 3 h mit Proteinase K behandelt.

Anschließend wurde dieses Gemisch auf die Fähigkeit zur Bildung von Ionenkanälen in planaren Membranen untersucht.

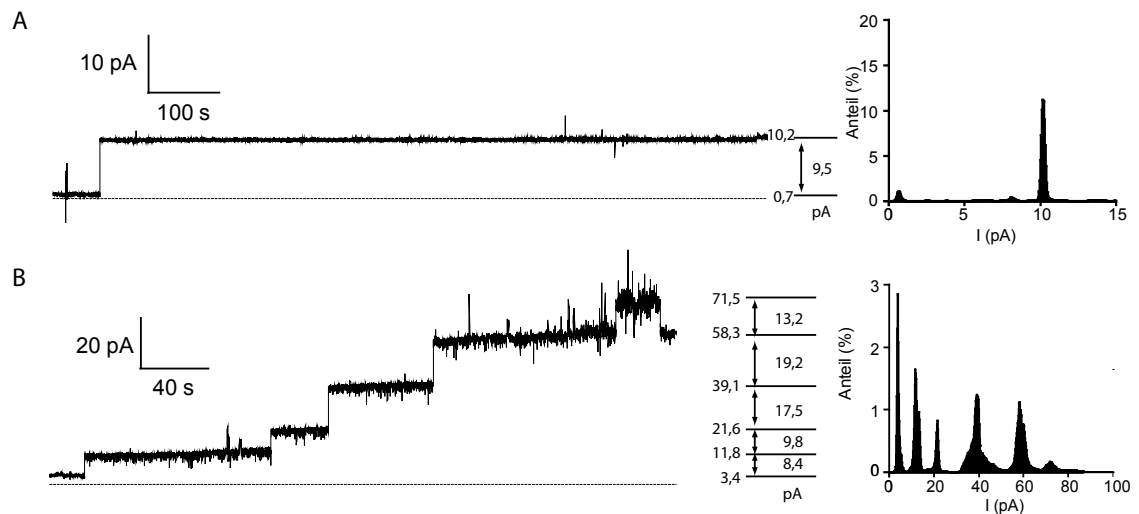


Abbildung 3.16: Ionenkanäle aus dem Regurgitat von *S. littoralis* nach der Behandlung mit Proteinase K. A und B: + 25 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2, Amplitudenhistogramm.

Im BLM-Assay wurden wie auch in unbehandeltem Regurgitat dieselbe Art von Ionenkanälen gemessen (Abbildung 3.16). Die mittlere Leitfähigkeit entsprach 409 pS (± 83 pS). Wie auch schon oben beschrieben, gab es auch hierbei Kanalereignisse die in diesem Fall über 700 pS erreichen, wobei unklar ist, ob es sich nicht um das simultane Öffnen zweier Kanäle handelt (Abbildung 3.16 B).

3.1.8. Vergleich verschiedener Futterquellen

Die untersuchten Larven wurden im Falle der Futterspezialisten auf deren bevorzugter, bzw. natürlicher Futterpflanze herangezogen, so dass das Regurgitat in seiner Zusammensetzung möglichst genau dem in der Natur vorkommenden entspricht. So wurde *M. sexta* mit Pflanzen der Art *Nicotiana attenuata* gefüttert, die beiden untersuchten Arten der Gattung *Pieris* mit *Brassica oleracea* sowie die Larven von *P. xylostella* auf *Arabidopsis thaliana*.

Im Falle der polyphagen Arten der Gattung *Spodoptera* wurde neben der als Modellpflanze für Pflanzen-Insekten-Interaktionen in der Arbeitsgruppe etablierten Limabohne *P. lunatus* auch eine künstliche Diät auf Basis von Bohnenmehl eingesetzt. Darüberhinaus wurde für *S. littoralis* auch *Medicago truncatula* als Futter für Vergleichszwecke genutzt.

In Abbildung 3.17 ist ein Vergleich der Kanäle aus dem Regurgitat von *S. littoralis* zu sehen, das von Larven stammt, die auf *M. truncatula* bzw. künstlicher Diät gehalten wurden. Zwischen den erzeugten Ionenkanälen ist kein wesentlicher Unterschied zu den Aufnahmen in Abbildung 3.6 zu erkennen. Auch bei den Kanälen aus Regurgitat von Larven, die mit künstlicher Diät oder *M. truncatula* gefüttert wurden, wurde ein Leitwert von 430 pS (*M. truncatula*), bzw. 400 und 460 pS (Diät) gemessen. Daraus lässt sich schließen, dass das Futter wohl nicht die Quelle der

Ionenkanal-bildenden Substanzen ist, sondern entweder das Insekt selbst oder ein im Darm lebender Kommensale diese Substanz(en) bildet.

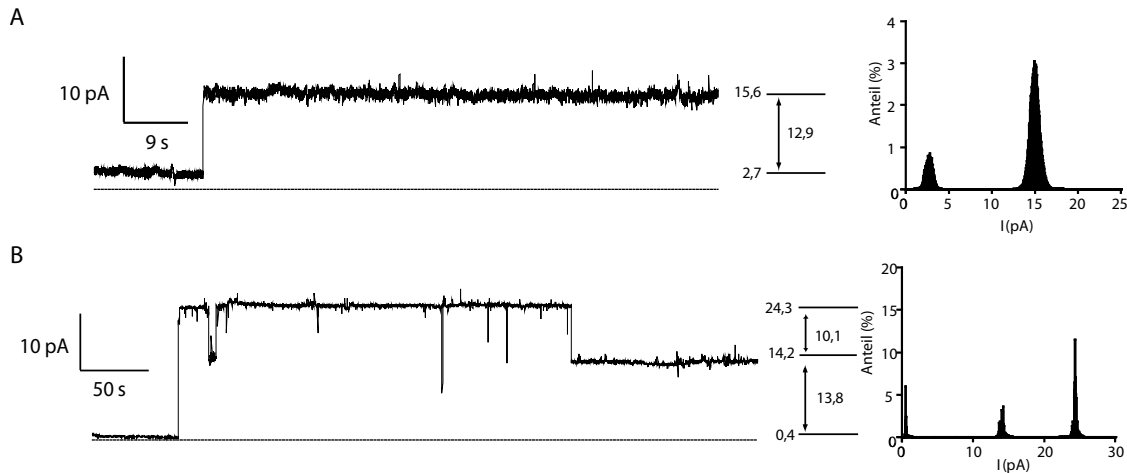


Abbildung 3.17: BLM-Aufnahmen von Regurgitat von Raupen gehalten auf verschiedenen Futterquellen: Regurgitat von *S. littoralis*, +30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. Larven gefüttert mit **A:** *M. truncatula*, **B:** Diät.

3.1.9. Zusammenfassung der Eigenschaften der Ionenkanal-bildenden Substanzen aus dem Regurgitat von Lepidopterenlarven

Das Regurgitat von Spodoptera-Larven enthält Ionenkanal-bildende Substanzen, welche sich durch BLM nachweisen lassen. Der am häufigsten auftretende Typ dieser Ionenkanäle zeichnet sich durch sehr lange Zeiten im geöffneten Zustand von bis zu 2000 s aus und besitzt Leitfähigkeiten im Bereich von etwa 400 pS. Dieser Typ von Ionenkanal besitzt eine moderate Selektivität für Kalium gegenüber Chlorid (4,9:1) und verhält sich ohmisch, das heißt er ist weder gleichrichtend noch spannungsabhängig. Außerdem wurden bei diesen Kanälen häufig Unterleitwerte gefunden. Daneben finden sich noch Kanäle mit kürzeren Schaltzeiten und auch solche mit geringerer Leitfähigkeit, die unabhängig von den hauptsächlich gemessenen Kanälen schalten.

Tabelle 3.2: Vergleich der mittleren Leitfähigkeit der vorherrschenden Ionenkanäle aller untersuchten Arten. n = Anzahl der ausgewerteten Schaltereignisse.

Art	Leitfähigkeit (pS, Mittelwert \pm Standardabweichung)	n
<i>S. exigua</i>	395,7 \pm 40,2	11
<i>S. littoralis</i>	434,3 \pm 76,6	26
<i>H. armigera</i>	870,0	1
<i>T. ni</i>	566	2
<i>M. sexta</i>	285,0 \pm 114,0	8
<i>P. xylostella</i>	1161,4 \pm 83,5	7
<i>P. brassicae</i>	393,9 \pm 62,8	12
<i>P. rapae</i>	431,8 \pm 79,5	13

Das Vorkommen von Ionenkanälen beschränkt sich nicht nur auf das Regurgitat von *Spodoptera*. Auch außerhalb der *Noctuidae* wurden im Regurgitat von allen untersuchten Arten Ionenkanal-bildende Substanzen gefunden, die große prinzipielle Ähnlichkeit zu denen von *Spodoptera* aufweisen. Die untersuchten Arten reichen von der ursprünglichen Familie der *Plutellidae* mit *P. xylostella* bis zu Vertretern echter Schmetterlinge mit den Vertretern der *Piridae* (*P. rapae* und *P. brassicae*). Mit Ausnahme der von Regurgitat von *P. xylostella* erzeugten Ionenkanäle unterscheiden sich die der anderen untersuchten Arten nicht signifikant, *H. armigera* und *T. ni* wurden aufgrund mangelnder Stichproben in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt (Abbildung 3.18 und Tabelle 3.2). Unter den untersuchten Arten waren sowohl Nahrungsspezialisten für verschiedene Pflanzengattungen als auch polyphage Arten, welche mit Futter verschiedener Quellen herangezogen wurden. Es ließ sich bei den getesteten Futterquellen kein Einfluss der Ernährung auf das Vorkommen von Ionenkanal-bildenden Substanzen im Regurgitat nachweisen.

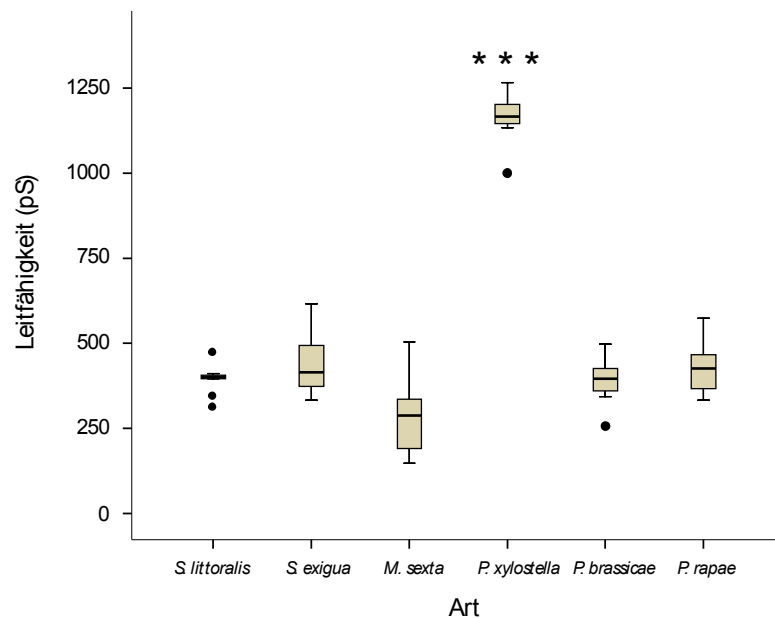


Abbildung 3.18: Vergleich der Leitfähigkeit von Ionenkanälen aus dem Regurgitat von Larven verschiedener Arten von Lepidopteren. Boxplot, •: Ausreisser, ***: $p < 0,001$, One-Way-ANOVA, Tamhane T2.

3.2. Aufreinigung der Ionenkanal-bildenden Aktivität aus Regurgitat

Die beiden Arten der Gattung Spodoptera, *S. littoralis* und *S. exigua*, waren als etablierte Modellorganismen in der Arbeitsgruppe auf regelmäßiger Basis vorhanden. Daher wurden diese gewählt, um die Aufreinigung der Ionenkanal-bildenden Substanz(en) aus dem Regurgitat der Larven dieser Arten durchzuführen.

3.2.1. Ultrafiltration

Bei der Ultrafiltration wurde das Regurgitat durch eine Membran mit definierter Porengröße filtriert, welche über Poren einer definierten Größe verfügt. Dadurch kommt es im Rückstand zu einer Anreicherung von Molekülen mit einer größeren Masse, bzw. einem größeren Durchmesser als die Poren. Im Durchlauf finden sich entsprechend die kleineren Moleküle, die die Membran passieren konnten.

Für die in Abbildung 3.19 gezeigten Aufnahmen eines Ionenkanals wurde Filtrat von Regurgitat von *S. exigua* eingesetzt, das durch Ultrafiltration mit einer Viva-spin-Zentrifugationssäule erzeugt wurde. Dabei wurde eine Viva-spin-Säule mit einem Größenausschluss von 5 kDa benutzt. Die aufgenommenen Kanäle entsprechen mit Leitwerten von 493 pS (± 47 pS) und in ihrem Erscheinen den üblicherweise in Regurgitat gefundenen Ionenkanälen. Darüberhinaus zeigt die Abbildung 3.4 ebenfalls einen Ionenkanal aus mit einem *cut-off* von 5 kDa filtrierten Regurgitat.

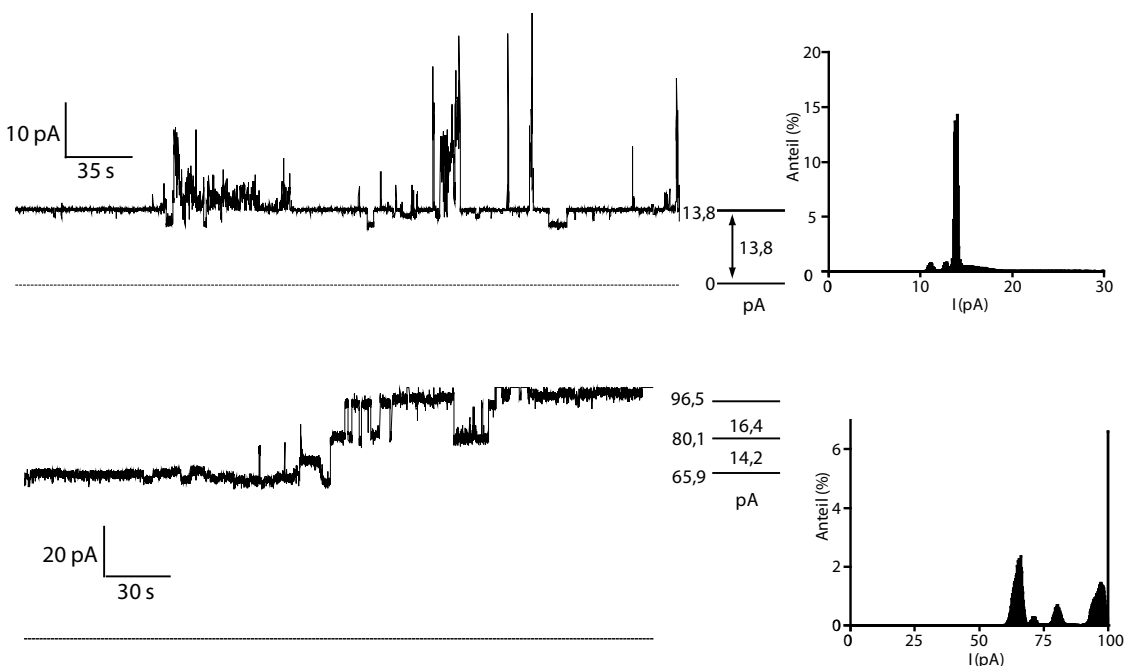


Abbildung 3.19: Ultrafiltration mit *cut-off* von 5 kDa: Regurgitat von *S. exigua*. 30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2.

Auch wenn die Angabe der 5 kDa als Ausschlussgröße nur ein ungefährender Wert ist und gerade bei Proteinen stark von der jeweiligen Faltung beeinflusst wird, kann man damit zumindest größere Proteine als Ursprung der Ionenkanäle ausschließen.

Darüber hinaus wurden auch noch Viva-spin-Säulen mit größerem *cut-off* benutzt, welche allesamt ebenfalls die typischen Ionenkanäle zeigten. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung bei einem Größenausschluss von 5 kDa, liefert aber keine zusätzliche Information zur Natur des Kanalbildners (nicht gezeigt).

3.2.2. Auftrennung mittels Gelfiltration (FPLC)

Als weitere Methode der Trennung von Substanzgemischen wurde eine Gelfiltration auf einer Superdex Peptide-Säule mit Hilfe des SMART-Systems durchgeführt. Dabei werden Substanzen mit einem Molekulargewicht kleiner als ca. 7 kDa der Größe nach getrennt.

Der Vergleich von Chromatogrammen verschiedener Peptide (Abbildung 7.5) zeigt, dass in A ist zu sehen ist, dass bei den gut wasserlöslichen Peptiden Aprotinin, Triglycylglycin und Glycylglycin eine sehr gute, den Größenverhältnissen entsprechende Trennung erfolgt und auch der nur zwei Aminosäuren große Unterschied zwischen Triglycylglycin und Glycylglycin ebenfalls bis zur Basislinie aufgelöst wird. Das lipophilere Peptid Gramicidin, verblieb länger auf der Säule und kommt erst dann von der Säule (52 min), wenn das sehr viel kleinere Triglycylglycin bereits eluiert ist (Abbildung 7.5 B). Der Grund für die sehr viel geringere Absorption von Gramicidin ist in der schlechten Löslichkeit in wässrigem Puffer begründet. Bei dem verwendeten Gramicidin handelt es sich um ein Ionenkanal-bildendes Peptidgemisch aus *Bacillus brevis* und wurde hier als Vergleichssubstanz benutzt, um das Verhalten auf der Säule in Relation zu hydrophilen Peptiden zu sehen. Die ähnlich amphiphilen Substanzen Cecropin A und Nystatin verhalten sich entsprechend.

Chromatogramm von Regurgitat

Es wurden 100 µl von Regurgitat von *S. littoralis* bzw. *S. exigua* für die Chromatographie eingesetzt und das in Abbildung 3.20 A, bzw. C gezeigte Chromatogramm erhalten. Zu Beginn ist eine ganze Reihe von Substanzen zu sehen, welche nicht oder nicht vollständig getrennt wurden. Zu späteren Zeitpunkten sind jedoch nur noch wenige Substanzen zu erkennen und die Trennleistung nimmt zu. Es wurden Fraktionen zu je 400 µl gesammelt.

Ionenkanal-bildende Aktivität nach Gelfiltrations-FPLC

Werden von der oben beschriebenen Gelfiltration des Regurgitats von *S. littoralis* (Abbildung 3.20 A) oder *S. exigua* (Abbildung 3.20 D) die gesammelten Fraktionen auf die Fähigkeit zur Kanalbildung in planaren Membranen hin untersucht, so findet man stets im Bereich von etwa 110-140 min die gesuchte Aktivität mit der üblichen Charakteristik (Abbildung 3.20 B und D). Die dabei erhaltenen Kanäle entsprechen mit einer Leitfähigkeit von etwa 360 pS (*S. littoralis*), bzw. 447 pS (*S. exigua*) den aus Regurgitat bekannten Werten. Nicht beobachtet hingegen wurden Ionenkanäle mit kleineren Leitfähigkeiten oder häufig schaltende Ionenkanäle. Um in den Fraktionen Ionenkanal-bildende Aktivität nachzuweisen, wurden 200 – 400 µl der Fraktion

in den BLM-Assay eingesetzt. Ursache hierfür ist unter anderem die geringe Kapazität der Säule. Dies wird gestützt durch die Beobachtung, dass im Durchfluss der Säule nach 20 min ebenfalls Aktivität nachgewiesen werden konnte, welche offensichtlich nicht in die Säule eingedrungen ist. Da die gesuchte Aktivität sehr spät von der Säule eluiert wurde, stellte die Überladung der Säule kein Problem für die Trennung dar.

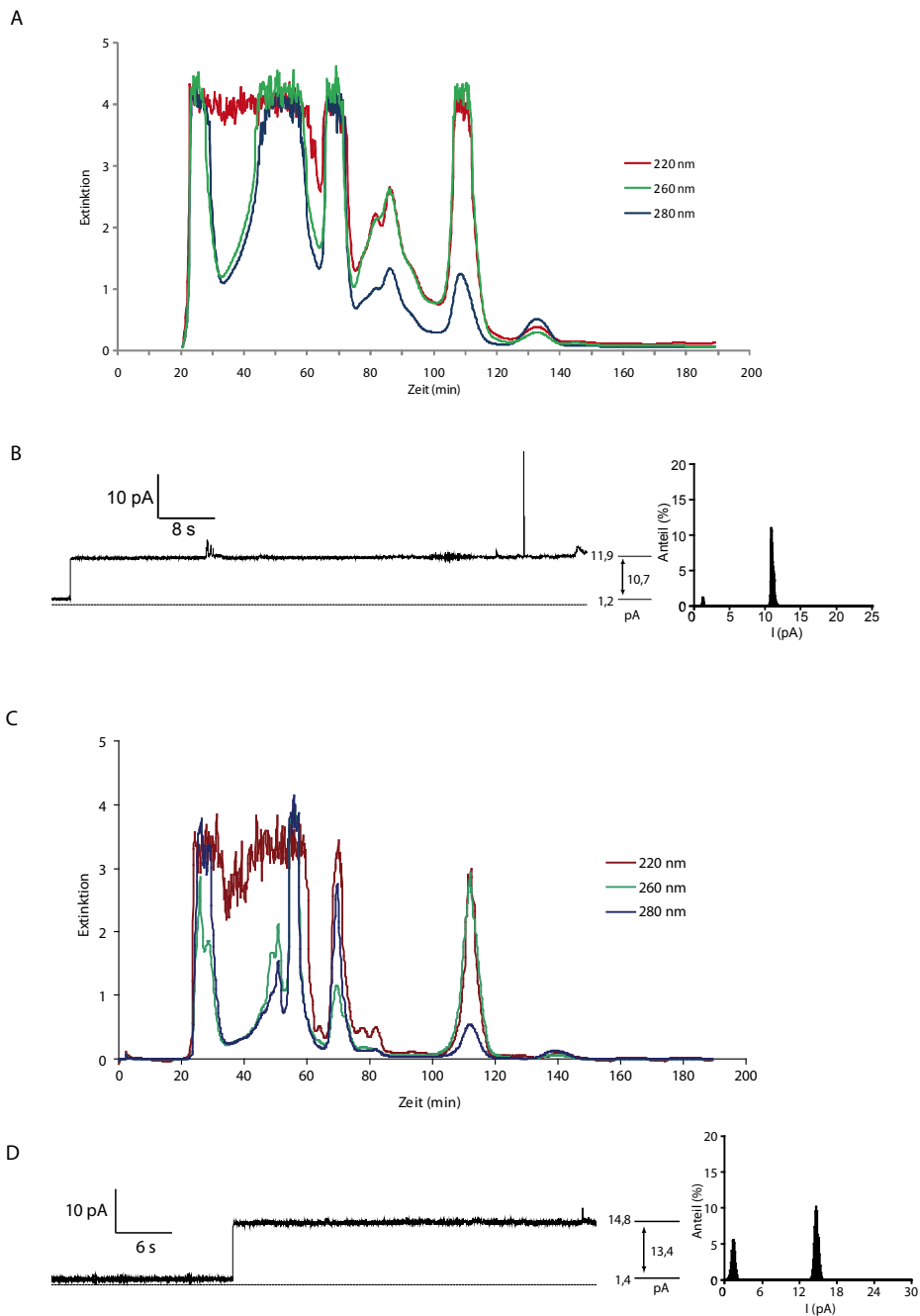
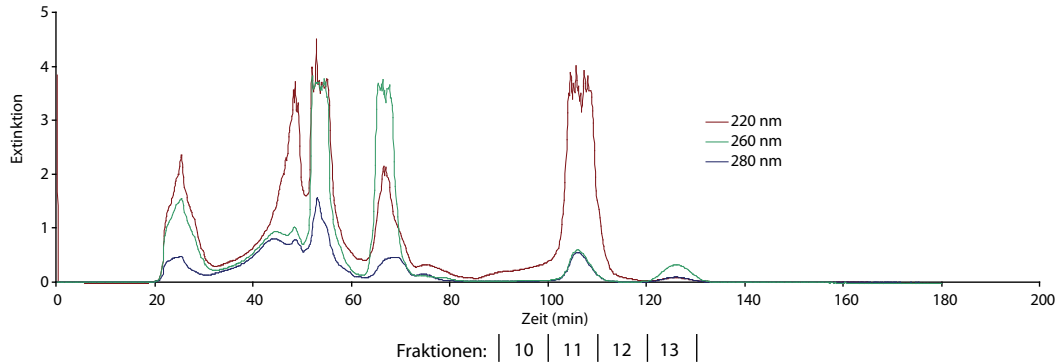


Abbildung 3.20: Gelfiltrationschromatogramm von Regurgitat und BLM-Analyse. A: Chromatogramm. 100 μ l Regurgitat von *S. littoralis*, Laufpuffer: 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2, 40 μ l/min, Superdex Peptide-Säule, SMART-System, Extinktion bei 220 nm (rot), 260 nm (grün) und 280 nm (blau) **B:** Aufnahme eines Ionenkanals aus der FPLC-Fraktion um 140 min. + 30mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. **C:** Chromatogramm. 100 μ l Regurgitat von *S. exigua*, Laufpuffer: 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2, 40 μ l/min, Superdex Peptide-Säule, SMART-System, Extinktion bei 220 nm (rot), 260 nm (grün) und 280 nm (blau) **D:** Aufnahme eines Ionenkanals aus der FPLC-Fraktion um 110 min., + 30mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2.

HPLC-Analyse der aktiven Fraktion

Die bei *S. exigua* im BLM-Assay aktiven Fraktionen der Gelfiltration mit der Superdex Peptide-Säule wurden zusammen mit den Nachbarfraktionen mittels LC/MS analysiert.

A



B

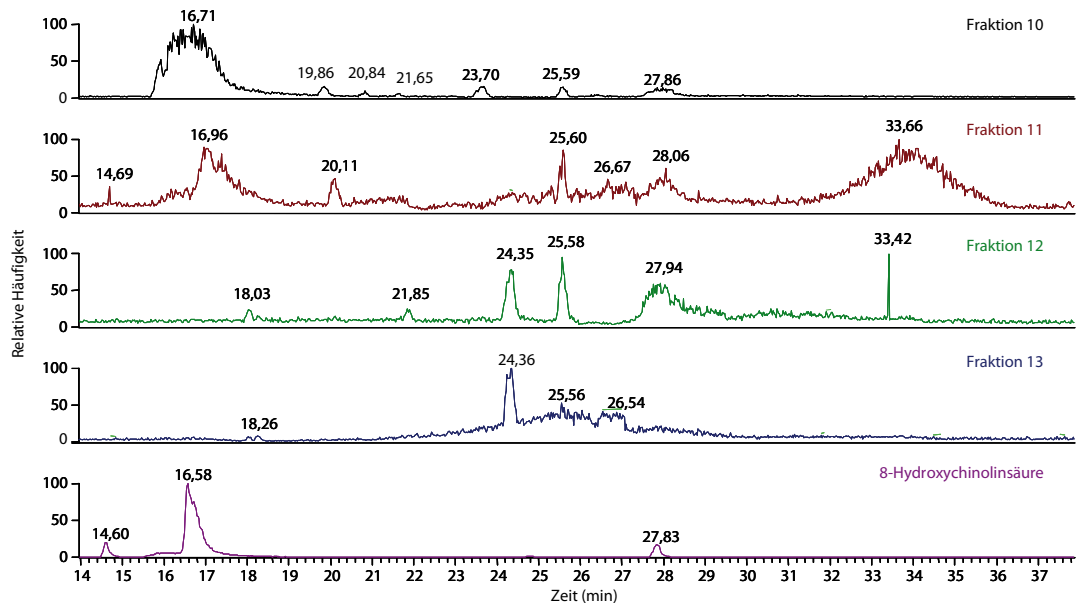


Abbildung 3.21: LC/MS-Analyse der Fraktionen aus der Gelfiltration. A: FPLC-Chromatogramm. 100 μ l Regurgitat von *S. exigua*, Laufpuffer: 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2, 40 μ l/min, Superdex Peptide-Säule, SMART-System, Extinktion bei 220 nm (rot), 260 nm (grün) und 280 nm (blau), mit HPLC untersuchte Fraktionen sind markiert. **B:** HPLC-Chromatogramme der FPLC-Fraktionen von A. Bereich m/z: 50-1500. Unten: Referenzsubstanz 8-Hydroxy-2-chinolinsäure.

Wie die Abbildung 3.21 B zeigt, enthalten die untersuchten Fraktionen noch eine ganze Reihe von Substanzen unterschiedlicher Massen. Die beobachteten m/z-Werte entsprechen nur zum Teil den in diesem Bereich des Chromatogramms zu erwartenden geringen Massenbereichen (Tabelle 7.1).

Identifikation von 8-Hydroxy-2-chinolinsäure

Zu den in den Fraktionen 10 und 11 enthaltenen Massen gehört 190 m/z. Diese Masse entspricht der Masse von 8-Hydroxy-2-chinolinsäure, $M = 189 \text{ g/mol} + \text{H}^+$.

8-Hydroxy-2-chinolinsäure ist ein Bestandteil von Regurgitat (Spiteller 2004) und neueren Studien zufolge als Eisenchelator wirkt (Funke 2008). Um zu überprüfen, ob es sich bei der Substanz mit der Masse 190 m/z in den Fraktionen 10 und 11 ebenfalls um 8-Hydroxy-2-chinolinsäure handelt, wurde unter denselben chromatographischen Bedingungen die Referenzsubstanz in der LC/MS untersucht. Die Abbildung 3.21 und Abbildung 3.23 zeigen jeweils den HPLC-Lauf von 8-Hydroxy-2-chinolinsäure im Vergleich zu den Fraktionen der Gelfiltration auf der FPLC. Die dabei ermittelten Retentionszeiten stimmen weitgehend überein. Die jeweils zugehörigen Massenspektren zeigen jedoch, dass in den FPLC-Fraktionen in dem betreffenden Zeitraum, in dem 8-Hydroxy-2-chinolinsäure eluiert, eine Reihe weiterer Substanzen enthalten sind (Tabelle 7.1).

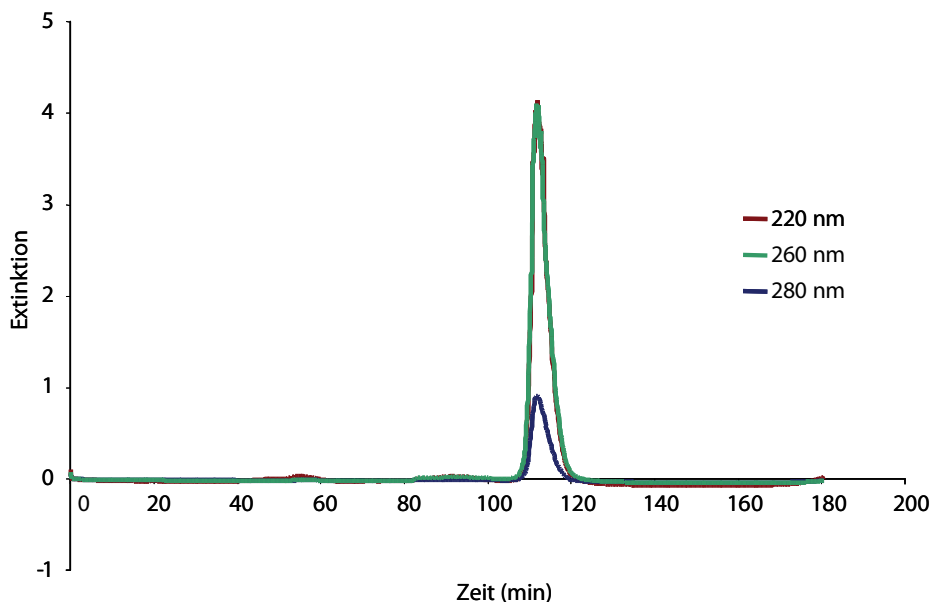


Abbildung 3.22: FPLC-Chromatogramm von 8-Hydroxy-2-chinolinsäure. 100 μl Hydroxychinolinsäure (250 $\mu\text{g/ml}$), Laufpuffer: 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris/HCl, pH 9,2, 40 $\mu\text{l/min}$, Superdex Peptide-Säule, SMART-System, Extinktion bei 220 nm (rot), 260 nm (grün) und 280 nm (blau).

Unterstützt wird dieser Befund durch die in Abbildung 3.23 C und D gezeigten Chromatogramme der FPLC-Fraktionen als DAD-Signal mit zugehörigen UV-Spektren. Daraus geht hervor, dass in den Fraktionen 10 und 11 der Gelfiltration 8-Hydroxy-2-chinolinsäure enthalten ist, nicht mehr jedoch in Fraktion 12 und 13.

Darüber hinaus eluiert 8-Hydroxy-2-chinolinsäure unter den oben beschriebenen Bedingungen in der Gelfiltration mit der Superdex Peptide-Säule zu dem erwarteten Zeitpunkt entsprechend den Fraktionen 10 und 11 (Abbildung 3.22).

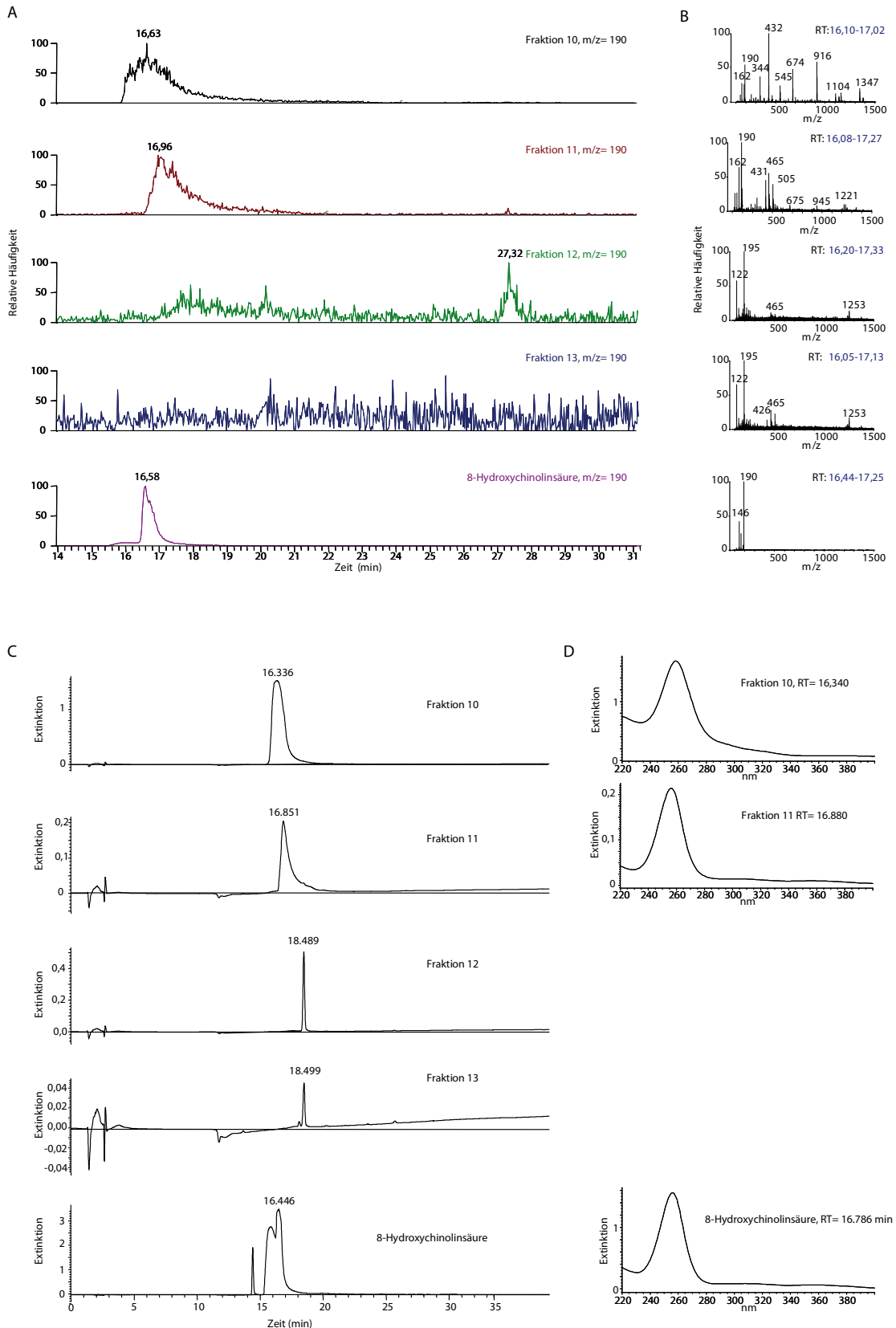


Abbildung 3.23: Identifikation von 8-Hydroxy-2-quinolinsäure mittels HPLC. A: HPLC/MS-Chromatogramme der FPLC-Fractionen von Abbildung 3.21. Ionenspur m/z: 190. Weiter nächste Seite. Unten: Referenzsubstanz 8-Hydroxy-2-quinolinsäure. **B:** Massenspektren zu den jeweils in A gezeigten Chromatogrammen der Retentionszeit von ca. 16-17 min. **C:** Chromatogramme wie A, aber als DAD-Signal 254 nm. **D:** Jeweils zu C gehörige UV-Spektren: 220-400 nm.

Der Vergleich der Referenzsubstanz mit den HPLC-Analysen der Fraktionen ergab, dass sowohl die Massenspektren als auch die UV-Spektren den Befund rechtfertigen, dass 8-Hydroxy-2-chinolinsäure zumindest in den FPLC-Fractionen enthalten ist, die bei *S. exigua* Ionenkanal-bildende Eigenschaften aufweisen.

Membranaktive Eigenschaften von 8-Hydroxy-2-chinolinsäure

Da sich 8-Hydroxy-2-chinolinsäure in den FPLC-Fractionen findet, die Ionenkanal-bildende Eigenschaften aufweisen, wurde 8-Hydroxy-2-chinolinsäure in BLM untersucht, ob diese Substanz ebenfalls Einfluss auf die Leitfähigkeit der künstlichen planaren Membranen hat.

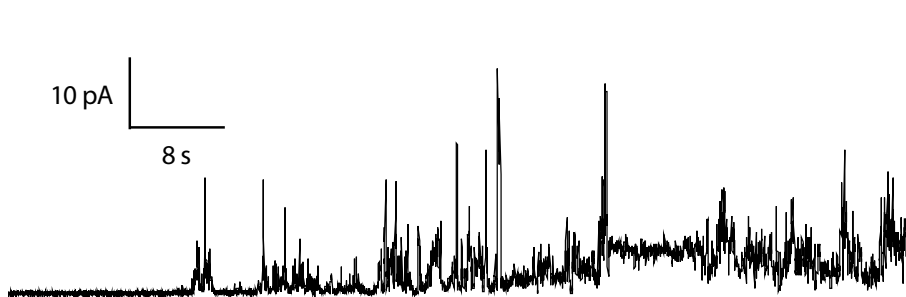


Abbildung 3.24: Effekt von 8-Hydroxy-2-chinolinsäure auf BLM. +30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. Endkonzentration ~0,5 mM 8-Hydroxy-2-chinolinsäure.

Die in etwa 60 % der Fälle (n=13) beobachtete Änderung der Leitfähigkeit durch 8-Hydroxy-2-chinolinsäure ist in Abbildung 3.24 exemplarisch gezeigt. Zu sehen ist eine Zunahme der Leitfähigkeit, die sich aber nicht auf einen bestimmten Leitwert beschränkt. 8-Hydroxy-2-chinolinsäure steigert in einer großen Anzahl von nicht aufgelösten, flickernden Schaltvorgängen die Leitfähigkeit soweit, dass die Membran instabil wird und zerreißt. In diesem Punkt ähnelt der Effekt dem von *N*-Linolenoylglutamin (siehe dort).

3.2.3. Extraktion von Regurgitat mit Dichlormethan

Kanalbildner müssen sowohl hydrophile wie auch hydrophobe Bereiche aufweisen, da sie sich zum einen im lipophilen Milieu im Innern der Membran aufhalten, gleichzeitig aber dort einen hydrophilen Kanal ausbilden, in dem die Ionen die Lipiddoppelschicht passieren können. Diese amphiphilen Eigenschaften wurden ausgenutzt, um die gesuchte Ionenkanal-bildende Aktivität aus dem Regurgitat von *S. littoralis* zu extrahieren. Dies geschah mit Hilfe von Dichlormethan, welches unter den nicht wassermischbaren organischen Lösungsmitteln vergleichsweise polare Eigenschaften besitzt.

Wie im Methodenteil beschrieben, wurde das Regurgitat mehrfach mit Dichlormethan extrahiert und anschließend im Stickstoffstrom abgeblasen. Der Rückstand wurde in Acetonitril aufgenommen und in BLM auf Ionenkanal-bildende Aktivität hin untersucht. Dabei konnte ebenfalls die gesuchte Kanal-bildende Aktivität wiedergefunden werden (Abbildung 3.25).

Ionenkanal-bildende Aktivität

Wurde mit Dichlormethan extrahiertes im BLM-Assay eingesetzt, so zeigten sich Ionenkanäle mit mittleren Leitwerten von 469 pS (± 108 pS, $n=6$). In Abbildung 3.25 sind einige dieser Aufnahmen gezeigt. Ebenfalls zu sehen sind alle oben beschriebenen Beobachtungen: Unterleitwerte (A), Leitwerte mit sehr langer Öffnungszeit (B) und auch Leitwerte mit geringer Leitfähigkeit (C). In der in C gezeigten Aufnahme schalten die beiden Leitwerte unabhängig voneinander. Zu Beginn der Aufnahme schaltet lediglich der Leitwert mit der geringeren Leitfähigkeit von 150 pS. Dessen Verweilzeiten im geöffneten Zustand sind mit 254 ms (± 258 ms) für den geöffneten Zustand und 81 ms (± 192 ms) für den geschlossenen Zustand in etwa halb so lang wie die Verweildauern des größeren Leitwerts mit 360 pS (Offen: 579 ms (± 607 ms), geschlossen: 151 ms (± 236 ms)), welcher später in der Aufnahme zusätzlich und unabhängig schaltet.

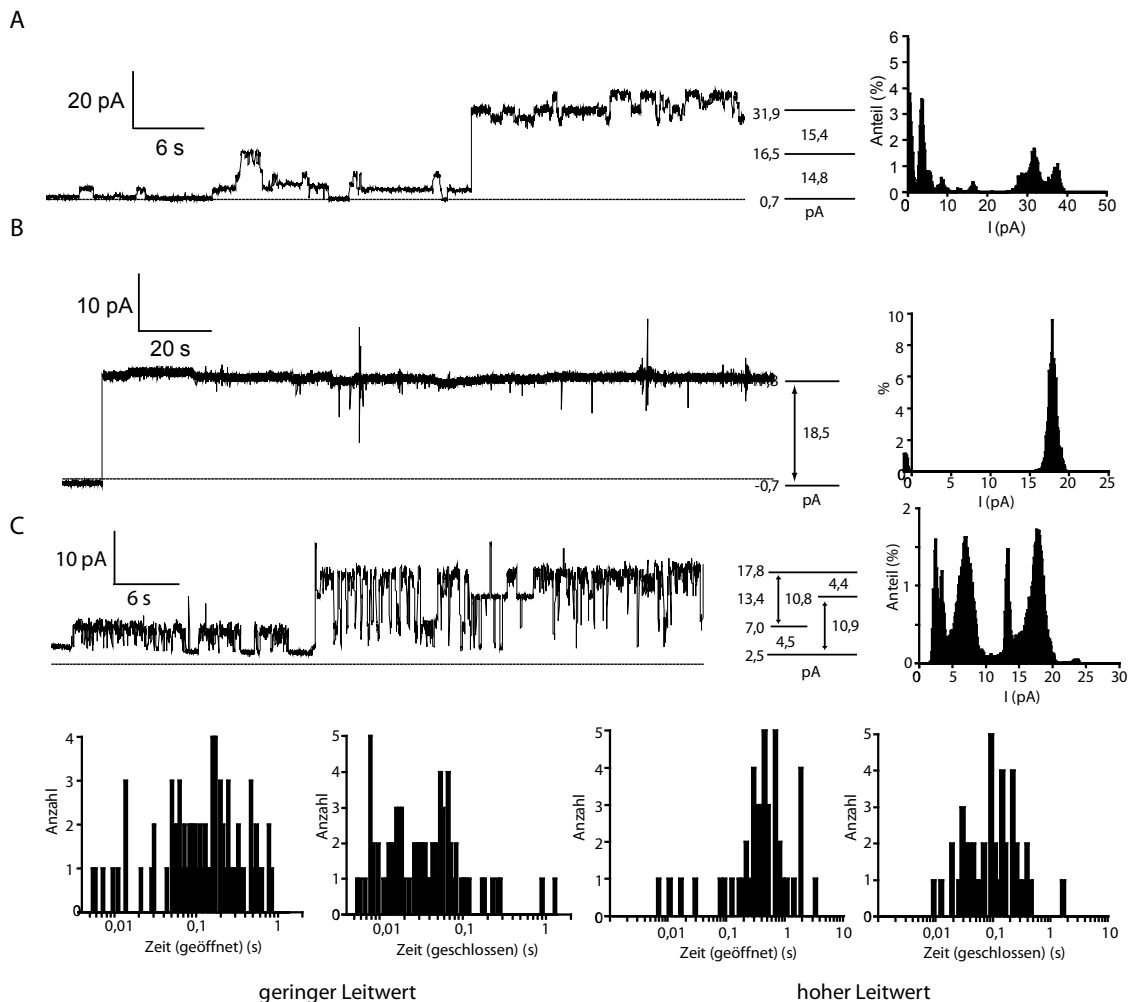


Abbildung 3.25: Ionenkanäle aus mit Dichlormethan extrahiertem Regurgitat von *S. littoralis*. +30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. **A** und **B**: Einzelkanalmessungen, Amplitudenhistogramm. **C**: Einzelkanalmessungen mit zwei verschiedenen Leitwerten, Amplitudenhistogramm und Histogramme für die Verweilzeiten im geschlossenen, bzw. geöffneten Zustand für den geringen (links) und hohen Leitwert (rechts).

Dieselben Eigenschaften zeigen sich, wenn der unter Stickstoff getrocknete Dichlormethanextrakt mit bidestilliertem Wasser versetzt wird und die entstehende Emulsion im BLM-Assay untersucht wird (Abbildung 7.6).

3.2.4. Anionenaustausch

Die in Abbildung 3.26 zu sehende Aufnahme wurde erhalten, nachdem Regurgitat von Larven von *S. littoralis* einem Anionenaustausch mit Amberlite IRA-400 unterzogen wurde. Das Eluat wurde im BLM-Assay untersucht und zeigte mehrere Kanalereignisse mit 377 pS, bzw. 200 pS und 180 pS für die kleineren Leitwerte. Ebenso sind einige nicht vollständig aufgelöste Schaltereignisse sowohl auf höhere wie auch auf niedrigere Leitwerte zu sehen. Insofern unterscheiden sich die durch Anionenaustausch isolierten Kanalbildner in ihren Eigenschaften nicht von denen in unbehandeltem Regurgitat.

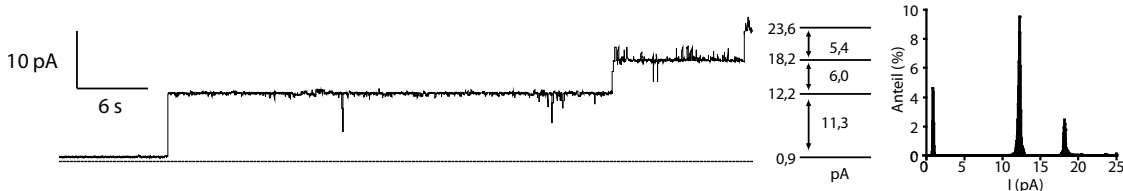


Abbildung 3.26: Ionenkanäle aus Eluat nach Anionenaustausch mit Amberlite IRA-400. Regurgitat von *S. littoralis*, + 30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2, Amplitudenhistogramm.

3.2.5. Aufreinigung mittels *reversed-phase* Pipettenvorsatzsäule

Nachdem Teile dieser Arbeit bereits veröffentlicht waren (Maischak *et al.* 2007) wurde von anderer Seite diese Ergebnisse im Wesentlichen bestätigt (Lühring *et al.* 2007). In dieser Arbeit wurde die Reinigung der Ionenkanal-bildenden Aktivität durch *reversed-phase* Pipettenvorsatzsäulen (ZipTip_{C18}) durchgeführt. Dabei wurden die amphiphilen Eigenschaften von Kanalbildnern ausgenutzt. Nach der Elution mit 50% Acetonitril wurde das Eluat im BLM-Assay untersucht. Zur Verifikation wurde diese Prozedur hier durchgeführt. Die Abbildung 3.27 zeigt die dabei erhaltenen Ionenkanäle. Zu sehen sind Leitwerte mit einer Leitfähigkeit von 377 pS und kleineren Leitwerten mit 100 pS, 160 pS bzw. 243 pS. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Leitwert von 160 pS um einen Unterleitwert des Leitwerts auf 23,7 pA handelt. Darüberhinaus sind eine Reihe von flickernden Öffnungereignissen beobachtet worden, die sich aber nicht auf ein gemeinsames Leitfähigkeitsniveau begeben haben.



Abbildung 3.27: Ionenkanäle nach Elution von *reversed-phase* ZipTip_{C18}-Säule. Regurgitat von *S. littoralis*, + 30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2, Amplitudenhistogramm.

3.2.6. Aufreinigung mittels HPLC

Wie bereits oben beschrieben, ist es möglich, die gesuchte Ionenkanal-bildende Aktivität aus Regurgitat von *S. littoralis*-Larven durch auf hydrophoben Wechselwirkungen basierenden Methoden zu isolieren. Um eine bessere Auftrennung bei gleichzeitiger Aufkonzentration der gesuchten Aktivität, wurde der DCM-Extrakt mittels HPLC/MS untersucht.

Ionenporenbildende Aktivität nach HPLC

Es konnte im Bereich von 32-34 min die gesuchte Ionenkanal-bildende Aktivität gefunden werden (Abbildung 3.28 F) mit Werten für die Leitfähigkeit von 320 pS bzw. 390 pS bei aufgelösten Einzelkanalereignissen. Das Chromatogramm zeigt in dem Bereich, in welchem auch die Ionenkanal-bildende Aktivität gefunden wurde, eine große Intensität an gemessenen Ionen (Abbildung 3.28 A).

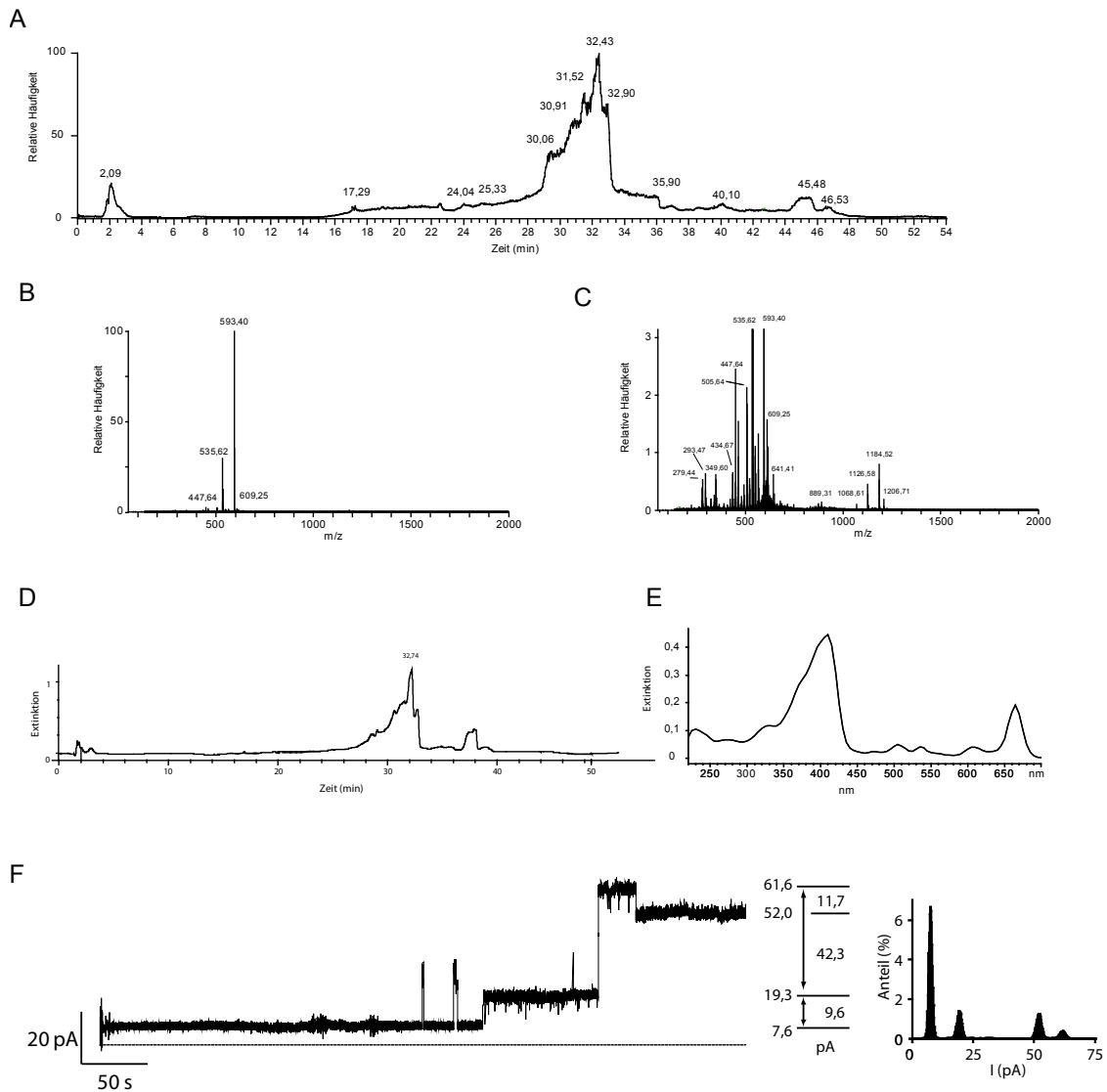


Abbildung 3.28: HPLC-Analyse des Dichlormethanextraktes von Regurgitat von *S. littoralis*. **A:** Chromatogramm. LC/MS 50-1500 m/z, Details siehe Material und Methoden. **B:** Massenspektrum von A im Zeitraum von 30-34 min. **C:** Vergrößerte Darstellung von A um Ionen mit niedriger Intensität deutlicher darzustellen.

Zu Abbildung 3.28 D: Chromatogramm wie A, jedoch DAD-Signal, 380 nm. **E:** UV-Spektrum zum Zeitpunkt 32,2 min. **F:** Aufzeichnung von Ionenkanälen nach Zugabe der Fraktion von A im Zeitraum von 32-34 min. + 30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2, Amplitudenhistogramm.

Im Massenspektrum dieses Bereichs sind zwei Ionen besonders stark vertreten. Die entsprechenden Massen-Ladungsverhältnisse sind $m/z = 593,40$ und $535,62$ (Abbildung 3.28 B). Wenn man die Ionen mit geringer Intensität mit in Betracht zieht, so findet man noch eine Reihe weiterer Massen (Abbildung 3.28 C), die im Anhang in Tabelle 7.2 aufgeführt sind. Einen weiteren Hinweis auf die Natur der Verbindungen in diesem Bereich des Chromatogramms erhält man durch das UV-Spektrum. Die Abbildung 3.28 D zeigt das Chromatogramm bei der Wellenlänge 380 nm, aufgezeichnet vom DAD. Im entsprechenden Bereich liefert der DAD ein UV-Vis-Spektrum mit Extinktionsmaxima von 410 nm und 665 nm. Eine identische Aktivität mit denselben Inhaltstoffen im Extrakt erhält man, wenn man den unter Stickstoff getrockneten Dichlormethanextrakt mit Wasser versetzt und die entstandene Emulsion mittels LC/MS untersucht (Abbildung 7.6).

Identifizierung von Phaeophorbid a

Aufgrund der molaren Masse (592 g/mol) der unbekannt Substanz und dem für Chlorophyll und dessen Derivate charakteristischem UV-Vis-Spektrum wurde Phaeophorbid a als möglicher Verursacher des Signals vermutet. Der Vergleich mit käuflich erworbener Referenzsubstanz ergab bei identischem m/z die identische Retentionszeit, hier auf einer Octylsäule, von 22,6 min, bzw. 22,8 min (Abbildung 3.29). Dies wurde hier direkt aus Regurgitat von *S. littoralis* gemessen, um auszuschließen, dass die Extraktion mit Dichlormethan einen Einfluss darauf hat. Zu der gegebenen Retentionszeit zeigen sowohl Phaeophorbid a als auch Regurgitat identische UV-Vis-Spektren mit Extinktionsmaxima bei 410 nm und 665 nm. Da sowohl Masse als auch Retentionszeit und UV-Vis-Spektren übereinstimmen, ist davon auszugehen, dass es sich bei der vorherrschenden Substanz in der HPLC-Fraktion, in der sich auch die Ionenkanal-bildende Substanz befindet, um Phaeophorbid a handelt.

Stellt man das LC/MS-Chromatogramm aus Abbildung 3.28 als Ionenspuren der Massen einiger bekannter Substanzen aus dem Regurgitat von *S. littoralis*-Larven dar, so sieht man, dass $m/z = 593$ von Phaeophorbid a die vorherrschende Substanz ist. Die in der FPLC-Gelfiltration mit der Ionenkanal-bildenden Aktivität co-eluierende Substanz 8-Hydroxy-2-chinolinsäure mit einem m/z von 190 wird zwar auch durch Dichlormethan aus dem Regurgitat angereichert, jedoch schon 15 min vor der Ionenkanal-bildenden Substanz von der Säule eluiert. Auch *N*-Linolenoylglutamin ($m/z = 407$) und *N*-Linoleoylglutamin ($m/z = 409$, nicht gezeigt) eluieren bereits zehn Minuten vor der gesuchten Aktivität (Abbildung 3.30).

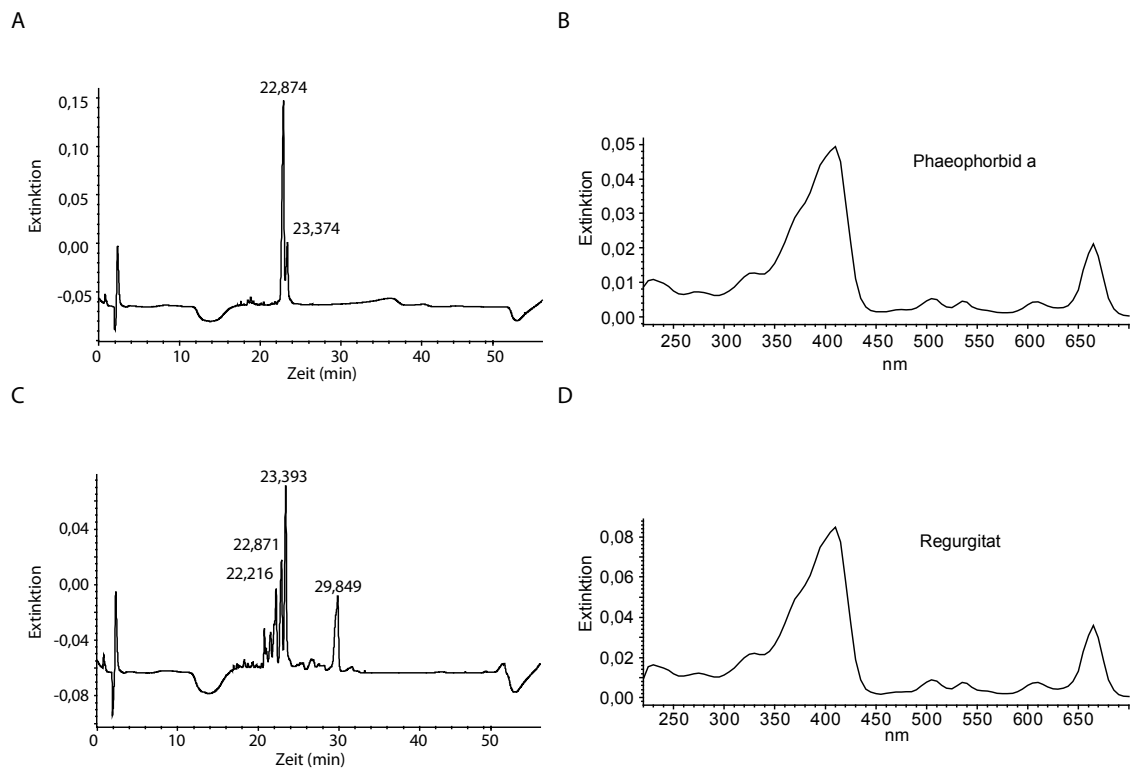


Abbildung 3.29: Vergleich der UV-Spektren von Phaeophorbid a mit Regurgitat von *S. littoralis*. HPLC-Säule: Octyl. **A:** HPLC-Chromatogramm von 50 µg/ml in Acetonitril Phaeophorbid a, DAD-Signal 380 nm. **B:** UV-Spektrum von A zum Zeitpunkt 22,6 min. **C:** HPLC-Chromatogramm von 10 µl Regurgitat von *S. littoralis*, DAD-Signal 380 nm. **D:** UV-Spektrum von C zum Zeitpunkt 22,8 min.

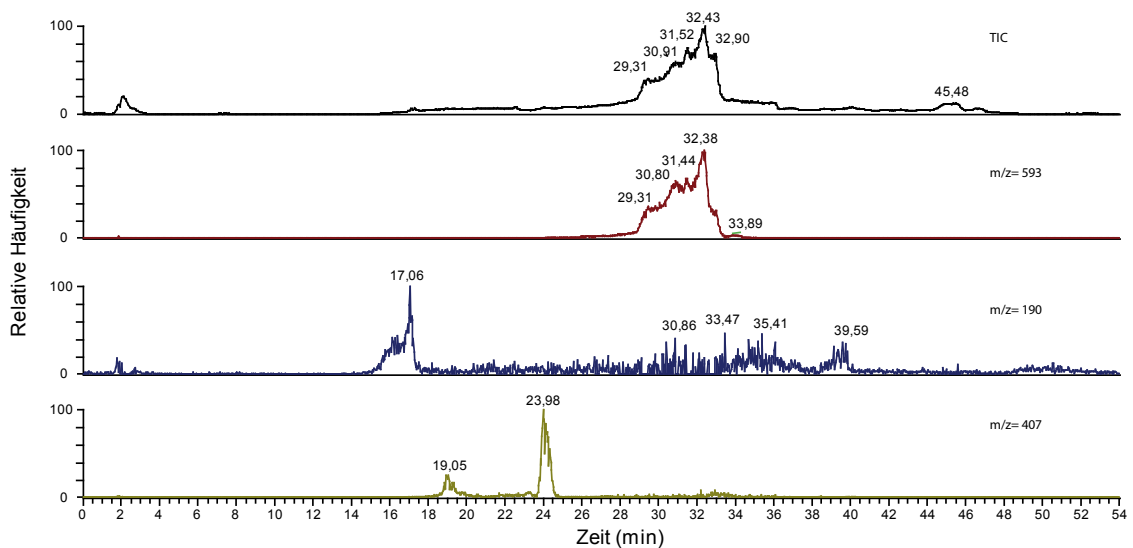


Abbildung 3.30: LC/MS-Chromatogramm mit Ionenspuren bekannter Substanzen. Bedingungen wie Abbildung 3.28. Von oben nach unten: Total Ion Current (TIC); $m/z=593$: Phaeophorbid a, Intensität $2,7 \cdot 10^8$; $m/z=190$: 8-Hydroxy-2-chinolinsäure, Intensität $3,0 \cdot 10^5$; $m/z=407$: *N*-Linolenoylglutamin, Intensität $6,0 \cdot 10^6$.

Quantifizierung von Phaeophorbid a

Der Gehalt an Phaeophorbid a wurde per LC/MS bestimmt, wobei als interner Standard Protoporphyrin IX in einer Konzentration von 5 mM sowohl dem Regurgitat als auch den Kalibrierlösungen zugesetzt wurde. Protoporphyrin IX ist eine Vorläufersubstanz aus dem Chlorophyllanabolismus und findet sich nicht in Regurgitat, weshalb es als interner Standard geeignet ist. Die Quantifizierung von 5 Proben von Regurgitat von *S. littoralis* ergab, dass im Mittel eine Konzentration von 34 $\mu\text{g/ml}$, bzw. 57 μM (\pm 94 μM Stabw.) gefunden wurde, wobei aber Extremwerte von 3,8 μM bis 225 μM auftraten.

Membranaktivität von Phaeophorbid a

Um den Effekt von Phaeophorbid a auf die Leitfähigkeit von künstlichen Membranen zu untersuchen, wurde die Substanz im BLM-Assay eingesetzt. Bei einer Endkonzentration von 100 μM Phaeophorbid a konnte ein Effekt auf die BLM festgestellt werden. Bei diesem Effekt handelt es sich aber nicht um die von Regurgitat bekannte Ionenkanal-bildende Aktivität. Der Effekt, der bei Phaeophorbid a beobachtet wird (Abbildung 3.31), ähnelt dem von *N*-Linolenoylglutamin oder 8-Hydroxy-2-chinolinsäure (siehe dort). Es treten hier ebenfalls keine definierten Leitwerte auf.

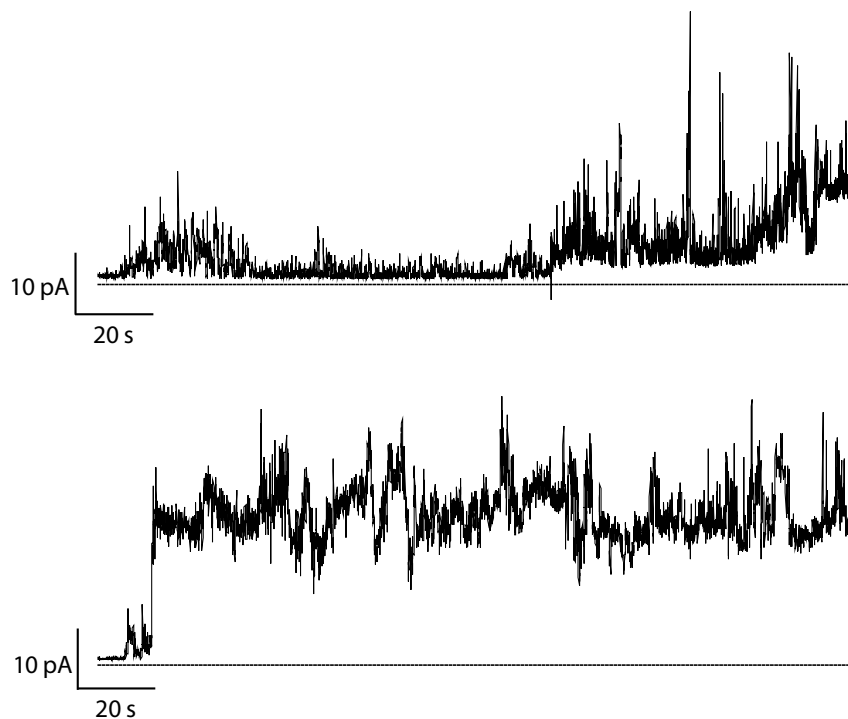


Abbildung 3.31: Einfluss von Phaeophorbid a auf die Leitfähigkeit von BLM. + 30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2, 100 μM Phaeophorbid.

3.2.7. Untersuchung des Dichlormethanextraktes und der Fraktionen der Gelfiltration mittels OrbiTrap-MS

Durch die Fraktionierung mittels Gelfiltration und dem Dichlormethanextrakt standen zwei auf verschiedenen Prinzipien basierende Methoden der Aufreinigung zur Verfügung. Jedoch lieferten beide Methoden lediglich Fraktionen mit einer großen Zahl an potenziellen Stoffen, die jedoch außer den angesprochenen Substanzen keine offensichtliche Überlappung aufwiesen. Um nach weiteren Kandidaten zu suchen, wurden die im BLM-Assay aktiven Fraktionen der Gelfiltration von Regurgitat von *S. littoralis* und der Dichlormethanextrakt (2 ml Regurgitat von *S. littoralis* wurden extrahiert und in einem Endvolumen von 100 µl konzentriert) in der Massenspektroskopie-Abteilung von Aleš Svatoš an diesem Institut mit der sehr empfindlichen OrbiTrap-MS untersucht. Der Vergleich ergab, dass sich in beiden Ansätzen ein Ion mit der einfach geladenen Masse $m/z = 943,5$ findet. Die genauere Untersuchung mittels ms^2 und ms^3 ergab Ionen mit der Massen $m/z = 781,5$ und $619,5$, was auf die sequentielle Abspaltung von Hexoseeinheiten hinweisen kann. Eine weitere Aufspaltung des Ions war aufgrund der Ionenintensität nicht möglich (persönliche Mitteilung A. Svatoš und R. Maddula).

Wenn man die Messungen der HPLC von Regurgitat oder des Dichlormethanextrakts davon auf diese Masse hin untersucht, so findet man, dass das $m/z = 943,5$ in einem Bereich zwischen 8-Hydroxy-2-chinolinsäure und *N*-Linolenoylglutamin eluiert und damit einige Minuten vor der BLM-aktiven Fraktion der HPLC von der Säule kommt (Abbildung 7.6). Dies erklärt zum einen, wieso dieses Ion bei der Analyse der aktiven HPLC-Fraktion nicht beachtet wurde, zum anderen scheidet damit dieses Ion als potenzieller Kandidat für die Ionenkanal-bildende Aktivität aus.

3.2.8. Zusammenfassung der Aufreinigung der Ionenkanal-bildenden Substanzen aus Regurgitat von Spodopteralarven

Es gelang, die Ionenkanal-bildende Aktivität aus dem Regurgitat von Spodoptera-Larven auf verschiedenen Wegen aufzureinigen. Zum einen ist es möglich, die gesuchten Substanzen durch Größenausschlussverfahren von Stoffen mit höheren Massen zu trennen. Die Ultrafiltration legt nahe, dass die gesuchte Substanz eine Masse kleiner als 5 kD besitzt, was durch die Gelfiltration mittels FPLC und Superdex Peptide-Säule bestätigt wurde. Entsprechend der Gelfiltration scheint die Masse erheblich kleiner als 5 kD zu sein, dem Vergleich mit Referenzsubstanzen nach sogar im niedermolekularen Bereich. Die LC/MS-Analyse zeigt aber, dass sich in diesem Bereich auch Stoffe mit einem m/z von über 1 kDa finden lassen.

Neben der Größe ließ sich auch das Löslichkeitsverhalten der Ionenkanal-bildenden Substanzen nutzen, um die gesuchte Aktivität aus dem Regurgitat abzutrennen. Dies gelang durch Extraktion mit Dichlormethan sowie durch *reversed phase*-HPLC, wobei die gesuchte Aktivität in der HPLC bei relativ hohen Anteilen an Acetonitril von der Säule eluierte.

Bei beiden Trennungsprinzipien wurden mit der gesuchten Aktivität auch andere Substanzen mit aufgereinigt, wobei es bei einigen davon möglich war, diese zu identifizieren. Weder 8-Hydroxy-2-chinolinsäure noch Phaeophorbid a sind jedoch für die typischen Ionenkanäle verantwortlich, die man nach Zugabe von Regurgitat zu *black lipid membranes* erhält.

Darüber hinaus wurden in den aktiven Fraktionen von FPLC und HPLC durch Massenspektrometrie keine gemeinsamen Ionen gefunden, die auf einen Kandidaten für die gesuchten Ionenkanal-bildenden Substanzen hinweisen könnten.

3.3. Untersuchungen zu anderen Substanzen

In diesem Abschnitt werden Untersuchungen mit anderen, bereits bekannten Substanzen aus dem Regurgitat von Spodopteralarven beschrieben. Diese wurden zwar nicht im Zusammenhang mit der Aufreinigung der Ionenkanal-bildenden Substanzen gefunden, sind aber trotzdem wichtig für die Perzeption durch die Pflanze.

3.3.1. *N*-Linolenoylglutamin

Fettsäure-Aminosäure-Konjugate wie z. B. Volicitin oder *N*-Linolenoylglutamin sind bekannte Bestandteile von Regurgitat mit der Fähigkeit, in Pflanzen Abwehrreaktionen auszulösen (Spiteller 2004). Wobei die Reaktion zumindest teilweise auf der Interaktion von Volicitin und einem Protein der Plasmamembran (Truitt *et al.* 2004) beruht. Jedoch werden diesen Detergenz-artigen Substanzen auch Wirkungen in der Abwehr von Ameisen zugesprochen (Rostas und Blassmann 2009).

Membranaktivität

Die amphiphile Struktur von *N*-Linolenoylglutamin verleiht der Substanz oberflächenaktive Eigenschaften. Wie diese auf BLM wirken und ob dieser Effekt den Beobachtungen mit Regurgitat entspricht wurde im BLM-Assay untersucht.

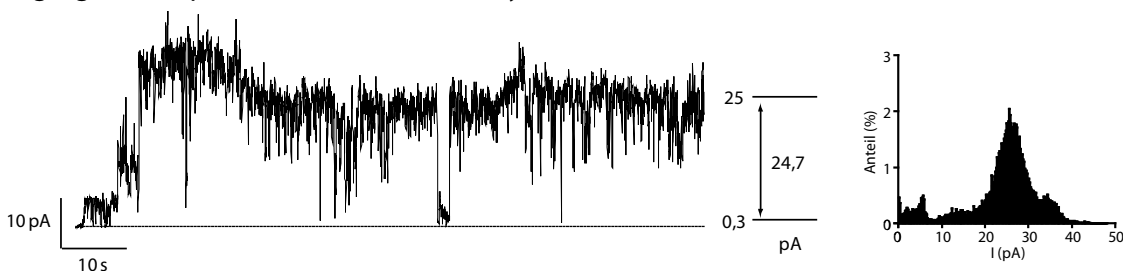


Abbildung 3.32: Einfluss von *N*-Linolenoylglutamin auf die Leitfähigkeit von BLM. + 30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2, 74 μ M *N*-Linolenoylglutamin.

Abbildung 3.32 zeigt die Veränderung der elektrischen Leitfähigkeit von BLM nach Zugabe von Linolenoylglutamin zu einer Endkonzentration von 74 μ M (30 μ g/ml). Wie schon oben bei 8-Hydroxy-2-chinolinsäure und Phaeophorbid a beschrieben, zeigt Linolenoylglutamin keine definierten Leitwerte, die über längere Zeit gehalten werden oder auf welche nach Schaltereignissen zurückgekehrt wird, wie man sie von Regurgitat kennt. Stattdessen werden

viele flickernde Schaltereignisse beobachtet, die sich zu einem gemeinsamen Leitwert addieren. Die Leitfähigkeit variiert in einem breiten Bereich um den Mittelwert und steigt mit der Zeit häufig bis zum Zerreißen der Membran an.

Einfluss der Konzentration von *N*-Linolenoylglutamin auf die Stabilität der BLM

Da die Membran durch *N*-Linolenoylglutamin destabilisiert wird, wurde untersucht, wie sich die Konzentration von *N*-Linolenoylglutamin auf die Stabilität der planaren Lipiddoppelschicht auswirkt.

Dazu wurde bei verschiedenen Konzentrationen von *N*-Linolenoylglutamin die über die Membran angelegte Spannung schrittweise erhöht, bis die Membran kollabierte.

Entsprechend der Erwartung nahm mit zunehmender Konzentration von *N*-Linolenoylglutamin die Spannung ab, die nötig war, um die Membran zu zerstören. Ab einer extrapolierten Konzentration von etwa 47 $\mu\text{g/ml}$ (115 μM) wäre die Membran auch ohne angelegte Spannung instabil. Dieser Versuch wurde mit vergleichsweise großen Öffnungen (Durchmesser etwa 0,8 mm) zwischen den Kompartimenten und dadurch großen Membranen durchgeführt. Bei kleineren Öffnungen von etwa 0,5 mm Durchmesser stieg aufgrund der erhöhten Stabilität der Membran entsprechend die extrapolierte Konzentration, ab der die Membran instabil wurde, auf etwa 213 μM an (nicht gezeigt).

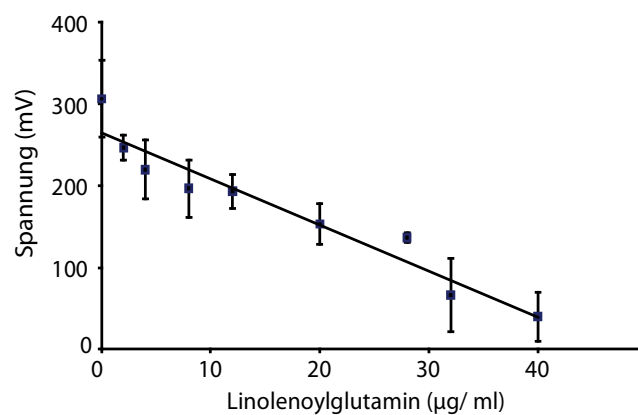


Abbildung 3.33: Korrelation der *N*-Linolenoylglutaminkonzentration und der Membranstabilität. 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2, n=3.

Membranaktivität von Gemischen von *N*-Linolenoylglutamin und Phaeophorbid a

Sowohl *N*-Linolenoylglutamin als auch Phaeophorbid a haben eine destabilisierende Wirkung auf BLM. Da beide Substanzen gemeinsam im Regurgitat von *S. littoralis*-Larven vorkommen, wurde untersucht, ob diese Stoffe im Gemisch eine von den Einzelsubstanzen abweichende Wirkung auf planare Lipiddoppelschichten haben.

Hierzu wurde ein Gemisch von *N*-Linolenoylglutamin und Phaeophorbid a im BLM-Assay eingesetzt (Abbildung 3.34). Die dabei aufgezeichneten Änderungen in der Leitfähigkeit der

Membran weisen in Teilen die oben beschriebenen Effekte auf. Es gibt jedoch Bereiche, in denen sich Ähnlichkeiten zu Ionenkanälen erkennen lassen. So gibt es in der Aufnahme in Abbildung 3.34 A einen Bereich, in dem über einen Zeitraum von etwa 20 s die Leitfähigkeit auf etwa 1170 pS beträgt. Auch sind in diesem Bereich Schaltereignisse zu sehen, die zu einem partiellen Schließen führen. Dabei wird aber nicht ein einheitliches Unterniveau erreicht, wie man es von Ionenkanälen typischerweise kennt. Dass es sich dabei um zeitlich nicht aufgelöste Schaltereignisse handelt ist auszuschließen, da die mittlere Zeit im geschlossenen Zustand 200 ms (\pm 205 ms) beträgt und die minimale Dauer mit 9 ms deutlich über der in diesem Fall 1 ms betragenden *sampling rate* liegt.

Die Abbildung 3.34 B zeigt auch relativ stabile Leitfähigkeitswerte über längere Zeiträume, jedoch ohne partielles Schließen oder scharfe Schaltvorgänge. Interessant ist der in Abbildung 3.34 C im Detail gezeigte Bereich von B. Dort sieht man diskrete Schaltvorgänge auf verschiedene Niveaus und Unterleitwerte mit einem Hauptleitwert von etwa 980 pS. Jedoch sind diese Schaltvorgänge nicht so scharf wie bei den aus Regurgitat bekannten Aufnahmen von Ionenkanälen. Auch wird das Leitfähigkeitsniveau über den vergleichsweise kurzen Zeitraum von insgesamt 13 s nicht sehr gut gehalten und unterliegt Schwankungen. Ein Gemisch aus Phaeophorbid a, *N*-Linolenoylglutamin und 8-Hydroxy-2-chinolinsäure verhält sich ähnlich wie die Gemische aus *N*-Linolenoylglutamin und Phaeophorbid a (nicht gezeigt). Daher und aus der Tatsache, dass in den aktiven HPLC-Fractionen lediglich Phaeophorbid a und in den Ionenkanal-bildenden Fractionen der Gelfiltration nur 8-Hydroxy-2-chinolinsäure zu finden sind, ist es unwahrscheinlich, dass es sich im Regurgitat, um Ionenkanäle handelt, die sich durch Zusammenlagern von *N*-Linolenoylglutamin und Phaeophorbid a bilden.

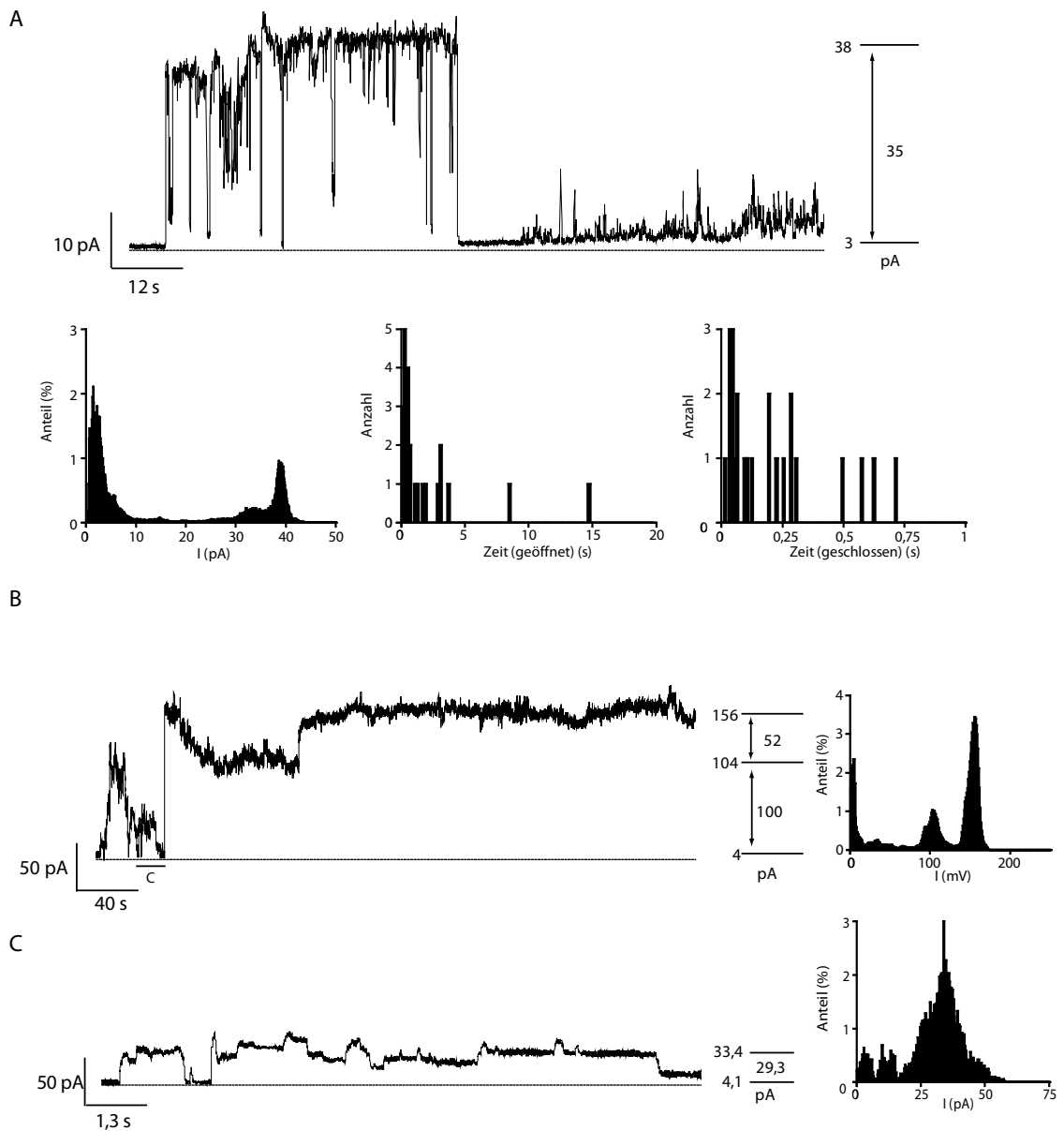


Abbildung 3.34: Einfluss von Gemischen von *N*-Linolenoylglutamin und Phaeophorbid a auf BLM. + 30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2, **A:** Aufnahme eines Gemisches von *N*-Linolenoylglutamin (25 μ M) und Phaeophorbid a (17 μ M), Amplitudenhistogramm, Histogramme für die Verweilzeiten im offenen bzw. geschlossenen Zustand. **B:** Aufnahme eines Gemisches von *N*-Linolenoylglutamin (2,5 μ M) und Phaeophorbid a (1,7 μ M), Amplitudenhistogramm. **C:** Detail von B, Amplitudenhistogramm.

3.3.2. Inceptin

Bei Inceptin handelt es sich um ein Peptid, das aus dem Regurgitat von *Spodoptera frugiperda* isoliert wurde (Schmelz *et al.* 2006). Inceptin (+ICDINGVCVDA-) ist in der Lage, bei *Vigna unguiculata* Abwehrreaktionen zu induzieren. Der Ursprung dieses Peptids ist die γ -Untereinheit der plastidären F_1F_0 -ATP-Synthase, welche durch spezifische Proteolyse im Verdauungstrakt von *Spodoptera frugiperda* entsteht. Es enthält zwei Cysteinreste, welche durch Oxidation eine Disulfidbrücke ausbilden und so abhängig von der Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten die ATP-Hydrolyse durch die plastidäre F_1F_0 -ATP-Synthase bei Nacht verhindert. Dieser Redox-Regulationsmechanismus ist ausschließlich auf Pflanzen und dort auf die plastidäre F_1F_0 -ATP-Synthase beschränkt. *Vigna unguiculata* ist, neben anderen, in der Lage, diese Peptide in femtomolaren Konzentrationen zu erkennen und durch Produktion von Ethylen, Jasmonsäure und Salicylsäure darauf zu reagieren.

Da der Großteil der Versuche in dieser Arbeit *P. lunatus* als Versuchspflanze benutzt, wurde ein aus der Sequenz der γ -Untereinheit der plastidären F_1F_0 -ATP-Synthase von *Phaseolus vulgaris* abgeleitetes Peptid benutzt (Schmelz *et al.* 2006). Das Peptid mit der Sequenz +ICDVNGVCIDA- wurde von der Firma JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin mit einer Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinresten synthetisiert.

Membranaktivität

Die Publikation von Schmelz *et al.* (2006) schlägt zwar eine Rezeptor-vermittelte Perzeption von Inceptin vor, um aber sicher zu gehen, dass nicht auch eine Membran-vermittelte Wirkung möglich ist, wurde synthetisches Inceptin im BLM-Assay untersucht. Inceptin wurde in einer Konzentration von bis zu 0,85 $\mu\text{g/ml}$ (760 nM) Endkonzentration eingesetzt – einem Vielfachen der in Pflanzen aktiven Konzentration - und in keinem Fall ($n=6$) wurde eine Veränderung der Leitfähigkeit der *black lipid membrane* beobachtet (nicht gezeigt).

Duftinduktion

Es wurden in einem Biotest abgeschnittene Pflanzen von Limabohne in eine Lösung von Inceptin mit einer Endkonzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ (etwa 1,8 μM), bzw. 0,2 $\mu\text{g/ml}$ gestellt und für 24 h die emittierten Duftstoffe durch *closed-loop stripping* mit Aktivkohlefilter gesammelt. Die Analyse der eluierten Duftstoffe durch GC/MS ergab bei den verwendeten Konzentrationen von Inceptin keine Induktion der Duftproduktion, die über der basalen Duftemission der Kontrollpflanzen in Leitungswasser ohne Inceptin liegt (Abbildung 3.35).

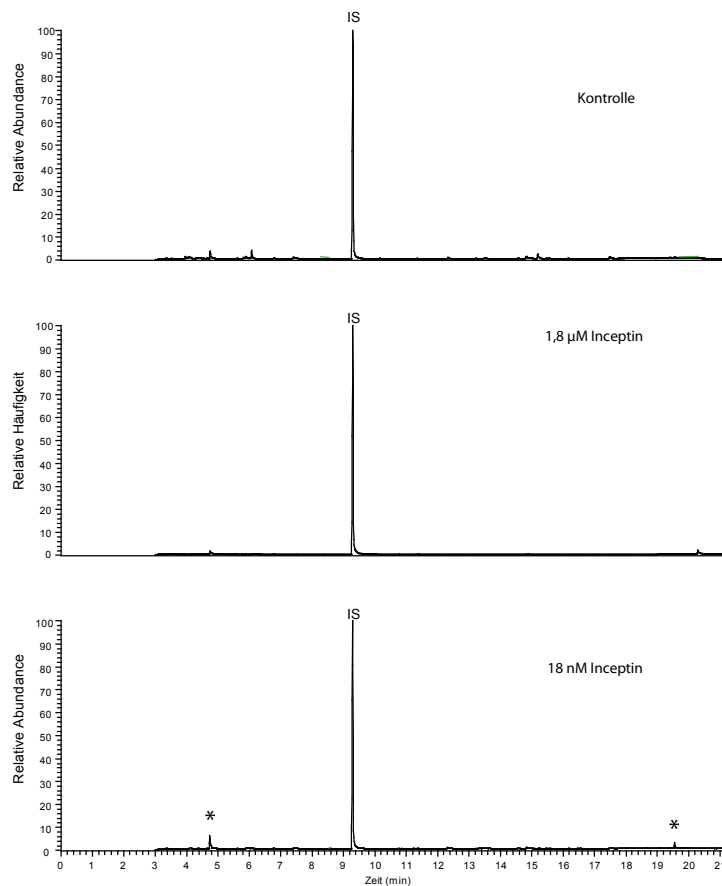


Abbildung 3.35: GC-MS-Analyse der Duftstoffe von *P. lunatus* nach Zugaben von Inceptin. Gaschromatogramme von Duftstoffen der Limabohne nach Induktion mit 1,8 μM Inceptin (Mitte), 18 nM Inceptin (unten) und Kontrolle (Leitungswasser, oben). *: Weichmacher, IS: Interner Standard, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ n-Bromdekan, Exemplarische Aufnahmen von $n=3$.

Veränderung der cytosolischen Calciumkonzentration durch Inceptin

Die Zugabe von Inceptin zu Äquorin-exprimierenden Zellen von *Glycine max* zur Bestimmung des Einflusses auf den cytosolischen Calciumspiegel ergab, dass Inceptin mit der Sequenz +ICDVNGVCIDA- die cytosolische Calciumkonzentration nicht steigert, zumindest im untersuchten Zeitraum nach der Zugabe. Ursache dafür könnte sein, dass das verwendete Inceptin, wie oben erwähnt, aus der vorhergesagten Sequenz für das Inceptin von *P. vulgaris* synthetisiert wurde und nicht mit dem postulierten Rezeptor (Schmelz *et al.* 2006) der Sojabohne interagiert.

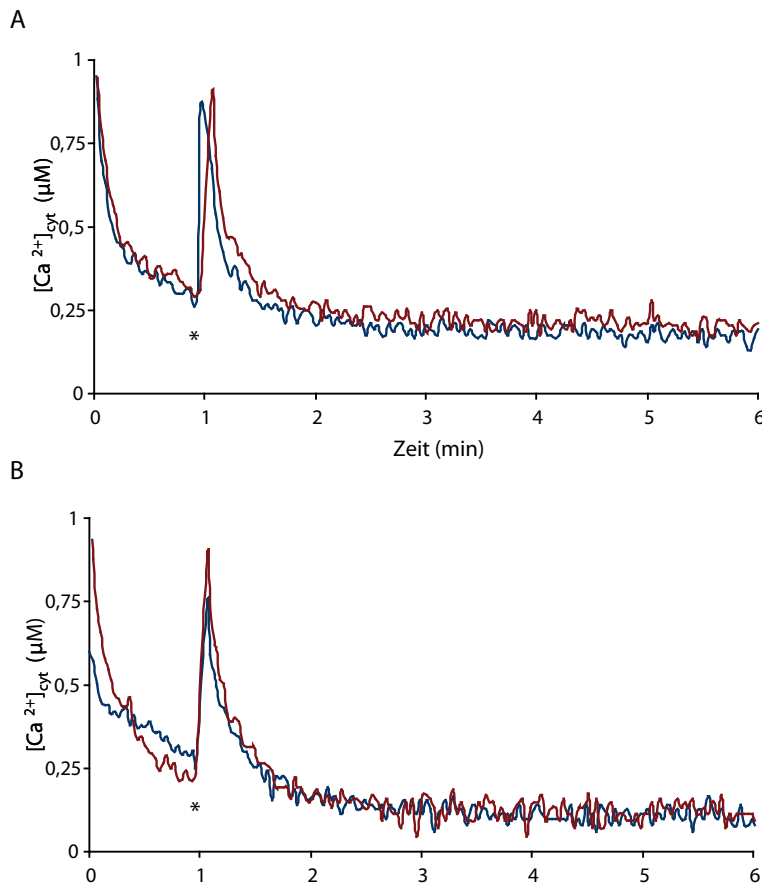


Abbildung 3.36: Veränderung der cytosolischen Calciumkonzentration nach Zugabe von Inceptin Zugabe zum angegebenen Zeitpunkt (*) von 5 µl wässriger Inceptinlösung (rote Linie), bzw. 5 µl Wasser (Kontrolle, blaue Linie). A: Inceptin von *P. vulgaris*, Stammlösung 37 µg/ml, Endkonzentration 3,3 fM. B: Inceptin aus der Sequenz von *A. thaliana* abgeleitet, Exemplarische Aufnahme von n=3.

3.4. Physiologische Untersuchungen

In diesem Abschnitt sind einige pflanzenphysiologische Experimente geschildert, die den Bezug zwischen den Messungen im künstlichen System – den *black lipid membranes* – und der Reaktion der lebenden Zelle, bzw. Pflanze beleuchten sollen.

Zum einen wurde untersucht, wie sich der cytosolische Calciumgehalt der von Pflanzenzellen nach Kontakt mit Regurgitat bzw. Ionenkanal-bildenden Substanzen ändert.

Außerdem wurde untersucht, wie die Pflanze als System auf die potenziell Membranpotenzial-verändernden Kanalbildner reagiert.

3.4.1. Messung der Veränderung der zellulären Calciumkonzentration

Calciumionen sind ein wichtiger *second messenger* in der Signalübertragungskaskade von Pflanzen (Sanders *et al.* 2002). Ausgelöst werden Veränderungen der Calciumkonzentration in verschiedenen Kompartimenten u. a. durch abiotischen Stress, verschiedene Elizitoren, Phytohormone (Lecourieux *et al.* 2006) sowie Herbivorie (Maffei *et al.* 2004).

Veränderung der cytosolischen Calciumkonzentration durch Regurgitat

Da die Änderung der cytosolischen Calciumkonzentration nach Herbivorie stärker ausfällt als nach mechanischer Verwundung (Maffei *et al.* 2004), liegt es nahe, die Ursache hierfür in der chemischen Komponente, nämlich dem Regurgitat, zu suchen.

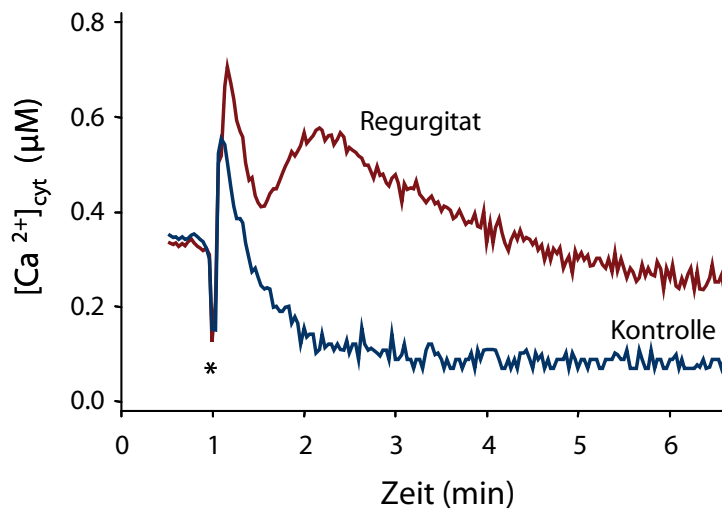


Abbildung 3.37: Veränderung der cytosolischen Calciumkonzentration nach Zugabe von Regurgitat von *S. littoralis*. Zugabe zum angegebenen Zeitpunkt (*) von 5 µl Regurgitat (rote Linie), bzw. 5 µl Wasser (Kontrolle, blaue Linie). Exemplarische Aufnahmen von n=3.

Nach Zugabe von Regurgitat zu den Äquorin-transformierten Zellen sieht man nach etwa 40 s einen vom Kurvenverlauf der Kontrolle abweichenden Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration. Das Maximum von etwa 0,5 µM über dem Kontrollwert wird nach etwa 75 s nach Zugabe erreicht (Abbildung 3.37).

Es ist bekannt, dass *N*-Linolenoylglutamin (Maffei *et al.* 2004) als Bestandteil des Regurgitats von *Spodoptera*-Larven in der Lage ist, die cytosolische Calciumkonzentration zu erhöhen und gegebenenfalls in der Lage ist, den oben beschriebenen Effekt allein oder synergistisch mit anderen Substanzen zu verursachen.

Veränderung der cytosolischen Calciumkonzentration durch den Dichlormethanextrakt von Regurgitat von *S. littoralis*

Um zu klären, ob die im Dichlormethanextrakt von Regurgitat von *S. littoralis* enthaltenen Ionenkanal-bildenden Substanzen – oder die vorherrschenden Substanzen wie Phaeophorbid a oder Pyropheophorbid a - in der Lage sind, eine Veränderung in der cytosolischen Calciumkonzentration zu bewirken, wurde dieser Extrakt mit Äquorin-exprimierenden Pflanzenzellen untersucht. Für diesen Versuch wurde 1 ml Regurgitat von *S. littoralis* dreimal mit Dichlormethan extrahiert, unter Stickstoffstrom getrocknet und in 100 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen. Von der resultierenden Emulsion wurden 5 µl im Test eingesetzt. Wie in Abbildung 3.38 zu sehen ist, erfolgt in dem Zeitraum, der nach Zugabe von Regurgitat zu einer Erhöhung der Calciumkonzentration im Cytoplasma führt, nach Zugabe von DCM-Extrakt von Regurgitat keine Zunahme der cytosolischen Calciumkonzentration.

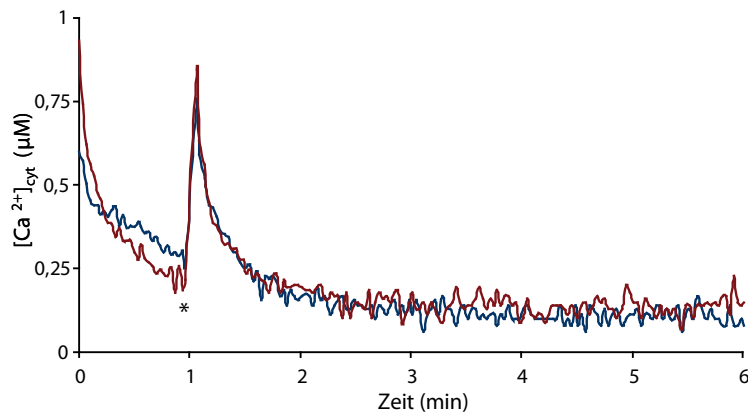


Abbildung 3.38: Veränderung der cytosolischen Calciumkonzentration nach Zugabe von wässrigem DCM-Extrakt von Regurgit von *S. littoralis*. Zugabe zum angegebenen Zeitpunkt (*) von 5 μl wässriger DCM-Extrakt von Regurgit (rote Linie), bzw. 5 μl Wasser (Kontrolle, blaue Linie). Exemplarische Aufnahmen von $n=3$.

Nachdem der DCM-Extrakt sowohl 8-Hydroxy-2-chinolinsäure, Phaeophorbid a, Pyropheophorbid a, *N*-Linolenoylglutamin enthält, kann man schließen, dass die genannten Substanzen sowie die Ionenkanal-bildende Substanz nicht für den cytosolischen Calciumanstieg verantwortlich ist, den man nach Zugabe von Regurgit beobachtet. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass der Dichlormethanextrakt höher konzentriert ist als das Regurgit.

Veränderung der cytosolischen Calciumkonzentration durch Alamethicin und Gramicidin

Zwar wurde mit dem Dichlormethanextrakt keine Veränderung der cytosolischen Calciumkonzentration gemessen, jedoch sollte ohne den Hintergrund begleitender Substanzen dieses Gemisches der Effekt bekannter Ionenkanal-bildender Peptide untersucht werden.

Dazu wurden methanolische Lösungen (0,1% v/v) von Alamethicin und Gramicidin im Test mit Äquorin-exprimierenden Zellen eingesetzt. In beiden Fällen konnte keine Erhöhung der Calciumkonzentration im Cytosol festgestellt werden.

Die beiden Experimente, zum einen mit dem Dichlormethanextrakt von Regurgit zum anderen mit den beiden Ionophoren, belegen, dass Ionenkanal-bildende Substanzen zu keiner Erhöhung des cytosolischen Calciums führen. Daher können Ionophore auch nicht die Ursache für den gemessenen Anstieg der Calciumkonzentration nach Zugabe von Regurgit sein. Die Konzentration der eingesetzten Lösungen sollte ausreichend bemessen sein, auch wenn beispielsweise Jasmonsäure oder 12-Oxophytodiensäure in vergleichsweise hohen Konzentrationen eingesetzt werden müssen (Walter *et al.* 2007). Im Falle von Alamethicin genügt die verwendete Konzentration um im Biotest eine vielfache Masse an Pflanzenzellen zu induzieren (Engelberth *et al.* 2001) und auch der Dichlormethanextrakt sollte mehr von den

oben beschriebenen Ionenkanal-bildenden Substanzen enthalten als Regurgitat selbst, welches ausreicht, um die cytosolische Calciumkonzentration ansteigen zu lassen.

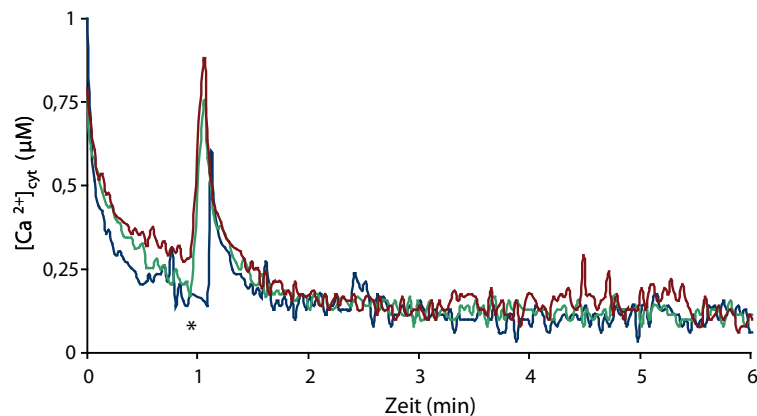


Abbildung 3.39: Veränderung der cytosolischen Calciumkonzentration nach Zugabe von Alamethicin und Gramicidin. Zugabe zum angegebenen Zeitpunkt (*) von 5 μl Gramicidin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 0,1 % Methanol, rote Linie), oder 5 μl Alamethicin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 0,1 % Methanol, grüne Linie) bzw. 5 μl 0,1 % Methanol in Wasser (Kontrolle, blaue Linie). Exemplarische Aufnahmen von $n=3$.

3.4.2. Elektrophysiologische Messung der Potenzialänderung im Apoplast

Ionophore besitzen die Fähigkeit, Membranen für Ionen permeabel zu machen und dadurch prinzipiell auch das Membranpotenzial zu beeinflussen.

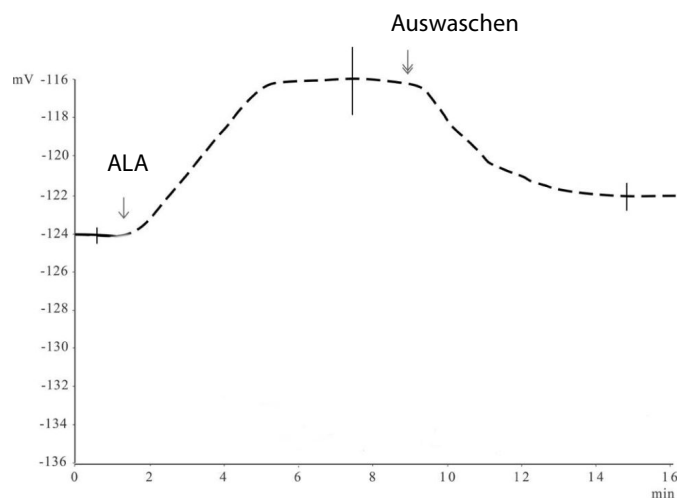


Abbildung 3.40: Messung des Membranpotenzials von *P. lunatus* nach Zugabe von Alamethicin. Diese Abbildung wurde freundlicherweise von M. Maffei, Universität Turin, zur Verfügung gestellt. ALA: Alamethicin.

Es konnte gezeigt werden, dass Alamethicin, ein Ionenkanal-bildendes Peptid aus *Trichoderma viride*, bei Limabohne sowohl Duft induziert als auch zu einem Anstieg der Phytohormone Salicylsäure und Jasmonsäure führt (Engelberth *et al.* 2001).

Ausgehend davon konnte M. Maffei zeigen, dass Alamethicin zu einer Depolarisation der Membran führt (persönliche Mitteilung und Abbildung 3.40). Dies geschah durch intrazelluläre Messung des Membranpotenzials.

Versuche zur Potenzialänderung durch Alamethicin in Limabohne

Ausgehend von diesen Versuchen wurden weitere Experimente mit Limabohne und Alamethicin durchgeführt, um heraus zu finden, ob es sich dabei lediglich um lokale Spannungstransienten handelt oder ein elektrisches Signal generiert wird, welches über längere Distanzen propagiert wird. Für die folgenden Versuche wurde das Potenzial nicht-invasiv im substomatären Raum erfasst. Im Falle der in Abbildung 3.41 gezeigten Aufnahme betrug die Distanz zwischen Zugabeort des Alamethicins und der Messelektrode etwa 5 cm.

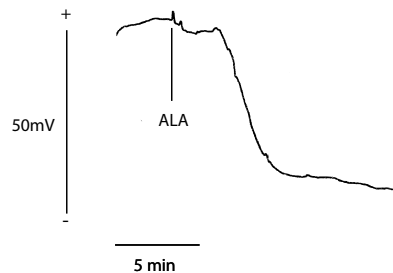


Abbildung 3.41: Potenzialänderung im Apoplast von *P. lunatus* nach Zugabe von Alamethicin (lokal). Applikation von 5 nM Alamethicin (ALA) zum angegebenen Zeitpunkt. ALA wurde durch das Xylem über den Blattstiel zugeführt (lokale Messung). Exemplarische Aufnahme von n=3.

Es ist zu sehen, dass es etwa zweieinhalb Minuten nach Zugabe von Alamethicin zu einer starken Depolarisierung von etwa 40 mV kommt (bezogen auf das Zellinnere gemäß den Konventionen, siehe Material und Methoden).

Versuche, eine systemische Messung mit Reiz (Alamethicin) und Messung an den zwei Primärblättern der Limabohne durchzuführen, scheiterten, da sich kein Signal durch bekannte, positive Reize (z. B. Flamme) übertragen ließen. Dies entspricht der Erfahrung von H. Felle und M. Zimmermann mit *P. lunatus* (persönliche Mitteilung). Um dieses Problem zu umgehen, wurde auf das im Labor von H. Felle etablierte System mit *H. vulgare* als Versuchspflanze gewechselt.

Versuche zur Potenzialänderung durch Alamethicin in Gerste

An Gerste wurden weitere Versuche zur systemischen Weiterleitung des durch Alamethicin verursachten Depolarisationssignals durchgeführt. Die Strecke, die vom Reizblatt zur Messelektrode in einem anderen Blatt zurückgelegt werden musste, betrug etwa 20-25 cm.

Wird nun das Reizblatt mit einer Pinzette verwundet und mit Alamethicin versetzt, so lässt sich nach etwa 10-12 min am Messblatt eine starke Depolarisierung um etwa 50 mV feststellen. Das bedeutet, dass die von Alamethicin ausgelöste Depolarisierung die Knoten zwischen den Blättern überspringen kann.

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit scheint bei beiden Pflanzen, Limabohne und Gerste, in etwa vergleichbar zu sein. Sie beträgt ungefähr 2,5 cm/min.

Darüberhinaus war ein nur schwer zu quantifizierender Effekt festzustellen. Nach der Behandlung mit Alamethicin reagierten die Pflanzen (*P. lunatus* und *H. vulgare*), wenn überhaupt, nur sehr träge auf weitere Reize, wie das Ausschalten von Licht. Es scheint, als ob

alle Kanäle der Plasmamembran ausgelastet wären und keine weiteren Reize mehr verarbeitet werden könnten, oder die Pflanzen durch Alamethicin desensibilisiert würden.

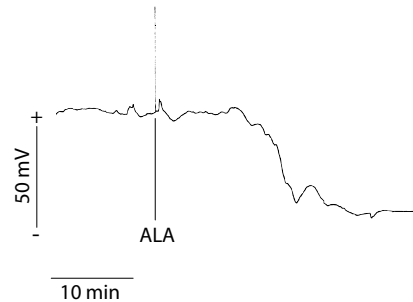


Abbildung 3.42: Potenzialänderung im Apoplast von *H. vulgare* nach Zugabe von Alamethicin (systemisch). Applikation von 25 nM Alamethicin (ALA) zum angegebenen Zeitpunkt. ALA wurde durch Verwundung des Reizblattes zugeführt und am Messblatt die Spannungsänderung des Apoplasten zur Referenzelektrode gemessen (systemische Messung). Exemplarische Aufnahme von n=3.

Versuche zur Potenzialänderung durch Jasmonsäure, Salicylsäure und Regurgitat

Ausgehend von diesen Versuchen und den Erkenntnissen, dass Jasmonsäure vorübergehend und Salicylsäure dauerhaft hochreguliert werden (Engelberth *et al.* 2001), wenn man Limabohne mit Alamethicin induziert, wurde untersucht, ob Jasmonsäure oder Salicylsäure allein ausreicht, ein vergleichbares elektrisches Signal in diesem System zu erzeugen.

Die Abbildung 3.43 zeigt die Zugabe von Jasmonsäure (A) bzw. Salicylsäure (B) zu ein und derselben Pflanze an zwei verschiedenen Stellen des Reizblattes. Bei beiden Substanzen ist keine Reaktion zu sehen. Die Empfindlichkeit des Systems wurde durch Aus- und wieder Einschalten des Lichtes überprüft, deutlich sind die Reaktionen darauf zu sehen. Daraus kann man schließen, dass sowohl Jasmonsäure als auch Salicylsäure in der Signalkaskade ausschließlich unterhalb des Depolarisationssignals wirken, sofern das Depolarisationssignal überhaupt an die Erkennung von Alamethicin gekoppelt ist.

Für die übergeordnete Fragestellung der Herbivorie sollte ausgehend von den Depolarisationen nach Zugabe von Regurgitat (Maffei *et al.* 2004) untersucht werden, ob diese Depolarisation sich ebenfalls über längere Distanzen ausbreitet und an einem systemischen Blatt gemessen werden kann. In Abbildung 3.43 C ist zu sehen, wie nach Zugabe von Regurgitat keine Veränderung des Potenzials am Messblatt gemessen werden konnte. Dies stimmt mit Beobachtungen von H. Felle und M. Zimmermann überein (persönliche Mitteilung). Auch hierbei wurde durch die Antwort auf Lichtreize sichergestellt, dass das System noch empfindlich ist.

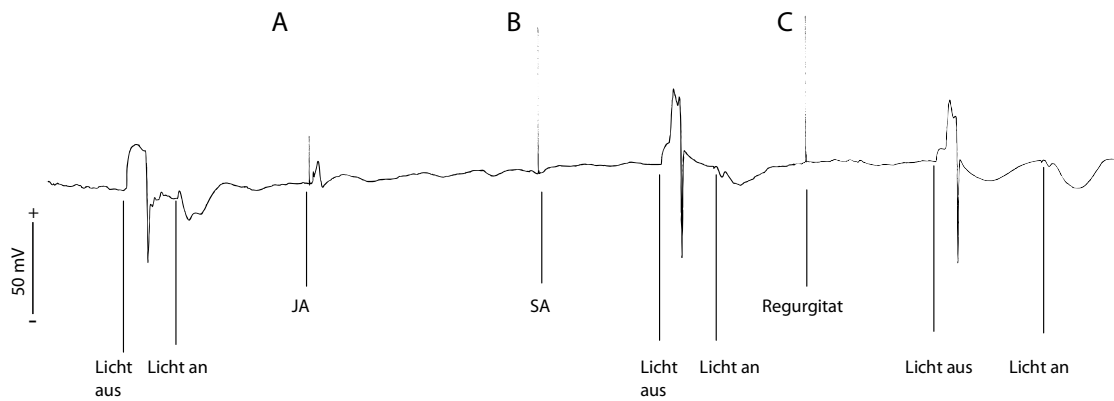


Abbildung 3.43: Potenzialänderung im Apoplast von *H. vulgare* nach Zugabe von Jasmonsäure, Salicylsäure und Regurgitat (systemisch). Applikation von **A:** 1 mM Jasmonsäure (JA), **B:** Salicylsäure (SA) zum und **C:** Regurgitat zum angegebenen Zeitpunkt. Alle Substanzen wurden durch Verwundung des Reizblattes in jeweils anderen Bereichen zugeführt und am Messblatt die Spannungsänderung des Apoplasten zur Referenzelektrode gemessen (systemische Messung). Zu Beginn und zwischen den Messungen wurde durch Kontrolle der Reaktion auf Lichtreize die Reizbarkeit des Systems getestet (Licht aus, bzw. an).

3.4.3. Thermographische Aufnahmen während Herbivorie

Aus der Literatur ist bekannt, dass Zugabe von Salicylsäure zu Tabak durch Steigerung des alternativen Wegs der Respiration es zu einer endogenen Erhöhung der Blatttemperatur kommt (Chaerle *et al.* 1999).

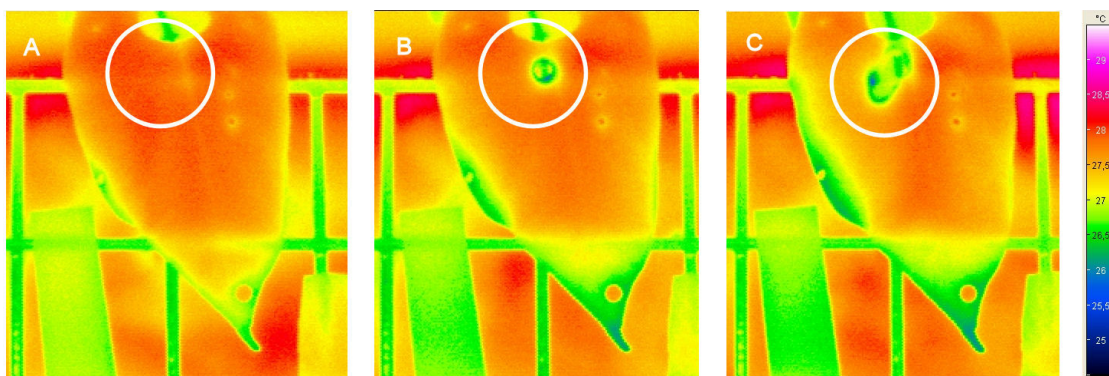


Abbildung 3.44: Thermographische Aufnahmen eines Blattes von *P. lunatus* während des Fraßes durch *S. littoralis*. Drei Aufnahmen erstellt mit einer Wärmebildkamera zu den Zeitpunkten **A:** 19:09 Uhr, **B:** 19:21 Uhr und **C:** 20:16 Uhr. Bereich des Raupenfraßes ist jeweils durch einen weißen Ring markiert. Raumtemperatur 27 °C, 46 % relative Luftfeuchte. Rechts: Temperaturskala in °C.

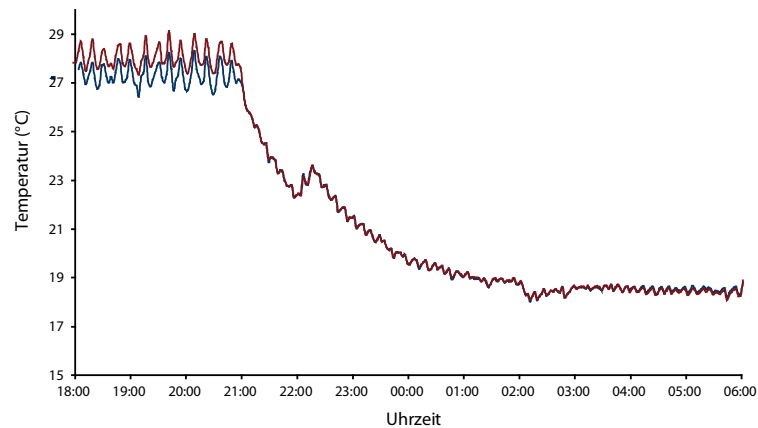
Dieses wird auch als Ursache angenommen, wenn es bei Befall durch das Tabak-Mosaik-Virus bei einer inkompatiblen Interaktion und *hypersensitive response* (HR) zu einer Temperaturerhöhung der Blätter von Tabakpflanzen kommt (Chaerle *et al.* 1999).

Zwar ist Salicylsäure als Phytohormon verantwortlich für *systemic acquired resistance* (SAR, (Ryals *et al.* 1996)) und der erwähnten HR bei biotrophen Phytopathogenen (Mur *et al.* 1997;

Mur *et al.* 2000), jedoch wird es auch bei Zugabe des Ionenkanalbildners Alamethicin gebildet (Engelberth *et al.* 2001), nicht jedoch bei Herbivorie durch Raupen.

Daneben gibt es theoretische Überlegungen, dass der Strom von Ionen durch einen geöffneten Ionenkanal zu einer Temperaturerhöhung führt (Chen *et al.* 1995). Da sich auch in Regurgitat Ionenkanal-bildende Substanzen finden, könnte es möglich sein, dass es unabhängig von Salicylat zu einer Temperaturerhöhung kommt.

A



B

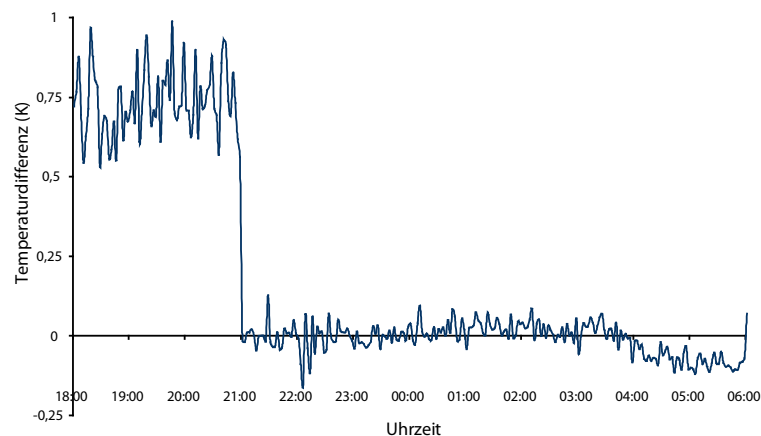


Abbildung 3.45: Temperaturverlauf eines Blattes von *P. lunatus* während Herbivorie durch *S. littoralis*. **A:** Zeitlicher Verlauf der Temperatur einer nicht befallenen Fläche des in Abbildung 3.44 gezeigten Blattes von *P. lunatus* (rote Linie) und eines Blattes Papier als Temperaturreferenz (blaue Linie). **B:** Zeitlicher Verlauf der Temperaturdifferenz zwischen den in A genannten Flächen.

Dabei wurden Aufnahmen mit einer Wärmebildkamera von Limabohnen angefertigt, während Larven von *S. littoralis* darauf gefressen haben (Abbildung 3.44). Dabei wurde klar beobachtet, dass es im unmittelbaren Bereich der Verwundung durch die Raupen zu einer Abkühlung um etwa 2 °C kommt. Diese ist aller Wahrscheinlichkeit nach verursacht durch die Verdunstungskälte des austretenden Pflanzensaftes. Künstliche Löcher, die mit einem Korkbohrer in das Blatt gestanzt wurden, zeigten einen ähnlichen Effekt, ebenso daran aufgebracht, vorher gesammeltes Regurgitat (nicht gezeigt). Dieser Effekt würde eine lokale

Temperaturerhöhung durch Ionenkanalbildner – so es diese gibt – deutlich überlagern. In sofern sind diese Messungen im Einklang mit publizierten Daten (Aldea *et al.* 2005).

In dieser Studie wurde jedoch nur eine Stunde, nach dem die Raupen gefressen hatten, die Blattemperatur aufgezeichnet. Es ist jedoch möglich, dass sich Änderungen im Stoffwechsel, wie der oben erwähnte alternative Weg der Respiration, erst langsamer auswirken und sich nicht ausschließlich durch Salicylsäure induzieren lassen. Deshalb wurde der Versuch über Nacht durchgeführt und die Temperaturen von einer nicht befressenen Stelle des Blattes sowie eines Stückes grünen Papiers (in Abbildung 3.44 jeweils unten links in den Bildern A – C zu sehen) ausgewertet. Das Ergebnis der Messung über 12 Stunden von 18:00 Uhr bis 6:00 Uhr des darauffolgenden Tages ist in Abbildung 3.45 zusammengefasst. In A sieht man den Vergleich der Temperaturverläufe von Limabohnen und Referenzpapier, in B die Temperaturdifferenz der beiden Flächen. Zu Beginn der Messung beträgt der Unterschied in der Temperatur zwischen Pflanze und Referenz etwa 0,75 K, begründet in der höheren Absorption des Lichtes durch das Blatt der Limabohne. Während der Fraßzeit der Raupen bis etwa 21:00 Uhr war keine Veränderung zu sehen. Ab 21:00 Uhr wurde das Licht bis 6:00 Uhr abgestellt und die Temperatur fiel langsam auf 19 °C. Nach dem Abschalten des Lichts fiel die Differenz zwischen Blatt und Referenz umgehend auf nahezu 0 K und pendelte um diesen Wert, was das Licht als Ursache für die Temperaturdifferenz bei „Tag“ bestätigt. Jedoch war auch 12 Stunden nach Versuchsbeginn kein Temperaturanstieg im Blatt der Limabohne zu verzeichnen.

Technische Bemerkungen: Ab 6:00 Uhr früh wurde das Licht wieder angestellt, was zu Blattbewegungen führte und die Aufnahmen für die Messung unbrauchbar machten. In Abbildung 3.45 A ist zu sehen, dass etwa alle 10 min es zu einem Ausschlag der Temperatur nach oben, bzw. unten kommt. Ursache dafür war die Temperaturregelung in der benutzten Klimakammer. Dieser Effekt war tagsüber bei eingeschalteter Beleuchtung und der damit verbundenen Temperaturentwicklung deutlich größer als nachts. Dies trug zu einem beträchtlichen Teil zum „Rauschen“ in der Temperaturdifferenz in B bei. Größere Temperaturänderungen (0,25-0,5 K) des Blattes gegenüber seiner Referenz hätten aber dennoch als Trend messbar sein müssen. Dieser Versuch wurde einmal wiederholt und einmal mit identischem Ergebnis mit Larven des mexikanischen Bohnenkäfers *Epilachna varivestis* durchgeführt.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Anwesenheit von Ionenkanal-bildenden Substanzen im Regurgitat von *Lepidoptera*-Larven gezeigt. Im Folgenden werden die elektrophysiologischen und chemischen-physikalischen Eigenschaften dieser Substanzen mit denen bekannter Ionenkanal-bildender Substanzen, hauptsächlich antimikrobiellen Peptiden aber auch Naturstoffen, verglichen. Im Anschluss wird die Wirkung von Ionenkanal-bildenden Peptiden auf pflanzliche Zellen und den pflanzlichen Organismus betrachtet.

4.1. Elektrophysiologische Charakteristika der Ionenkanal-bildenden Substanzen aus dem Regurgitat von *Lepidoptera*-Larven im Vergleich zu bekannten Ionenkanal-bildenden Substanzen

Die in dieser Arbeit präsentierten Aufnahmen von Einzelkanalmessungen von Ionenkanal-bildenden Substanzen aus dem Regurgitat von *Lepidoptera*-Larven in *black lipid membranes* weisen in allen untersuchten Arten eine große Ähnlichkeit auf. So blieben die einmal geöffneten Ionenkanäle in der Regel für lange Zeiträume geöffnet. Häufig wurde beobachtet, dass die Ionenkanäle bis zum spontanen Kollaps der Membran geöffnet blieben. Gelegentlich zeigten die Kanäle flickernde Schaltvorgänge sowohl auf höhere Leitwerte (z. B. Abbildung 3.2, 3.3 und 3.11) als auch auf geringere Leitwerte (z. B. Abbildung 3.6, 3.8 und 3.11). In seltenen Fällen wurden auch vollständige Schaltvorgänge auf das Ausgangsniveau aufgezeichnet (z.B. Abbildung 3.3 und Abbildung 3.4), wobei die Verweilzeiten auf dem geschlossenen Zustand nur etwa ein Viertel der mittleren Zeit auf dem geöffneten Zustand betragen.

Vergleicht man die Leitwerte der charakteristischen Aufnahmen von Ionenkanälen im BLM-Assay, so stellt man fest, dass bei den meisten untersuchten Arten die Leitfähigkeit etwa 400 pS beträgt, lediglich die Kanäle von *P. xylostella* wiesen mit fast 1200 pS eine beinahe dreifache Leitfähigkeit auf und unterschieden sich statistisch signifikant von den Kanälen der anderen untersuchten Arten (Abbildung 3.18 und Tabelle 3.2). Daraus lässt sich schließen, dass die Ionenkanal-bildenden Substanzen bei der ursprünglicheren Art *P. xylostella* eine andere Struktur aufweisen als die Substanzen, welche die Ionenkanäle im BLM-Assay mit Regurgitat der anderen Arten. Diese ähneln sich wohl in ihrer Struktur oder sind von identischer Natur.

Eine weitere Eigenschaft der im Regurgitat von *Lepidoptera*-Larven untersuchten Ionenkanäle ist das Vorkommen verschiedener Leitwerte. Neben dem Hauptleitwert, auf dem der Ionenkanal die meiste Zeit während der Messung verweilte, gab es Unterleitwerte von geringerer Leitfähigkeit (z.B. Abbildung 3.3, 3.8, 3.13, 3.25, 3.27, 7.3 und 7.4). Während des Verweilens auf dem Unterleitwert senkte sich die Leitfähigkeit auf etwa 75 % des Hauptleitwerts. Der Zustand des Unterleitwerts blieb in der Regel nur für höchstens wenige Sekunden stabil und schaltete dann wieder auf den Hauptleitwert. Ähnlich verhielt es sich mit Änderungen des Hauptleitwerts zu höheren Leitwerten hin. Diese traten ebenfalls gelegentlich auf und erhöhten den Leitwert um etwa 20 bis 50 % des Hauptleitwertes (z. B. Abbildung 3.2, 3.7, 3.12, 3.26, 7.3). Dabei blieben sie auch nur höchstens für einige Sekunden geöffnet. Von

beiden Arten der Abweichung vom Hauptleitwert aus ließen sich unabhängig schaltende, flickernde Öffnungsereignisse beobachten. Dies deutet darauf hin, dass diese Schaltereignisse auf einer anderen molekularen Ursache beruhen als die vorherrschenden Kanäle mit langen Öffnungszeiten.

Es ist nicht klar, ob die oben beschriebenen, zusätzlich zum Hauptleitwert öffnenden Leitwerte von einigen Sekunden Dauer nicht ebenfalls unabhängig vom Hauptleitwert schalten und auf einer eigenen Substanz beruhen. Da diese Leitwerte aber nie ohne den Hauptleitwert vorkamen und keine Unterleitwerte ihrerseits aufwiesen, liegt es nahe, dass es sich um eine Eigenschaft des Hauptleitwerts handelt.

Zwar wurde in den Aufnahmen, in denen diese zusätzlichen Leitwerte auftraten, keine dieser Schaltvorgänge ohne den Hauptleitwert aufgezeichnet, jedoch gibt es Aufnahmen von Ionenkanälen mit geringerer Leitfähigkeit (Abbildung 3.5). Diese traten nur sehr selten auf und hatten mit einer Leitfähigkeit von etwa 100 pS nur etwa ein Viertel der Leitfähigkeit der vorwiegenden Kanäle. Darüberhinaus wiesen auch diese Ionenkanäle Unterleitwerte auf.

Außerdem gibt es Aufnahmen mit sehr komplexen Abläufen von Schaltereignissen und mehreren geöffneten Hauptleitwerten wo eine exakte Zuordnung der einzelnen Leitwerte nicht möglich ist und vermutlich auch zwei Hauptleitwerte simultan öffnen (Abbildung 3.8, 3.11, 3.14, 3.17, 7.2).

Für die Isolierung der Ionenkanal-bildenden Substanz wurde der Nachweis mittels BLM-Assay gewählt und dabei auf die Bildung der hauptsächlich auftretenden Form von Ionenkanälen (etwa 400 pS Leitfähigkeit und sehr lange Verweildauer im geöffneten Zustand) selektiert, da die Ionenkanäle mit niedrigeren Leitwerten nur sehr sporadisch auftraten. Die Aufreinigung der Ionenkanal-bildenden Aktivität aus dem Regurgitat erfolgte hauptsächlich über chromatographische Methoden, da die Nutzung von SDS-Gelen eine Verunreinigung des (dafür angenommenen) Peptids mit Detergenz zur Folge hätte und einen funktionellen Nachweis mittels BLM-Assay beeinträchtigt hätte. Außerdem ergaben einige nicht gezeigte Versuche mit SDS-PAGE durch Akkumulation von Blattfarbstoffen im zu erwartenden Bereich von niedermolekularen Peptiden keine auswertbaren Proteinbanden.

Eine grobe Abschätzung der molekularen Masse der gesuchten Aktivität boten die Ultrafiltration und die Gelfiltration mit einer Superdex Peptide-Säule. Die gesuchte Aktivität wurde nach der Ultrafiltration im Durchfluss gefunden und deutet zumindest auf niedermolekulare Peptide hin. Dies wurde durch die Gelfiltration bestätigt. Durch den Gebrauch einer Superdex Peptide-Säule mit einem Trennbereich von 7000 Da bis 100 Da. Die gesuchte Aktivität lies sich stets in gesammelten Fraktionen im Bereich von 110 – 140 min nachweisen (Abbildung 3.20). Dazu musste jedoch stets die gesamte gesammelte Fraktion eingesetzt werden. Durch den Vergleich mit Aprotinin (etwa 6,5 kDa); Triglycylglycin (246 Da) und Glycylglycin (132 Da) wurde einerseits gezeigt, dass die Trennleistung der Säule gut ist, andererseits dass sich amphiphile Substanzen wie die gesuchte Ionenkanal-bildende Aktivität untypisch verhält. Daher wurden einige bekannte Ionenkanal-bildende Substanzen auf ihr Verhalten in dieser Methode untersucht. Das bakterielle Gramicidin (etwa 1,9 kDa) und Cecropin A, ein von Insekten produziertes Peptid mit 4 kDa, eluierten beide nach 52 min, das

mit 924 Da kleinere Nystatin, ein Polyen-Antibiotikum, eluierte entsprechend der kleineren Größe nach 61 min. Dies ist annähernd eine Stunde vor der Elutionszeit für die Ionenkanal-bildende Substanz aus dem Regurgitat von *Spodoptera*-Larven. Da sich mit Gramacidin und Nystatin auch nur sehr schlecht wasserlösliche Ionenkanalbildner unter den getesteten Substanzen befanden und sich diese dennoch entsprechend der Erwartung auf der Säule verhielten, lässt sich schließen, dass diese Methode verlässlich funktioniert und die gesuchte Substanz vermutlich deutlich kleiner als ein kDa ist. Zumal die ebenfalls schlecht wasserlösliche 8-Hydroxy-2-chinolinsäure auch erst nach 110 min von der Säule eluiert. Da sich aber in diesen Fraktionen durch Massenspektroskopie auch größere Massen nachweisen lassen, scheint es auch unspezifische, aber reproduzierbare Interaktionen zwischen der Superdex Peptide-Säule und verschiedenen Substanzen zu geben, darunter die gesuchte Ionenkanal-bildende Substanz.

Ein weiterer Hinweis, dass es sich um kleinere Substanzen handeln sollte, ist die Eigenschaft der Ionenkanal-bildenden Substanz, sich durch Dichlormethan aus dem Regurgitat extrahieren zu lassen. Dies sollte für große Proteine von einigen zehn kDa nicht möglich sein, für kleinere Peptide aber wohl. Als Beispiel hierfür sei genannt, dass Alamethicin im Allgemeinen in methanolischer Stammlösung benutzt wird (Engelberth *et al.* 2001; Rippa *et al.* 2007). Die vergleichende Analyse von Dichlormethanextrakt und aktiver Gelfiltrations-Fraktion im sehr empfindlichen Orbitrap-MS ergab keine augenfällige Übereinstimmung. Dies ist ein Hinweis, dass die gesuchte Substanz in sehr geringen Mengen im Regurgitat vorkommt.

Als dritte Methode der Isolierung der Ionenkanal-bildenden Substanz erwies sich *reversed phase* HPLC als geeignet. Hierbei eluierte die gesuchte Aktivität auf C8 und C18-Säulen zusammen mit Phaeophorbid a, welches seinerseits zwar auf die Membranstabilität wirkt, aber nicht in der gesuchten Weise mit definierten Einzelkanal-Strömen (Kapitel 3.2.6). Auch hier ergab der Vergleich mit der aktiven Fraktion der Gelfiltration keine Übereinstimmung von in der LC/MS gemessenen Massen. Von der gesammelten Fraktion musste ebenfalls die gesamte Menge im BLM-Assay eingesetzt werden. Da beide chromatographische Methoden, (FPLC und HPLC) einen sehr hohen Verlust an relativer Aktivität mit sich brachten und die vergleichenden Studien der Massenspektren keine Kandidatensubstanzen lieferten, wurden diese Methoden nicht kombiniert. Dies könnte ein Hinweis sein, dass verschiedene Substanzen mit sehr ähnlichen Eigenschaften im BLM-Assay vorliegen oder die Substanzmenge zu gering ist.

Obwohl die Ionenkanal-bildenden Substanzen aus dem Regurgitat noch nicht identifiziert wurden, wurden genug charakteristische Daten gesammelt um sie mit den Eigenschaften bekannter Kanalbildner zu vergleichen.

4.1.1. Vergleich mit antimikrobiellen Peptiden

Im Folgenden werden einige exemplarische und gut untersuchte Ionenkanal-bildenden Peptide verschiedener Struktur vorgestellt und mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten verglichen. Die dabei ausgewählten Beispiele repräsentieren verschiedene Stoffklassen mit ihren charakteristischen Eigenschaften.

Alamethicin

Bei Alamethicin handelt es sich um ein Peptid, das von dem Pilz *Trichoderma viride* produziert wird (Meyer und Reusser 1967). Es ist ein lineares Peptid von 20 Aminosäuren Länge, von denen bei Alamethicin I acht Reste aus der ungewöhnlichen Aminosäure α -Aminoisobuttersäure (Aib) bestehen. Aib verfügt über zwei Methylreste, welche durch sterische Hinderung die Peptidkette in eine α -helikale Struktur zwingt (Burgess und Leach 1973). Diese helikale Struktur wurde durch Röntgenstrukturmessung bestätigt (Fox und Richards 1982), wovon ausgehend ein Modell als hexamere Pore berechnet wurde (Sansom 1993; Tieleman *et al.* 1999). Alamethicin ist der am besten untersuchte Vertreter der „Peptaibole“, der Aib enthaltenden Peptide, und soll hier stellvertretend besprochen werden. Die elektrophysiologischen Eigenschaften von Alamethicin unterscheiden sich stark von den hier untersuchten Ionenkanälen. Die durch Alamethicin erzeugten Ionenkanäle sind im Gegensatz zu den durch Zugabe von Regurgitat in BLM erzeugten Kanälen spannungsabhängig und weisen darüberhinaus einen asymmetrischen Verlauf im I/U-Plot auf (Gordon und Haydon 1975). Die Leitfähigkeit der Ionenkanäle aus Alamethicin beträgt bei 28 mV und 1 M Kaliumchlorid Elektrolytlösung zwischen 43 pS und 1540 pS (Boheim 1974) und erfolgt in *bursts* von einigen Millisekunden bis Sekunden mit mehreren gleichzeitig geöffneten Kanälen, wobei die Leitwerte nicht exakt das Vielfache des ursprünglichen Leitwertes betragen (Boheim 1974; Eisenberg *et al.* 1973; Gordon und Haydon 1972). Die Dauer der inaktiven Zeit zwischen zwei *bursts* ist abhängig von der angelegten Spannung (Cafiso 1994). In der niedrigsten Leitfähigkeitsstufe sind Alamethicin-Kanäle nahezu impermeabel für Chloridionen (Hanke und Boheim 1980) wobei höhere Leitfähigkeitsstufen nahezu keine Selektivität zeigen (Gordon und Haydon 1975).

Gramicidin

Gramicidin ist ein lineares Peptid, welches von *Bacillus brevis* produziert wird. Es hat die strukturelle Besonderheit, dass es in seiner 15 Aminosäuren langen Sequenz alternierend D- und L-Aminosäuren besitzt (Sarges und Witkop 1965). Neben verschiedenen linearen Gramicidin-Varianten (A, B, C), die sich in ihrer Primärsequenz unterscheiden (Sarges und Witkop 1965; Sarges und Witkop 1965) gibt es noch eine zyklische Form, Gramicidin S, welche sich in ihren Eigenschaften unterscheidet und hier nicht besprochen wird. Die von linearen Formen von Gramicidin geformten Kanäle sind selektiv für monovalente Kationen und für divalente Kationen und Anionen nahezu undurchlässig (Myers und Haydon 1972). In der Membran liegen die Peptide in Form einer Doppelhelix, also zweier ineinander verschlungener Peptidketten, oder in Form eines Helix-Dimers vor, wobei sich jeweils ein Peptid in einer Lipidschicht der Membran befindet und den Kanal durch Ausbildung von sechs intermolekularen Wasserstoffbrücken gebildet wird. Da Gramicidin über keine polaren oder hydrophilen Aminosäuren verfügt, wird der Kanal durch die Carbonylgruppen des Peptidgerüsts gebildet (Wallace 2000). Ähnlich wie die in dieser Arbeit untersuchten Kanäle verhalten sich die Kanäle aus Gramicidin ohmsch, das heißt, sie sind weder gleichrichtend noch spannungsabhängig und entsprechend steigt die Leitfähigkeit linear mit der Spannung

an (Hladky und Haydon 1972). Die Öffnungszeiten der Kanäle sind hauptsächlich im Bereich von unter 0,5 s (Hladky und Haydon 1972), es wurden aber auch längere Öffnungszeiten von über 70 s gemessen (Busath und Szabo 1981). Von Gramicidin A wurden darüberhinaus auch *substates* gemessen, welche sowohl ausgehend vom Grundzustand der Membran als auch ausgehend vom Hauptleitwert gebildet werden (Busath und Szabo 1981). Die Leitfähigkeit von Gramicidin-Kanälen beträgt etwa 48 pS in 1 M Kaliumchlorid-Lösung für den Hauptleitwert und etwa 5 pS für den Unterleitwert (Busath und Szabo 1981). Diese Werte liegen weit unter denen, die für Ionenkanäle gemessen wurden, die aus dem Regurgitat von *Lepidoptera*-Larven stammen.

α -Hämolyisin

Stellvertretend für eine Reihe von Poren-bildenden Toxinen von Gram-positiven Bakterien wird im Folgenden das α -Hämolyisin von *Staphylococcus aureus* mit den Ionenkanälen, die nach Zugabe von Regurgitat von Raupen im BLM-Assay nachweisbar sind, verglichen. Bei α -Hämolyisin handelt es sich um ein Protein von 293 Aminosäuren Länge und einer molaren Masse von 33 kDa (Freer *et al.* 1968). Das Protein lagert sich auf der Membranoberfläche zu einem Heptamer zusammen und bildet eine Pore, wobei sich außerhalb der Membran ein Ring (*rim*) und eine Kappe (*cap*) bilden. Die Pore selbst wird aus 2 Faltblattstrukturen je Untereinheit gebildet, die die Membran durchspannen und als Heptamer einen Ring bilden (Song *et al.*, 1996). Die in BLM gebildeten Kanäle von α -Hämolyisin besitzen eine leichte Spannungsabhängigkeit, jedoch gibt es keine Spannungsbereiche, wo die Poren für Ionen undurchlässig sind. Die Leitfähigkeit beträgt bei 100 mM Kaliumchlorid etwa 90 pS, bei 500 mM etwa 450 pS, darüberhinaus sind diese Ionenkanäle anionenselektiv (Belmonte *et al.* 1987; Menestrina 1986). Bemerkenswert ist, dass die einmal geöffneten Ionenkanäle von α -Hämolyisin in der Regel geöffnet bleiben, wie es bei den hier beschriebenen Ionenkanälen aus dem Regurgitat von *Lepidoptera*-Larven auch der Fall ist. Jedoch sind in der Literatur keine *substates* erwähnt, wohl aber, dass die Leitfähigkeit der Einzelkanäle sehr stark schwanken kann, bei 20 °C z. B. zwischen etwa 100 pS und 400 pS. Dies wird auf eine variable Anzahl von α -Hämolyisin-Untereinheiten zurückgeführt (Belmonte *et al.* 1987).

Syringopeptin und Syringomycin

Das Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* produziert zwei Klassen von nicht-ribosomal synthetisierten Lipopeptiden, Syringopeptide und Syringomycine (Ballio *et al.* 1991; Iacobellis *et al.* 1992). Beide Substanzklassen fungieren als Pathogenitätsfaktor und bestehen aus einem hydrophoben 3-Hydroxycarbonsäure-Rest variabler Länge und einer geladenen, zyklischen Peptidgruppe als hydrophilem Kopf (Hutchison und Gross 1997). Beide Substanzklassen weisen aufgrund dieser Struktur sowohl die oberflächenaktive Eigenschaft eines Detergenzes auf, als auch die Fähigkeit, im BLM-Assay Ionenkanäle zu generieren (Hutchison und Gross 1997). So zeigt Syringomycin nur vergleichsweise kleine Leitfähigkeiten von etwa 12 pS, dies aber auch in sehr verdünntem Elektrolyt von 30, bzw. 10 mM Kaliumchlorid bei 80 mV Spannung (Hutchison und Gross 1997). Besser charakterisiert sind die

Ionenkanäle, die durch Syringopeptin erzeugt werden. Diese besitzen eine Leitfähigkeit von etwa 40 pS in 100 mM Natriumchlorid. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sie spannungsabhängig und gleichrichtend sind und Natriumionen gegenüber Chloridionen in einem Verhältnis von etwa 3 : 1 bevorzugen. Außerdem wurden *substates* beobachtet, die bei negativen Spannungen mit einer durchschnittlichen Dauer von etwa 30 ms, wobei die Hauptleitwerte auch bis in den Minutenbereich hinein geöffnet bleiben können (Dalla Serra *et al.* 1999).

Dermaseptin und Magainin

Magainine und Dermaseptine sind Peptide, die sich von der Haut von Fröschen isolieren lassen. Dabei handelt es sich im Falle von Magainin I und 2 (beide von *Xenopus laevis*) um Peptide mit einer Länge von 23 Aminosäuren (Cruciani *et al.* 1992; Duclohier *et al.* 1989) und bei Dermaseptin um ein 33 Aminosäure langes Peptid von *Phyllomedusa bicolor* (Duclohier 2006). Beides sind Vertreter von polykationischen antimikrobiellen Peptiden und weisen α -helikale Struktur auf. Magainin I weist einen leicht spannungsabhängigen Verlauf makroskopischen I/U-Plot auf, wohingegen Einzelkanäle nicht spannungsabhängig sind. Die Leitfähigkeit beträgt in den meisten Fällen etwa 370 pS bzw. 680 pS, seltener 1200 pS (Duclohier *et al.* 1989). Diese Beobachtung ähnelt den in dieser Arbeit beschriebenen Schaltereignissen, bei denen Leitwerte mit einer in etwa doppelten Leitfähigkeit verglichen mit den häufigsten Leitwerten aufgezeichnet wurden (z. B. in den Abbildung 3.8, 3.11, 3.12 und 3.14). Jedoch sind die Verweilzeiten im geöffneten Zustand bei Magainin I mit unter 100 ms (Duclohier *et al.* 1989) ungleich kürzer als bei den in dieser Arbeit untersuchten Kanalbildenden Substanzen. Darüber hinaus besitzt Magainin I eine leichte Selektivität für Anionen (Natrium: Chlorid 3:1, (Duclohier *et al.* 1989)). Für Magainin 2 wurde jedoch eine Selektivität von 5:1 zugunsten der Natriumionen festgestellt sowie eine ausgeprägtere Spannungsabhängigkeit (Cruciani *et al.* 1992). Dass die Ionenselektivität im Falle von polykationischen Peptiden von den Membranlipiden abhängt, wurde durch Studien mit Dermaseptin gezeigt. So wird in neutralen Lipiden (Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin) eine Anionenselektivität von 7:1 gemessen und bei Anwesenheit negativ geladener Lipide (z. B. Phosphatidylcholin und Cholesterol) sinkt diese auf 1,4:1, ebenso wird die Leitfähigkeit negativ und die Öffnungszeiten positiv durch die Auswahl der Lipide beeinflusst und Dermaseptin ist im Gegensatz zu Magainin ohmsch (Duclohier 2006).

4.1.2. Vergleich mit Ionenkanal-bildenden Peptiden aus Insekten

Melittin

Bei Melittin handelt es sich um die Hauptkomponente des Bienengifts (Habermann 1972). Das Peptid besteht aus 26 Aminosäuren und trägt insgesamt 5 positive Ladungen. Melittin zeigt einen spannungsabhängigen und gleichrichtenden Verlauf. In niedriger Konzentration weisen die Kanäle von Melittin eine Lebensdauer von bis zu 60 s bei einer Leitfähigkeit von etwa 10 pS bei 60 mV auf und sind leicht selektiv für Anionen, hier Chlorid, gegenüber

Natrium- und Kaliumionen (Tosteson und Tosteson 1981). Es wurden aber auch kürzere (< 1 s) Öffnungszeiten beobachtet, die steigender Spannung zunahm und schließlich nicht aufgelöste Schaltvorgänge zeigte (Pawlak *et al.* 1991). Die nicht aufgelösten Schaltvorgänge und fluktuierenden Leitwerte wurden auch bei synthetischen Melittin gemessen (Tosteson *et al.* 1987). Auch bei Melittin entsprechen bei Messungen mit deutlich unterscheidbaren Leitwerten zusätzliche Leitwerte nicht einem Vielfachen des Ausgangsleitwerts (Hanke *et al.* 1983), wie es auch bei den Ionenkanälen aus den Regurgitat von *Lepidoptera*-Larven häufig der Fall war.

Cecropin

Cecropine sind ein wichtiger Bestandteil des humoralen Immunsystems von Insekten (Boman und Hultmark 1987) und wurden in einer Vielzahl von Dipteren und Lepidopteren gefunden (Hong *et al.*, 2008). Sie zeigen ein breites antibakterielles Spektrum (Steiner *et al.* 1981) und werden durch bakterielle Infektionen induziert (Kobayashi *et al.* 1993). Cecropine von *Hyalophora cecropia* besitzen eine Länge von 35 – 37 Aminosäuren mit 5 – 7 basischen Aminosäuren (Christensen *et al.* 1988). Wie die meisten polykationischen antimikrobiellen Peptide sind die von Cecropinen in Lipiddoppelschichten erzeugten Ionenkanäle spannungsabhängig, lediglich Cecropin D verhält sich ohmsch. Die Leitfähigkeit von Einzelkanälen schwankt zwischen 7 pS (Cecropin D von *Hyalophora cecropia*) und 160 pS (Cecropin A), es wurden aber Cecropin-Analoga mit veränderter Sequenz erzeugt, deren Leitfähigkeit bis zu 2500 pS beträgt (Leitfähigkeiten jeweils bei -40 mV; (Christensen *et al.* 1988)). Die Ionenkanäle von Cecropinen blieben über einen Zeitraum von mehreren Minuten geöffnet und wiesen eine für polykationische antimikrobielle Peptide typische Anionenselektivität auf (Christensen *et al.* 1988).

4.1.3. Vergleich mit Defensinen und Thioninen

Defensine und Thionine sind basische, mit meist 3-4 Disulfidbrücken ausgestattete Peptide mit wenigen α -helikale Strukturen und überwiegend durch β -Faltblatt-Strukturen stabilisiert (Hill *et al.* 1991). Sie sind in der Abwehr von Infektionen durch Pilze, bzw. Bakterien von Bedeutung und interagieren wie die bisher genannten Peptide mit Membranen (Lay und Anderson 2005; Pelegriini und Franco 2005). Die taxonomische Verbreitung reicht von Mollusken über Arthropoden bis zu Vertebraten (Bulet *et al.* 2004).

Defensine von Insekten

Die Defensine der Insekten bestehen aus 36 bis 51 Aminosäuren und besitzen meist 3 Disulfidbrücken (Bulet *et al.* 1999). Auch aus Lepidopteren wurden Defensine isoliert wie das antibakteriell wirkende, Defensin A-ähnliche Defensin von *Mamestra brassicae* (Mandrioli 2003) und Heliomicin aus *H. virescens*, welches stark fungizid wirkt (Lamberty *et al.* 1999). Das Defensin A aus der Fleischfliege *Phormia terranova* wurde elektrophysiologisch charakterisiert. Die gemessenen Einzelkanäle wiesen Leitfähigkeitswerte von etwa 100 pS bis 200 pS auf, waren spannungsabhängig und es konnten Öffnungszeiten der Kanäle von bis zu

einigen Sekunden begleitet von häufigen, nicht aufgelösten Schaltvorgängen gezeigt werden (Cociancich *et al.* 1993). Damit ähnelt es dem Defensin NP-1 (*neutrophil peptide 1*) aus Kaninchen, welches ebenfalls spannungsabhängige Ionenkanäle in Lipiddoppelschichten induziert, die eine große Variabilität in ihrer Leitfähigkeit von 10 pS bis über 1000 pS aufweisen und Chlorid gegenüber Natrium (2,4:1) bevorzugen (Kagan *et al.* 1990). Zwar entspricht die elektrophysiologische Charakteristik nicht den in Raupenregurgitat gefundenen Ionenkanalbildenden Substanzen, dennoch sollten die Defensine als ein zentraler Bestandteil des Immunsystems der Insekten erwähnt werden.

Defensine von Pflanzen

Pflanzliche Defensine sind Peptide mit einer Länge von 45-55 Aminosäuren und 4 konservierten Disulfidbrücken. Sie sind durch Infektionen mit Bakterien und Pilzen, aber auch durch Verwundung, Trockenheit, osmotischem Stress und Kälte induzierbar (Lay und Anderson 2005). Historisch wurden die ersten pflanzlichen Defensine als γ -Thionine bezeichnet und aus dem Endosperm von Weizen und Gerste isoliert (Colilla *et al.* 1990; Mendez *et al.* 1990). Aufgrund von Strukturellen Unterschieden zu Thioninen und größerer Ähnlichkeit zu Defensinen von Insekten werden γ -Thionine seit 1995 den Defensinen zugeordnet (Terras *et al.* 1995). Anders als für Defensine tierischen Ursprungs oder Thionine konnte für pflanzliche Defensine nicht gezeigt werden, dass diese Ionenkanäle in Lipiddoppelschichten erzeugen (Thevissen *et al.* 1996). Dennoch wirken pflanzliche Defensine auf vielfältige Weise, wie z. B. durch die Inhibition der Translation (*in vitro*), als Inhibitor von α -Amylase und Proteasen (Carvalho Ade und Gomes 2009) und durch die Blockade von Ionenkanälen, wie z. B. γ 1-Zeathionin und γ 2-Zeathionin auf Natriumkanäle (Kushmerick *et al.* 1998). Darüberhinaus wurde gezeigt, dass sowohl Dm-AMP1 aus Dahlien als auch Rs-AFP1 aus Meerrettich an Sphingolipide binden, genauer an Mannosyldiinositolphosphoceramid (Dm-AMP1) von *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae* und Glucosylceramid aus *Pichia pastoris* (Rs-AFP1). Stämme dieser Pilze, die durch Mutation nicht die entsprechenden Sphingolipide produzieren können, weisen eine bis zu 20-fach erhöhte Resistenz gegen die genannten Defensine auf (Thevissen *et al.* 2000; Thevissen *et al.* 2003). Es wird vermutet, dass durch diese Interaktion die Plasmamembranen der Pilze destabilisiert werden und es zur Lyse kommt. In den oben erwähnten Versuchen zur Ionenkanalbildung in künstlichen Membranen wurden keine Sphingolipide eingesetzt (Thevissen *et al.* 1996), so dass diese Experimente als nicht vollständig betrachtet werden können, zumal beide untersuchten Defensine hyperpolarisierende oder depolarisierende Wirkung auf das Membranpotenzial von *N. crassa* hatten (Thevissen *et al.* 1996). Bis heute sind keine elektrophysiologischen Experimente mit pflanzlichen Defensinen und Sphingolipiden veröffentlicht. Die Strukturell sehr ähnlichen Defensine aus Insekten wie Heliomicin binden ebenfalls Sphingolipide (Thevissen *et al.* 2004).

Thionin

Thionine sind ebenfalls cysteinreiche Peptide pflanzlichen Ursprungs mit hauptsächlich antibakterieller oder fungizider Wirkung, die sich unter Anderem im Endosperm und in

Pathogen-induzierter Blättern finden lassen (Bohlmann und Apel 1991). Im BLM-Assay wurden Ionenkanal-bildende Aktivität sowohl von α -Hordothionin (Thevissen *et al.* 1996) als auch von β -Purothionin (Hughes *et al.* 2000) festgestellt. Die gemessenen Membranaktivitäten waren spannungsabhängig und bestanden aus sehr kurzen Schaltzeiten im Millisekundenbereich ohne definierten Leitwert (Thevissen *et al.* 1996). Bei β -Purothionin wurden Leitwerte von etwa 125 pS mit Schaltzeiten von bis zu etwa 100 ms in Lipiddoppelschichten gemessen, diese Kanäle waren ebenfalls spannungsabhängig und selektiv für Kationen gegenüber Anionen, etwa 7:1 (Hughes *et al.* 2000).

4.1.4. Vergleich mit Messungen von verschiedenen Ionenkanälen pflanzlichen Ursprungs in *black lipid membranes*

Da Regurgitat auch zu einem wesentlichen Teil aus pflanzlichem Material besteht, werden im Folgenden einige mögliche Quellen für Ionenkanäle pflanzlichen Ursprungs diskutiert.

Regurgitat enthält mechanisch zerkleinerte und anverdaute Reste von Blattmaterial. Da sich in Regurgitat ebenfalls Fettsäure-Aminosäurekonjugate befinden (Paré *et al.* 1998), die aufgrund ihres amphiphilen Charakters auch als Emulgator dienen können, ist es zumindest denkbar, dass Membranproteine solubilisiert werden oder in Vesikeln vorkommen. Aus diesem Grund werden nun einige auf Proteinen basierende Ionenkanäle mit den in Regurgitat gefundenen Ionenkanälen verglichen. Diese sind entweder aus Vesikeln, welche aus Pflanzenmaterial isoliert wurden, oder aus heterolog exprimiertem Protein, das nach der Renaturierung in künstliche Vesikel gebracht wurde. So wurde aus Wurzelgewebe von *Phaseolus vulgaris* ein Kationen-selektiver Kanal (Kalium, Natrium und Ammonium) aus Vesikeln, die mit BLM fusioniert wurden, gemessen. Die Leitfähigkeit der ohmschen Einzelkanäle betrug etwa 213 pS und die Schaltzeiten betragen häufig unter 100 ms. Ein zugehöriges Protein wurde nicht genannt (Balleza *et al.* 2005). Dies ist ein Beispiel dafür, dass es möglich ist, derartige Ionenkanäle aus „natürlichen“ Vesikeln im BLM-Assay zu messen. Es gibt eine ganze Reihe von Ionenkanälen aus in künstlichen Vesikeln rekonstituierten Proteinen, die Ähnlichkeit zu den aus Regurgitat charakterisierten Ionenkanälen aufweisen. Meist sind es Präprotein-Translokasen aus Mitochondrien oder Chloroplasten. Diese weisen eine ähnlich hohe Leitfähigkeit auf und sind selektiv für Kationen. So hat Tom40 aus *S. cerevisiae* eine Leitfähigkeit von etwa 380 pS auf. Es wurden aber aus „natürlichen“ Vesikeln der äußeren Mitochondrien-Membran auch Kanäle gemessen, die dem doppelten Leitwert entsprachen und auf die Struktur einer Doppelpore des Tom-Komplexes zurückzuführen ist. Der Kanal weist eine Selektivität von 8-10:1 von Kalium über Chlorid auf und zeigt sich als Einzelkanal spannungsunabhängig und nicht gleichrichtend. Es werden *substates* gefunden, die sich für einige Sekunden einstellen, während dessen die Leitfähigkeit auf etwa ein Drittel absinkt und es gibt häufig flickernde Schaltvorgänge. Die gezeigten Schaltzeiten sind im Sekundenbereich (Becker *et al.* 2005; Hill *et al.* 1991). Eine ähnliche Charakteristik weist Tim22, ebenfalls aus Bäckerhefe, auf, jedoch sind hier Schaltzeiten von bis zu einer Minute gezeigt. Bei Hauptleitwerten von etwa 540 pS gibt es ebenfalls Unterleitwerte und nicht aufgelöste

Schaltvorgänge. Die Kationenselektivität beträgt 15:1 Kaliumionen: Chloridionen (Kovermann *et al.* 2002). Aus Chloroplasten wurde auf diese Weise das OEP75 (=TOC75)-Protein im BLM-Assay gemessen. Es weist Leitfähigkeiten von etwa 70 pS bis 145 pS für die sich ohmsch verhaltenden Einzelkanäle auf und bildet *substates*. Die Schaltzeiten liegen im Sekundenbereich und weisen auch flickernde Schaltvorgänge auf (Hinnah *et al.* 1997).

Die allgemeine Ähnlichkeit dieser Ionenkanäle, die durch Präprotein-Importproteine in Lipiddoppelschichten erzeugt werden zu den Kanälen, welche von Regurgitat von Lepidoptera-Larven erzeugt werden, ist sehr gross. Dennoch erscheint es unwahrscheinlich, dass diese Proteine mit einer relativen Masse von 22 bis 75 kDa die Ursache für die in dieser Arbeit beschriebenen Ionenkanäle sind. Zum einen ist es unwahrscheinlich, dass diese sich in Dichlormethan lösen lassen und dabei funktionell bleiben, zum anderen ergaben die weiteren Reinigungsmethoden wie Ultrafiltration oder FPLC (Peptidsäule), dass es sich um kleinere Moleküle handelt. Es wäre aber denkbar, dass Abbauprodukte von pflanzlichen Proteinen die Ursache sind, ähnlich wie z. B. Inceptin, ein vermutlich Rezeptor-vermittelter Peptid-Elizitor pflanzlichen Ursprungs aus dem Regurgitat von *Spodoptera frugiperda* (Schmelz *et al.* 2006). So wurde gezeigt, dass die transmembranen Bereiche des nikotinergen Acetylcholinrezeptor ausreichen, um in Lipiddoppelschichten Ionenkanäle zu erzeugen (Ghosh und Stroud 1991; Oblatt-Montal *et al.* 1993). Ähnliches wäre für Abbauprodukte pflanzlicher Membranproteine denkbar, wenn Domänen außerhalb der Membran proteolytisch abgebaut werden und transmembrane Bereiche, wie oben vorgeschlagen, durch Fettsäure-Aminosäurekonjugate solubilisiert würden. Ähnlich wie bei Inceptin, müsste es sich aber um definierte Bereiche bestimmter Proteine handeln, da das Erscheinungsbild der Ionenkanäle aus Regurgitat, zumindest was den vorherrschenden Typus anbelangt, sehr homogen ist.

Verglichen mit den aus Regurgitat im BLM-Assay gemessenen Ionenkanälen sind die Leitwerte einiger exemplarischer Ionenkanäle aus der pflanzlichen Plasmamembran eher gering. So besitzen einige Kaliumkanäle aus *A. thaliana* Leitwerte von 44 pS bis 109 pS (Spalding *et al.* 1992), der Kaliumkanal der Schließzellen aus *Vicia faba* 20 pS (Schroeder *et al.* 1987).

4.1.5. Vergleich mit nicht-peptidogenen Ionenkanalbildnern

Neben Peptiden, Proteinen und Lipopeptiden gibt es noch eine Reihe weiterer Substanzklassen, von denen es Vertreter gibt, die in der Lage sind, in *bilayer lipid membranes* Ionenkanäle zu erzeugen. Hier werden einige Vertreter verschiedener Substanzklassen ohne Anspruch auf Vollständigkeit vorgestellt.

Beticolin

Beticoline sind eine Gruppe von chlorierten polycyclischen Substanzen die von *Cercospora beticola*, einem phytopathogenen Pilz produziert werden. Die von Beticolinen erzeugten Kanäle verhalten sich alle ohmsch, weisen Leitfähigkeiten von etwa 40 bis 120 pS auf in 200 mM Kaliumchlorid auf und besitzen zwei Unterleitwerte. Sie sind leicht kationenselektiv

mit einem Verhältnis von etwa 2:1 bei Kaliumchlorid. Die Schaltzeiten liegen im Allgemeinen deutlich unter einer Sekunde (Goudet *et al.* 1999; Goudet *et al.* 2000).

Elaiophylin

Elaiophylin ist ein Macrodiolid-Antibiotikum, das von *Streptomyces spec.* produziert wird und gegen Gram-positive Bakterien wirkt (Fiedler *et al.* 1981). Es erzeugt im BLM-Assay Ionenkanäle mit 220 pS Leitfähigkeit und einem Verhältnis von Kationen zu Anionen von 24:1 bei Kaliumchlorid. Die Kanäle weisen zwei Leitwerte auf, wobei der erste langsam schaltet und eine Verweildauer von etwa 5 s besitzt und der zweite Leitwert, der auf den ersten aufbaut, ein *burst*-artiges Verhalten zeigt und etwa 0,1 s anhält (Grigoriev *et al.* 2002).

Amphotericin B und Nystatin

Bei Amphotericin B und Nystatin handelt es sich um Antibiotika aus der Gruppe der Polyen-Antibiotika aus *Streptomyces spec.*. Sie besitzen einen Laktonring mit einerseits 5 - 6 konjugierten Doppelbindungen und andererseits acht Hydroxylgruppen. Darüberhinaus gibt es eine polare Kopfgruppe (Waksman und Lechevalier, 1962). Das Verhalten der von ihnen erzeugten Ionenkanäle ist nicht, für Nystatin, oder nur schwach spannungsabhängig wie bei Amphotericin B (Andreoli und Monahan 1968; Ermishkin *et al.* 1976). Es gibt verschiedenen Leitfähigkeitsstufen, die jedoch unabhängig sind und nicht wie Unterleitwerte ineinander übergehen (Cotero *et al.* 1998). Die Leitfähigkeitswerte liegen mit 5 – 8 pS sehr viel niedriger als die für andere Ionenkanal-bildende Toxine, die Öffnungszeiten der Ionenkanäle sind im Sekunden- bis Minutenbereich (Cotero *et al.* 1998; Kleinberg und Finkelstein 1984). Bei der Ionenselektivität tritt der interessante Fall auf, dass bei Zugabe von Nystatin von nur einer Seite der Membran sich ein kationenselektiver Ionenkanal bildet, bei Zugabe von Nystatin auf beiden Seiten der Membran ein Ionenkanal mit anionenselektiven Eigenschaften gebildet wird, was auf die Ausbildung verschieden langer Ionenkanäle zurückgeführt wird, die aus nur einer Schicht Nystatin-Monomeren oder zweier Schichten bestehen (Kleinberg und Finkelstein 1984).

Die Ionenkanäle besitzen einige mit den von Regurgitat in Lipiddoppelschichten gebildeten Ionenkanälen vergleichbare Eigenschaften. Zum einen die Öffnungszeiten von bis zu mehreren Minuten, die Kationenselektivität und die Eigenschaft, verschiedene Hauptleitwerte anzunehmen. Jedoch sind die gemessenen Leitwerte um beinahe zwei Größenordnungen kleiner als die der in dieser Arbeit vorgestellten Ionenkanäle aus dem Regurgitat von *Lepidoptera*-Larven.

Triton X-100

Das im Laboralltag gebräuchliche Detergenz Triton X-100 wurde benutzt, um Proteolipide von *Torpedo electropax* zu solubilisieren. Dabei wurde festgestellt, dass Triton X-100 allein ausreicht, um in Lipiddoppelschichten Ionenkanäle mit für bis zu 3 min stabilen Leitwerten von etwa 200 bis 300 pS zu erzeugen. Diese verhalten sich in Lecithin-Membranen leicht spannungsabhängig, in Lecithin-Cholesterol-Membranen jedoch ohmsch. Triton X-100 Kanäle

bevorzugen Kaliumionen gegenüber Chloridionen in einem Verhältnis von 31:1. Die Detergenzien Brij-35, Tween-40 und Tween 80 erzeugten keine stabilen Ionenkanäle im BLM-Assay (Schlieper und De Robertis 1977).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von *N*-Linolenoylglutamin auf Lipiddoppelschichten untersucht. *N*-Linolenoylglutamin ist ein Fettsäure-Aminosäurekonjugat aus dem Regurgitat von *Lepidoptera*-Larven und weist Strukturelle Ähnlichkeit zu Detergenzien auf. Die davon erzeugten Leitfähigkeitsänderungen in der Membran wiesen keine stabilen Leitwerte auf, sondern lediglich eine flickernde Zunahme der Leitfähigkeit. Das Gemisch aus *N*-Linolenoylglutamin und Phaeophorbid a erzeugt aber Ionenkanäle mit stabilen Leitfähigkeiten, jedoch in einer sehr diversen Form. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass *N*-Linolenoylglutamin und Phaeophorbid a die molekulare Ursache für die Ionenkanäle sind, die nach Zugabe von Regurgitat in Lipiddoppelschichten gemessen werden können. Zum einen sind die durch Regurgitat erzeugten Ionenkanäle vergleichsweise homogen, was auf die durch *N*-Linolenoylglutamin und Phaeophorbid a erzeugten Ionenkanäle nicht zutrifft. Zum zweiten entstehen die Ionenkanäle aus *N*-Linolenoylglutamin und Phaeophorbid a erst bei Konzentrationen im BLM-Assay, wie man sie im Regurgitat findet. Regurgitat jedoch wird im BLM-Assay stark verdünnt eingesetzt. Durch Detergenzlösung lässt sich die abwehrende Wirkung von Regurgitat auf Ameisen simulieren, was auf die amphiphilen Fettsäure-Aminosäurekonjugate zurückgeführt wird (Rostas und Blassmann 2009). In der Abwehr von anderen Insekten wie Ameisen benutzen die Larven mancher Schildkäferarten (*Cassidinae*) einen Schild aus Kot, welcher große Mengen an Phaeophorbid a enthält, welches Ameisen abwehrt (Vencl *et al.* 2009).

Lipide

Auch Lipide ohne Protein können in künstliche Lipiddoppelschichten Ionenströme erzeugen. So wurden sowohl in BLM als auch *patch-clamp*-Membranen aus DOPC (Dioleoyl-Phosphatidylcholin) traten Änderungen in der Leitfähigkeit von bis zu 120 pS auf, ohne jedoch konkrete Leitwerte anzunehmen oder zu halten, sondern es traten abrupte Wechsel der Leitfähigkeit auf (Yoshikawa *et al.* 1988). Künstliche kationische Lipide wie BHTD-TADC (5,18-Bis-(2-hydroxytetradecyl)-1,5,18,22-tetraazadocosantetraoxalat) oder BHHD-TADC (5,18-Bis-(2-hydroxyhexadecyl)-1,5,18,22-tetraazadocosantetraoxalat), wie sie benutzt werden um DNS-Moleküle in Zellen einzuschleusen, erzeugen ebenfalls in niedrigen Konzentrationen langfristig auftretende Ionenkanäle in Lipiddoppelschichten von mehreren hundert pS Leitfähigkeit, höhere Konzentrationen führen zum Bruch der Membran (Chanturiya *et al.* 2003). Ausserdem lassen sich bei pH 1 Ionenflüsse über Membranen erzeugen (Kaufmann und Silman 1983). Bei höheren Temperaturen gibt es einen Phasenübergang in Membranen, wobei es ebenfalls zu Ionenkanälen im Sekundenbereich kommen kann (Antonov *et al.* 1980), jedoch nicht in vergleichsweise komplexen und heterogenen Lipidgemischen wie das in dieser Arbeit verwendete Lipidgemisch (Kaufmann und Silman 1983).

4.1.6. Zusammenfassung

Wenn man die Eigenschaften der Ionenkanäle aus dem Regurgitat von Lepidopteren-Larven mit denen anderer Ionenkanal-bildender Substanzen vergleicht, so fällt auf, dass es bei den durch Regurgitat in Lipiddoppelschichten erzeugten Ionenkanälen keine Alleinstellungsmerkmale gibt. Sowohl Leitfähigkeit als auch die Verweilzeit im geöffneten Zustand, die Ionenselektivität oder das ohmsche Verhalten treten bei Vertretern mehrerer Gruppen auf.

Die größte Übereinstimmung der Eigenschaften gibt es zu den in Vesikeln rekonstituierten Präproteintranslokasen, Tim22 und Tom40 (Tabelle 4.1). Jedoch erscheint es unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um Kandidaten für die gesuchte Ionenkanal-bildende Substanz in Regurgitat handelt, da sich hierfür entweder durch den Fressvorgang der Raupe Vesikel bilden müssten, die bei der üblichen Vorbehandlung des Regurgitats abzentrifugiert würden, oder die Proteine würden durch beispielsweise *N*-Linolenoylglutamin solubilisiert werden. Die Extraktion derart großer Proteine in funktioneller Form durch Dichlormethan hingegen scheint ebenfalls eher unwahrscheinlich. Dagegen spricht auch, dass sowohl FPLC, Ultrafiltration und die Fähigkeit, sich mit gewöhnlichen HPLC-Säulen isolieren zu lassen, auf niedermolekulare Stoffe hinweisen.

Sollten die gesuchten Ionenkanal-bildenden Substanzen pflanzlichen Ursprungs sein, dann wäre es auch denkbar, dass teilverdaute transmembrane Proteine wie zum Beispiel Ionenkanalproteine aus der Plasmamembran. Ähnliches geschieht bei Inceptin (Schmelz *et al.* 2006). Inceptin ist ein Peptid aus der plastidären F_1F_0 -Synthase, welches im Raupendarm durch Proteolyse freigesetzt wird und als Elizitor der pflanzlichen Abwehr dient (Schmelz *et al.* 2006). Dass transmembrane Bereiche von Proteinen ausreichen, um im BLM-Assay Ionenkanal-Eigenschaften zu erzeugen, wurde beispielsweise mit Teilen des nikotinergen Acetylcholinrezeptor gezeigt (Ghosh und Stroud 1991; Oblatt-Montal *et al.* 1993).

Weitere mögliche pflanzliche Quellen für die Ionenkanal-bildende Eigenschaft von Regurgitat wären Defensine und Thionine. Während es noch nicht vollends geklärt ist, ob pflanzliche Defensine neben biochemischen Wirkungen auch Ionenkanal-bildende Eigenschaften besitzen (siehe oben und (Thevissen *et al.* 2000; Thevissen *et al.* 1996; Thevissen *et al.* 2000; Thevissen *et al.* 2004) ist dies für Thionine belegt (Hughes *et al.* 2000; Thevissen *et al.* 1996). Diese kommen auch in Samen und Blättern vor (Bohlmann und Apel 1991). Daher ist es nicht zwangsweise widersprüchlich, dass sowohl im Regurgitat, das von Raupen stammt, die auf der künstlichen Diät, die unter Anderem aus Bohnenmehl besteht, gehalten wurden und auch im Regurgitat von Raupen, die auf Pflanzen gefressen haben, Ionenkanal-bildende Substanzen durch den BLM-Assay nachgewiesen wurden. Jedoch ist es auch in diesem Fall so, dass in der FPLC-Aufreinigung mittels Peptid-Säule die Ionenkanal-bildende Aktivität über eine Stunde nach den Referenzsubstanzen Cecropin A, etwa 4 kDa, und Gramicidin, etwa 2 kDa, von der Säule eluiert (Abbildung 7.5) und die mit etwa 5 kDa noch größeren Defensine und Thionine im selben Zeitfenster eluieren sollten.

Tabelle 4.1: Vergleich der Eigenschaften der Ionenkanäle aus dem Regurgitat von *S. exigua* mit Literaturwerten von anderen Ionenkanälen. Gemeinsame Eigenschaften sind grün unterlegt, N. a.: in der zitierten Literatur nicht angegeben. Literaturnachweise siehe Text.

Kanalbildner	Leitfähigkeit (pS)	Dauer	Ionenselektivität	Spannungsabhängigkeit
Regurgitat (<i>S. exigua</i>)	400	Min	Kationen	Nein
Alamethicin	40 – 1500	ms - s	Kationen	Ja
Gramicidin	50	s	Kationen	Nein
α-Hämolyisin	100 - 400	Min	Anionen	Gering
Syringopeptin/ Syringomycin	10 – 40	Min	Kationen	Ja
Dermaseptin/ Magainin	370 – 1200	ms	Beides möglich	Beides möglich
Melittin	10	s - Min	Anionen	Ja
Cecropin	7 – 160 (2500)	Min	Anionen	Ja
Defensine (Insekt)	100 – 200	s	Anionen	Ja
Thionin	125	ms - s	Kationen	Ja
Tom40	380	Min	Kationen	Nein
Tim22	540	Min	Kationen	N. a.
TOC75	70 – 145	s	Kationen	Nein
Beticolin	40 – 120	ms	Kationen	Nein
Elaiophylin	220	s	Kationen	N. a.
Amphotericin B/ Nystatin	5 – 8	s – Min	Kationen	Nein (gering)
Triton X-100	200 – 300	Min	Kationen	Nein (gering)

Dies gilt auch für polykationische Peptide wie erwähntes Cecropin. Diese sind ein zentraler Bestandteil der Immunabwehr von Insekten und deren Transkription lässt sich im Darmgewebe von *T. ni* nachweisen, kommen daher als Kandidaten für die gesuchte Aktivität in Frage, zumal es unter den polykationischen Peptiden auch Beispiele für ohmisches Verhalten und Kationenselektivität gibt (Tabelle 4.1). Dagegen spricht neben den Ergebnissen der Gelfiltration auch, dass sich die gesuchte Substanz mittels Anionenaustausch aus dem Regurgitat entfernen lässt.

Eine Reihe von Naturstoffen mit geringeren Massen als die peptidogenen Kanalbildner sind ebenfalls in der Lage, in Lipiddoppelschichten Ionenkanäle zu erzeugen. So sind diese Kanäle häufig kationenselektiv und nicht oder nur gering spannungsabhängig. Es wurden bei dem Macrodiolid-Antibiotikum Elaiophylin Leitwerte von 220 pS gemessen, was in derselben Größenordnung ist wie die von in Regurgitat gefundenen Ionenkanäle aufweisen. Das Polyen-Antibiotikum Nystatin weist Schaltzeiten von einigen Minuten auf (Tabelle 4.1). Diese

Antibiotika werden zwar nicht von Insekten produziert, jedoch finden sich eine ganze Reihe von Bakterien im Regurgitat von *S. littoralis* (Spiteller 2004) und im Darm von Termiten eine Vielzahl von Streptomycceten (Kurtböke und French 2007; Pasti *et al.* 1990), welche derartige Antibiotika produzieren (Andreoli und Monahan 1968; Fiedler *et al.* 1981). Daher ist es durchaus denkbar, dass hierin die Ursache für die Ionenkanal-bildenden Substanzen liegt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Natur der Ionenkanal-bildenden Stoffe in Regurgitat von *Lepidoptera*-Larven noch immer ungeklärt ist. Wie der Vergleich mit verschiedenen Ionenkanal-bildenden Stoffen aus der Literatur zeigt (Tabelle 4.1), lassen sich aus den Eigenschaften des gebildeten Ionenkanals, wie Leitfähigkeit, Ionenselektivität oder Spannungsabhängigkeit, keine endgültigen Rückschlüsse auf die molekulare Grundlage der Ionenkanal-bildenden Substanzen schließen. Jedoch sind Ähnlichkeiten zwischen der Ionenkanälen, die von Regurgitat in Lipiddoppelschichten erzeugt werden und denen von Präprotein-Translokasen auffällig und es scheint denkbar, dass zum Teil durch Proteolyse abgebaute auch diese Eigenschaft besitzen.

4.2. Die Wirkung von Ionenkanalbildnern auf pflanzliche Zellen und Organismen

Calciumionen sind ein bedeutender *second messenger* in der Signaltransduktion der durch die vorübergehende Veränderung seiner Konzentration in Cytosol und Nukleus in der Lage ist, Signale zu Verstärken und Differenzieren (White 2000; White 2009). Dieses trifft auch zu, wenn *Spodoptera*-Larven an Blättern der Limabohne fressen (Maffei *et al.* 2004). Der Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration konnte nicht durch mechanische Verwundung erzeugt werden, jedoch durch Regurgitat (Abbildung 3.37) und *N*-Linolenoylglutamin (Maffei *et al.* 2004). Um zu untersuchen, ob der cytosolische Anstieg der Calciumkonzentration auch durch Ionenkanal-bildende Substanzen hervorgerufen werden kann, wurde sowohl der im BLM-Assay aktive Dichlormethanextrakt als auch Alamethicin und Gramicidin zum Äquorin-Assay zugegeben. In keinem Fall ist es zu einer Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration gekommen (Kapitel 3.4.1). Da sowohl die durch Regurgitat in Lipiddoppelschichten erzeugten Ionenkanäle als auch die verwendeten Peptide keine Reaktion hervorriefen, könnte es sein, dass eine Depolarisation nicht zwangsläufig eine Veränderung der Calciumkonzentration mit sich bringt. Sowohl Gramicidin (Myers und Haydon 1972) als auch die durch Regurgitat in Lipiddoppelschichten erzeugten Ionenkanäle sind für Calciumionen praktisch undurchlässig, es wäre also auch kein primär durch die neuen Ionenkanäle induzierter Calciumionenanstieg zu erwarten gewesen, jedoch eventuell eine sekundäre, durch Signaltransduktionsprozesse ausgelöste Steigerung der Calciumionenkonzentration, wie sie zum Beispiel durch den Kaliumionenexport ausgelöst werden könnten. Auch Alamethicin zeigte keinen Einfluss auf die Calciumionenkonzentration, obwohl es für Calciumionen durchlässige Ionenkanäle bildet (Eisenberg *et al.* 1973) und Pflanzenzellen depolarisiert (siehe unten). Es ist im Bereich des möglichen, dass durch Ionenkanal-bildende Peptide oder Substanzen eine über Depolarisation

laufende Signalwirkung erzeugt wird, die – zumindest im betrachteten Zeitraum – ohne Calciumionen als *second messenger* auskommt. Dies wird im Folgenden geschildert.

Alle lebenden Zellen und einige Zellorganelle wie Mitochondrien oder Plastiden sind von einer energetisierten Membran umgeben. Dieses Membranpotenzial dient beispielsweise dem Stofftransport, der Überführung des elektrischen Potenzials in chemische Energie durch Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) oder der Signalweiterleitung durch Aktionspotenziale. Da das Membranpotenzial für Zellen lebensnotwendig ist, ist es auch Ziel von Angriffen durch andere Organismen. Dies geschieht entweder durch Toxine die auf zelluläre Ionenkanäle wie Natrium- oder Kaliumkanäle hemmend wirken, wie es bei den Giften von Spinnen, Skorpionen, Schlangen und Kegelschnecken der Fall ist (Billen *et al.* 2008; Mouhat *et al.* 2008). Oder es werden Poren-bildende Toxine (*pore forming toxins*, PFT) gebildet, von denen einige bereits vorgestellt wurden. Diese permeabilisieren die Membran für Ionen (Kapitel 4.1) und sind in der Lage, das Membranpotenzial zu zerstören (Beven und Wroblewski 1997; de Waal *et al.* 1991; Juretic *et al.* 1994) und pro- und eukaryotische Zellen letztlich zu lysieren (Leptihn *et al.* 2009; Nishimura *et al.* 2004).

Diese Art von Toxinen wirken auch auf pflanzliche Organismen. So wurden einige Untersuchungen mit dem Modellpeptid Alamethicin durchgeführt. Dies führt bei *P. lunatus* zu Duftemission und Akkumulation von Salicylat (Engelberth *et al.* 2001) und bei *A. thaliana* zur Emission von Methylsalicylat (Chen *et al.* 2003). In der pflanzlichen Zelle wirkt Alamethicin auf die Membran von Mitochondrien, die sie für Cofaktoren wie NADH und NADPH permeabilisiert und die Elektronentransportkette zumindest teilweise hemmt (Johansson *et al.* 2004). Dies wurde bestätigt und zusätzlich die Permeabilisierung des Plasmalemmas gezeigt, nicht jedoch des Tonoplasten (Matic *et al.* 2005). Für den Tonoplast von *Chara corallina* wurde allerdings demonstriert, dass Alamethicin in der Lage ist, in diesen zu inserieren (Lühring *et al.* 2007). Bei *A. thaliana* wurde außerdem rRNA-Abbau und letztlich der Zelltod, ausgelöst durch eine Behandlung mit Alamethicin, nachgewiesen (Rippa *et al.* 2007).

Die Wirkung von Alamethicin auf pflanzliche Zellen ist keine Ausnahme, andere Ionenkanal-bildende Toxine haben vergleichbare Effekte. So lysiert Syringopeptin, ein Lipodepsipeptid aus *P. syringae* pv. *syringae* Erythrozyten und Tabak-Protoplasten (Hutchison und Gross 1997). Auch Cecropine wirken lytisch auf *Escherichia coli*-Zellmembranen (Lockey und Ourth 1996) und induzieren Ionenkanäle in Krebszellen (Ye *et al.* 2004). Eine Wirkung auf Pflanzen scheint jedoch nicht gegeben, bzw. sehr viel schwächer zu sein. Es gibt eine Reihe von Studien, in denen Cecropine heterolog in Pflanzen exprimiert wurden. So wurde bei Kartoffel und Tabak der Nachweis der Transkription erbracht, es konnten aber keine Peptide nachgewiesen werden, was von den Autoren auf einen schnellen proteolytischen Abbau zurückgeführt, jedoch nicht belegt wurde (Florack *et al.* 1995). Dies könnte als eine rasche Entgiftung verstanden werden. In Tabak gibt es aber auch eine Reihe von Studien, in denen das Cecropin in der transgenen Pflanze nachgewiesen wurde. Zum Teil konnte keine steigernde Wirkung auf die Resistenz von Pflanzen nachgewiesen werden (Hightower *et al.* 1994) während andere Gruppen mit heterolog exprimiertem modifiziertem Cecropin, in Tabak oder Apfel, oder Analoga von Cecropin eine gesteigerte Resistenz gegenüber *P. syringae* pv. *tabaci*, *Erwinia*

amylovora bzw. *P. solanacearum* gefunden haben (Huang *et al.* 1997; Jaynes *et al.* 1993). In keiner dieser Studien ist erwähnt, dass die transgenen Pflanzen unter den exprimierten Peptiden leiden würden oder Anzeichen einer Erkrankung aufwiesen. Dies mag daran liegen, dass Sterole in den Membranen die Ionenkanal-Bildung durch Cecropin stark inhibieren (Christensen *et al.* 1988). Auch für das heterolog in Tabak, Banane und Tomate exprimierte Magainin-Analogon MSI-99 wurde eine gesteigerte Resistenz gegen verschiedene Phytopathogene gezeigt (Alan *et al.* 2004; Chakrabarti *et al.* 2003).

Den Zusammenhang von Ionenkanal-Bildung und Aktivierung der pflanzlichen Immunabwehr untersuchte eine Arbeit, die die Interaktion zwischen *P. syringae* pv. *phaseolicola* und *Petroselinum crispum* anhand des zum Typ-III Sekretionssystem gehörenden HrpZ1-Proteins betrachtete (Engelhardt *et al.* 2009). Das Protein HrpZ1 ist in der Lage, in Vesikeln und planaren Lipiddoppelschichten kationenspezifische Ionenkanäle zu erzeugen (Engelhardt *et al.* 2009; Lee *et al.* 2001). Verkürzte HrpZ1-Varianten, bei denen der C-Terminus fehlte, waren in der Lage, Ionenkanäle zu erzeugen, nicht jedoch die untersuchten pflanzlichen Immunabwehrmarker zu induzieren. Umgekehrt waren HrpZ1-Varianten, bei denen der N-Terminus fehlte, nicht in der Lage, Ionenkanäle zu erzeugen, jedoch die untersuchten pflanzlichen Immunabwehrmarker zu induzieren. Dies wurde Mutationsstudien von HrpZ1 bestätigt. Als Indikatoren der Immunabwehr wurde die Aktivität der MAP-Kinasen MPK3 und MPK6, die induzierte Transkription der pathogenitätsbezogenen Proteine PR1 und PR2 sowie die Akkumulation von Phytoalexin gemessen (Engelhardt *et al.* 2009). Während es keinen Zweifel an der rezeptorvermittelten Perzeption des HrpZ1-Proteins gibt, so wurden dennoch ausschließlich Marker für die Interaktion von *P. syringae* pv. *phaseolicola* und *Petroselinum crispum* anhand des zum Typ-III Sekretionssystem gehörenden HrpZ1-Proteins betrachtet. Das Typ-III Sekretionssystem ist ein sehr komplexes System aus einer Vielzahl von Proteinen (Jin *et al.* 2003). Es erscheint unwahrscheinlich, dass das HrpZ1-Protein außerhalb des stark regulierten Sekretionssystems allein auftritt und Poren bildet und es ist fraglich, ob der Injektionsapparat, durch den die Effektoren in die Pflanzenzelle injiziert werden, Ionenflüsse im größeren Maße gestattet. Daher ist es zweifelhaft, ob bei der Interaktion zwischen *P. syringae* pv. *phaseolicola* und *Petroselinum crispum* durch Porenbildung entstehende Ionenflüsse von Bedeutung sind und daher die gewählten Indikatoren der Immunabwehr geeignet sind, Ionenflüsse oder Depolarisation indirekt nachzuweisen. Aus diesem Grund ist es nicht möglich, die Aussage, dass die Ionenkanal-bildenden Eigenschaften von HrpZ1 für die Erkennung von *P. syringae* pv. *phaseolicola* keine Bedeutung hat, auf andere Systeme mit Ionenkanal-bildenden Stoffen zu übertragen.

Dass Ionenkanal-bildende Peptide in der Lage sind, Membranpotenziale negativ zu beeinflussen wurde mit Magainin I und II demonstriert. Es wurden die Membranpotenziale von Mitochondrienmembranen abgesenkt (de Waal *et al.* 1991) sowie das Potenzial von Cytochrom-Oxidase-enthaltenden Liposomen, die keine weiteren Proteine enthielten und somit die Wirkung von Magainin auf die erhöhte Membranleitfähigkeit zurückzuführen war (Juretic *et al.* 1994). Auch in *Spiroplasma melliferum* konnte eine Depolarisation des

Membranpotenzials durch verschiedene *pore forming toxins*, darunter Gramicidin S, Melittin, Cecropin A, Magainin 2 und Alamethicin gezeigt werden (Beven und Wroblewski 1997).

Auch bei Pflanzen (Hafer, Mais und Hirse) wurde nach Kontakt zu Toxinen der Pilze *Helminthosporium victoriae* und *Periconia circinata* eine Membrandepolarisation gemessen. Jedoch sind die Toxine nicht näher beschrieben und das Vorkommen von resistenten Kultivaren kann ein Hinweis auf eine Rezeptor-vermittelte Reaktion sein (Gardner 1974).

Dass nicht nur Angriffe von Phytopathogenen einen Einfluss auf das Membranpotenzial von Pflanzen haben, wurde durch Messungen an *P. lunatus* gezeigt. Hierbei wurde festgestellt, dass es nach Raupenfraß durch *S. littoralis* zu einer lokalen Depolarisation kommt. Diese ließ sich zum Teil auch durch Fettsäure-Aminosäurekonjugate auslösen (Maffei *et al.* 2004). Wie die in dieser Arbeit gezeigten Versuche ergaben, sind jedoch von *N*-Linolenoylglutamin sehr viel höhere Konzentrationen nötig, um Leitfähigkeitsänderungen in derselben Größenordnung zu erhalten wie mit den Ionenkanal-bildenden Substanzen aus Regurgitat (Kapitel 3.1 und Material und Methoden). Daher ist der Schluss gerechtfertigt, dass die potenziell depolarisierenden, Ionenkanal-bildenden Substanzen aus Regurgitat, die in planaren Lipiddoppelschichten aus Lipiden von Soja-Membranen (Material und Methoden), Ionenkanäle erzeugen, auch an der nach Herbivorie gemessenen Depolarisation (Maffei *et al.* 2004) beteiligt sind.

Da die in Regurgitat von *Lepidoptera*-Larven enthaltenen Substanzen noch nicht identifiziert sind, wurde das häufig als Modell eingesetzte Peptid Alamethicin benutzt, um zu überprüfen, ob der pflanzliche Organismus auf die Anwesenheit eines Ionenkanal-bildenden Peptids mit einer Depolarisation reagiert. Alamethicin wurde benutzt, da es bekannt war, dass Pflanzen mit Duftemission und steigenden Konzentrationen von Jasmonsäure und Salicylsäure auf Alamethicin reagieren (Engelberth *et al.* 2001), Alamethicin in pflanzliche Membranen eindringen kann (Matic *et al.* 2005) und in *Spiroplasma melliferum* zur Membrandepolarisation führt (Beven und Wroblewski 1997). Bei den Versuchen mit Alamethicin und Limabohne, bzw. Gerste wurde gezeigt, dass es sowohl zu einer lokalen wie auch systemischen Depolarisation kommt (Kapitel 3.4.2). Das dabei erhaltene elektrische Signal ist in seinem Erscheinen ungewöhnlich. Von den drei bekannten elektrischen Signalen, Aktionspotenziale, Systempotenziale und Variationspotenziale, scheint es am ehesten Ähnlichkeit mit den Variationspotenzialen zu besitzen. Systempotenziale breiten sich durch eine durch Aktivierung der Protonenpumpe verursachte Hyperpolarisation aus (Zimmermann *et al.* 2009) und Aktionspotenziale weisen einen typischen Spannungsverlauf mit Alles-oder-Nichts-Charakteristik auf und propagieren sich selbst. Ein derartiger Spannungsverlauf ist beispielsweise zwischen den Experimenten in Abbildung 3.43 zu sehen (Davies 2006). Das Variationspotenzial ist, vergleichbar mit den hier vorgestellten Daten, ebenfalls eine sich ausbreitende Depolarisation, ausgehend von einer Inaktivierung der Protonenpumpe und zumindest soweit bekannt, ohne eine Veränderung der Calciumionen-Konzentration (Davies 2006). Jedoch schwächt sich das Signal des Variationspotenzials mit zunehmender Distanz und Zeit ab (Dziubinska *et al.* 2003). Beides ist in dem hier gezeigten experimentellen Rahmen nicht der Fall und erfordert weitere Arbeiten in der Zukunft. Dass es zu keiner Depolarisation durch

Regurgitat gekommen ist, kann an den experimentellen Bedingungen liegen, da bei den hier gezeigten Versuchen es nicht möglich war, so nahe an der Verwundungstelle zu messen wie in der Arbeit von Maffei (Maffei *et al.* 2004) und damit die vermutlich nur lokale Wirkung bei geringerer Konzentration wie im Regurgitat zu erfassen.

Damit ist gezeigt, dass durch Ionenkanal-bildende Peptide das Membranpotenzial von Pflanzen beeinflusst werden kann, wie es auch zum Beispiel durch Herbivorie geschieht (Maffei *et al.* 2004).

4.3. Die Rolle von Ionenkanal-bildenden Substanzen im Immunsystem von Insekten

Neben Verwundungen ist das Darmepithel die Haupteintrittsstelle für Bakterien in den Körper von Insekten. Daher spielt der Darm eine bedeutende Rolle in der Immunabwehr. Insekten besitzen zwar keine adaptive Abwehr, sondern nur eine angeborene Immunabwehr (*innate immunity*), welche durch verschiedene meist für Bakterien typische Moleküle induziert wird, wie Lipopolysaccharide oder β -1,3-Glucane. Die davon induzierte Abwehr besteht zum Teil aus Enzymen wie Lysozym, aus Peptiden, die die Synthese von Proteinen der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien beeinträchtigen, wie Gloverin und auch membranaktive Peptide wie die erwähnten Defensine und Cecropine (Axen *et al.* 1997; Kanost *et al.* 2004). Den wichtigsten Teil der Biosynthese übernimmt dabei der Fettkörper, der diese Abwehrstoffe bei einer Infektion an die Hämolymphe abgibt (Samakovlis *et al.* 1990; Tzou *et al.* 2000), jedoch konnte bei *T. ni* gezeigt werden, dass auch im Gewebe des Mitteldarms die Transkription von Immunabwehr-bezogenen Genen durch bakterienhaltige Nahrung induziert werden, darunter auch Cecropine (Freitak *et al.* 2007). Darüberhinaus werden für die Entwicklung bakterieller Pathogenitätsfaktoren wichtigen quorum sensing-Moleküle im Insektendarm rasch abgebaut (Funke *et al.* 2008).

Dem stehen die Bakterien jedoch nicht wehrlos gegenüber. So ist beispielsweise *Bacillus thuringiensis* in der Lage, mit Inhibitor A eine Protease zu sekretieren, die Attacine und Cecropine abbaut (Dalhammar und Steiner 1984) oder durch die Produktion von Cry-Toxinen, welche in der Lage sind, Ionenkanäle zu bilden (Pardo-Lopez *et al.* 2006) die Membranen des Darmepithels zu lysieren (Knowles 1994). Man sollte nicht aus den Augen verlieren, dass es im Ökosystem Insektendarm ebenfalls Ionenkanal-bildende Substanzen mit nachgewiesenen Funktionen gibt, so dass die in dieser Arbeit präsentierten Ionenkanal-bildende Substanzen auch in diesem Umfeld eine mehr oder weniger große Rolle spielen könnten.

4.4. Ausblick

Der Fokus weiterer Experimente wird auf der Identifikation der Ionenkanal-bildenden Substanz(en) liegen. Da für die vorliegende Arbeit bei der Extraktion mit Dichlormethan bis zu 6 ml Regurgitat eingesetzt und anschließend mittels HPLC/MS analysiert wurden, scheint es nötig, dass mit wesentlich höheren Volumina gearbeitet wird. Dies war es auch bei der Identifikation von Inceptin nötig, dafür wurde Regurgitat von einem Volumen von 100 ml

extrahiert (Schmelz *et al.* 2006). Die Extraktion mit Dichlormethan wird dafür sehr hilfreich sein, da sich anschließend an die Extraktion das Volumen durch Evaporation des Lösungsmittels stark reduzieren lässt.

Die dann identifizierten Ionenkanal-bildenden Substanz(en) sollten im BLM-Assay charakterisiert und der Vergleich mit den in dieser Arbeit gezeigten Werten gezogen werden. Darüberhinaus besteht dann die Möglichkeit, dass man die Messungen des Membranpotenzials an ganzen Pflanzen wiederholt, um zu entscheiden, ob die Substanz(en) tatsächlich zur Depolarisation der Plasmamembran führt, ähnlich wie mit Alamethicin beobachtet, und sich dadurch Gewissheit über Relevanz im Kontext der Herbivorie zu verschaffen. Dabei sollte das Augenmerk vor allem auf die sehr lokale Umgebung der Verwundungsstelle gelegt werden (Maffei *et al.* 2004).

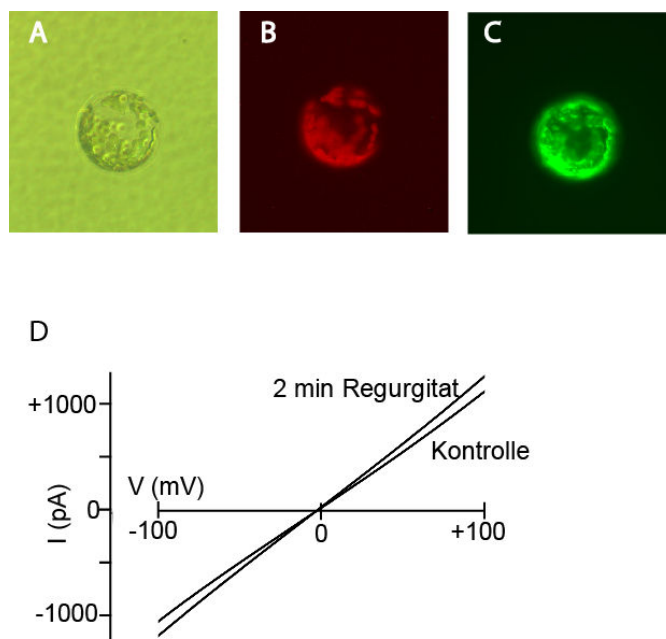


Abbildung 4.1: Patch-clamp-Messung mit Protoplasten von *A. thaliana*. **A:** Hellfeldmikroskopische Aufnahme eines Protoplasten. **B:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Protoplasten, Autofluoreszenz von Chlorophyll. **C:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Protoplasten, Lebendfärbung mit FDA. **D:** Patch-clamp-Messung im *cell attached*-Modus mit einem Protoplasten von *A. thaliana*.

Eine weitere Charakterisierung der Wirkung auf die pflanzliche Zelle kann durch Messungen mittels *patch-clamp*-Technik an Protoplasten erreicht werden. Dadurch lässt sich der Nachweis führen, dass die Ionenkanal-bildende Substanz tatsächlich in energietisierte pflanzliche Membranen inseriert und dort Ionenflüsse hervorruft. Man muss bedenken, dass es sich bei Protoplasten um sehr gestresste Zellen handelt, welche auf äußere Reize nur reduziert reagieren, da die zur Protoplastierung eingesetzten Enzyme wie Pectolyase und Cellulase die Wirkung von Elizitoren haben. Dies wurde am Beispiel der Reaktion von damit behandelten *Medicago sativa*-Zellen auf Nod-Faktoren gezeigt (Carden und Felle 2003). Jedoch lassen sich aufeinanderfolgende Messungen von Kontrolle und der zu testenden Substanz am selben

Protoplasten, in diesem Fall die Ionenkanal-bildende Substanz aus dem Regurgitat von *Lepidoptera*-Larven gut durchführen. Mit diesem Ansatz ist es in Vorversuchen gelungen zu zeigen, dass Regurgitat von *S. littoralis* Ionenflüsse in *Arabidopsis*-Protoplasten auslöst (Abbildung 4.1). Die Messungen fanden im *cell-attached*-Modus statt und zeigten 2 min nach Zugabe des Regurgitats einen erhöhten Stromfluss. Ob dieser durch die Ionenkanal-bildenden Substanzen aus dem Regurgitat oder durch eine Ionenkanalöffnung in Folge einer Rezeptor-vermittelten Perzeption eines Elizitors erfolgte, kann nur durch die Zugabe der Ionenkanal-bildenden Verbindung aus Regurgitat als Reinsubstanz geklärt werden.

5. Zusammenfassung

Im Kontext der Wechselwirkungen von Pflanzen mit herbivoren Insekten wie Raupen kommt es zu induzierten Änderungen des pflanzlichen Stoffwechsels. Dabei werden giftige Stoffe zur direkten Verteidigung und auch Nektar oder Duftstoffe zur indirekten Verteidigung durch Anlocken von predatorischen oder parasitoiden Insekten gebildet. Dies alles geschieht als Folge einer komplexen Reihe von Signalwahrnehmung und -transduktion.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den sehr frühen Ereignissen während des Befalls von Pflanzen durch Raupen. In der pflanzlichen Abwehr von Herbivorie gibt es, noch bevor es zu einer Antwort in Form von differenzieller Genexpression kommt, eine Reihe von physiologischen Änderungen in den Zellen und Geweben der Pflanze. Dazu gehören Veränderungen der Konzentration an cytosolischen Calciumionen, die als sekundäre Botenstoffe Signalfunktion erfüllen, sowie ein Anstieg der Wasserstoffperoxidkonzentration, welches neben seiner Funktion als Signalstoff auch der Abwehr von Infektionen mit Phytopathogenen dienen kann. Als erste Reaktion der Pflanze wird aber eine Depolarisation der Plasmamembran gemessen. Als Auslöser hierfür gelten beispielsweise Fettsäure-Aminosäurekonjugaten oder Wasserstoffperoxid im Regurgitat von Raupen.

In dieser Arbeit wurde eine weitere mögliche Ursache für die Depolarisation beschrieben und untersucht.

Im Regurgitat von Raupen finden sich Ionenkanal-bildende Substanzen. Diese wurden durch die BLM-Technik (*black lipid membrane*, BLM) nachgewiesen. Mit Hilfe dieser Technik wurde gezeigt, dass die genannten Ionenkanal-bildenden Substanzen nach Zugabe zum Test spontan in künstliche, planare Lipiddoppelschichten aus pflanzlichen Lipiden ohne Membranproteine inserieren und dadurch die Leitfähigkeit der Membran erheblich erhöhen.

Derartige Ionenkanal-bildenden Verbindungen ließen sich im Regurgitat der Larven von acht verschiedenen *Lepidoptera*-Arten aus vier Familien nachweisen. Dazu gehörten *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera exigua*, *Helicoverpa armigera* und *Trichoplusia ni* als Vertreter der *Noctuidae*, sowie *Manduca sexta* (*Sphingidae*), *Pieris rapae* und *Pieris brassicae* (beide *Pieridae*) und *Plutella xylostella* (*Plutellidae*).

Das Regurgitat von Larven der Arten *S. littoralis*, *S. exigua*, *M. sexta*, *P. rapae* oder *P. brassicae* erzeugte in planaren Lipiddoppelschichten Einzelkanäle mit einer Leitfähigkeit von etwa 404 pS (± 87 pS). Diese ließen sich aufgrund ihres Leitwertes statistisch nicht voneinander unterscheiden. Im Allgemeinen wiesen diese Ionenkanäle sehr lange Verweildauern von bis zu 2000 s im geöffneten Zustand auf. Das Regurgitat von *P. xylostella* erzeugte Einzelkanäle mit einem Leitwert von etwa 1161 pS (± 84 pS). Die phylogenetisch weite Verbreitung dieser Ionenkanal-bildenden Substanzen weist auf generelle Bedeutung für die Larven von Lepidopteren hin.

Die Ionenkanäle, die durch das Regurgitat von *S. exigua* in planaren Lipiddoppelschichten erzeugt wurden, besitzen eine Kationenselektivität bei Kaliumchlorid von etwa 4,9:1. Die Ionenkanal-bildenden Substanzen aus dem Regurgitat von *S. littoralis* erzeugten für die Ionen von Natrium, Kalium, Rubidium und Cäsium permeable Ionenkanäle ohne eine statistisch

signifikant unterschiedliche Leitfähigkeit. Eine Durchlässigkeit für Calciumionen konnte nicht festgestellt werden.

Neben den genannten, typischerweise auftretenden Leitwerten traten in einigen Fällen Ionenkanäle von geringerer Leitfähigkeit und schnelleren Schaltfolgen auf.

Die Ionenkanal-bildenden Substanzen aus dem Regurgitat von *S. littoralis* ließen sich auf verschiedenen Wegen aufreinigen. Mittels Dichlormethan ließen sich die gesuchten Ionenkanal-bildenden Aktiviäten aus Regurgitat extrahieren und es war möglich, durch Ultrafiltration, Gelfiltration und HPLC die gesuchten Substanzen weitgehend zu reinigen. Vergleiche der jeweiligen aktiven Fraktionen durch massenspektroskopische Verfahren ergaben keinen Hinweis auf die Substanz. Mit der Ionenkanal-bildenden Substanz koeluierten auch andere Substanzen: 8-Hydroxy-2-chinolinsäure und Phaeophorbid a konnten identifiziert werden. Beide Substanzen wirken jedoch nicht in Form von definierten Ionenkanälen auf künstliche Lipiddoppelschichten ein.

N-Linolenoylglutamin ist ein bekannter Elizitor der pflanzlichen Abwehr. Als Fettsäure-Aminosäurekonjugat besitzt es eine amphiphile Struktur und destabilisiert planare Lipiddoppelschichten in ähnlichen Konzentrationen, in denen es natürlicherweise in Regurgitat gefunden wird. Dies geschieht ebenfalls nicht in Form von definierten Ionenkanälen.

Das Regurgitat von *S. littoralis* verursacht eine transiente Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration im Aequorin-System, jedoch wurde diese Reaktion weder von extrahierten Ionenkanal-bildenden Substanzen noch von bekannten Ionenkanal-bildenden Peptiden wie Alamethicin oder Gramicidin erzeugt. Dies legt den Schluss nahe, dass verschiedene Signaltransduktionswege beteiligt sind.

Das als Modell für Ionenkanal-bildende Peptide dienende Alamethicin war in der Lage, das Membranpotenzial von *Phaseolus lunatus* lokal zu depolarisieren und bei *Hordeum vulgare* auch systemisch zu einer Depolarisation zu führen. Dies konnte durch nicht-invasive Messungen des apoplastischen Potenzials gezeigt werden. Durch diesen Nachweis wurde die experimentelle Lücke geschlossen und gezeigt, dass Ionenkanal-bildende Substanzen auch bei Pflanzen zur Depolarisation der Plasmamembran führen können. Diese Depolarisation wiederum, wie sie auch bei dem Fressen von Raupen an Pflanzen gemessen wird, kann sowohl Signalcharakter für die Pflanze besitzen als auch ein Versuch des Insekts sein, die Reaktionsfähigkeit der pflanzlichen Zelle zu beeinflussen.

6. Summary

In the context of interactions between plants and herbivorous insects, such as caterpillars, there are induced changes of the plant metabolism. This leads to the production of toxic compounds for direct defense or the production of nectar or volatile compounds that function in indirect defense by attracting predatory or parasitoid insects. All these changes are consequences of complex chains of signal perception and signal transduction.

This thesis addresses the earliest events during the infestation of plants by caterpillars. In plant defense of herbivory, there are – even before a response in terms of differential gene expression is manifested – a number of physiological changes in the cells and tissues of the plant appear. Among them are changes in the cytosolic concentration of calcium ions, which are second messengers in signal transduction, as well as an increase of the concentration of hydrogen peroxide, which serves as well as a signal as it is also preventing an infection by phytopathogens. But as the very first reaction of the plant, a depolarization of the plasma membrane is measured. The trigger for this reaction are fatty acid-amino acid conjugates and hydrogen peroxide which both are present in the regurgitate of caterpillars.

The aim of this thesis was the description and characterization of another possible origin of the depolarization of the plant plasma membrane.

There are channel-forming compounds present in the regurgitate of caterpillars. These were detected by the use of black lipid membranes. With the help of this technique it could be shown that these channel-forming compounds, after addition to the setup, insert spontaneously into the artificial, planar lipid bilayers. These bilayers are made of plant lipids that do not contain any proteins. By doing so, these compounds led to a considerable increase in membrane conductivity.

It was possible to detect such channel-forming compounds in regurgitates of eight different species from four families of *Lepidoptera*. Among them were *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera exigua*, *Helicoverpa armigera* and *Trichoplusia ni* as representatives of the *Noctuidae*, *Manduca sexta* (*Sphingidae*), *Pieris rapae* and *Pieris brassicae* (both *Pieridae*) and finally *Plutella xylostella* (*Plutellidae*).

Regurgitates from larvae of the species of *S. littoralis*, *S. exigua*, *M. sexta*, *P. rapae* or *P. brassicae* were able to produce single channels in planar lipid bilayers with a conductance of 404 pS (± 87 pS). According to their conductivity, it was not possible to discriminate between them by statistics. In general, these ion channels rested very long times in the open state. Times of up to 2000 s were recorded. Regurgitate of *P. xylostella* produced single channel conductances of 1161 pS (± 84 pS). The broad phylogenetic distribution of these channel-forming compounds points to a general relevance for the larvae of lepidopterans.

The ion channels produced in planar lipid bilayers by regurgitate of *S. exigua* exhibited a cation-selectivity in the case of potassium chloride of 4,9 vs. 1. The channel forming compounds from regurgitate of *S. littoralis* produced permeable channels for the ions from sodium, potassium, rubidium and cesium without a statistically significant difference in their conductivity. Conductivity for calcium ions was not detected.

Apart from the above mentioned typical ion channels, there were occasionally measurements of ion channels with a lower conductivity and faster switching times.

It was possible to purify the channel-forming substances from regurgitate of *S. littoralis* by several means. The use of dichloromethane extracted the channel-forming activity from regurgitate and it was also possible to purify the sought-after substances by ultra filtration, gel filtration, and HPLC. Comparison of the respective active fractions by mass spectrometric analyses revealed no clues on the compounds in search for. But together with the channel-forming compounds other compounds co-eluted: Among them 8-Hydroxy-2-chinolinic acid and Pheophorbide a were identified. Both substances had an impact on the planar lipid bilayers, but not in terms of defined ion channels.

N-Linolenoyl-glutamine is a known elicitor of plant defense. As a fatty acid-amino acid conjugate, it possesses an amphiphilic structure and destabilizes planar lipid bilayers when added in comparable final concentrations as found in regurgitate. Again, this impact on the planar lipid bilayers does not resemble defined ion channels.

Regurgitate of *S. littoralis* causes a transient increase in the concentration of cytosolic calcium ions in the Aequorin-system. But this reaction was neither produced by the extracted channel-forming compounds from regurgitate nor by known channel-forming peptides like Alamethicin or Gramicidin. This points to different signal transduction pathways.

Alamethicin serves as a model ion channel-forming peptide. In *Phaseolus lunatus*, Alamethicin leads to a local depolarization of the plant plasma membrane and in *Hordeum vulgare*, it induces a systemic depolarization. This was shown by non-invasive measurement of the apoplastic potential. By this evidence, a gap in experiments was closed and it was shown, that channel-forming substances can induce plasma membrane depolarization also *in planta*. This depolarization, just as it is measured during the feeding of a caterpillar on the plant, might as well serve as a signal for the plant as it might represent the attempt of the insect to affect the plant cells ability to respond.

7. Anhang

7.1. Abbildungen

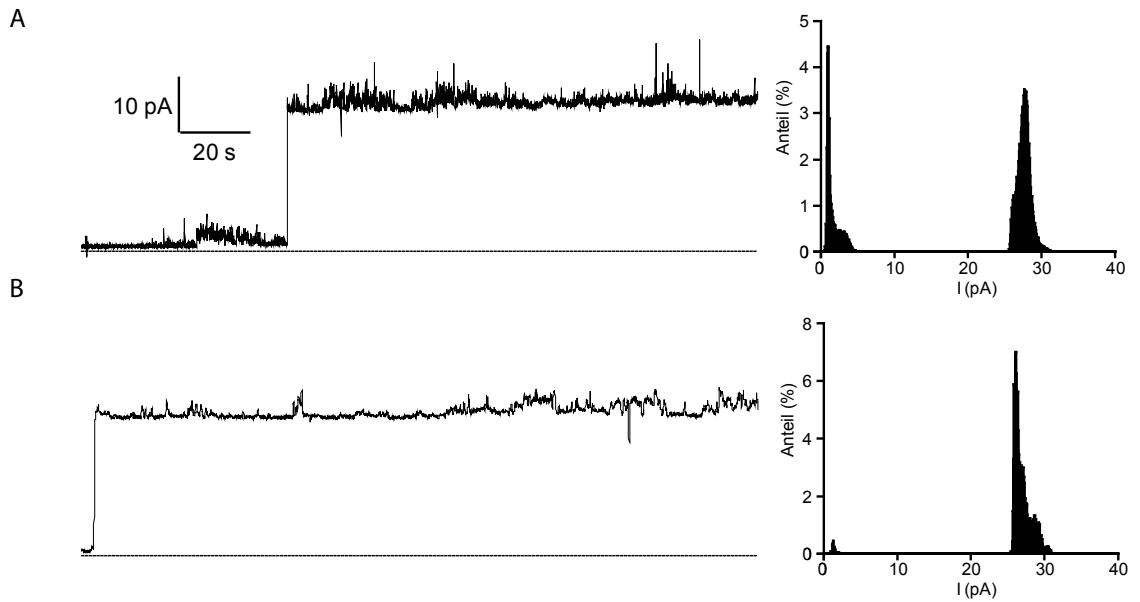


Abbildung 7.1.: Aufzeichnung mit Regurgitat von *Helicoverpa armigera*. 30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. **A:** Übersicht der Aufnahme mit Amplitudenhistogramm. **B:** Detail von A mit Amplitudenhistogramm.

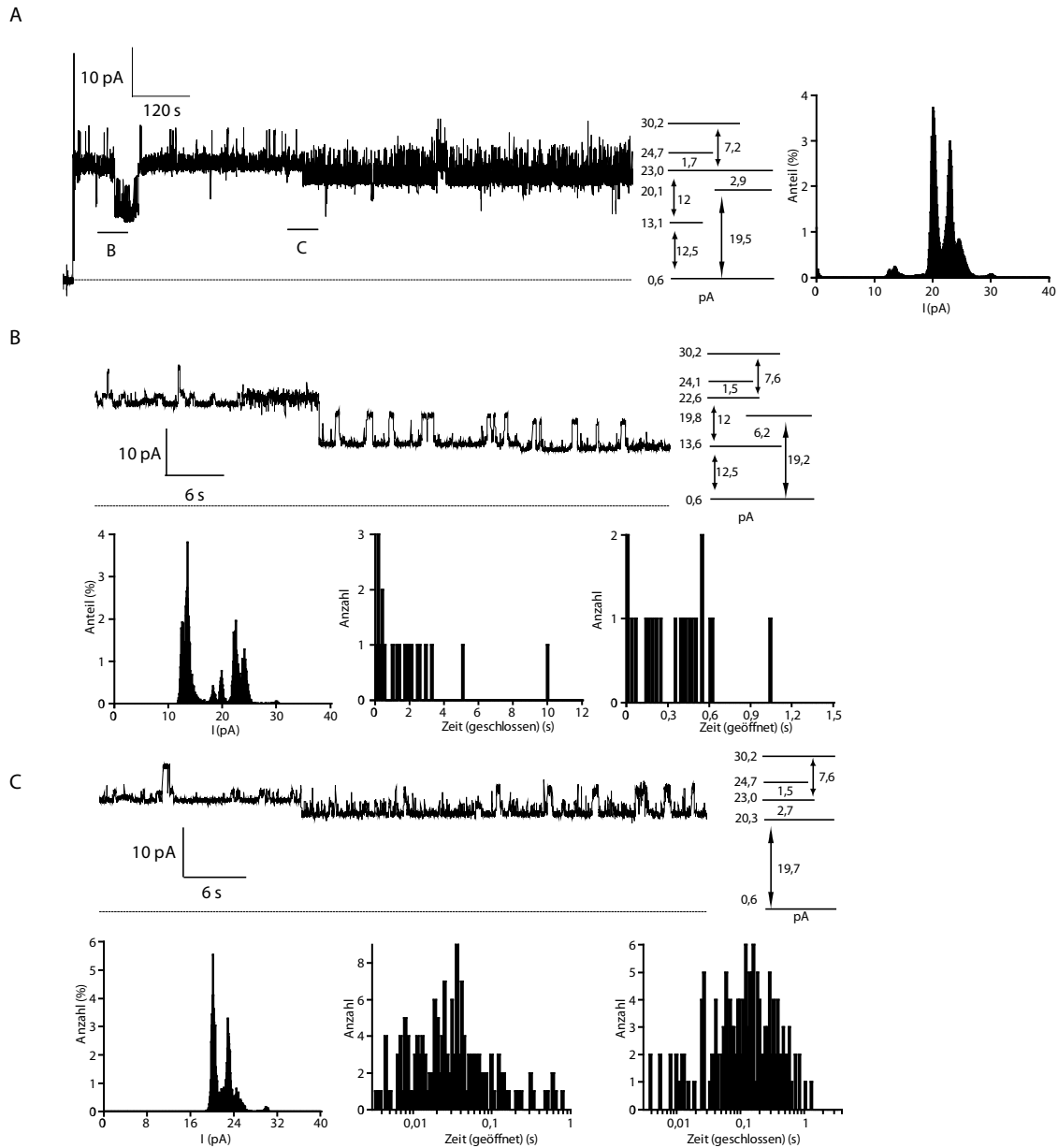


Abbildung 7.2.: Aufzeichnung mit Regurgitat von *Trichoplusia ni*. 30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. **A:** Übersicht der Aufnahme mit Amplitudenhistogramm. **B:** Detail von A. mit Amplitudenhistogramm und Histogrammen zu den Verweilzeiten im geöffneten und geschlossenen Zustand ausgehend vom Unterleitwert ab 1/3 des Ausschnitts. **C:** Detail von A mit Amplitudenhistogramm und Histogrammen zu den Verweilzeiten im geöffneten und geschlossenen Zustand ausgehend vom Unterleitwert ab 1/3 des Ausschnitts.

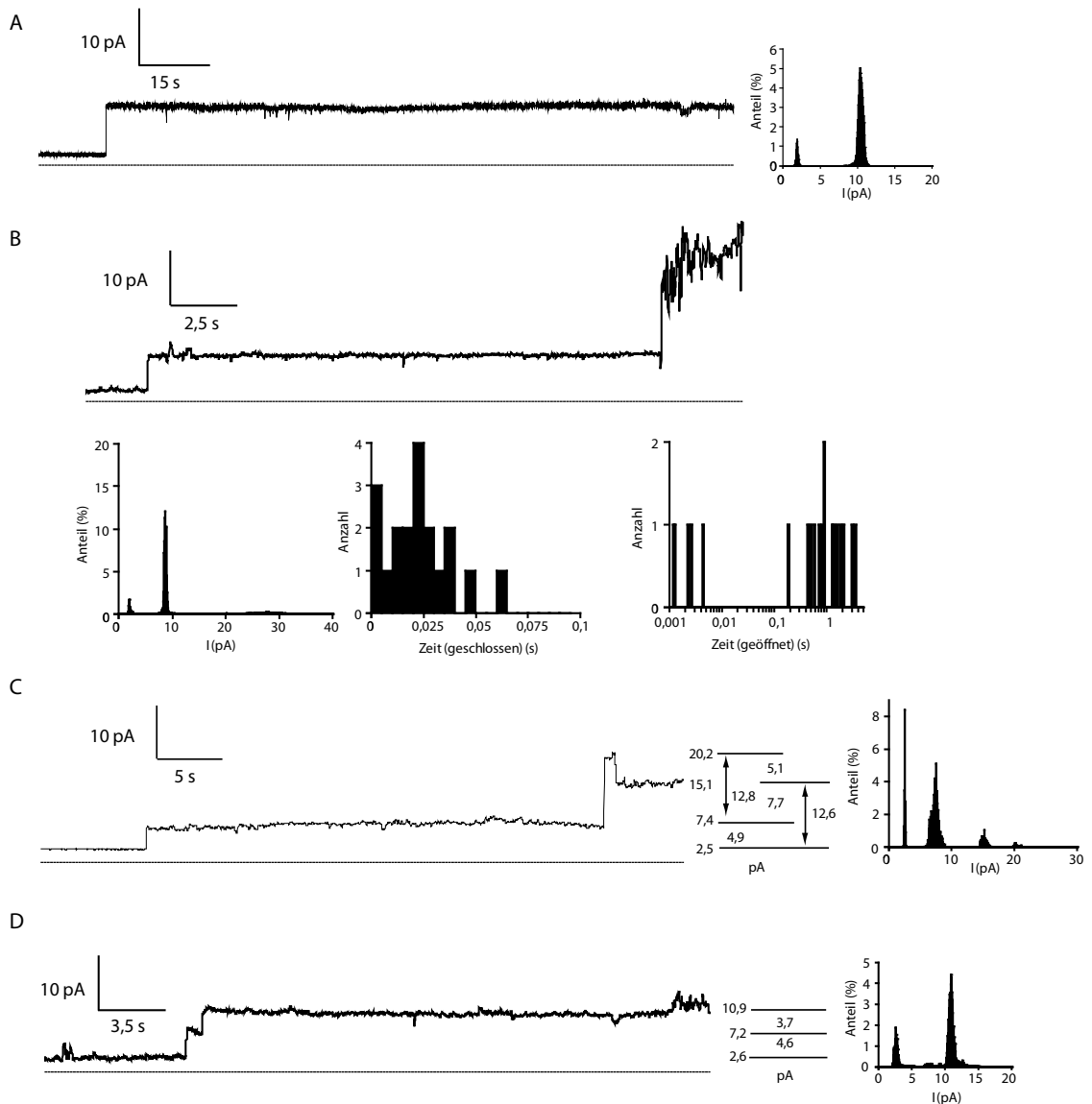


Abbildung 7.3.: Aufzeichnungen mit Regurgitat von *Manduca sexta*. 25 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. **A:** Aufnahme eines Einzelkanals mit Amplitudenhistogramm. **B:** Aufnahme eines Einzelkanals mit Amplitudenhistogramm und Histogrammen für die Verweilzeiten auf dem Hauptleitwert (geöffnet) und Dauer der nicht aufgelösten Schaltereignisse. **C:** Aufnahme mit mehreren Öffnungs- und Schließvorgängen, mit Amplitudenhistogramm. **D:** Aufeinanderfolgende Öffnung zweier Einzelkanäle. Amplitudenhistogramm.

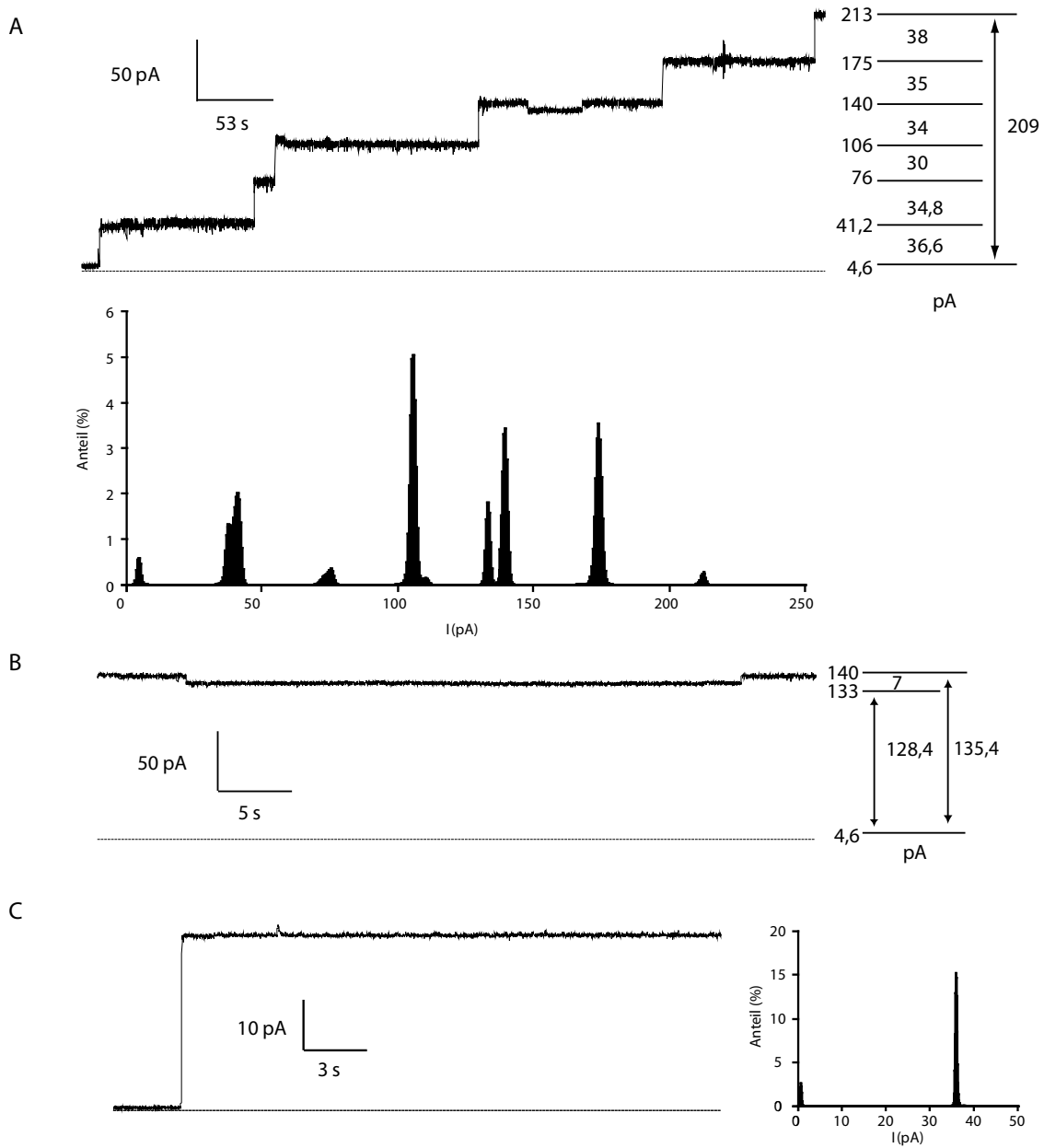


Abbildung 7.4.: Aufzeichnungen mit Regurgitat von *Plutella xylostella*. 30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. **A:** Aufnahme mit sequentiellen Öffnungsereignissen, Amplitudenhistogramm. **B:** Detail von A, mit substate. **C:** Einzelkanal.

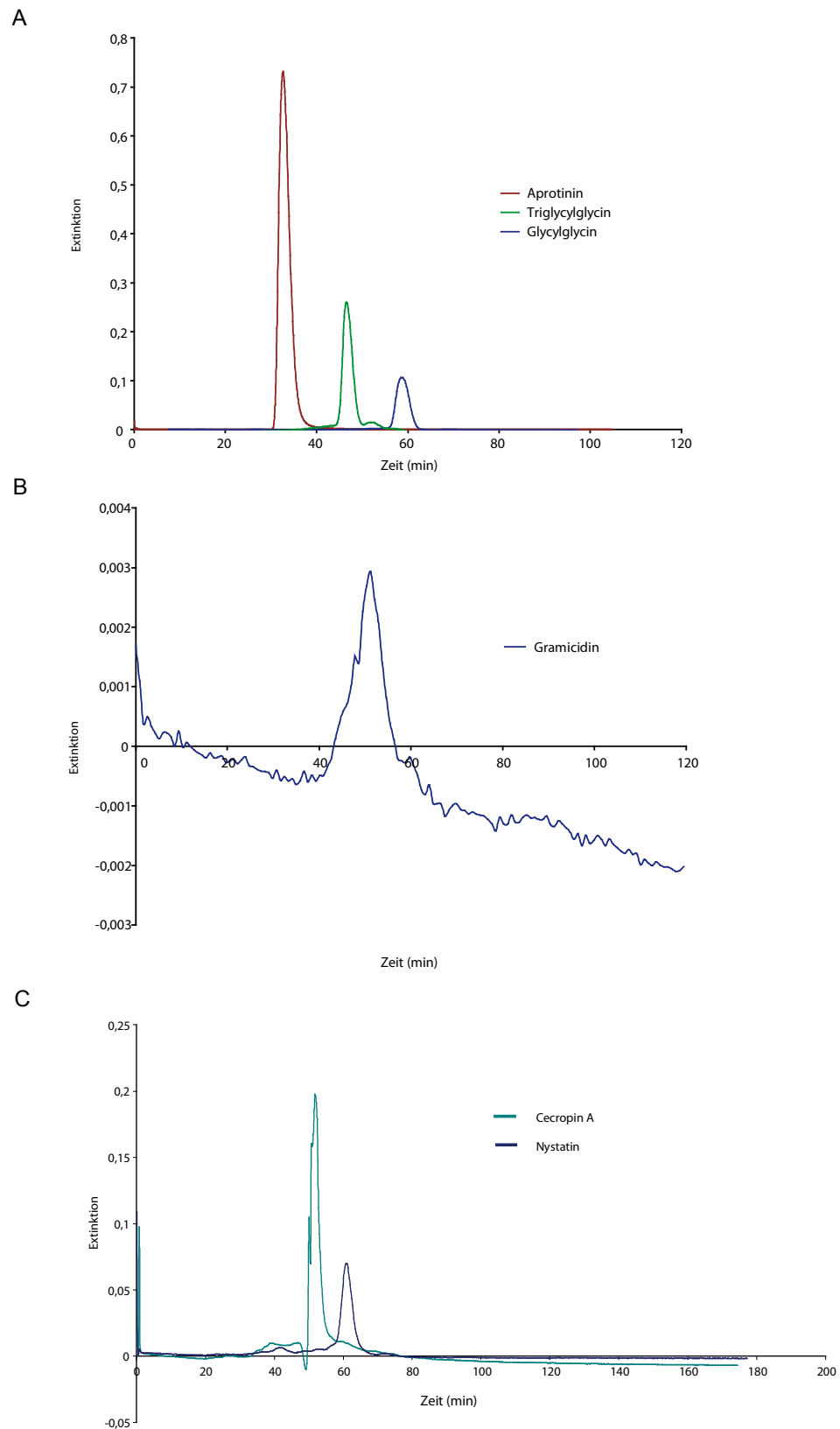


Abbildung 7.5: Trennleistung der Superdex Peptide-Säule. 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2, 40 μ l/min, Superdex Peptide-Säule, SMART-System, Extinktion bei 240 nm. **A:** Vergleich von Aprotinin (rot), Triglycylglycin (grün), Glycylglycin (blau), jeweils 2 mg/ml. **B:** Gramicidin, 0,25 mg/ml **C:** Vergleich von Cecropin A (grün) und Nystatin (blau).

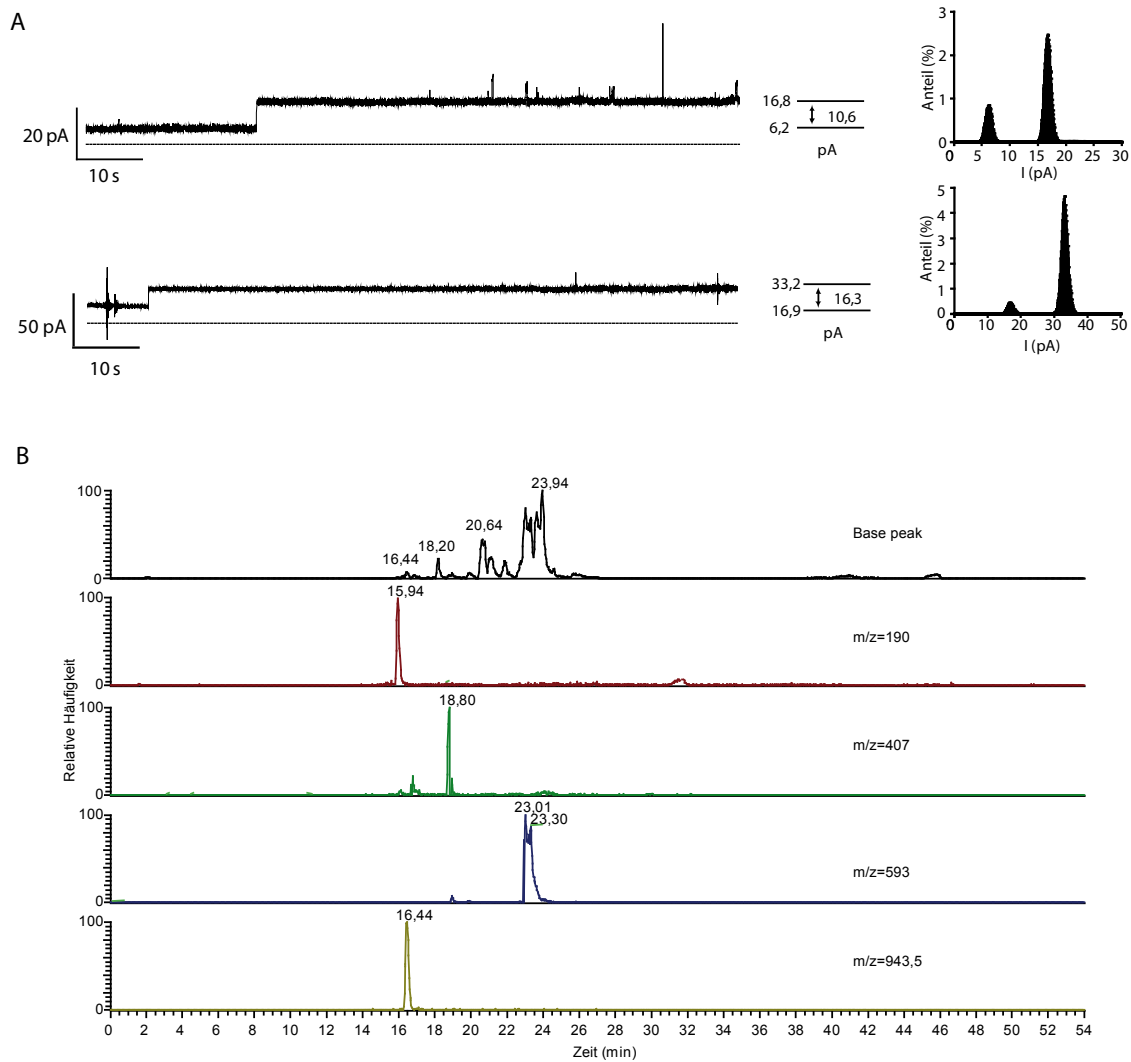


Abbildung 7.6: BLM-Messungen mit wässrigem DCM-Extrakt von Regurgitat von *S. littoralis* und HPLC-Analyse. 2 ml Regurgitat von *S. littoralis* wurden mit Dichlormethan extrahiert und unter Stickstoff getrocknet, anschließend mit 100 μ l Wasser aufgenommen. **A:** Aufzeichnungen der Ionkanal-bildenden Aktivität im BLM-Assay. + 30 mV, 200 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris, pH 9,2. **B:** HPLC-MS-Analyse des wässrigen DCM-Extraktes, Ionenspur für 8-Hydroxy-2-chinolinsäure ($m/z=190$), *N*-Linolenoylglutamin ($m/z=407$), Phaeophorbid a ($m/z=593$) und $m/z=943,5$ (unbekannte Substanz).

7.2. Tabellen

Tabelle 7.1: Liste mit den in den untersuchten Fraktionen der FPLC enthaltenen Massen nicht identifizierter Substanzen. Es sind ohne Anspruch auf Vollständigkeit die augenfälligsten m/z aufgezählt. Die erwähnten m/z beschränken sich nicht ausschließlich auf diesen Bereich.

Fraktion	Retentionszeit (min)	m/z
10	16,71	190, 343, 431, 544, 674, 915, 1104, 1158, 1346
	19,86	190, 959, 1029, 1080
	20,84	401, 521
	23,70	343, 355
	25,59	266, 329, 660
11	14,69	293
	16,69	190, 431, 1075
	20,11	943, 1029, 1150
	25,6	577, 660
12	33,66	663,
	18,03	195, 929, 1049
	21,85	195, 427, 547, 973
	24,35	381, 501, 660, 761
	25,58	140, 195, 266, 329
13	33,42	291, 529
	24,36	381, 761, 784
	25,56-26,54	643, 784

Tabelle 7.2: Liste mit Massen nicht identifizierter Substanzen aus der HPLC. Es sind ohne Anspruch auf Vollständigkeit die augenfälligsten m/z aufgezählt. Die erwähnten m/z beschränken sich nicht ausschließlich auf diesen Bereich.

Retentionszeit	m/z
30-34	279, 350, 435, 448, 505, 536, 609, 641, 889, 1069, 1127, 1185, 1207,

7.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Beispiele für die Struktur einiger HAMPs	9
Abbildung 2.1. Schematische Darstellung des Messprinzips von BLM	20
Abbildung 2.2.: Vereinfachtes Ersatzschaltbild	21
Abbildung 2.3: Aufbau des Messstandes	22
Abbildung 2.4.: Schema einer Aufzeichnung eines <i>voltage clamp</i> -Experiments	24
Abbildung 2.5.: Apparatur zur Messung apoplastischer Spannungsänderungen	26
Abbildung 2.6.: Verschiedene <i>patch-clamp</i> -Methoden	27
Abbildung 2.7.: Versuchsaufbau Thermographie	32
Abbildung 3.1: Einzelkanalmessung mit Regurgitat von <i>S. exigua</i>	35
Abbildung 3.2: Langzeitaufnahme eines Einzelkanals von <i>S. exigua</i> -Regurgitat	36
Abbildung 3.3: Einzelkanalmessung mit Regurgitat von <i>S. exigua</i> mit <i>substate</i>	38
Abbildung 3.4: Einzelkanalmessung mit Regurgitat von <i>S. exigua</i> mit voll aufgelösten Kanalereignissen	39
Abbildung 3.5: Aufnahmen von Einzelkanälen mit geringer Leitfähigkeit von <i>S. exigua</i>	40
Abbildung 3.6: Aufnahmen typischer Einzelkanäle mit <i>S. littoralis</i> -Regurgitat	42
Abbildung 3.7: Aufnahme eines Kanals mit zusätzlichen Öffnungen von <i>S. littoralis</i>	43
Abbildung 3.8: Aufnahme von multiplen Öffnungen aus Regurgitat von <i>S. littoralis</i>	44
Abbildung 3.9: I/U-Plot und Umkehrpotential	45
Abbildung 3.10: Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Elektrolytkonzentration	46
Abbildung 3.11: Vergleich der Ionenkanäle aus Regurgitat verschiedener Arten	49
Abbildung 3.12: Aufnahmen von Ionenkanälen aus Regurgitat von <i>Pieris brassicae</i>	51
Abbildung 3.13: Aufnahmen von Ionenkanälen aus Regurgitat von <i>Pieris rapae</i>	52
Abbildung 3.14: Einzelkanal nach 6 h bei Zimmertemperatur	53
Abbildung 3.15: BLM-Messung mit gekochtem Regurgitat von <i>S. exigua</i> und <i>P. brassicae</i>	54
Abbildung 3.16: Ionenkanäle aus dem Regurgitat von <i>S. littoralis</i> nach der Behandlung mit Proteinase K	55
Abbildung 3.17: BLM-Aufnahmen von Regurgitat von Raupen gehalten auf verschiedenen Futterquellen	56
Abbildung 3.18: Vergleich der Leitfähigkeit von Ionenkanälen aus dem Regurgitat von Larven verschiedener Arten von Lepidopteren	57
Abbildung 3.19: Ultrafiltration mit <i>cut-off</i> von 5 kDa	58
Abbildung 3.20: Gelfiltrationschromatogramm von Regurgitat und BLM-Analyse	60
Abbildung 3.21: LC/MS-Analyse der Fraktionen aus der Gelfiltration	61
Abbildung 3.22: FPLC-Chromatogramm von 8-Hydroxy-2-chinolinsäure	62
Abbildung 3.23: Identifikation von 8-Hydroxy-2-chinolinsäure mittels HPLC	63
Abbildung 3.24: Effekt von 8-Hydroxy-2-chinolinsäure auf BLM	64
Abbildung 3.25: Ionenkanäle aus mit Dichlormethan extrahiertem Regurgitat von <i>S. littoralis</i>	65
Abbildung 3.26: Ionenkanäle aus Eluat nach Anionenaustausch mit Amberlite IRA-400	66
Abbildung 3.27: Ionenkanäle nach Elution von <i>reversed-phase</i> ZipTip _{C18} -Säule	66

Abbildung 3.28: HPLC-Analyse des Dichlormethanextraktes von Regurgitat von <i>S. littoralis</i>	67
Abbildung 3.29: Vergleich der UV-Spektren von Phaeophorbid a mit Regurgitat von <i>S. littoralis</i>	69
Abbildung 3.30: LC/MS-Chromatogramm mit Ionenspuren bekannter Substanzen	69
Abbildung 3.31: Einfluß von Phaeophorbid a auf die Leitfähigkeit von BLM	70
Abbildung 3.32: Einfluss von Linolenoylglutamin auf die Leitfähigkeit von BLM	72
Abbildung 3.33: Korrelation der <i>N</i> -Linolenoylglutaminkonzentration und der Membranstabilität	73
Abbildung 3.34: Einfluss von Gemischen von <i>N</i> -Linolenoylglutamin und Phaeophorbid a auf BLM	75
Abbildung 3.35: GC-MS-Analyse der Duftstoffe von <i>P. lunatus</i> nach Zugaben von Inceptin	77
Abbildung 3.36: Veränderung der cytosolischen Calciumkonzentration nach Zugabe von Inceptin	78
Abbildung 3.37: Veränderung der cytosolischen Calciumkonzentration nach Zugabe von Regurgitat von <i>S. littoralis</i>	79
Abbildung 3.38: Veränderung der cytosolischen Calciumkonzentration nach Zugabe von wässrigem DCM-Extrakt von Regurgitat von <i>S. littoralis</i>	80
Abbildung 3.39: Veränderung der cytosolischen Calciumkonzentration nach Zugabe von Alamethicin und Gramicidin	81
Abbildung 3.40: Messung des Membranpotentials von <i>P. lunatus</i> nach Zugabe von Alamethicin	81
Abbildung 3.41: Potenzialänderung im Apoplast von <i>P. lunatus</i> nach Zugabe von Alamethicin (lokal)	82
Abbildung 3.42: Potenzialänderung im Apoplast von <i>H. vulgare</i> nach Zugabe von Alamethicin (systemisch)	83
Abbildung 3.43: Potenzialänderung im Apoplast von <i>H. vulgare</i> nach Zugabe von Jasmonsäure, Salicylsäure und Regurgitat (systemisch)	84
Abbildung 3.44: Thermographische Aufnahmen eines Blattes von <i>P. lunatus</i> während des Fraßes durch <i>S. littoralis</i>	84
Abbildung 3.45: Temperaturverlauf eines Blattes von <i>P. lunatus</i> während Herbivorie durch <i>S. littoralis</i>	85
Abbildung 4.1: <i>Patch-clamp</i> -Messung mit Protoplasten von <i>A. thaliana</i>	106
Abbildung 7.1.: Aufzeichnung mit Regurgitat von <i>Helicoverpa armigera</i>	113
Abbildung 7.2.: Aufzeichnung mit Regurgitat von <i>Trichoplusia ni</i>	114
Abbildung 7.3.: Aufzeichnungen mit Regurgitat von <i>Manduca sexta</i>	115
Abbildung 7.4.: Aufzeichnungen mit Regurgitat von <i>Plutella xylostella</i>	116
Abbildung 7.5: Trennleistung der Superdex Peptide-Säule	117
Abbildung 7.6: BLM-Messungen mit wässrigem DCM-Extrakt von Regurgitat von <i>S. littoralis</i> und HPLC-Analyse	118

7.4. Gleichungsverzeichnis

Gleichung 2.1: Ohmsches Gesetz	23
Gleichung 2.2: Leitfähigkeit	23
Gleichung 2.3.: Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung, angepasst	24
Gleichung 2.4: Ionenverhältnis nach Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung, angepasst	25
Gleichung 2.5: Bestimmung des Ionenverhältnisses nach Goldman-Hodgkin-Katz	25

7.5. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Vergleich der Leitfähigkeit bei verschiedenen Alkaliionen	46
Tabelle 3.2: Vergleich der mittleren Leitfähigkeit der vorherrschenden Ionenkanäle aller untersuchten Arten	56
Tabelle 4.1: Vergleich der Eigenschaften der Ionenkanäle aus dem Regurgitat von <i>S. exigua</i> mit Literaturwerten von anderen Ionenkanälen	100
Tabelle 7.1: Liste mit den in den untersuchten Fraktionen der FPLC enthaltenen Massen nicht identifizierter Substanzen	119
Tabelle 7.2: Liste mit Massen nicht identifizierter Substanzen aus der HPLC	119

7.6. Abkürzungsverzeichnis

μM	mikromolar
ALA	Alamethicin
Aib	Aminoisobuttersäure
AOC	Allenoxidcyclase
AOS	Allenoxidsynthase
APCI	ambient pressure chemical ionization
BLM	Planare Lipidmembranen, <i>black lipid membranes</i>
DAD	<i>diode array detektor</i>
DCM	Dichlormethan
EI	electron impact
ESI	Elektrodensprayionisation
fM	femtomolar
FPLC	Schnelle Proteinflüssigchromatographie (<i>fast protein liquid chromatography</i>)
G	Leitfähigkeit
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie / Massenspektrometrie

GOX	Glucoseoxidase
HCl	Chlorwasserstoff, bzw. Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HQA	8-Hydroxi-2-chinolinsäure
HR	hypersensitive response
I	Stromstärke
JA	Jasmonsäure
LC/MS	Flüssigchromatographie / Massenspektrometrie
LOX	Lipoxygenase
MeJA	Methyljasmonat
MeSA	Methylsalicylat
Min	Minuten
mM	millimolar
MS	Massenspektrometrie
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
nA	Nanoampère
nm	Nanometer
nM	nanomolar
pS	Picosiemens
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunden
SA	Salicylsäure
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>
Stabw.	Standardabweichung
TIC	<i>total ion current</i>
U	Spannung

7.7. Literatur

- Abel, S. und A. Theologis (1998). "Transient gene expression in protoplasts of *Arabidopsis thaliana*." Methods Mol Biol **82**: 209-217.
- Alan, A. R., *et al.* (2004). "Expression of a magainin-type antimicrobial peptide gene (MSI-99) in tomato enhances resistance to bacterial speck disease." Plant Cell Rep **22**(6): 388-396.
- Alborn, H. T., *et al.* (2007). "Disulfoxy fatty acids from the American bird grasshopper *Schistocerca americana*, elicitors of plant volatiles." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(32): 12976-12981.
- Aldea, M., *et al.* (2005). "Indirect effects of insect herbivory on leaf gas exchange in soybean." Plant, Cell & Environment **25**(3): 402-411.
- Alonso, J. M., *et al.* (1999). "EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*." Science **284**(5423): 2148-2152.
- Andreoli, T. E. und M. Monahan (1968). "The interaction of polyene antibiotics with thin lipid membranes." J Gen Physiol **52**(2): 300-325.
- Antonious, G. F., *et al.* (2009). "Screening *Brassica* species for glucosinolate content." J Environ Sci Health B **44**(3): 311-316.
- Antonov, V. F., *et al.* (1980). "The appearance of single-ion channels in unmodified lipid bilayer membranes at the phase transition temperature." Nature **283**(5747): 585-586.
- Arimura, G., *et al.* (2000). "Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves." Nature **406**(6795): 512-515.
- Arimura, G., *et al.* (2000). "Gene responses in bean leaves induced by herbivory and by herbivore-induced volatiles." Biochem Biophys Res Commun **277**(2): 305-310.
- Armengaud, P., *et al.* (2004). "The potassium-dependent transcriptome of *Arabidopsis* reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling." Plant Physiol **136**(1): 2556-2576.
- Attaran, E., *et al.* (2009). "Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in *Arabidopsis*." Plant Cell **21**(3): 954-971.
- Axen, A., *et al.* (1997). "Gloverin, an antibacterial protein from the immune hemolymph of *Hyalophora* pupae." Eur J Biochem **247**(2): 614-619.
- Balleza, D., *et al.* (2005). "A high conductance cationic channel from *Phaseolus vulgaris* roots incorporated into planar lipid bilayers." Arch Biochem Biophys **438**(1): 88-92.
- Ballhorn, D. J., *et al.* (2009). "Cyanogenesis of wild lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) is an efficient direct defence in nature." PLoS One **4**(5): e5450.
- Ballio, A., *et al.* (1991). "Syringopeptins, new phytotoxic lipodepsipeptides of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*." FEBS Lett **291**(1): 109-112.

- Becker, L., *et al.* (2005). "Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: reconstituted Tom40 forms a characteristic TOM pore." J Mol Biol **353**(5): 1011-1020.
- Belmonte, G., *et al.* (1987). "Pore formation by *Staphylococcus aureus* α -toxin in lipid bilayers. Dependence upon temperature and toxin concentration." Eur Biophys J **14**(6): 349-358.
- Bergomaz, R. und M. Boppré (1986). "A simple insect diet for rearing *Arctiidae* and other moths." J. Lepidopterist's Soc. **40**: 131-137.
- Beven, L. und H. Wroblewski (1997). "Effect of natural amphipathic peptides on viability, membrane potential, cell shape and motility of mollicutes." Res Microbiol **148**(2): 163-175.
- Beyhl, D., *et al.* (2009). "The *fou2* mutation in the major vacuolar cation channel TPC1 confers tolerance to inhibitory luminal calcium." Plant J **58**(5): 715-723.
- Billen, B., *et al.* (2008). "Animal peptides targeting voltage-activated sodium channels." Curr Pharm Des **14**(24): 2492-2502.
- Bittel, P. und S. Robatzek (2007). "Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity." Curr Opin Plant Biol **10**(4): 335-341.
- Bleecker, A. B. und H. Kende (2000). "Ethylene: a gaseous signal molecule in plants." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 1-18.
- Boheim, G. (1974). "Statistical analysis of alamethicin channels in black lipid membranes." J Membr Biol **19**(3): 277-303.
- Bohlmann, H. und K. Apel (1991). "Thionins." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **42**: 227-240.
- Boman, H. G. und D. Hultmark (1987). "Cell-free immunity in insects." Annu Rev Microbiol **41**: 103-126.
- Bonaventure, G., *et al.* (2007). "A gain-of-function allele of TPC1 activates oxylipin biogenesis after leaf wounding in *Arabidopsis*." Plant J **49**(5): 889-898.
- Bonaventure, G., *et al.* (2007). "The *fou2* gain-of-function allele and the wild-type allele of Two Pore Channel 1 contribute to different extents or by different mechanisms to defense gene expression in *Arabidopsis*." Plant Cell Physiol **48**(12): 1775-1789.
- Bulet, P., *et al.* (1999). "Antimicrobial peptides in insects; structure and function." Dev Comp Immunol **23**(4-5): 329-344.
- Bulet, P., *et al.* (2004). "Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates." Immunol Rev **198**: 169-184.
- Burgess, A. W. und S. J. Leach (1973). "An obligatory α -helical amino acid residue." Biopolymers **12**(11): 2599-2605.
- Busath, D. und G. Szabo (1981). "Gramicidin forms multi-state rectifying channels." Nature **294**(5839): 371-373.
- Cafiso, D. S. (1994). "Alamethicin: a peptide model for voltage gating and protein-membrane interactions." Annu Rev Biophys Biomol Struct **23**: 141-165.

- Carden, D. E. und H. H. Felle (2003). "The mode of action of cell wall-degrading enzymes and their interference with Nod factor signalling in *Medicago sativa* root hairs." Planta **216**(6): 993-1002.
- Carvalho Ade, O. und V. M. Gomes (2009). "Plant defensins--prospects for the biological functions and biotechnological properties." Peptides **30**(5): 1007-1020.
- Chaerle, L., et al. (1999). "Presymptomatic visualization of plant-virus interactions by thermography." Nat Biotechnol **17**(8): 813-816.
- Chakrabarti, A., et al. (2003). "MSI-99, a magainin analogue, imparts enhanced disease resistance in transgenic tobacco and banana." Planta **216**(4): 587-596.
- Chang, L. und M. Karin (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." Nature **410**(6824): 37-40.
- Chanturiya, A., et al. (2003). "New cationic lipids form channel-like pores in phospholipid bilayers." Biophys J **84**(3): 1750-1755.
- Chao, Q., et al. (1997). "Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins." Cell **89**(7): 1133-1144.
- Chen, D. P., et al. (1995). "Hydrodynamic model of temperature change in open ionic channels." Biophys J **69**(6): 2304-2322.
- Chen, F., et al. (2003). "An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense." Plant J **36**(5): 577-588.
- Chen, Y. F., et al. (2005). "Ethylene signal transduction." Ann Bot (Lond) **95**(6): 901-915.
- Chinchilla, D., et al. (2006). "The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception." Plant Cell **18**(2): 465-476.
- Chini, A., et al. (2009). "The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between *Arabidopsis* JAZ proteins." Plant J **59**(1): 77-87.
- Christensen, B., et al. (1988). "Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5072-5076.
- Cociancich, S., et al. (1993). "Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*." J Biol Chem **268**(26): 19239-19245.
- Colilla, F. J., et al. (1990). " γ -Purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm." FEBS Lett **270**(1-2): 191-194.
- Cotero, B. V., et al. (1998). "On the role of sterol in the formation of the amphotericin B channel." Biochim Biophys Acta **1375**(1-2): 43-51.
- Cruciani, R. A., et al. (1992). "Magainin 2, a natural antibiotic from frog skin, forms ion channels in lipid bilayer membranes." Eur J Pharmacol **226**(4): 287-296.

- Dalhammar, G. und H. Steiner (1984). "Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects." Eur J Biochem **139**(2): 247-252.
- Dalla Serra, M., et al. (1999). "Conductive properties and gating of channels formed by syringopeptin 25A, a bioactive lipodepsipeptide from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, in planar lipid membranes." Mol Plant Microbe Interact **12**(5): 401-409.
- Davies, E. (2006). Electrical Signals in Plants: Facts and Hypotheses. Berlin Heidelberg, Springer Verlag.
- De Vos, M., et al. (2005). "Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack." Mol Plant Microbe Interact **18**(9): 923-937.
- de Waal, A., et al. (1991). "Magainins affect respiratory control, membrane potential and motility of hamster spermatozoa." FEBS Lett **293**(1-2): 219-223.
- Dewick, P. M. (2002). "The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds." Nat Prod Rep **19**(2): 181-222.
- Donath, J. und W. Boland (1995). "Biosynthesis of Acyclic Homoterpenes - Enzyme Selectivity and Absolute-Configuration of the Nerolidol Precursor." Phytochemistry **39**: 785-790.
- Doss, R. P., et al. (2000). "Bruchins: insect-derived plant regulators that stimulate neoplasm formation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 6218-6223.
- Duclohier, H. (2006). "Bilayer lipid composition modulates the activity of dermaseptins, polycationic antimicrobial peptides." Eur Biophys J **35**(5): 401-409.
- Duclohier, H., et al. (1989). "Antimicrobial peptide magainin I from *Xenopus* skin forms anion-permeable channels in planar lipid bilayers." Biophys J **56**(5): 1017-1021.
- Dziubinska, H., et al. (2003). "Variation and action potentials evoked by thermal stimuli accompany enhancement of ethylene emission in distant non-stimulated leaves of *Vicia faba* minor seedlings." J Plant Physiol **160**(10): 1203-1210.
- Eichenseer, H., et al. (1999). "Salivary glucose oxidase: multifunctional roles for *Helicoverpa zea*?" Arch Insect Biochem Physiol **42**(1): 99-109.
- Eisenberg, M., et al. (1973). "The nature of the voltage-dependent conductance induced by alamethicin in black lipid membranes." J Membr Biol **14**(2): 143-176.
- Engelberth, J., et al. (2001). "Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendrill coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean." Plant Physiol **125**(1): 369-377.
- Engelhardt, S., et al. (2009). "Separable roles of the *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* accessory protein HrpZ1 in ion-conducting pore formation and activation of plant immunity." Plant J **57**(4): 706-717.
- Ermishkin, L. N., et al. (1976). "Single ionic channels induced in lipid bilayers by polyene antibiotics amphotericin B and nystatine." Nature **262**(5570): 698-699.
- Evans, N. H., et al. (2001). "Calcium oscillations in higher plants." Curr Opin Plant Biol **4**(5): 415-420.

- Felle, H. H., *et al.* (2000). "Dynamics of ionic activities in the apoplast of the sub-stomatal cavity of intact *Vicia faba* leaves during stomatal closure evoked by ABA and darkness." Plant J **24**(3): 297-304.
- Felle, H. H. und M. R. Zimmermann (2007). "Systemic signalling in barley through action potentials." Planta **226**(1): 203-214.
- Fiedler, H. P., *et al.* (1981). "Metabolic products of microorganisms. 200 Isolation and characterization of niphithricins A, B, and elaiophylin, antibiotics produced by *Streptomyces violaceoniger*." J Antibiot (Tokyo) **34**(9): 1107-1118.
- Fliegmann, J., *et al.* (2004). "An ancient enzyme domain hidden in the putative β -glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance." J Biol Chem **279**(2): 1132-1140.
- Florack, D., *et al.* (1995). "Expression of giant silkworm cecropin B genes in tobacco." Transgenic Res **4**(2): 132-141.
- Fonseca, S., *et al.* (2009). "(+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate." Nat Chem Biol **5**(5): 344-350.
- Fox, R. O., Jr. und F. M. Richards (1982). "A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5-Å resolution." Nature **300**(5890): 325-330.
- Freer, J. H., *et al.* (1968). "Interaction of staphylococcal α -toxin with artificial and natural membranes." J Bacteriol **95**(3): 1153-1168.
- Freitak, D., *et al.* (2007). "Immune system responses and fitness costs associated with consumption of bacteria in larvae of *Trichoplusia ni*." BMC Biol **5**: 56.
- Funk, C. J. (2001). "Alkaline phosphatase activity in whitefly salivary glands and saliva." Arch Insect Biochem Physiol **46**(4): 165-174.
- Funke, M. (2008). *N-Fettsäure-Aminosäure-Konjugate und die 8-Hydroxychinolin-2-carbonsäure aus dem Regurgitat von Lepidoptera Larven*. Jena, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Funke, M., *et al.* (2008). "Rapid hydrolysis of quorum-sensing molecules in the gut of lepidopteran larvae." Chembiochem **9**(12): 1953-1959.
- Gardner, J. M. (1974). "Effects of Host-Specific Toxins on Electropotentials of Plant Cells." Plant Physiol **54**(3): 246-249.
- Ghosh, P. und R. M. Stroud (1991). "Ion channels formed by a highly charged peptide." Biochemistry **30**(14): 3551-3557.
- Gordon, L. G. und D. A. Haydon (1972). "The unit conductance channel of alamethicin." Biochim Biophys Acta **255**(3): 1014-1018.
- Gordon, L. G. und D. A. Haydon (1975). "Potential-dependent conductances in lipid membranes containing alamethicin." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **270**(908): 433-447.

- Goudet, C., *et al.* (1999). "Cluster organization and pore structure of ion channels formed by beticolin 3, a nonpeptidic fungal toxin." *Biophys J* **77**(6): 3052-3059.
- Goudet, C., *et al.* (2000). "Beticolins, nonpeptidic, polycyclic molecules produced by the phytopathogenic fungus *Cercospora beticola*, as a new family of ion channel-forming toxins." *Mol Plant Microbe Interact* **13**(2): 203-209.
- Grigoriev, P. A., *et al.* (2002). "Formation of anion-selective membrane pores by texenomycin A, a basic lipopeptaibol antibiotic." *J Antibiot (Tokyo)* **55**(9): 826-828.
- Habermann, E. (1972). "Bee and wasp venoms." *Science* **177**(46): 314-322.
- Halim, V. A., *et al.* (2006). "The Role of Salicylic Acid and Jasmonic Acid in Pathogen Defence." *Plant Biology* **8**(3): 307-313.
- Hanke, W. und G. Boheim (1980). "The lowest conductance state of the alamethicin pore." *Biochim Biophys Acta* **596**(3): 456-462.
- Hanke, W., *et al.* (1983). "Melittin and a chemically modified trichotoxin form alamethicin-type multi-state pores." *Biochim Biophys Acta* **727**(1): 108-114.
- Heil, M. und C. Kost (2006). "Priming of indirect defences." *Ecol Lett* **9**(7): 813-817.
- Heil, M. und J. C. Silva Bueno (2007). "Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(13): 5467-5472.
- Herskowitz, I. (1995). "MAP kinase pathways in yeast: for mating and more." *Cell* **80**(2): 187-197.
- Hightower, R., *et al.* (1994). "The expression of cecropin peptide in transgenic tobacco does not confer resistanceto *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*." *Plant Cell Rep.* **13**: 295-299.
- Hill, C. P., *et al.* (1991). "Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization." *Science* **251**(5000): 1481-1485.
- Hinnah, S. C., *et al.* (1997). "Reconstitution of a chloroplast protein import channel." *Embo J* **16**(24): 7351-7360.
- Hladky, S. B. und D. A. Haydon (1972). "Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. I. Studies of the unit conductance channel." *Biochim Biophys Acta* **274**(2): 294-312.
- Huang, Y., *et al.* (2003). "Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in Arabidopsis." *Plant J* **33**(2): 221-233.
- Huang, Y., *et al.* (1997). "Expression of an Engineered Cecropin Gene Cassette in Transgenic Tobacco Plants Confers Disease Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*." *Phytopathology* **87**(5): 494-499.
- Hughes, P., *et al.* (2000). "The cytotoxic plant protein, β -purothionin, forms ion channels in lipid membranes." *J Biol Chem* **275**(2): 823-827.
- Hutchison, M. L. und D. C. Gross (1997). "Lipopeptide phytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: comparison of the biosurfactant and ion

- channel-forming activities of syringopeptin and syringomycin." Mol Plant Microbe Interact **10**(3): 347-354.
- Iacobellis, N. S., *et al.* (1992). "Phytotoxic properties of *Pseudomonas syringae syringae*." Physiol. Mol. Plant Pathol. **40**: 107-116.
- James, D. G. (2003). "Field evaluation of herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects: methyl salicylate and the green lacewing, *Chrysopa nigricornis*." J Chem Ecol **29**(7): 1601-1609.
- James, D. G. (2005). "Further field evaluation of synthetic herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects." J Chem Ecol **31**(3): 481-495.
- Jaynes, J. M., *et al.* (1993). "Expression of a Cecropin B lytic peptide analog in transgenic tobacco confers enhanced resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*." Plant Science **89**: 43-53.
- Jih, P. J., *et al.* (2003). "Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in expression of the ipomoelin gene from sweet potato." Plant Physiol **132**(1): 381-389.
- Jin, Q., *et al.* (2003). "Type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*." Microbes Infect **5**(4): 301-310.
- Johansson, F. I., *et al.* (2004). "Oxidation and reduction of pyridine nucleotides in alamethicin-permeabilized plant mitochondria." Biochem J **380**(Pt 1): 193-202.
- Jonak, C., *et al.* (2002). "Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling." Curr Opin Plant Biol **5**(5): 415-424.
- Jones, J. D. und J. L. Dangl (2006). "The plant immune system." Nature **444**(7117): 323-329.
- Juretic, D., *et al.* (1994). "Magainin oligomers reversibly dissipate delta μH^+ in cytochrome oxidase liposomes." Biochemistry **33**(15): 4562-4570.
- Kagan, B. L., *et al.* (1990). "Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(1): 210-214.
- Kagan, B. L. und Y. Sokolov (1994). "Use of lipid bilayer membranes to detect pore formation by toxins." Methods Enzymol **235**: 691-705.
- Kaku, H., *et al.* (2006). "Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(29): 11086-11091.
- Kandoth, P. K., *et al.* (2007). "Tomato MAPKs LeMPK1, LeMPK2, and LeMPK3 function in the systemin-mediated defense response against herbivorous insects." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(29): 12205-12210.
- Kang, J. H., *et al.* (2006). "Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Manduca sexta*." Plant Cell **18**(11): 3303-3320.
- Kanost, M. R., *et al.* (2004). "Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*." Immunol Rev **198**: 97-105.

- Kaufmann, K. und I. Silman (1983). "The induction by protons of ion channels through lipid bilayer membranes." Biophys Chem **18**(2): 89-99.
- Kessler, A., *et al.* (2004). "Silencing the jasmonate cascade: induced plant defenses and insect populations." Science **305**(5684): 665-668.
- Kim, C. Y. und S. Zhang (2004). "Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco." Plant J **38**(1): 142-151.
- Kleinberg, M. E. und A. Finkelstein (1984). "Single-length and double-length channels formed by nystatin in lipid bilayer membranes." J Membr Biol **80**(3): 257-269.
- Knowles, B. H. (1994). "Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins." Adv. Insect Physiol. **24**: 275-308.
- Kobayashi, A., *et al.* (1993). "Purification and characterization of a 59-kilodalton protein that specifically binds to NF-kappa B-binding motifs of the defense protein genes of *Sarcophaga peregrina* (the flesh fly)." Mol Cell Biol **13**(7): 4049-4056.
- Kobayashi, M., *et al.* (2007). "Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase." Plant Cell **19**(3): 1065-1080.
- Kost, C. und M. Heil (2008). "The defensive role of volatile emission and extrafloral nectar secretion for lima bean in nature." J Chem Ecol **34**(1): 1-13.
- Kovermann, P., *et al.* (2002). "Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel." Mol Cell **9**(2): 363-373.
- Krumm, T., *et al.* (1995). "Induction of volatile biosynthesis in the lima bean (*Phaseolus lunatus*) by leucine- and isoleucine conjugates of 1-oxo- and 1-hydroxyindan-4-carboxylic acid: evidence for amino acid conjugates of jasmonic acid as intermediates in the octadecanoid signalling pathway." FEBS Lett **377**(3): 523-529.
- Kurtböke, D. I. und J. R. French (2007). "Use of phage battery to investigate the actinofloral layers of termite gut microflora." J Appl Microbiol **103**(3): 722-734.
- Kushmerick, C., *et al.* (1998). "Functional and structural features of γ -zeathionins, a new class of sodium channel blockers." FEBS Lett **440**(3): 302-306.
- Lamberty, M., *et al.* (1999). "Insect immunity. Isolation from the lepidopteran *Heliothis virescens* of a novel insect defensin with potent antifungal activity." J Biol Chem **274**(14): 9320-9326.
- Lay, F. T. und M. A. Anderson (2005). "Defensins--components of the innate immune system in plants." Curr Protein Pept Sci **6**(1): 85-101.
- Lecourieux, D., *et al.* (2006). "Calcium in plant defence-signalling pathways." New Phytol **171**(2): 249-269.
- Lee, J., *et al.* (2001). "HrpZ(Psph) from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 289-294.
- Leitner, M., *et al.* (2005). "Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*." New Phytol **167**(2): 597-606.

- Leitner, M., *et al.* (2009). "Does mycorrhization influence herbivore-induced volatile emission in *Medicago truncatula*?" *Mycorrhiza*.
- Leptihn, S., *et al.* (2009). "Single molecule resolution of the antimicrobial action of quantum dot-labeled sushi peptide on live bacteria." *BMC Biol* **7**: 22.
- Li, Q., *et al.* (2006). "Mi-1-Mediated aphid resistance involves salicylic acid and mitogen-activated protein kinase signaling cascades." *Mol Plant Microbe Interact* **19**(6): 655-664.
- Liu, Y. und S. Zhang (2004). "Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*." *Plant Cell* **16**(12): 3386-3399.
- Lockey, T. D. und D. D. Ourth (1996). "Formation of pores in *Escherichia coli* cell membranes by a cecropin isolated from hemolymph of *Heliothis virescens* larvae." *Eur J Biochem* **236**(1): 263-271.
- Lühring, H., *et al.* (2007). "Caterpillar regurgitant induces pore formation in plant membranes." *FEBS Lett* **581**(28): 5361-5370.
- Maffei, M., *et al.* (2004). "Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. I. Membrane potentials, intracellular calcium variations, oral secretions, and regurgitate components." *Plant Physiol* **134**(4): 1752-1762.
- Maffei, M. E., *et al.* (2006). "Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. III. Membrane depolarization and involvement of hydrogen peroxide." *Plant Physiol* **140**(3): 1022-1035.
- Maischak, H., *et al.* (2007). "Oral secretions from herbivorous lepidopteran larvae exhibit ion channel-forming activities." *FEBS Lett* **581**(5): 898-904.
- Mandrioli, M. (2003). "Identification and chromosomal localization of mariner-like elements in the cabbage moth *Mamestra brassicae* (Lepidoptera)." *Chromosome Res* **11**(4): 319-322.
- Matic, S., *et al.* (2005). "Alamethicin permeabilizes the plasma membrane and mitochondria but not the tonoplast in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow) suspension cells." *Biochem J* **389**(Pt 3): 695-704.
- Mattiacci, L., *et al.* (1995). " β -Glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(6): 2036-2040.
- Mendez, E., *et al.* (1990). "Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, γ -hordothionin, from barley endosperm." *Eur J Biochem* **194**(2): 533-539.
- Menestrina, G. (1986). "Ionic channels formed by *Staphylococcus aureus* α -toxin: voltage-dependent inhibition by divalent and trivalent cations." *J Membr Biol* **90**(2): 177-190.
- Meyer, C. E. und F. Reusser (1967). "A polypeptide antibacterial agent isolated from *Trichoderma viride*." *Experientia* **23**(2): 85-86.

- Mithöfer, A. und W. Boland (2008). "Recognition of herbivory-associated molecular patterns." Plant Physiol **146**(3): 825-831.
- Mithöfer, A. und J. Ebel (1999). "Functional reconstitution of β -glucan elicitor-binding activity upon incorporation into lipid vesicles." FEBS Lett **458**(2): 129-132.
- Mithöfer, A., *et al.* (2005). "Cation fluxes cause plasma membrane depolarization involved in β -glucan elicitor-signaling in soybean roots." Mol Plant Microbe Interact **18**(9): 983-990.
- Mithöfer, A., *et al.* (2000). "The hepta- β -glucoside elicitor-binding proteins from legumes represent a putative receptor family." Biol Chem **381**(8): 705-713.
- Mithöfer, A. und C. Mazars (2002). "Aequorin-based measurements of intracellular Ca²⁺-signatures in plant cells." Biol Proced Online **4**: 105-118.
- Mithöfer, A., *et al.* (2005). "Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission." Plant Physiol **137**(3): 1160-1168.
- Mouhat, S., *et al.* (2008). "Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels." Curr Pharm Des **14**(24): 2503-2518.
- Müller, P. und D. O. Rudin (1969). Laboratory Techniques of Membrane Biophysics. Berlin, Springer-Verlag.
- Mur, L. A., *et al.* (1997). "Compromising early salicylic acid accumulation delays the hypersensitive response and increases viral dispersal during lesion establishment in TMV-infected tobacco." Plant J **12**(5): 1113-1126.
- Mur, L. A., *et al.* (2000). "A loss of resistance to avirulent bacterial pathogens in tobacco is associated with the attenuation of a salicylic acid-potentiated oxidative burst." Plant J **23**(5): 609-621.
- Musser, R. O., *et al.* (2006). "Ablation of caterpillar labial salivary glands: technique for determining the role of saliva in insect-plant interactions." J Chem Ecol **32**(5): 981-992.
- Myers, V. B. und D. A. Haydon (1972). "Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. II. The ion selectivity." Biochim Biophys Acta **274**(2): 313-322.
- Nishimura, M., *et al.* (2004). "Effect of defensin peptides on eukaryotic cells: primary epithelial cells, fibroblasts and squamous cell carcinoma cell lines." J Dermatol Sci **36**(2): 87-95.
- Nürnbergger, T., *et al.* (1994). "High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses." Cell **78**(3): 449-460.
- Oblatt-Montal, M., *et al.* (1993). "Synthetic peptides and four-helix bundle proteins as model systems for the pore-forming structure of channel proteins. I. Transmembrane segment M2 of the nicotinic cholinergic receptor channel is a key pore-lining structure." J Biol Chem **268**(20): 14601-14607.

- Ohme-Takagi, M. und H. Shinshi (1995). "Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element." Plant Cell **7**(2): 173-182.
- Orozco-Cardenas, M. und C. A. Ryan (1999). "Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6553-6557.
- Overmyer, K., *et al.* (2003). "Reactive oxygen species and hormonal control of cell death." Trends Plant Sci **8**(7): 335-342.
- Pardo-Lopez, L., *et al.* (2006). "Structural and functional analysis of the pre-pore and membrane-inserted pore of Cry1Ab toxin." J Invertebr Pathol **92**(3): 172-177.
- Paré, P. W., *et al.* (1998). "Concerted biosynthesis of an insect elicitor of plant volatiles." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13971-13975.
- Park, S. W., *et al.* (2007). "Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance." Science **318**(5847): 113-116.
- Pasti, M. B., *et al.* (1990). "Lignin-solubilizing ability of actinomycetes isolated from termite (Termitidae) gut." Appl Environ Microbiol **56**(7): 2213-2218.
- Pawlak, M., *et al.* (1991). "Melittin induced voltage-dependent conductance in DOPC lipid bilayers." Biochim Biophys Acta **1062**(1): 94-102.
- Pedley, K. F. und G. B. Martin (2005). "Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity." Curr Opin Plant Biol **8**(5): 541-547.
- Pelegri, P. B. und O. L. Franco (2005). "Plant γ -thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins." Int J Biochem Cell Biol **37**(11): 2239-2253.
- Pohnert, G., *et al.* (1999). "New fatty acid amides from regurgitant of lepidopteran (*Noctuidae*, *Geometridae*) caterpillars." Tetrahedron **55**: 11275-11280.
- Rasman, S., *et al.* (2005). "Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots." Nature **434**(7034): 732-737.
- Reichert, M., *et al.* (2002). "Benzoic acid glucosinolate esters and other glucosinolates from *Arabidopsis thaliana*." Phytochemistry **59**(6): 663-671.
- Rippa, S., *et al.* (2007). "The peptaibol alamethicin induces an rRNA-cleavage-associated death in *Arabidopsis thaliana*." Chem Biodivers **4**(6): 1360-1373.
- Rostas, M. und K. Blassmann (2009). "Insects had it first: surfactants as a defence against predators." Proc Biol Sci **276**(1657): 633-638.
- Ryals, J. A., *et al.* (1996). "Systemic Acquired Resistance." Plant Cell **8**(10): 1809-1819.
- Sagi, M. und R. Fluhr (2001). "Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection." Plant Physiol **126**(3): 1281-1290.
- Samakovlis, C., *et al.* (1990). "The immune response in *Drosophila*: pattern of cecropin expression and biological activity." Embo J **9**(9): 2969-2976.
- Sanders, D., *et al.* (2002). "Calcium at the crossroads of signaling." Plant Cell **14 Suppl**: S401-417.

- Sansom, M. S. (1993). "Alamethicin and related peptaibols--model ion channels." Eur Biophys J **22**(2): 105-124.
- Sarges, R. und B. Witkop (1965). "Gramicidin a. V. the Structure of Valine- and Isoleucine-Gramicidin A." J Am Chem Soc **87**: 2011-2020.
- Sarges, R. und B. Witkop (1965). "Gramicidin a. Vi. the Synthesis of Valine- and Isoleucine-Gramicidin A." J Am Chem Soc **87**: 2020-2027.
- Sarges, R. und B. Witkop (1965). "Gramicidin. Vii. the Structure of Valine- and Isoleucine-Gramicidin B." J Am Chem Soc **87**: 2027-2030.
- Schlieper, P. und E. De Robertis (1977). "Triton X-100 as a channel-forming substance in artificial lipid bilayer membranes." Arch Biochem Biophys **184**(1): 204-208.
- Schmelz, E. A., et al. (2006). "Fragments of ATP synthase mediate plant perception of insect attack." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(23): 8894-8899.
- Schmelz, E. A., et al. (2009). "Phytohormone-based activity mapping of insect herbivore-produced elicitors." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(2): 653-657.
- Schmelz, E. A., et al. (2007). "Cowpea chloroplastic ATP synthase is the source of multiple plant defense elicitors during insect herbivory." Plant Physiol **144**(2): 793-805.
- Schroeder, J. I., et al. (1987). "Voltage dependence of K channels in guard-cell protoplasts." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(12): 4108-4112.
- Schulze, B., et al. (2007). "Rapid enzymatic isomerization of 12-oxophytodienoic acid in the gut of lepidopteran larvae." Chembiochem **8**(2): 208-216.
- Sitte, P., et al. (2002). Strasburger Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Heidelberg Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- Solano, R., et al. (1998). "Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1." Genes Dev **12**(23): 3703-3714.
- Spalding, E. P., et al. (1992). "Ion Channels in *Arabidopsis* Plasma Membrane : Transport Characteristics and Involvement in Light-Induced Voltage Changes." Plant Physiol **99**(1): 96-102.
- Spiteller, D. (2004). Charakterisierung von *N*-Acyl-glutaminkonjugaten aus dem Regurgitat von *Lepidoptera* Larven Jena, Friedrich Schiller Universität Jena.
- Staswick, P. E. und I. Tiryaki (2004). "The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*." Plant Cell **16**(8): 2117-2127.
- Steiner, H., et al. (1981). "Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity." Nature **292**(5820): 246-248.
- Steppuhn, A., et al. (2004). "Nicotine's defensive function in nature." PLoS Biol **2**(8): E217.
- Suza, W. P. und P. E. Staswick (2008). "The role of JAR1 in Jasmonoyl-L- isoleucine production during *Arabidopsis* wound response." Planta **227**(6): 1221-1232.
- Tatsuki, M. und H. Mori (2001). "Phosphorylation of tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, LE-ACS2, at the C-terminal region." J Biol Chem **276**(30): 28051-28057.

- Terras, F. R., *et al.* (1995). "Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense." Plant Cell **7**(5): 573-588.
- Thevissen, K., *et al.* (2000). "A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*)." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(17): 9531-9536.
- Thevissen, K., *et al.* (2003). "Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components." Peptides **24**(11): 1705-1712.
- Thevissen, K., *et al.* (1996). "Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins." J Biol Chem **271**(25): 15018-15025.
- Thevissen, K., *et al.* (2000). "Specific binding sites for an antifungal plant defensin from Dahlia (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity." Mol Plant Microbe Interact **13**(1): 54-61.
- Thevissen, K., *et al.* (2004). "Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides." J Biol Chem **279**(6): 3900-3905.
- Thines, B., *et al.* (2007). "JAZ repressor proteins are targets of the SCF(CO1) complex during jasmonate signalling." Nature **448**(7154): 661-665.
- Thorpe, M. R., *et al.* (2007). "¹¹C-imaging: methyl jasmonate moves in both phloem and xylem, promotes transport of jasmonate, and of photoassimilate even after proton transport is decoupled." Planta **226**(2): 541-551.
- Ti Tien, H. und A. Ottova-Leitmannova (2000). Membrane Biophysics as viewed from experimental Bilayer Lipid Membranes.
- Ti Tien, H. und A. Ottova-Leitmannova (2003). Planar Lipid Bilayers (BLMs) and their Applications.
- Tielemann, D. P., *et al.* (1999). "Alamethicin channels in a membrane: molecular dynamics simulations." Faraday Discuss. **111**: 209-223.
- Torres, M. A. und J. L. Dangel (2005). "Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development." Curr Opin Plant Biol **8**(4): 397-403.
- Tosteson, M. T., *et al.* (1987). "Solid-phase synthesis of melittin: purification and functional characterization." Biochemistry **26**(21): 6627-6631.
- Tosteson, M. T. und D. C. Tosteson (1981). "The sting. Melittin forms channels in lipid bilayers." Biophys J **36**(1): 109-116.
- Truitt, C. L. und P. W. Pare (2004). "In situ translocation of volicitin by beet armyworm larvae to maize and systemic immobility of the herbivore elicitor in planta." Planta **218**(6): 999-1007.
- Truitt, C. L., *et al.* (2004). "A plasma membrane protein from *Zea mays* binds with the herbivore elicitor volicitin." Plant Cell **16**(2): 523-532.
- Tzou, P., *et al.* (2000). "Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia." Immunity **13**(5): 737-748.
- Vencl, F. V., *et al.* (2009). "The chlorophyll catabolite, pheophorbide a, confers predation resistance in a larval tortoise beetle shield defense." J Chem Ecol **35**(3): 281-288.
- Verbene, M. C., *et al.* (1999). Salicylic acid biosynthesis, Elsevier Science B.V.

- von Dahl, C. C., *et al.* (2007). "Tuning the herbivore-induced ethylene burst: the role of transcript accumulation and ethylene perception in *Nicotiana attenuata*." Plant J **51**(2): 293-307.
- Wallace, B. A. (2000). "Common structural features in gramicidin and other ion channels." Bioessays **22**(3): 227-234.
- Walling, L. L. (2000). "The Myriad Plant Responses to Herbivores." J Plant Growth Regul **19**(2): 195-216.
- Walter, A., *et al.* (2007). "Structural requirements of jasmonates and synthetic analogues as inducers of Ca²⁺ signals in the nucleus and the cytosol of plant cells." Angew Chem Int Ed Engl **46**(25): 4783-4785.
- Wang, K. L., *et al.* (2002). "Ethylene biosynthesis and signaling networks." Plant Cell **14** **Suppl**: S131-151.
- Wang, L., *et al.* (2007). "Independently silencing two JAR family members impairs levels of trypsin proteinase inhibitors but not nicotine." Planta **226**(1): 159-167.
- Wasternack, C. (2007). "Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development." Ann Bot (Lond) **100**(4): 681-697.
- White, P. J. (2000). "Calcium channels in higher plants." Biochim Biophys Acta **1465**(1-2): 171-189.
- White, P. J. (2009). "Depolarization-activated calcium channels shape the calcium signatures induced by low-temperature stress." New Phytol **183**(1): 6-8.
- Wildermuth, M. C., *et al.* (2001). "Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence." Nature **414**(6863): 562-565.
- Wu, J. und I. T. Baldwin (2009). "Herbivory-induced signalling in plants: perception and action." Plant Cell Environ.
- Wu, J., *et al.* (2007). "Herbivory rapidly activates MAPK signaling in attacked and unattacked leaf regions but not between leaves of *Nicotiana attenuata*." Plant Cell **19**(3): 1096-1122.
- Ye, J. S., *et al.* (2004). "Induction of transient ion channel-like pores in a cancer cell by antibiotic peptide." J Biochem **136**(2): 255-259.
- Yoshikawa, K., *et al.* (1988). "Electrical oscillation and fluctuation in phospholipid membranes - Phospholipids can form channel without protein." Biophysical Chemistry **29**: 293-299.
- Yoshinaga, N., *et al.* (2007). "Fatty acid amides, previously identified in caterpillars, found in the cricket *Teleogryllus taiwanemma* and fruit fly *Drosophila melanogaster* larvae." J Chem Ecol **33**(7): 1376-1381.
- Zavala, J. A., *et al.* (2004). "Constitutive and inducible trypsin proteinase inhibitor production incurs large fitness costs in *Nicotiana attenuata*." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(6): 1607-1612.

Zimmermann, M. R., *et al.* (2009). "System potentials, a novel electrical long-distance apoplastic signal in plants, induced by wounding." Plant Physiol **149**(3): 1593-1600.

8. Lebenslauf

Name	Heiko Maischak
Geburtsdatum	12. 09. 1974
Geburtsort	Augsburg
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Ausbildung und beruflicher Werdegang:

Seit 2004	Doktorand am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena
2003-2004	Diplomarbeit bei Prof. Dr. V. Müller an der LMU München
1998-2004	Studium der Biologie an der Ludwigs-Maximilians-Universität München Hauptfach: Mikrobiologie, Nebenfächer: Biochemie, Genetik, Physiol. Botanik
1998	Chemielaborant bei Hoechst Trevira in Bobingen
1995-1998	Ausbildung zum Chemielaboranten bei Hoechst Trevira in Bobingen
1994-1995	Wehrdienst
1994	Abitur am Holbein-Gymnasium Augsburg

Wissenschaftliche Publikationen:

2007	Maischak H., Grigoriev P.A., Vogel H., Boland W., Mithöfer A.: Oral secretions from herbivorous lepidopteran larvae exhibit ion channel forming activities. FEBS Letters 581, 898-904.
2007	Pisa K.Y.*, Weidner C.*, Maischak H.*, Kavermann H., Müller V.: The coupling ion in the methanoarchaeal ATP synthases: H ⁺ vs. Na ⁺ in the A1Ao ATP synthase from the archaeon Methanosarcina mazei Gö1. FEMS Microbiol Letters 277, 56-63. (* Autoren mit gleichwertigem Beitrag)
2009	Zimmermann M. R., Maischak H., Mithöfer A., Boland W., Felle H. H.: System Potentials, a Novel Electrical Long-Distance Apoplastic Signal in Plants, Induced by Wounding. Plant Physiology 149, 1593–1600

Tagungsbeiträge:

- Februar 2008 Mitteldeutsches Pflanzenphysiologentreffen, Jena. Pore formation in plant membranes during herbivory (Vortrag).
- September 2007 Botanikertagung BT'07, Hamburg. Signals in plant herbivore interactions: A role for channel-forming compounds from oral secretions of insects (Vortrag).
- Juli 2007 SIP13 13th Symposium on Insect-Plant Relationships, Uppsala, Schweden. Oral secretions from Lepidopteran larvae exhibit ion channel-forming activities (Poster).
- Juli 2007 23rd ISCE International Society for Chemical Ecology Annual Meeting, Jena. Description and characterization of channel-forming compounds from the regurgitate of lepidopteran larvae (Poster).
- Mai 2007 3rd International Symposium on Plant Neurobiology, Štrbské Pleso, Slowakei. Ion channel-forming compounds in caterpillar regurgitate: A way to manipulate the plant plasma membrane potential during herbivory? (Vortrag)
- April 2007 Naturstoffe: Chemie, Biologie und Ökologie. 33. Doktorandenworkshop, Leipzig. Ionenfluss durch Speichelfluss: Kanalbildende Substanzen im Oralsekret von Herbivoren (Vortrag).

9. Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. W. Boland dafür, dass ich in seinem Labor dieses spannende Thema bearbeiten durfte und PD Dr. Axel Mithöfer für die fachliche Betreuung meiner Dissertation und die konstruktiven Diskussionen und Anregungen.

Besonderen Dank bin ich Prof. Dr. Pavel Grigoriev schuldig. Er unterrichtete mich in der BLM-Technik, die zentraler Teil meiner Arbeit wurde und zeigte mir, dass man morgens um halb fünf auf dem Bahnsteig die interessantesten Diskussionen über diese Technik haben kann.

Ich danke Prof. Dr. E. Kothe für die Betreuung meiner Doktorarbeit von universitärer Seite und für die Gelegenheit, meine Fortschritte in Ihrem Seminar diskutieren zu dürfen.

Der Max-Planck-Gesellschaft und dem Virtuellen Institut – Biotische Interaktionen verdanke ich die finanzielle Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können.

Im Rahmen des Virtuellen Instituts – Biotische Interaktionen möchte ich insbesondere PD Dr. Anton Schäffner danken für die Gelegenheit, in seiner Gruppe Versuche durchzuführen und diese mit ihm auszuwerten. Desweiteren möchte ich mich auch bei allen Angehörigen von BIOP am HelmholtzZentrum bedanken, um nur einige zu nennen, Prof. Dr. Jörg Durner, Dr. Christian Lindermayer, Dr. Andreas Fröhlich.

PD Dr. E.-C. Oerke von der Universität Bonn und Prof. Dr. H. Felle von der Universität Giessen erlaubten es mir, in ihren Laboren „exotische“ Techniken kennenzulernen und für meine Versuche zu benutzen. In diesem Zusammenhang sei auch Matthias Zimmermann gedankt für die intensiven Diskussionen im Labor und außerhalb.

Ich danke PD Dr. D. Wicher für seine Geduld, trotz einiger von mir zerstörter Kapillaren und Filamente, mit mir *patch-clamp*-Messungen durchzuführen.

Die Liste der Leute am MPI für Chemische Ökologie, denen ich zu Dank verpflichtet bin, scheint unendlich, dennoch will ich es versuchen. Zunächst wäre Tamara Krügel und ihr Team im Gewächshaus zu nennen, die mich immer mit Pflanzen versorgt haben, das Bibliotheksteam, die IT-Abteilung, insbesondere Diana Mewes und Martin Niebergall für Hilfe bei unüberwindlichen Problemen mit angeblich einfacher Software. Den Service-Gruppen, und insbesondere A. Svatos für HR-MS Messungen, muss an dieser Stelle auch gedankt werden.

Aus der Abteilung Bioorganische Chemie möchte ich mich bei Andrea Lehr für ihre Unterstützung bei dem einen oder anderen Experiment bedanken und bei Angelika Berg für die Unmengen an Raupen, die sie mir stets zur Verfügung gestellt hat.

Den „Mittagsmädel“, neben den beiden genannten noch Grit Winnefeld, Anja David, Rita Büchler und Maritta Kunert, danke ich für unzählige unterhaltsame Mittagspausen.

Im steten Kampf gegen zickige Geräte leisteten mir Paulina Dabrowska, Birgit Schulze, Rita Büchler, Kertin Ploss und vor allem Dieter Spitteller immer dann Beistand, wenn die Not am größten war, wofür ich ihnen dankbar bin.

Ich danke auch den Büromitgliedern von D1.012, Andrea Lehr, Sandy Rottloff, Margit Leitner, Axel Mithöfer sowie den kurzzeitigen Insassen für viele fröhliche und ja, auch die eine oder andere alberne Unterhaltung.

Auch wenn ich hier nicht allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Boland namentlich danke, wird mir deren stete Kollegialität und Hilfsbereitschaft lange in guter Erinnerung bleiben.

Dass es auch ein Leben außerhalb des Labors gibt, haben mir Sven Adolph, Christian Kost, Silvia Schmidt, Lars Clement, Margit Leitner, Dieter Spitzler, Birgit Schulze und Daniela Schmid gezeigt. Dafür bin ich ihnen besonders dankbar. Auch dankbar bin für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Für den Kontakt in die Heimat danke ich Ralph Acker, Tanja Schüttrigkeit, Walter Weidenbacher & Nina und Claudia und Rober Liessel. Besonderen Dank hat sich Michael Hintermayr dafür verdient, dass er mich immer über den ruhmreichen FC Augsburg auf dem Laufenden gehalten hat.

Abschließend danke ich meiner Mutter. Ihre Unterstützung und Verständnis haben das Studium und diese Promotion erst möglich gemacht.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist.

Ich habe die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und alle Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in der Arbeit angegeben.

Sämtliche Personen, die mich bei der Auswahl, Auswertung und Herstellung des Manuskripts unterstützt haben, sind in der Danksagung genannt.

Ich habe weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch haben Dritte unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Arbeit stehen.

Ich habe die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ferner habe ich auch nicht versucht, die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation einzureichen.

Jena, September 2009

Maischak Heiko