

Molekulare Analyse des Kannensaftes von *Nepenthes* Spezies

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 Franziska Buch, Magistra Scientiarum
geboren am 06.08.1983 in Friedrichroda

Angefertigt wurde die vorliegende Arbeit am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie Jena/Abteilung für Bioorganische Chemie/Arbeitsgruppe „*Plant Defense Physiology*“, geleitet von PD Dr. Axel Mithöfer.

Durchgeführt von 07/2009 – 9/2014

Gutachter: PD Dr. Axel Mithöfer
PD Dr. Klaus Appenroth
Ao. Univ.-Prof. Dr. Irene Lichtscheidl-Schultz

Tag der öffentlichen Verteidigung: 29.04.2015

Nepenthes curtisii-Pflanze

©2013 John Innes Centre

7138



M. S. del., J. N. Fitch. lith.

https://wikis.nbi.ac.uk/InnerWorlds/images/e/e2/Nepenthes_curtisii_DSC8695_c.jpg

Vincent Brooks, Day & Son, L.

L. Reeve & Co. London.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	II
1. Einleitung	
1.1 Karnivorie im Pflanzenreich – Mythen und Fakten	1
1.2 Nepenthaceae	5
1.2.1 Die <i>Nepenthes</i> -Gleitfalle: Entwicklung und Grundstruktur	6
1.2.2 Anlocken, Fangen und Verdauen der Beute	9
<i>Besondere Fangmethoden und ungewöhnliche Nährstoffquellen</i>	10
<i>Der Verdauungsprozess</i>	13
1.3 PR (pathogenesis-related)-Proteine	14
1.3.1 PR-Proteine im <i>Nepenthes</i> -Kannensaft	18
<i>PR-1 Proteine</i>	18
<i>Proteasen</i>	19
1.4 Zielstellung dieser Arbeit	21
2. Übersicht zu den Manuskripten	22
Manuskript 1	22
Manuskript 2	23
Manuskript 3	24
3. Manuskripte	26
<i>Manuskript 1 (Buch, Rott u.a. 2013)</i>	26
<i>Manuskript 2 (Buch, Pauchet u.a. 2014)</i>	37
<i>Manuskript 3 (Buch, Kaman u.a. eingereicht 2014)</i>	47
4. Abschlussdiskussion	85
4.1 Ausblick	95
5. Zusammenfassung	96
6. Summary	98
7. Referenzen	100
8. Anhang	116
<i>Curriculum vitae</i>	117
<i>Wissenschaftliche Veröffentlichungen</i>	118
<i>Danksagung</i>	119
<i>Eigenständigkeitserklärung</i>	121

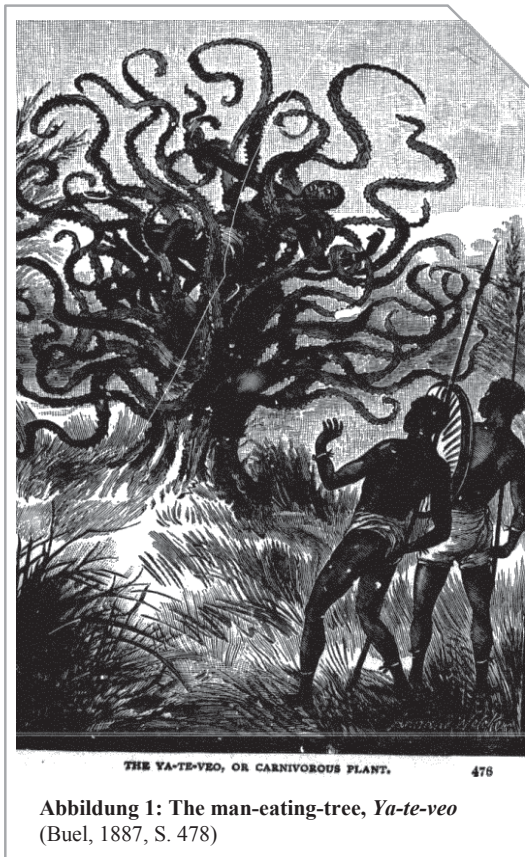
Abkürzungsverzeichnis

bspw.	beispielsweise
cDNA	<i>copy DNA</i>
cm	<i>culture medium</i>
Fe	Eisen
JA	Jasmonsäure
K	Kalium
kDa	Kilodalton
N	Stickstoff
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information, Bethesda MD, USA</i>
nm	Nanometer
Nm	<i>Nepenthes mirabilis</i>
P	Phosphor
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PNGase F	Peptide-N-Glycosidase F
PR	<i>pathogenesis-related</i>
pv.	pathovar
RNA	Ribonukleinsäure
S	Schwefel
S.	Seite
SA	Salicylsäure
SP	Signalpeptid
Tab.	Tabelle
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
u.a.	und andere
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Karnivorie im Pflanzenreich – Mythen und Fakten

Die Faszination für karnivore Pflanzen geht bishin zu fantasievollen Berichten des deutschen Entdeckers Carl Liche zurück, welcher in diversen Briefen behauptete auf seinen Reisen durch Madagaskar einen menschenfressenden Baum (*man-eating-tree*), von den Ureinwohnern *Halavata* (Spinnenbaum) genannt, aufgefunden zu haben. Er schrieb „... *it is a large plant with ... a set of long, hairy green tendrils and tentacles, constantly and vigorously in motion...*“ und weiter, dass der großen, Tentakeln besitzenden Pflanze eine Frau des Mkodo-Ureinwohnerstammes zum Opfer fiel (Chase *et al.*, 2009). Eine weitere menschenfressende Pflanze, *Ya-te-veo* genannt (Abb. 1), ähnelt dem *Halavata*-Baum sehr und wurde angeblich vom Journalisten James William Buel im Süden Mittelamerikas entdeckt und folglich in seinem Werk „*Sea and Land*“ (Buel, 1887) beschrieben. Wie der *man-eating-tree* hat auch der *Ya-te-veo* seinen Ursprung in den Legenden der ansässigen Ureinwohner. Nicht nur in der Literatur, sondern auch in Filmen wie z. B. *Tarzan, The day of the Triffids* (1962, Abb. 2A) und *The Little Shop of Horrors* (1882, Abb. 2B) wurden diese Pflanzen als Blumen des Bösen beschrieben. Carl Liches Geschichte wurde von Chase Osborn in seinem Werk „*Madagascar, Land of the Man-Eating Tree*“ (Osborn, 1924) aufgegriffen und bestätigt. Selbige Erzählung in Hinblick auf den menschenfressenden Baum und den Mkodo-Stamm, sowie die Person „Carl Liche“ selbst,



wurden 1955 von Willy Ley als erfunden erklärt (Ley, 1955). Kein Wunder das der Mythos „menschenfressende Pflanzen“ uns über Jahrhunderte begleitete, ist es doch eine andauernde Faszination in diesen Geschichten die Merkmale wirklich existierender Karnivoren übertrieben darzustellen und in Menschen die Angst zu schüren, von überdimensionalen Pflanzen verschlungen zu werden.

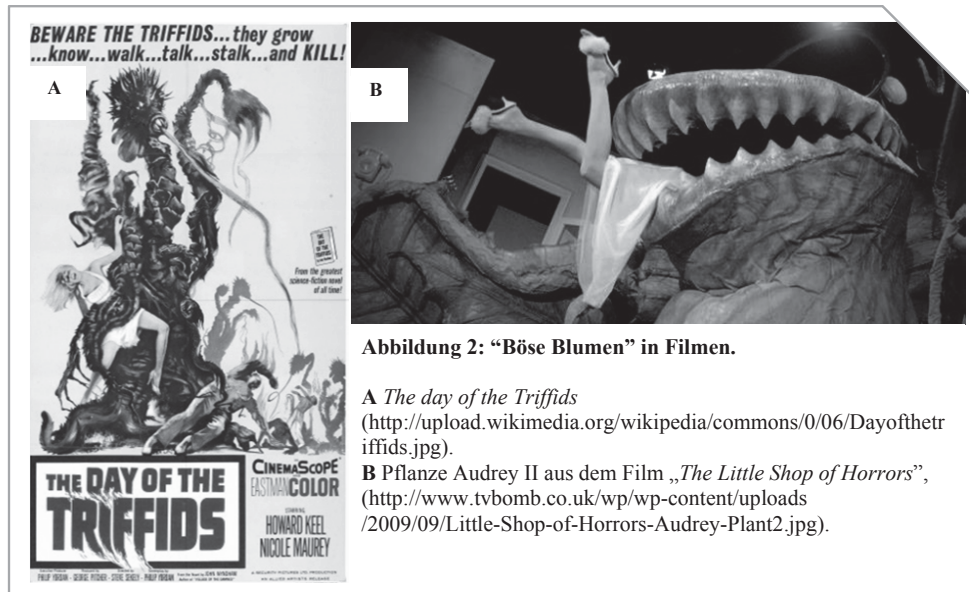


Abbildung 2: „Böse Blumen“ in Filmen.

A *The day of the Triffids*

(<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/06/Dayofthetriffids.jpg>).

B Pflanze Audrey II aus dem Film „*The Little Shop of Horrors*“,

(<http://www.tvbomb.co.uk/wp/wp-content/uploads/2009/09/Little-Shop-of-Horrors-Audrey-Plant2.jpg>).

Einer mehr ernsthaften Seite dieses Themengebietes zugewandt, gibt es für den Begriff „Karnivorie“ im Pflanzenreich verschiedene Definitionen. Die Grunddefinition beinhaltet, dass eine karnivore Pflanze die Fähigkeit besitzt, Produkte der Beutezersetzung absorbieren zu können. Dies geschieht entweder direkt durch die Blätter oder über die Wurzeln und steigert zugleich Fitness und Samenproduktion (Chase *et al.*, 2009). Alle Pflanzen können demnach zu einem bestimmten Grad karnivor sein, jedoch werden als "echte" Karnivoren nur jene bezeichnet, welche die Fähigkeiten aufweisen, (1) ihre Beute eigens anzulocken, (2) die Beute zu fangen und (3) diese im Anschluss zu verdauen, die Stoffwechselprodukte zu verwerten und für das eigene Wachstum zu nutzen (Lloyd, 1942; Chase *et al.*, 2009). Die Verdauung kann durch eigens sekretierte Enzyme (echte Karnivoren), aber auch über Enzyme, welche z. B. von Bakterien oder Pilzen sekretiert werden, geschehen (Chase *et al.*, 2009). Pflanzen, die nicht alle Voraussetzungen erfüllen, um als echte fleischfressende Pflanzen anerkannt zu werden bzw. jene, welche die Fähigkeit besitzen die Beute zwar anzulocken, jedoch die zur Verdauung benötigten Enzyme nicht bereitstellen können, werden als präkarnivor bezeichnet (Juniper *et al.*, 1989). Ein Beispiel hierfür ist *Darlingtonia californica* (die Kobralilie), die für die Verdauung ihrer Beutetiere die Mithilfe der in den passiven Fallen lebenden Bakterien benötigt, aber die resultierenden Nährstoffe selbst absorbieren kann (Barthlott *et al.*, 2004; Chase *et al.*, 2009).

Charles Darwin legte den Grundstein für karnivore Pflanzen in der modernen Wissenschaft und belegte die Tatsache „Karnivorie“ 1875 in seinem Werk „*Insectivorous Plants*“ experimentell. Er gab erste detaillierte Beschreibungen zu den Strukturen der Fallen, mit denen acht Pflanzengattungen (*Drosophyllum*, *Drosera*, *Dionaea*, *Aldrovanda*, *Roridula*, *Pinguicula*, *Utricularia*, *Byblis*) in der Lage sind, Insekten oder andere Beutetiere zu fangen. Er stellte dazu erstmals fest, dass tierische Proteine direkt von Pepsin-ähnlichen Enzymen aufgelöst und sofort

von der Pflanze absorbiert werden (auch in Hepburn, 1922; Hepburn *et al.*, 1927). Dies wiederum trägt zum Pflanzenwachstum bei (Darwin, 1875). Karnivore Pflanzen ergänzen ihren Nährstoffbedarf v.a. mit Phosphor und Stickstoff, indem sie mit den spezialisierten Fallen kleine Arthropoden vorwiegend aber Insekten anlocken und verdauen. Aufgrund dieser Eigenschaft sind sie dazu befähigt an besonders nährstoffarmen Standorten zu gedeihen. Darwin beschrieb ausführlich den Aufbau von Klebe-, Klapp- und Saugfallen, aber erwähnte auch die Gleitfallen.

Phylogenetisch wurden die Karnivoren früher aufgrund struktureller Homologien bestimmten Fallentypen zugeordnet. Heute weiß man, basierend auf kombinierten Sequenzanalysen, dass sich die Karnivorie mehrfach in der Klasse der Angiospermen entwickelt hat (Stevens, 2001 onwards; Ellison & Gotelli, 2009). Die bisher über 600 bekannten karnivoren Pflanzenarten, welche sich nach aktueller phylogenetischer Einteilung auf vier Großgruppen der Angiospermen (Monokotyledonen, Kerneudikotyledonen, Rosiden, Asteriden) verteilen, sind in den 5 Ordnungen, Poales, Caryophyllales, Oxalidales, Ericales und Laminales vertreten. In Abbildung 3 sind zusätzlich die fünf Fallentypen durch farbige Unterstriche gekennzeichnet, die sich neben dem Unterschied ihrer Funktionsweisen in aktive und passive Fallen gliedern lassen. Aktive Fallen (Klapp- und Saugfallen) führen Bewegungen durch, um die Beutetiere zu fangen, währenddessen passive Fallen (Gleit- und Reusenfallen) sich nicht bewegen können. Die Evolution der Fallentypen in der Ordnung Laminales reicht von Klebe- (*Pinguicula*, *Ibicella*, *Byblis*) bis hin zu den komplexeren Reusen- (*Genlisea*) und Saugfallen (*Utricularia*) (Lloyd, 1942; Guisande *et al.*, 2007). Der Ordnung Poales gehörten ursprünglich nur präkarnivore Pflanzen (*Brocchinia*, *Catopsis*) mit Gleitfallen an, bei denen die Blattrosetten zu krugartigen Fallengruben umgewandelt sind. Für *Brocchinia reducta* wurde aber später gezeigt, dass sie eigens Phosphatasen produzieren kann und somit als echte Karnivore gilt (Plachno *et al.*, 2006). Während *Cephalotus* der einzige fleischfressende Vertreter der Ordnung Oxalidales ist, gibt es unter den Ericales drei Gleitfallen besitzende präkarnivore Pflanzengattungen – *Sarracenia*, *Heliophora* und *Darlingtonia*, sowie *Roridula* als Klebfalle (Abb. 3). Die zwei Arten *Aldrovanda vesiculosa* und *Dionaea muscipula* mit ihren Klappfallen wurden als Schwesterngruppen des Sonnentaus (*Drosera*) über Sequenzanalysen des *trnK*-Introns und dem assoziierten *matK*-Gen, den Chloroplasten-Genen *atpB* und *rbcL* und der nukleären 18S rDNA innerhalb der Caryophyllales bestimmt (Heubl *et al.*, 2006). Mehr als 95 % aller Karnivoren lassen sich in die Ordnungen Laminales und Caryophyllales einteilen, wobei zu letzterer die Familie der Nepenthaceae gehört (Abb. 3). Diese stellt eine Schwesterngruppe der Droseraceae dar (Ellison & Gotelli, 2009). Die Nepenthaceae, bzw. die *Nepenthes*-Pflanzen an sich, waren Darwin nur über Beobachtungen von Dr. Hooker bekannt (Hooker, 1873; Hooker, 1874), zu dem er engen Kontakt pflegte.

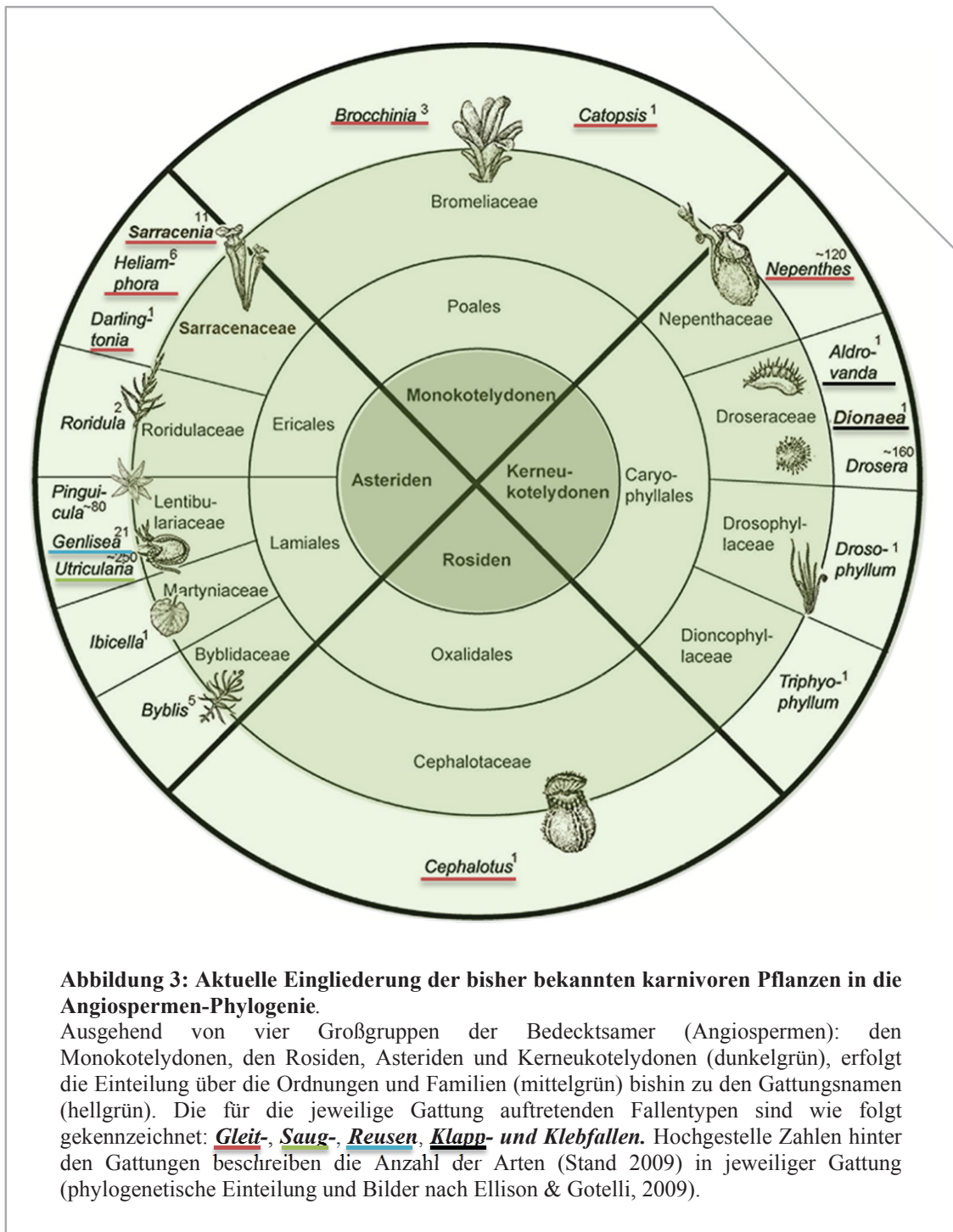


Abbildung 3: Aktuelle Eingliederung der bisher bekannten karnivoren Pflanzen in die Angiospermen-Phylogenie.

Ausgehend von vier Großgruppen der Bedecktsamer (Angiospermen): den Monokotyledonen, den Rosiden, Asteriden und Kerneukotyledonen (dunkelgrün), erfolgt die Einteilung über die Ordnungen und Familien (mittelgrün) bis hin zu den Gattungsnamen (hellgrün). Die für die jeweilige Gattung auftretenden Fallentypen sind wie folgt gekennzeichnet: Gleit-, Saug-, Reusen, Klapp- und Klebfallen. Hochgestellte Zahlen hinter den Gattungen beschreiben die Anzahl der Arten (Stand 2009) in jeweiliger Gattung (phylogenetische Einteilung und Bilder nach Ellison & Gotelli, 2009).

1.2 Nepenthaceae

Die monotypische Familie der karnivoren Kannenpflanzen umfasst rund 120 bisher beschriebene *Nepenthes*-Arten (McPherson, 2009). Ihr Diversitätszentrum liegt in den Tropen der Alten Welt und erstreckt sich von Madagaskar (*N. madagascariensis*, *N. masoalensis*) über die Seychellen (*N. pervillei*), Indien (*N. khasiana*), Sri Lanka (*N. distillatoria*) und Südost-Asien bis Nordost-Australien und Neukaledonien. Die große Mehrheit beschränkt sich auf das Malayische Archipel, insbesondere auf Borneo und Sumatra (Meimberg *et al.*, 2001; Barthlott *et al.*, 2004; Meimberg & Heubl, 2006). *Nepenthes*-Pflanzen weisen eine große Vielfalt in Kannengröße und -form auf und besitzen eine erhebliche Auswahl an Beutetieren (Clarke, 2006). Auch die größten aller Karnivoren gehören dieser Pflanzenfamilie an. Die kleinsten Kannen haben ein Fassungsvermögen von weniger als 2 ml, wobei die größten sogar 2000 ml überschreiten können. Unterschieden werden 2 Formen der *Nepenthes*-Pflanzen. Zum einen die Tieflandarten, die vorwiegend vom Meeresspiegel ausgehend bis auf etwa 1000 m Höhe vorkommen und zum anderen die Hochlandarten, welche in weitaus höheren Arealen wachsen. *Nepenthes* wurzeln im Boden (terrestrisch) oder wachsen auf Bäumen (epiphytisch) und Felsen (lithophytisch). Die meisten von ihnen treten aber terrestrisch auf, während das lithophytische Habitat nur sehr vereinzelt besiedelt wird (Clarke, 2001; Clarke, 2006; Moran & Clarke, 2010). Sie sind meist verholzende, Lianen-artige Pflanzen, die als aufrechte Sträucher (z.B. *N. pervillei*, *N. madagascariensis*) oder auch kriechend am Boden (z.B. *N. rajah*, *N. villosa*) vorkommen. Kletternde Arten wie z.B. *N. bicalcarata* und *N. ampullaria* können ein Ausmaß bis zu 15 m Länge erreichen (Barthlott *et al.*, 2004; Clarke, 2006). In Abbildung 4 sind die Blätter der Kannenpflanzen zu sehen, die denselben Grundbauplan wie normale Laubblätter aufweisen. Der laubblattförmige Basalteil, aus dem sonst eher kleinen Blattgrund hervorgegangen, ist hier dagegen groß und flächig. An der Spitze des Basalteils (Apex) entwickeln sich geschlungene Ranken (tatsächlicher Blattstiel), mit denen sich die meisten Arten an der angrenzenden Vegetation fixieren (Moran & Clarke, 2010). Die Kanne als Gleitfalle ist eine Metamorphose der eigentlichen Blattspreite, die für den Beutefang meist invertibrater Tiere verantwortlich ist (Kaul, 1982; Kato, 1993; Barthlott *et al.*, 2004).

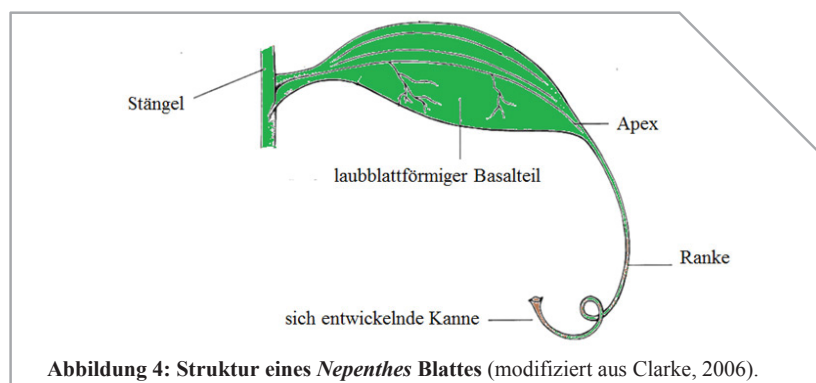


Abbildung 4: Struktur eines *Nepenthes* Blattes (modifiziert aus Clarke, 2006).

1.2.1 Die *Nepenthes*-Gleitfalle: Entwicklung und Grundstruktur

Die Kannenentwicklung ist ein langsam voranschreitender Entwicklungsprozess, der in der Dauer stark speziesabhängig ist. Zu Beginn ist nur eine abgeflachte Knospe (< 10 mm Länge) zu erkennen (Abb. 5A), welche sich schließlich bis hin zur typischen Kannenform verlängert (Abb. 5B, C). Nach mehreren Tagen beginnt ein Stadium, indem diese junge, flache Kanne anfängt anzuschwellen (Abb. 5D) und stark an Größe zuzunehmen. Kurz vor Öffnung wird die Kanne mit Luft aufgebläht und anschließend mit eigens sekretiertem Saft gefüllt. Ein paar Tage später öffnet sich die ausgewachsene Kanne und ist nach wenigen weiteren Tagen funktionsfähig (Abb. 5E). Oft kann der gesamte Entwicklungsprozess mehrere Wochen andauern. Bei manchen Arten dauert er weniger als einen Monat (z.B. *N. alata*), andere brauchen nahezu ein Jahr bis die funktionsfähige Kanne (z.B. *N. bicalcarata*) ausgebildet ist. Ähnlich stark wie die Dauer der Kannenentwicklung variiert auch die Lebensdauer einer Kanne von Spezies zu Spezies stark. Während Kannen von *N. bicalcarata* und *N. ampullaria* \pm 200 Tage alt werden können, ist die Lebensdauer einer Gleitfalle von *N. mirabilis* mit \pm 30 Tagen eher kurz (Phillipps & Lamb, 1996; Clarke, 2006).

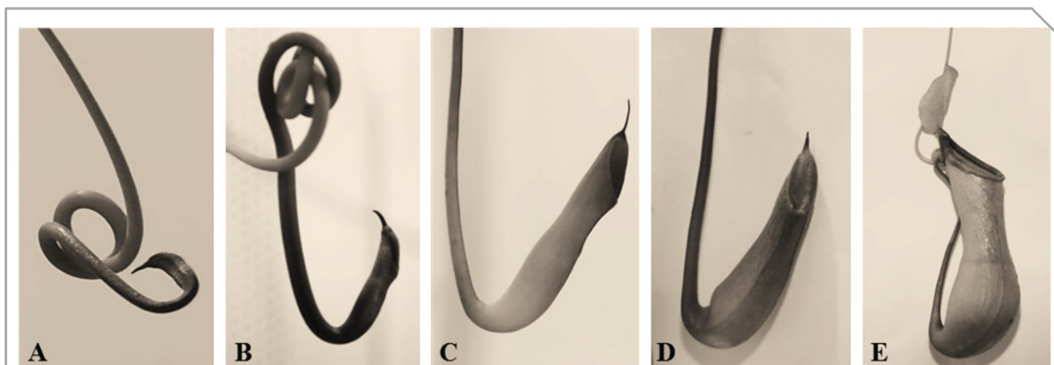


Abbildung 5: Fotos von verschiedenen Stadien der Kannenentwicklung einer *N. alata* Pflanze. Ausgehend von A der abgeflachten Knospe, welche sich zur typischen Kannenform hin verlängert, schließlich anschwillt B, C und sich mit Luft und sekretiertem Saft füllt D. Das funktionsfähige Stadium ist nach der Öffnung der Kanne E erreicht (Textinformationen nach Clarke, 2006).

Die Kannen aller *Nepenthes*-Arten sind passive, gravitationsabhängige Gleitfallen ohne Bewegungsapparat (Barthlott *et al.*, 2004), welche eine funktionelle Gliederung aufweisen (MacFarlane, 1893; Lloyd, 1942; Adams & Smith, 1977; Juniper *et al.*, 1989; Owen & Lennon, 1999). Innerhalb einer Art kann man oft zwei verschiedene Kannentypen unterscheiden (Dimorphismus): 1. die obere (Luft-) Kanne und 2. die untere (terrestrische-/ Boden-) Kanne (Juniper *et al.*, 1989; Clarke, 1997; Clarke, 2001; Benz *et al.*, 2012). Die jungen *Nepenthes*-Pflanzen produzieren die Rosetten der Bodenkannen. Dieser Kannentyp ist meist klein, eiförmig, sitzt auf dem Boden auf und besitzt 2 Flügelleisten (Abb. 6). Die sogenannten Luftkannen werden

während des Wachstumsprozesses von der Pflanze gebildet und weisen eine eher zylinder- bis trichterförmige Gestalt auf. Zeitweise werden Zwischenformen beider Kannentypen ausgebildet (Moran & Clarke, 2010). Es wurde unter anderem an *N. rafflesiana* (Moran, 1996; Di Giusto *et al.*, 2008) und *N. mirabilis* (Jebb, 1991) gezeigt, dass die verschiedenen Kannentypen sich nicht nur in Morphologie, sondern auch im Beutespektrum unterscheiden. Unabhängig von dem ontogenetischen Kannendimorphismus besitzen alle *Nepenthes*-Gleitfallen einen identischen Grundaufbau (Abb. 6).

Die sogenannte Anlockungszone besteht aus Deckel und Peristom (Abb. 6). Der Deckel agiert als blattförmige Scheibe, die das Innere der Kanne vor Staub, Regenwasser und anderen Verunreinigungen schützt und gleichzeitig auch die Evaporation des Verdauungssaftes reduziert (Wang *et al.*, 2009). Auch extraflorale Nektarien und Stomata sind an der Innenseite des Deckels ausgebildet (Gaume *et al.*, 2002). Das Peristom (Abb. 6A) bildet eine kragenförmige Struktur (Querschnitt, Abb. 6A3, A4), welche die Kannenöffnung umschließt. Die meisten *Nepenthes*-Arten besitzen auch hier große, extraflorale Nektarien (Juniper *et al.*, 1989), welche in Vertiefungen zwischen den zahnartigen Strukturen lokalisiert sind (Abb. 6A1). Die Oberfläche des Peristoms (Abb. 6A2) besteht aus verschiedenen, radial verlaufenden Furchen, die aus anisotrop ausgerichteten, überlappenden epidermalen Zellen aufgebaut sind und so in Richtung „Kannemund“ führen (Moran *et al.*, 2013). Die Gleitzone bzw. Wachszone (Abb. 6B) besteht im Inneren der Kanne aus zum Kannengrund gerichteten sichel- bzw. halbmondförmigen Zellen, welche mit Wachskristallen bedeckt sind (Gaume *et al.*, 2002). Die Anzahl dieser Zellen und folglich der Wachskristalle ist stark artspezifisch und reicht von kompletter Wachsbedeckung (Abb. 6B1, B2) über vereinzelt auftretende sichelförmige Zellen (Abb. 6B3), bis hin zu vollständigem Fehlen dieser Zellen und Wachskristalle (Abb. 6B4) (Benz *et al.*, 2012).

Der untere Teil der Pflanze wird Verdauungszone genannt (Abb. 6C), ist mit einer von ihr selbst sekretierten viskoelastischen Flüssigkeit gefüllt und besitzt multizelluläre, bifunktionale Drüsen (Gaume & Forterre, 2007; Di Giusto *et al.*, 2008) (Abb. 6C1, C2, C3). Diese Drüsen sitzen in Vertiefungen der Epidermis und bestehen aus Sekretionszellen, die zum Teil von einem Häubchen bedeckt werden (Abb. 6C4) (Gorb *et al.*, 2004; Thornhill *et al.*, 2008). Die beschriebenen Strukturen der Kanne erfüllen verschiedene Funktionen, ausgehend von Anlocken und Fangen bis hin zur Retention und Verdauung der Beutetiere, sowie anschließendem Aufnehmen der Nährstoffe (Gorb & Gorb, 2011).

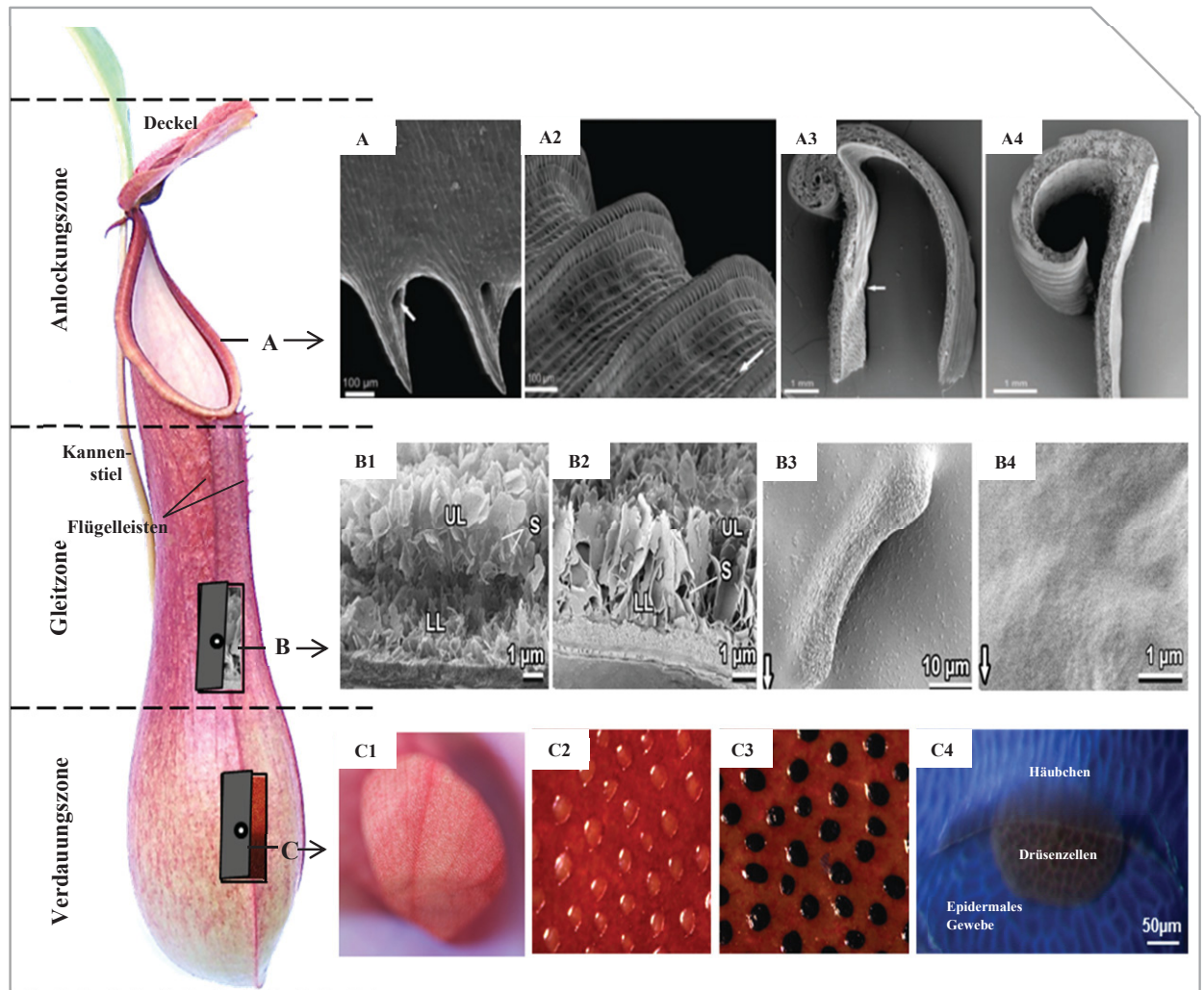


Abbildung 6: Kannenanatomie.

Foto einer *N. mirabilis*-Kanne; **A** Peristom, 1: Unterseite des inneren Peristomrandes mit zahnartigen Auskragungen und Nektarporen (Pfeil), 2: Aus Furchen bestehende Oberfläche mit überlappenden epidermalen Zellen (Pfeil zeigt zum Inneren der Kanne), 3 + 4: Querschnitt (Aufnahmen A1- A3 von *N. bicalcarata*, A4 von *N. alata* entnommen, Bohn & Federle, 2004). **B** Cryo-SEM Mikrographie der inneren Oberfläche der Gleitzone (Benz *et al.*, 2012), 1: *N. alata* + 2: *N. macrophylla*, seitliche Ansicht der oberen (UL= upper layer) und unteren (LL= lower layer) Wachsschicht, verbunden durch Stiele (S= stalks), 3: *N. ventricosa*, Oberfläche mit einer sporadisch auftretenden halbmondförmigen Zelle, 4: *N. veitchii*, ohne Wachskristalle und halbmondförmige Zellen (Pfeil zeigt in Richtung Kannengrund). **C** Innenseite der Verdauungszone mit zahlreichen multizellulären, bifunktionalen Drüsen, *N. alata*, 1: Foto (Maßstab 1:1), durch den geöffneten Kannenmund, von der Verdauungszone mit Verdauungssaft, 2: Drüsen bevor und 3: nach der Färbung mit Methylenblau (0.16 mg/ ml ddH₂O) – Drüsen zeigen Absorption der Verdauungsprodukte (Methylenblau), 4: Drüsenzzone eine *N. maxima*-Kanne (Rottloff, 2012).

1.2.2 Anlocken, Fangen und Verdauen der Beutetiere

Der Deckel und das Peristom der *Nepenthes*-Kannen sind in erster Linie verantwortlich für das Anlocken der Beutetiere (Jebb & Cheek, 1997; Owen & Lennon, 1999; Gaume *et al.*, 2002; Gorb *et al.*, 2004), wobei der Deckel mit einer vielfältigen Kombination diverser Farben die erste Kontaktstelle für fliegende Insekten darstellt (Clarke, 2006).

Eine hohe Attraktivität der Luftkannen für anthophile Insekten, hervorgerufen durch einen stark süßlichen Duft, konnte am Beispiel von *N. rafflesiana* von Di Giusto *et al.* (2008) gezeigt werden. Eine weitere Rolle im Anlocken von Gliedertieren übernehmen die spektralen Reflexionseigenschaften der Gleitfalle. Bei *N. rafflesiana* steht das Peristom in hohem Kontrast zum restlichen Kannenkörper und ist im Vergleich dazu im ultravioletten- (360nm), blauen- (430nm-470nm) und grünen (490nm-540nm) Wellenlängenbereich stark absorptionsfähig. Dies kann man als visuellen Stimulus für trichromate Insekten beschreiben, da sie deren optischen Sensitivitätsmaxima entsprechen (Moran, 1996; Moran *et al.*, 1999).

Die Deckelunterseite, der Innenrand des Peristoms und die zwei Flügelleisten, weisen neben verschiedenen Farbmustern zahlreiche Nektar produzierende Drüsen auf. Diese Nektarien geben zuckerhaltige Ausscheidungen ab und locken so die Insekten in Richtung Kanneninneres. Ihre Anzahl ist von Art zu Art verschieden. Das Peristom kann leicht durch Kapillarkräfte zwischen den jeweiligen Furchen (Abb. 6A2) benetzt und durch Nektar-Absonderungen, darauf fallenden Regen oder Kondensation angefeuchtet werden, sodass die Insekten ihre Haftung verlieren („*insect aquaplaning*“) und in das Innere der Kanne fallen. Dagegen können sie auf einem trockenen Peristom ohne große Probleme entkommen (Bohn & Federle, 2004; Bauer *et al.*, 2008; Bauer *et al.*, 2009; Bauer *et al.*, 2011; Bauer *et al.*, 2012a; Bauer *et al.*, 2012b). Zudem spielt die Größe des Peristoms eine entscheidende Rolle beim Beutefang. Je größer es ist, desto wahrscheinlicher wird es von nahrungssuchenden Insekten wahrgenommen (Moran *et al.*, 1999). Die ins Innere überhängenden Zähne des Kragens dienen als Fluchtbarriere (Clarke, 2001).

Ist die Beute gefangen, verhindern Gleit- und Verdauungszone ein Entkommen. Die nach unten gerichteten, überlappenden, halbmondförmigen Zellen der Gleitzone verhindern das Aufwärtsklettern der Insekten im Kanneninneren. Die zusätzlich darauf vorhandenen Wachsplatten (Abb. 6B) sind sehr fragil und brechen ab, sobald sich Insekten darauf fortbewegen wollen. Neben diesen Eigenschaften variiert auch die chemische Zusammensetzung der Gleitzone zwischen einzelnen Arten. Einheitlich aber bestehen alle Wachse aus sehr langkettigen Aldehyden (C₃₀ - C₃₂) und einfachen Alkoholen (Riedel *et al.*, 2003; Riedel *et al.*, 2007; Moran & Clarke, 2010; Scholz *et al.*, 2010). Außerdem bildet die Wachsschicht eine Struktur geringer Oberflächenenergie und macht somit die innere Wand unbenetzbar. Hinzu können sich Wachskristalle in die Tarsen der Insekten setzen und verhindern, dass die Tiere Halt gewinnen (Owen & Lennon, 1999; Gorb *et al.*, 2004; Gorb & Gorb, 2006).

Der Verdauungssaft im unteren Teil der Kanne (Abb. 6C1) ist hauptsächlich ein wässriges Sekret, das auch dem Zurückhalten der Beute in der Falle dient. Einige *Nepenthes*-Arten produzieren einen mehr oder weniger viskoelastischen Saft, welcher es den Insekten unmöglich macht sich zu befreien und sie schließlich ertrinken. Beispiele für diese hohe Viskoelastizität stellen die Kannen von *N. rafflesiana*, *N. inermis* Danser, *N. aristolochioides* Jebb & Cheek dar (Clarke, 2001; Moran & Clarke, 2010). Interessanterweise ist das Sekret der Luftkannen deutlich mehr viskoelastisch, als das der Bodenkannen (Di Giusto *et al.*, 2008). Dieser visköse Saft wird meist von Gebirgsarten sekretiert, während eine sehr gut ausgebildete Wachsschicht häufiger bei Flachlandarten auftritt. Letzteres stellt die effizientere Methode dar, um Ameisen zu fangen (Bonhomme *et al.*, 2011b). Die Hauptbeute der Luftkannen sind dagegen eher fliegende Insekten. Demnach spielt die Viskoelastizität des Kannensekrets scheinbar beim Fangen dieser Arthropoden eine größere Rolle (Bauer *et al.*, 2011). Deutlich wird hier, dass die Gattung *Nepenthes* eine große Vielfalt in der Kannenmorphologie aufweist und diverse Strategien entwickelt hat, um Nährstoffe zu gewinnen. Einfache Veränderungen der Kannengeometrie und deren Physiologie machen es möglich die verschiedensten Nahrungsquellen zu nutzen (Chin *et al.*, 2010; Moran *et al.*, 2010; Bonhomme *et al.*, 2011b; Pavlovič, 2012).

Besondere Fangmethoden und ungewöhnliche Nährstoffquellen

Nepenthes-Kannen können den Nährstoffhaushalt der Pflanze durch bestimmte morphologische Ausbildungen ergänzen und somit, unter anderem, nicht-tierische Quellen nutzen.

Einmalig im karnivoren Pflanzenreich ist die Spezialisierung von *Nepenthes albomarginata*, deren Nahrungsquelle sich auf nur ein Beutetaxon beschränkt. Mit einem Kranz aus weißen Futterhaaren (Trichomen) direkt unter dem Peristom sitzend, lockt sie ausschließlich Termiten der Unterfamilie Nasutitermitinae (vorwiegend *Hospitalitermes*) an (Abb. 7A). Diese versammeln sich dort in enormer Anzahl, fallen folglich ins Kanneninere und werden verdaut (Merbach *et al.*, 2002).

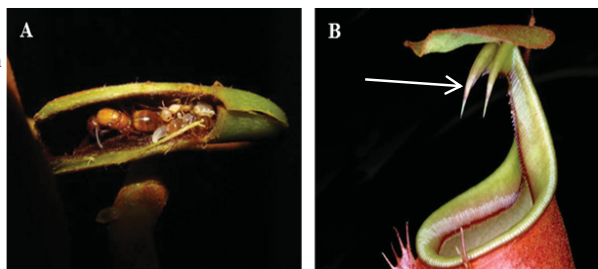
Eine weitere Besonderheit beschreibt *N. ampullaria*, welche ein Beispiel für die Nutzung nicht-tierischer Nahrungsquellen darstellt. Morphologisch besitzen die Kannen dieser Art einen dem Kannenmund abgewendeten, zurückgebogenen Deckel und sitzen als Kannenteppich auf der Oberfläche eines stark bewachsenen Erdbodens auf. Diese Wachstumsstrategie und Kannengeometrie ermöglicht es den Pflanzen eine Vielzahl des Blattwurfs der höher gewachsenen Bäume aufzufangen und zu verwerten (Abb. 7B). Das herabfallende Laub dient der Pflanze als Stickstoffquelle und erhöht somit die Chlorophyll- und Stickstoffkonzentration (Cresswell, 1998; Moran *et al.*, 2003; Pavlovič *et al.*, 2011).



Nepenthes bicalcarata ist als einzige der zirka 120 Arten dieser Gattung ein Myrmekophyt. Dies bedeutet, dass diese Pflanze eine symbiotische Verbindung mit Ameisen eingeht. An der Basis jeder Kanne befindet sich die Ranke, die hier artspezifisch angeschwollen ist und den Ameisen, speziell *Camponotus schmitzii*, als Behausung dient (Abb. 8A) (Burbidge, 1880; Clarke & Kitching, 1995). Ihr Futter beziehen sie aus Nektar, welcher vom Kannenrand und 2 riesigen „Fangzähnen“ gebildet wird (Abb. 8B, Pfeil). *C. schmitzii* kann also auf der Pflanze hausen und so in sicherer Umgebung fressen, da keine oder nur wenig Konkurrenz durch andere Tierarten besteht. *N. bicalcarata* profitiert vermutlich von den Ameisen, während diese schwimmend oder tauchend im Kannensaft größere Beutetiere zerlegen und so bei der Verdauung helfen. Sie entfernen Beuteüberschuss aus der Kannenflüssigkeit und retten möglicherweise so das *Nepenthes*-Verdauungssystem vor z.B. Fäulnis (Clarke & Kitching, 1995). Zugleich schützen die Ameisen die Pflanze, indem sie Rüsselkäfer der Gattung *Alcidodes* attackiert, welche sonst an der Pflanze fressen und die sich entwickelnden Kannen zerstören (Merbach *et al.*, 2007; Bonhomme *et al.*, 2011a; Bazile *et al.*, 2012).

Abbildung 8 : Pflanze-Ameise Interaktion.

A *C. schmitzii* haust und brütet in der Ranke von *N. bicalcarata* (<http://i.huffpost.com/gen/601111/original.jpg>).
B Als Nahrung dient ihnen Nektar, welcher vom Peristom und den beiden Fangzähnen gebildet wird (weißer Pfeil) (http://cdn.wired.co.uk/1240x826/k_n/Nepenthes-bicalcarata.jpg).



Ein weiterer, einzigartiger Mechanismus, um an essentielle Nährstoffe zu gelangen, ist jener von *Nepenthes lowii*. Die Luftkannen weisen enorme Unterschiede gegenüber denen anderer Arten auf, wobei Merkmale der Karnivorie fehlen (Wachszone) bzw. reduziert sind (Peristom) (Clarke, 2006; Pavlovič, 2012). Anstelle dessen werden diese Kannen von Spitzhörnchen (*Tupaia montana*) besucht, die ihren Kot nach dem Fressen eines vom Deckel produzierten Sekrets ausscheiden. Die Pflanzen entnehmen dem Kot die Nährstoffe und profitieren somit stark von Besuchern auf ihren Kannen (Clarke *et al.*, 2009; Pavlovič, 2012). Die Fangapparate von *N. rajah* und *N. macrophylla* haben ebenso mutualistische Verbindungen. Erstere zu *Rattus*

baluensis und weitere zu *Tupaia montana*. Diese Arten behielten aber die Möglichkeit lebende Beute zu fangen und zu verwerten (Clarke *et al.*, 2010; Greenwood *et al.*, 2011; Wells *et al.*, 2011). Die Kannengeometrie und Größe von *N. rajah*, *N. macrophylla* und *N. lowii* ist passend zum mutualistischen Verhalten verändert, indem sie enorm große Kannenöffnungen besitzen und die Deckel zu dieser nahezu rechtwinklig stehen. Letzteres ist entscheidend für das Sitzverhalten der kleinen Säugetiere auf dem Kannenmund, während diese am Deckel fressen (Chin *et al.*, 2010; Pavlovič, 2012). Ein weiteres Beispiel für Mutualismus stellen kleine Fledermäuse der Art *Kerivoula hardwickii* dar, die in den Fangtrichtern der Pflanze *N. rafflessiana elongata* leben und überleben. Hier bietet die Kanne einen sicheren, sauberen Schlafplatz und bekommt auch hier nährstoffreichen Kot als Gegenleistung (Grafe *et al.*, 2011).

Neben dem Anlocken, Fangen und Verdauen der Beute bieten die *Nepenthes*-Kannen interessanterweise auch Wohnraum für die verschiedensten Tiere (Clarke, 2006). Viele von ihnen sind so spezialisiert, dass sie an keinem anderen Ort mehr überleben können und deshalb Nepenthebionts genannt werden (Beaver, 1979). Beispiele hierfür sind Moskitos bzw. deren Larven, welche sich von Überresten der von der Kanne gefangenen Insekten ernähren. Nur die adulten Tiere der Moskitos verlassen die Kanne, kehren aber zum Eier legen wieder zurück (Clarke, 1992; Clarke, 2006). Eine andere große Bewohnergruppe stellen verschiedene Fliegenlarven dar, die die Leichen größerer, gefangener Tiere attackieren. Die bekanntesten *Nepenthes*-Bewohner sind rote Krabbenspinnen der Art *Misumenops nepenthicola*, welche unter dem Peristom auf Beute warten oder im Kannensaft auf Larvenjagd gehen bzw. diese packen, sobald sie versuchen an der Oberfläche zu atmen. Solche Tierarten, welche die Kanne nur gelegentlich heimsuchen, aber in keinem Stadium ihres Lebens abhängig von ihr sind, nennt man Nepenthesphiles. Die meisten Tiere mit denen die *Nepenthes*-Pflanze mutualistische Beziehungen eingeht, kann man darunter zusammenfassen. Warum diese Tiere in der sauren Kannenflüssigkeit überleben und nicht verdaut werden, ist nicht bekannt. Klar ist aber, dass viele Organismen resistent gegenüber Verdauungsenzymen sind, solange sie leben. Nach dem Versterben jedoch, sind die Tiere durch jene Enzyme angreifbar (Clarke, 1992; Clarke, 2006). Die bislang beste Erklärung für die Verbindung zwischen *Nepenthes*-Pflanzen und Tieren ist, dass die Kannenpflanzen eine fakultativ-mutualistische Beziehung zu ihrer Infauna (in Kannen lebende Organismen) besitzen. Das bedeutet, dass *Nepenthes* ohne diese Beziehung überleben kann, aber von ihrer Präsenz profitiert. Die Spezies der Infauna sind dagegen meist abhängig von der Pflanze (Pflichtpartnerschaft), welche für sie oft das einzige Habitat für Entwicklung, Nahrung und Reproduktion darstellt (Clarke, 2006).

Ob Wohnraum oder Falle, die *Nepenthes*-Kanne verwertet nahezu alle nicht-tierischen und tierischen Nährstoffquellen im nachfolgend beschriebenen Verdauungsprozess.

Der Verdauungsprozess

“...it is a far more remarkable problem how..., as Dr. Hooker recently shown, *Nepenthes*, could all have acquired the power of secreting a fluid which dissolves or digests animal matter...” (Darwin, 1875, S. 361).

Wie dieses Zitat zeigt, ist die Präsenz proteolytischer Enzymaktivität in karnivoren Pflanzen, speziell in der Verdauungsflüssigkeit, seit der Zeit Darwins bekannt. Diese Enzyme werden benötigt, um die Nährstoffe aus der angelockten und gefangenen Beute freizusetzen. Nachweisen lassen sich im Kannensaft der Fallen die Aktivitäten von Amylasen, Chitinasen, Esterasen, Lipasen, Peroxidasen, Phosphatasen, Proteasen und Ribonucleasen (Matthews, 1960; Tökés *et al.*, 1974; Jentsch *et al.*, 1989; Higashi *et al.*, 1993; Athauda *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2005; Eilenberg *et al.*, 2006; Plachno *et al.*, 2006; Stephenson & Hogan, 2006; Hatano & Hamada, 2008; Mithöfer, 2011; Rottloff *et al.*, 2011). Diese kommen bei *Nepenthes* schon in geschlossenen Kannen vor (Lloyd, 1942; Bauer *et al.*, 2009; Adlassnig *et al.*, 2011; Adlassnig *et al.*, 2012). Der pH-Wert der eigens in geschlossenen Kannen sekretierten Flüssigkeit ist leicht sauer, selten neutral und verändert sich mit dem Fangen der Beute von z. B. pH 5.5 auf pH 3.0 stark (Lloyd, 1942; Barthlott *et al.*, 2004; Adlassnig *et al.*, 2011). Die gezielte pH-Wert Änderung bzw. Ansäuerung des Kannensaftes nach Fangen der Beute, wird durch eine Plasmamembran- H^+ -ATPase gewährleistet (An *et al.*, 2001). Die Expression von Transporter Genen für Stickstoffverbindungen (Ammonium-Ionen, Aminosäuren, Peptide) wurde für Kannen von *N. alata* beschrieben (Schulze *et al.*, 1999). Die Effizienz der Verdauung scheint zwischen verschiedenen Arten zu variieren, korreliert aber bei allen Spezies mit dem pH-Wert der Kannenflüssigkeit (Takahashi, 2007). Der Verdauungssaft aller Spezies wird von multizellulären Drüsen produziert und apoplastisch ins Kanneninnere sekretiert (Owen *et al.*, 1999). Auch die Expression und Sekretion der hydrolytischen Enzyme und anderer Proteine erfolgt im unteren Teil der Kanne, einerseits durch die Drüsen, andererseits auch durch das Drüsen-umgebende Gewebe (Owen *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2005; Moran & Clarke, 2010; Mithöfer, 2011; Rottloff *et al.*, 2011). Umgekehrt verläuft die Absorption der Nährstoffe aus dem Kannensaft zunächst symplastisch durch die erste Zellschicht, weiter aber apoplastisch durch das vorhandene Endodermisgewebe (Owen *et al.*, 1999). Aufgenommen werden beispielsweise gelöste Nährstoffe wie N, P, K, S oder Fe (Juniper *et al.*, 1989; Barthlott *et al.*, 2004; Adlassnig *et al.*, 2012). Zusätzlich können „ganze“ Proteine über Endozytose aufgenommen werden, was einen Teil der Verdauung ins Innere der Drüsen verlagert. Die entstandenen Endosome (Vesikel) verschmelzen mit Lysosomen, welche abbauende Enzyme enthalten. Endozytose wurde für *Nepenthes* mithilfe von Endozytosemarkern wie FITC-BSA gezeigt (Adlassnig *et al.*, 2012). In zwei Arten (*N. rafflessiana*, *N. alata x merilliana*) konnte keine Verdauung von Proteinen verzeichnet werden, in

anderen wiederum wurde Proteaseaktivität festgestellt, wovon *N. thorelli* die höchste Aktivität aufweist (Adlassnig *et al.*, 2011). In *N. gracilis* fördert die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und freien Radikalen die Verdauung, indem Proteine und Biomembranen der Beute zerstört werden (Chia *et al.*, 2004; Moran & Clarke, 2010). Zusätzlich zu den in die Verdauung involvierten Proteinen wurden niedermolekulare Verbindungen wie Naphthochinone (*N. khasiana*) im Kannensekret nachgewiesen. So traten Droseron und sein Derivat 5-O-Methyl droseron nach der Zugabe von Chitin auf (Eilenberg, 2010). Beide Substanzen hemmen das Wachstum von Pilzmyzel bzw. die Sporenbildung bekannter Pflanzen- (*Botrytis cineria*, *Alternaria solani*) und Humanpathogene (*Aspergillus fumigatus*, *Candida spp.*) (Eilenberg, 2010; Mithöfer, 2011; Raj *et al.*, 2011). Auch in Geweben der Pflanze konnten Sekundärmetabolite detektiert werden (Bringmann *et al.*, 2000; Aung *et al.*, 2002; Rischer *et al.*, 2002), jedoch beschrieb bis zum heutigen Zeitpunkt nur Eilenberg *et al.* (2010) diese im Verdauungsekret. Da der Saft geschlossener Kannen in keinem direkten Kontakt zur Umwelt steht, wurde angenommen, dass all seine Proteine und Verbindungen der Pflanze selbst entstammen und der Saft somit steril sei. Frühzeitig wurden bezüglich der Sterilität Studien durchgeführt, in denen der Saft geschlossener Kannen auf Agar plattiert wurde, um so bakterielles Wachstum auszuschließen (Hepburn, 1918; Lüttge, 1964). Für die damalige Zeit galt die Sterilität als experimentell bewiesen.

Die meisten Proteine, die im Kannensaft detektiert wurden, gehören Familien der PR-Proteine an, von denen eine große Anzahl hydrolytische Aktivität zeigen (Mithöfer, 2011). In Pflanzen-Pathogen-Interaktionen wird genau diese Eigenschaft gegen mikrobielle Angreifer gerichtet. Zugleich benötigt man dieselbe Aktivität zum Verdauen der Beutetiere, was in karnivoren Pflanzen sehr wahrscheinlich zu einer Funktionsverlagerung von Abwehr zu Nährstoffzersetzung führte (Mithöfer, 2011).

1.3 PR (*pathogenesis-related*)-Proteine

Befallen Herbivore oder pathogene Viren, Bakterien und Pilze eine Pflanze wirken vorerst sogenannte passive Mechanismen wie z.B. Dornen und Stacheln oder dicke, komplexe Zellwände als präformierte Invasionsbarriere (Thatcher *et al.*, 2005). Diese können sowohl physikalischer, als auch chemischer Natur sein. Beispielsweise zeigen Trichome (als Barriere gegen kleine Herbivoren) sekretorische Strukturen, welche antimikrobielle Stoffe produzieren (Sitte *et al.*, 2002; Mithöfer, 2011). Die aktive Abwehr einer Pflanze wird im Gegensatz dazu nur bei Bedrohung induziert. Eine direkte Antwort darauf ist z.B. die induzierte Bildung und Speicherung von Toxinen. Eine indirekte Abwehr ist unter anderem das Anbieten von alternativen Nährstoff-

quellen, wie extrafloraler Nektar, zum Anlocken von Ameisen, welche die befallene Pflanze verteidigen (Sitte *et al.*, 2002; Mithöfer *et al.*, 2009). Die langsame Abwehr setzt erst nach einigen Stunden oder Tagen ein und ist häufig durch Genaktivierungen charakterisiert. Ein Beispiel ist die Synthese von Phytoalexinen (Harborne, 1988). Bei der sogenannten „systemisch erworbenen Resistenz“ (*systemic acquired resistance*, SAR) wird über eine lokale Resistenzantwort ein mobiles Signal generiert und durch die Pflanze transportiert. Signalmoleküle können hierbei Jasmonsäure (JA), Salizylsäure (SA) und Ethylen (ET) sein. Dies wiederum stimuliert Abwehrreaktionen, die z.B. mit der Induktion von PR-Proteinen einhergehen und die Pflanzen resistenter gegenüber nachfolgenden Infektionen machen (Van Loon *et al.*, 2006). Die Bezeichnung der PR-Proteine bezieht sich auf durch Mikroben-induzierte Proteine. Jedoch werden nur jene, die extrem gering in gesundem Gewebe vorkommen und die, die einer Induktion nach Infektion bedürfen, als „induzierbare, abwehrspezifische Proteine“ bezeichnet (Van Loon *et al.*, 2006). Meist besitzen die PR-Proteine ein Signalpeptid (SP) am N-Terminus, welches die Translokation in das Endoplasmatische Retikulum (ER) und die anschließende Sekretion in den Apoplasten bestimmt. Diese Proteine akkumulieren lokal extrazellulär (Van Loon *et al.*, 2006).

Die Haupteigenschaften der bislang klassifizierten PR-Proteine sind in Tabelle 1 (grün hinterlegt) zusammengefasst. Insgesamt werden 17 Familien beschrieben, wobei der erste Vertreter jeder Einzelnen ausgewählt und anhand dessen die Familie weiter biologisch und biochemisch charakterisiert wurde (Van Loon *et al.*, 2006). Die Nummerierung der Familien liegt der Reihenfolge ihrer Entdeckung zugrunde. Die ersten induzierbaren, abwehrspezifischen Proteine wurden in Tabak-Pflanzen entdeckt, in denen sie gegen das *Tabacco mosaic virus* (TMV) wirkten (Tab. 1, PR-Familie 1-5). Beispielsweise wurden Vertreter der PR-2 Familie als Endoglukanasen beschrieben, die das Pathogenwachstum und deren Verbreitung in der Pflanze hemmen. Andere, als Chitinasen agierende Enzyme der PR-Familien 3, 4, 8, 11, wirken gegen Pilzbefall (Van Loon & Van Strien, 1999; Van Loon *et al.*, 2006). Ein Weg, die verschiedenen Typen der Chitinasen zu unterscheiden, sind ihre Substrat-Spezifitäten. Chitinase Typ III (PR-8) zum Beispiel besitzt Lysozym-Aktivität (Van Loon & Van Strien, 1999). PR-5 (*Thaumatococcus*-ähnliche Proteine, TLPs) sind den Permatinen sehr homolog und permeabilisieren die Membranen von Pilzen (Vigers *et al.*, 1991; Van Loon & Van Strien, 1999). Für Vertreter der PR-1 und PR-5 Familien wird eine Wirkung gegen Oomyceten beschrieben, wobei PR-1 oft als Marker für einen erhöhten Abwehrstatus genutzt wird (Van Loon & Van Strien, 1999).

Die molekularen Massen der verschiedenen PR-Proteine reichen von 10 bis 75 kDa. Kleinere Proteine mit einer Größe <10 kDa werden als PR-Peptide bezeichnet und sind durch die PR-Familien 6, 12, 13, 14, siehe Tabelle 1, vertreten (Sels *et al.*, 2008). PR-6 sind Serinproteinasen-Inhibitoren (PIs), welche diese Enzyme binden und deren Aktivität kontrollieren können. Diese Eigenschaft ist Teil vieler biochemischer Prozesse und erfüllt somit mehrere Funktionen in Pflanzen, einschließlich einer Rolle in der Abwehr gegen Insekten und andere Herbivoren,

Mikroben und Nematoden (Ryan, 1990; Koiwa *et al.*, 1997; Van Loon & Van Strien, 1999; Sels *et al.*, 2008). PR-12 waren die ersten pflanzlichen Defensine, welche aus Weizen und Gerste isoliert wurden. Diese wurden als PR-12 in die Klassifizierung mit aufgenommen, als 2 antimykotische Defensine in Rettich detektiert wurden (Terras *et al.*, 1995; Sels *et al.*, 2008). Die Thionine (PR-13), Cystein-reiche Peptide, wurden ursprünglich aus Getreide isoliert (Bohlmann *et al.*, 1988; Sels *et al.*, 2008) und zeigen auch induzierte Expression nach Pilzbefall (Bohlmann *et al.*, 1988; Epple *et al.*, 1995; Sels *et al.*, 2008). PR-14 sind sogenannte Lipid-Transfer-Proteine (*Lipid transfer proteins*, LTPs), denen es möglich ist verschiedene Lipidtypen wie Phosphatidylinositol, Phosphatidylcholin und Galaktolipide zu transportieren. Auch LTP-Gene werden nach Pathogenbefall exprimiert (Garcia-Olmedo *et al.*, 1995; Castro & Fontes, 2005).

PR-7 wurde hauptsächlich über Tomatenpflanzen charakterisiert, ist als Endoproteinase aktiv, hilft bei der Auflösung der mikrobiellen Zellwand und ist somit Teil der antimykotischen Abwehr (Van Loon & Van Strien, 1999; Van Loon *et al.*, 2006). Die PR-9 Familie beinhaltet Peroxidasen, die wahrscheinlich die Verholzung der pflanzlichen Zellwände bei mikrobiellem Angriff katalysieren (Passardi *et al.*, 2004; Van Loon *et al.*, 2006). Die PR-10-Familie ist sehr komplex und besitzt verschiedenste Vertreter, welche je nach Funktion in Untergruppen gegliedert sind (Liu & Ekramoddoullah, 2006). Einige Vertreter sind strukturell den Ribonukleasen zugeordnet und mutmaßlich aktiv gegen Viren, indem sie virale RNA spalten (Moiseyev *et al.*, 1997; Van Loon & Van Strien, 1999). Die Familien PR-15, 16 und 17 wurden später der Klassifizierung beigefügt (Tab. 1). PR-15 und 16 generieren Wasserstoffperoxide, welche auf die verschiedensten Angreifer toxisch wirken. Hinzu stimulieren sie direkt oder indirekt die pflanzliche Abwehrreaktion. Sie sind typische Germin- oder Oxalatoxidasen-ähnliche Proteine, welche Superoxiddismutase-Aktivität zeigen (Donaldson *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2003). PR-17 wurde in infizierten Tabak-, Weizen- und Gerste-Pflanzen gefunden und besitzt Sequenzen, die dem aktiven Zentrum von Zink-Metallproteinasen ähneln (Christensen *et al.*, 2002; Van Loon *et al.*, 2006).

Wie im Absatz „der Verdauungsprozess“ erwähnt, sind auch die meisten im *Nepenthes*-Kannensaft vorkommenden und charakterisierten Proteine den PR-Familien zuzuordnen (Mithöfer, 2011).

<i>Familie</i>	<i>Typ</i>	<i>Eigenschaften</i>	<i>Gensymbol/ Akzession-Nr.</i>	<i>Referenz</i>
PR-1	PR-1a (Tabak)	antimykotisch	<i>Ypr1</i>	
	PR-1 (<i>Nepenthes mirabilis</i>)	unbekannt	<i>NmPR-1/ ACT99721</i>	(Rott, 2009)
PR-2	PR-2 (Tabak)	β -1,3-Glukanase	<i>Ypr2, [Gns2('Glb')]</i>	
	Glukanase (<i>N. khasiana</i>) Glukanase (<i>N. alata</i>)	β -1,3-Glukanase β -1,3-Glukanase	<i>glu1/ ABB89525</i> <i>NaBGluc2/ AB518307</i>	nicht publiziert (Hatano & Hamada, 2012)
PR-3	P, Q (Tabak)	Chitinase (I,II,IV, V, VI,VII)	<i>Ypr3, Chia</i>	
	Chitinase (<i>N. khasiana</i> , <i>N. alata</i>)	Chitinase (I) Chitinase (IV)	<i>AAT40733</i> <i>BAF98919</i>	(Eilenberg <i>et al.</i> , 2006) (Hatano & Hamada, 2008)
PR-4	'R' (Tabak)	Chitinase (I, II)	<i>Ypr4, Chid</i>	
PR-5	S (Tabak)	Thaumatococin-like	<i>Ypr5</i>	
	TLP (<i>N. alata</i>) TLP (<i>N. singalana</i>)	Thaumatococin-like “	<i>TLP/ BAF98918</i> <i>TLP/ ACU31849</i>	(Hatano & Hamada, 2008) (Rottloff <i>et al.</i> , 2009)
PR-6	Inhibitor I (Tomate)	Proteinase- Inhibitor	<i>Ypr6, Pis ('Pir')</i>	
PR-7	P69 (Tomate)	Endoproteinase	<i>Ypr7</i>	
	Nepenthesin (I) & Nepenthesin (II) (<i>N. gracilis</i>)	Aspartat Proteinase “	<i>nep1/ BAD07474</i> <i>nep2/ BAD07475</i>	(Athauda <i>et al.</i> , 2004) “
PR-8	Chitinase (Gurke)	Chitinase (III)	<i>Ypr8, Chib</i>	
	Chitinase (<i>N. rafflesiana</i>) Chitinase (<i>N. alata</i>)	Chitinase (III), Endochit. Chitinase (III)	<i>NrChit1/ ACU31854</i> <i>NaCHIT3/ AB510164</i>	(Rottloff <i>et al.</i> , 2011) (Hatano & Hamada, 2012)
PR-9	Lignin-formende Peroxidase (Tabak)	Peroxidase	<i>Ypr9, Prx</i>	
	Peroxidase (<i>N. alata</i>)	Peroxidase (III)	<i>NaPrx1a/ AB476301</i>	(Hatano & Hamada, 2012)
PR-10	'PR-1' (Petersilie)	Ribonuklease- ähnlich	<i>Ypr10</i>	
	Ribonuklease (<i>N. ventricosa</i>)	Ribonuklease	<i>NvRN1</i>	(Stephenson & Hogan, 2006)
PR-11	Chitinase V (Tabak)	Chitinase (I)	<i>Ypr11, Chic</i>	
PR-12	Rs-AFP3 (Rettich)	Defensin	<i>Ypr12</i>	
PR-13	THI2.1 (<i>Arabidopsis</i>)	Theonin	<i>Ypr13, Thi</i>	
PR-14	LTP4 (Gerste)	Lipid-Transfer-Protein	<i>Ypr14, Ltp</i>	
PR-15	OxOa, germin (Gerste)	Oxalat- Oxidase	<i>Ypr15</i>	
PR-16	OxOLP (Gerste)	Oxalat- Oxidase- ähnlich	<i>Ypr16</i>	
PR-17	PRp27 (Tabak)	unbekannt	<i>Ypr17</i>	

Tabelle 1: Anerkannte Familien der PR-Proteine (grün) mit Vertretern in *Nepenthes sp.* (rot hinterlegt).

1.3.1 PR-Proteine im *Nepenthes*-Kannensaft

In Tabelle 1 (S. 17) sind die im Kannensaft vorkommenden PR-Proteine (rot hinterlegt) vergleichend zu den anerkannten PR-Familien (grün hinterlegt) aufgeführt. Auch die in *Nepenthes* *sp.* vertretenen Proteine weisen größtenteils Signalpeptide auf, welche hier der Sekretion in die Verdauungsflüssigkeit dienen (Van Loon *et al.*, 2006; Rottloff, 2012). Viele der im Kannensaft vorhandenen PR-Proteine sind sehr wahrscheinlich in die Verdauung der gefangenen Beutetiere involviert, bspw. Nepenthesin I und II (Tab. 1, PR-7). Jedoch dienen nicht alle Enzyme im Kannensaft der Verdauung. Auch Abwehrproteine wie beispielsweise die TLPs, wurden beschrieben (Hatano & Hamada, 2008; Rottloff *et al.*, 2009). Des Weiteren wurde eine PR-1 Protein cDNA-Sequenz aus *N. mirabilis* ermittelt (Tab. 1, Rott, 2009). Die genaue biochemische Funktion und die Wirkungsweise von PR-1 Proteinen sind bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt. Dieser Fakt macht gerade dieses Protein in Bezug auf den *Nepenthes*-Verdauungssaft interessant, soll in vorliegender Studie in seiner Rolle weiter untersucht und im folgenden Absatz zuvor näher beschrieben werden.

PR-1 Proteine

Das aus *Nepenthes mirabilis* identifizierte Protein gehört zur PR-1 Familie, welche die ersten entdeckten PR-Proteine mit molekularen Massen von 15- 17 kDa repräsentiert (Van Loon & Van Strien, 1999). Erste Vertreter wurden in den Blättern von Tabakpflanzen nach einer Infektion mit TMV detektiert (Gianinazzi *et al.*, 1970; Van Loon & Van Kammen, 1970). Unterschieden werden saure und basische PR-1 Proteine aufgrund ihrer isoelektrischen Punkte (Van Loon & Van Strien, 1999). Beispielsweise sind die sauren Tabak PR-1 Proteine im Apoplasten (PR-1a, -b, -c) lokalisiert, während die Basischen in der Vakuole akkumulieren (PR-1g) (Bol *et al.*, 1990). Diese generelle Einteilung sollte jedoch nicht verallgemeinert werden. Das saure *N. tabacum* PR-1a war das erste aufgereinigte und charakterisierte Protein (Antoniw & Pierpoint, 1978). 22 Homologe dieses Vertreters wurden über Sequenzvergleiche in *Arabidopsis* gefunden (Van Loon *et al.*, 2006), in Tabak selbst weitere 15 (Cornelissen *et al.*, 1987) und in Reis 39 (Mitsuhara *et al.*, 2008). In Tomatenpflanzen sind die sauren Tabak PR-1a, -b, -c Proteine basisch (Van Loon *et al.*, 1994). Seit ihrer Erstentdeckung wurden mehrere dieser Proteine auch in zahlreichen anderen Pflanzen wie Gerste, Pfeffer, Weizen und Mais identifiziert (Liu & Xue, 2006). PR-1 Proteine weisen antimykotische Aktivität gegenüber einer Reihe von phytopathogenen Pilzen wie z.B. *Erysiphe graminis* und *Uromyces fabae* und einem Pathogen aus der Klasse der Oomyceten, *Phytophthora infestans*, auf (Niderman *et al.*, 1995; Borad V & S, 2008). Da ihre Genexpression nach Pathogenbefall enorm induziert wird, werden PR-1 Proteine oftmals als molekulare Marker

einer SAR genutzt. Während in *Arabidopsis* nach Infektion nur ein PR-1 Protein induziert wird (Van Loon *et al.*, 2006), sind es in Reis schon 12 (Mitsuhara *et al.*, 2008). Dies veranschaulicht, wie unterschiedlich die Induzierbarkeit von PR-1 Proteinen von Art zu Art sein kann. PR-1 Proteine sind stark konserviert und kommen in nahezu allen Pflanzenfamilien vor. Strukturell sehr ähnlich besitzen sie 4 α - Helices, 4 β - Faltblätter und 6 konservierte Cysteinreste, welche 3 Disulfidbrücken bilden (Van Loon *et al.*, 1994; Van Loon *et al.*, 2006). Die kompakte Struktur macht die PR-1 Proteine sehr stabil und unempfindlich gegenüber Proteasen (Van Loon & Gerritsen, 1989), welche auch im Kannensaft nachgewiesen wurden.

Nur wenig ist bekannt über die eigentliche Regulation und Produktion der in den Verdauungsprozess involvierten Proteasen von *Nepenthes*-Pflanzen. Dies soll daher auch im Rahmen dieser Studie untersucht werden.

Proteasen

Durch engen Kontakt zu Charles Darwin und durch ihn inspiriert, dokumentierte Hooker (1874) erstmalig, dass *Nepenthes*-Pflanzen karnivor sind. Seit jener Zeit wurde untersucht wie *Nepenthes* diesen Prozess eigentlich realisieren kann (Frazier, 2000). Hooker bestimmte die Verdauungsaktivität indem er nachwies, dass Eiweiß, Fleisch und Knorpel innerhalb von 24 Stunden zerfallen. Diese Aktivität konnte durch Ansäuern gesteigert werden. So zeigte z.B. Vines (1877), dass nach Ansäuern die Kannenextrakte in der Lage waren Fibrin zu verdauen. Die Annahme kam auf, dass *Nepenthes* endogene Verdauungsenzyme besitzt. Dubois (1890) und Tischutkin (1892) widersprachen dem, als sie feststellten, dass Saft geschlossener Kannen keine Verdauungseffekte zeigte. Sie schlossen daraus, dass die Aktivität maßgeblich von Bakterien ausgeht, welche nach dem Öffnen ins Kanneninnere gelangen. Vines (1897) zeigte daraufhin, dass Saft geschlossener Kannen nach Ansäuerung mit 0.2 % HCl Proteine verdaute, angesäuertes Wasser dagegen nicht. Er suggeriert den Namen *nepenthin* für das Verdauungsenzym im Kannensaft (Vines, 1901), welches ungewöhnlich stabil gegenüber Hitze und Alkali ist (Vines, 1897) und auf eine große Zahl verschiedener Substrate wirken kann (Stern & Stern, 1932). Neben Vines (1897) zeigten später auch andere Studien, dass *Nepenthes*-Pflanzen ihre eigenen sauren Proteinase wie die Nepenthesine produzieren und diese die höchste proteolytische Aktivität im Kannensaft bereitstellen (Nakayama & Amagase, 1968; Amagase *et al.*, 1969; Woessner, 1998). Lobareva *et al.* (1973) und Takahashi *et al.* (1974) postulierten, dass Nepenthesine Vertreter von sogenannten Aspartatproteasen (*aspartic proteases*, APs) sind. Diese APs sind weit verbreitete proteolytische Enzyme, die in Viren, Bakterien, Hefen, Pilzen, Tieren und Pflanzen vorkommen (Davies, 1990; Dunn, 2002; Kadek *et al.*, 2014). Alle Aspartatproteasen werden als Zymogen exprimiert und sind zur Autoaktivierung in saurem Milieu fähig, indem sie das Propeptid abspalten (Dunn, 1997; Khan & James, 1998; Kadek *et al.*, 2014). Im Vergleich zu anderen APs bilden Pflanzen-APs eine

Gruppe mit speziellen Veränderungen in Struktur und Sequenz. Die größte Untergruppe bilden die vakuolären Aspartatproteasen, welche ein pflanzenspezifisches Insert (*plant-specific Insert*, PSI) am C-terminalen Ende besitzen, das Ähnlichkeit zu Saposinen hat (Runeberg-Roos *et al.*, 1991; Simões & Faro, 2004).

Eine weitere Klasse pflanzlicher APs wird durch die oben erwähnten Nepenthesine repräsentiert. Diese werden im unteren Teil der *Nepenthes*-Kannen produziert, genauer in den Drüsen-umgebenden Zellen exprimiert (Takahashi *et al.*, 2005) und sind außerdem in *Drosera* und *Arabidopsis* zu finden (Hooker, 1874; Frazier, 2000). Nepenthesine unterscheiden sich stark von anderen APs, da die Aminosäuresequenz signifikant verschieden ist und ihnen das PSI fehlt. Darüber hinaus besitzen sie ein Insert (*nepenthesin-type AP-specific Insert*), welches zu zusätzlichen Cysteinen in der Primärstruktur führt und für mehr Stabilität sorgt (Athauda *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2005; Kadek *et al.*, 2014). Verantwortlich für eine hohe Stabilität, auch über ein breites pH-Spektrum hinweg, sind wahrscheinlich die dadurch erzeugte höhere Anzahl an Disulfidbindungen und eine vermutete N-Glykosylierung. Dagegen sind sie ziemlich sensitiv gegenüber Denaturierung und Reduktionsmitteln (Kubota *et al.*, 2010; Kadek *et al.*, 2014). Nepenthesine sind PR-Proteine der Familie 7 (Tab. 1). Aufgrund ihrer Einmaligkeit im Vergleich zu anderen Aspartatproteasen, sollten ihre Wirkungsweisen im *Nepenthes*-Verdauungssystem in Bezug auf das Phänomen „Karnivorie“ genauer untersucht werden.

1.4 Zielstellung dieser Arbeit

Bevor die tierische Beute verdaut werden kann, müssen die Karnivoren aus dem Pflanzenreich diese vorerst auf oder in ihre Fallen locken. Dies geschieht durch optische Reize, wird aber zusätzlich durch Nektarien und Duftsignale verstärkt. Karnivore *Nepenthes*-Pflanzen besitzen passive, aus der Blattspreite gebildete Gleitfallen, welche durch die eben genannten Anlockungsmechanismen ihre Beute fangen und anschließend verdauen. Letzteres geschieht durch die in Kannen vorhandene Verdauungsflüssigkeit, die hydrolytische Enzymaktivitäten aufweist. Trotz dieses Wissens sind die Informationen über die genaue Komposition des *Nepenthes*-Verdauungssaftes, sowie deren Regulation bis heute sehr limitiert. Daher bedarf es einer detaillierten Betrachtung auf biochemischem und molekularem Level.

Ziel dieser Arbeit war,

- dieses Wissen durch weitere Analysen der Kannenflüssigkeit in Bezug auf seine nicht proteinäre Zusammensetzung zu ergänzen. Auch die frühzeitig unternommenen Studien zur Sterilität des Saftes, sollten auf molekularer Ebene erweitert werden.
- aufzuklären, ob und wenn ja, welche Effekte der *Nepenthes*-Verdauungssaft auf mikrobielles Wachstum in (*in vivo*) und außerhalb (*in vitro*) der Kanne zeigt.
- folgend exemplarisch ein in unserer Arbeitsgruppe über Peptidsequenzen gewonnenes Abwehrprotein, PR-1, zu charakterisieren und seine bisher unbekannte Funktion im Kannensaft zu untersuchen.
- eine FRET (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer)-basierte Methode unter Verwendung eines synthetischen, Protease-spezifischen Substrates für *Nepenthes*-Pflanzen zu optimieren und zu charakterisieren. Eine direkte Detektion von Proteaseaktivitäten im Kannensaft könnte so neue Dimensionen im Beobachten der just ablaufenden Verdauungsprozesse offenlegen. Parallel sollte die Spezifität des Substrates zu den *Nepenthes*-eigenen Proteasen genauer untersucht werden.

2. Übersicht zu den Manuskripten

Manuskript 1

Franziska Buch, Matthias Rott, Sandy Rottloff, Christian Paetz, Ines Hilke, Michael Raessler, Axel Mithöfer (2013)

Secreted pitfall-trap fluid of carnivorous *Nepenthes* plants is unsuitable for microbial growth

Veröffentlicht, *Annals of Botany* 111: 375 – 383

In dieser Studie wurde die *Nepenthes*-Verdauungsflüssigkeit auf Sterilität und antimikrobielle Eigenschaften untersucht und die Kenntnis über deren chemische Zusammensetzung mithilfe verschiedener Ansätze erweitert. Das Ergebnis zeigte ein von der Pflanze eigens abgesondertes steriles, bakterienfreies Sekret, welches ungeeignet für mikrobielles Wachstum ist. Somit können *Nepenthes*-Pflanzen die mikrobielle Besiedlung ihrer Kannen verhindern bzw. kontrollieren. Dadurch reduzieren sie ein Wettstreiten mit Mikroben, um von der Beute stammende Nährstoffe.

FB / AM: Planten die Experimente und schrieben das Paper.

FB / MaR / SR: Führten einen Großteil der Experimente durch und analysierten die Daten.

CP: Identifizierung der Sekundärmetabolite *via* LC-MS und NMR.

IH / MiR: Analyse der Mineralstoffe *via* Ionenchromatografie und induktiv gekoppelter Plasma-Emissionsspektroskopie (ICP-OES).

Manuskript 2

Franziska Buch, Yannick Pauchet, Matthias Rott, Axel Mithöfer (2014)

Characterization and heterologous expression of a PR-1 protein from traps of the carnivorous plant *Nepenthes mirabilis*

Veröffentlicht, *Phytochemistry* 100: 43-50

Diese Studie beschreibt die Identifikation und Charakterisierung des Abwehrproteins PR-1 aus karnivoren *Nepenthes mirabilis*-Pflanzen (*NmPR-1*). Hierzu ermittelte Indikatoren, wie das Vorhandensein eines Signalpeptids, die Identifikation PR-1-ähnlicher Peptidsequenzen im Kannensaft und die vorgefundene Glykosylierung, stehen für eine Sekretion des *NmPR-1* in die Verdauungsflüssigkeit. Molekularphylogenetische Analysen zeigten, zu welchem Level die *NmPR-1* Sequenz homolog zu denen anderer Pflanzenspezies ist. Die Arten, die mit *N. mirabilis* eine Abstammungslinie bilden, wurden wie *NmPR-1* selbst als glykosyliert vorhergesagt. Nach erfolgreicher Expression in *Sf9*-Insektenzellen wurden Experimente bezüglich biologischer Aktivität durchgeführt. Erstmals unter allen bekannten PR-1 Proteinen im Pflanzenreich, wurde für *NmPR-1* antibakterielle statt antimykotische Aktivität nachgewiesen. Diese, für *NmPR-1* unerwarteten Eigenschaften, können möglicherweise durch das spezifische Umfeld „Kannensflüssigkeit“ begründet werden.

FB / AM: Planten die Experimente und schrieben das Paper.

YP / FB: Planung und Durchführung der Expressions-Experimente in Insektenzellen.

FB: Führte den größten Teil der Experimente durch.

MR: Führte erste Experimente zur Charakterisierung des *NmPR-1* Proteins durch.

Manuskript 3

Franziska Buch, Wendy E. Kaman, Floris J. Bikker, Ayufu Yilamujiang, Axel Mithöfer

Nepenthesin protease activity displays the digestive fluid dynamics in carnivorous *Nepenthes* plants

Eingereicht am 04.08.2014, *Journal of Experimental Botany*

Ein Vorteil im Arbeiten mit der karnivoren *Nepenthes*-Pflanze, liegt in der Sterilität ihrer Verdauungsflüssigkeit. Das Arbeiten dem Kannensaft geschlossener Gleitfallen ist schließlich ohne Kontamination vom Umfeld möglich. Im Rahmen dieser Studie wurde eine für *Nepenthes*-Pflanzen neuartige FRET-basierte Methode etabliert, optimiert und erfolgreich angewendet. Durch die Nutzung eines synthetisch hergestellten, fluoreszierenden und für Proteasen hoch spezifischen Substrates (PFU-093), war eine schnelle Detektion von Proteaseaktivitäten direkt im *Nepenthes*-Verdauungssaft möglich. Die Dynamik dieser Proteaseaktivitäten konnte über den Substratabbau, als Antwort auf verschiedene Stimuli, nachstehend untersucht werden. Parallele Tests, einbezogen Klonierung und heterologe Expression, zeigten eine Beteiligung der Aspartatproteasen Nepenthesin I und II am Degradierungsprozess des spezifischen PFU-093 Substrates.

FB / AM: Planten die Experimente und schrieben das Paper.

FB: Führte die Experimente durch.

WEK / FJB: Entwickelten das PFU-093-Substrat und stellten es für unsere Untersuchung zur Verfügung.

AY: Führte einen Teil der pH-Messungen durch.

Zusatzinformation zur Einreichung von Manuskript 3:

Email: *Journal of Experimental Botany*, 04.08.2014

MS ID#: JEXBOT/2014/133470
MS TITLE: Nepenthesin protease activity indicates digestive fluid
dynamics in
carnivorous *Nepenthes* plants

Dear Dr. Mithöfer,

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of Experimental Botany.

Please note, it is considered on the understanding that it has not been submitted for publication to another journal, and that it will not be submitted elsewhere unless it is rejected.

To follow the progress of your paper please go to:
<http://submit-jxb.oxfordjournals.org>
and login to your Author Area.

If you have not registered with the system please click on
'Create a new account'

Any problems please contact the Editorial Office at:
j.exp.bot@lancaster.ac.uk

Yours sincerely,

Diana Hudspith
Editorial Office
Journal of Experimental Botany

3. Manuskripte

Manuskript 1

Secreted pitfall-trap fluid of carnivorous *Nepenthes* plants is unsuitable for microbial growth

Franziska Buch¹, Matthias Rott^{1,‡}, Sandy Rottloff^{1,‡}, Christian Paetz², Ines Hilke³,
Michael Raessler³ and Axel Mithöfer^{1,*}

¹Department Bioorganic Chemistry, Max Planck Institute for Chemical Ecology, Hans-Knöll-Straße 8, 07745 Jena, Germany,

²Biosynthesis and NMR, Max Planck Institute for Chemical Ecology, Hans-Knöll-Straße 8, 07745 Jena, Germany
and ³Max Planck Institute for Biogeochemistry, Hans-Knöll-Straße 10, 07745 Jena, Germany

[†]Present address: Department of Plant–Microbe Interactions, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Carl-von-Linné-Weg 10, D-50829 Köln, Germany.

[‡]Present address: Laboratoire Agronomie et Environnement, Université de Lorraine, 2 Avenue Forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre, France.

* For correspondence. E-mail: amithoef@ice.mpg.de

Received: 24 October 2012 Revision requested: 9 November 2012 Accepted: 15 November 2012 Published electronically: 21 December 2012

• **Background and Aims** Carnivorous plants of the genus *Nepenthes* possess modified leaves that form pitfall traps in order to capture prey, mainly arthropods, to make additional nutrients available for the plant. These pitchers contain a digestive fluid due to the presence of hydrolytic enzymes. In this study, the composition of the digestive fluid was further analysed with regard to mineral nutrients and low molecular-weight compounds. A potential contribution of microbes to the composition of pitcher fluid was investigated.

• **Methods** Fluids from closed pitchers were harvested and analysed for mineral nutrients using analytical techniques based on ion-chromatography and inductively coupled plasma–optical emission spectroscopy. Secondary metabolites were identified by a combination of LC-MS and NMR. The presence of bacteria in the pitcher fluid was investigated by PCR of 16S-rRNA genes. Growth analyses of bacteria and yeast were performed *in vitro* with harvested pitcher fluid and *in vivo* within pitchers with injected microbes.

• **Key Results** The pitcher fluid from closed pitchers was found to be primarily an approx. 25-mM KCl solution, which is free of bacteria and unsuitable for microbial growth probably due to the lack of essential mineral nutrients such as phosphate and inorganic nitrogen. The fluid also contained antimicrobial naphthoquinones, plumbagin and 7-methyl-juglone, and defensive proteins such as the thaumatin-like protein. Challenging with bacteria or yeast caused bactericide as well as fungistatic properties in the fluid. Our results reveal that *Nepenthes* pitcher fluids represent a dynamic system that is able to react to the presence of microbes.

• **Conclusions** The secreted liquid of closed and freshly opened *Nepenthes* pitchers is exclusively plant-derived. It is unsuitable to serve as an environment for microbial growth. Thus, *Nepenthes* plants can avoid and control, at least to some extent, the microbial colonization of their pitfall traps and, thereby, reduce the need to vie with microbes for the prey-derived nutrients.

Key words: Antimicrobial activity, carnivorous plants, defensive proteins, digestive pitcher fluid, naphthoquinones, *Nepenthes* spp., mineral nutrients, pitfall traps.

INTRODUCTION

Carnivorous or insectivorous plants fascinate scientists, in particular botanists, since the times of Charles Darwin. He was the first to write a book on this topic, which still represents the standard work about insectivorous plants (Darwin, 1875). Although in that work Darwin described plants that are equipped with pitfall traps, so-called pitchers, to catch their prey such as *Sarracenia* spp. and *Darlingtonia californica*, he never saw species of the genus *Nepenthes* occurring basically in south-east Asia. Like other carnivorous plants, *Nepenthes* spp. grow on poor soil. Therefore, they need to complement their mineral nutrients – primarily with nitrogen and phosphorus – from caught and digested prey. When visiting the pitfall traps, the attracted prey, mainly arthropods, falls into the trap (Gaume *et al.*, 2002; Bohn and Federle, 2004),

drowns and is digested by the enzyme cocktail of the pitcher fluid (Heslop-Harrison, 1975; Juniper *et al.*, 1989). Because the digestive liquid can be easily harvested from the pitcher, *Nepenthes* plants are ideal objects to study enzymes and other compounds involved in this plant carnivory. As a consequence, compared with other carnivorous taxa, the protein composition of the digestive fluid of *Nepenthes* is fairly well analysed and documented (Mithöfer, 2011).

In *Nepenthes*, the trap-bearing leaf consists of a photosynthetic part, originally the enlarged leaf base, and a tendril that at its end might develop the pitfall trap, which is formed from a leaf by episcidation, i.e. by in-rolling of the adaxial leaf surface followed by marginal fusion (Juniper *et al.*, 1989; Owen and Lennon, 1999). The digestive fluid can already be collected from young, still closed and prey-free pitchers (Fig. 1). Due to the fact that closed pitchers have no



FIG. 1. Closed pitcher of *Nepenthes alata*.

direct contact to the environment it has been widely claimed that (a) their pitcher fluid is sterile and (b) all proteins and compounds identified in this pitcher fluid are solely plant-derived. Interestingly, only two experiments have been conducted to demonstrate the sterility of pitcher liquid: fluid taken from a closed pitcher was plated either on plain nutrient agar (Hepburn, 1918) or on meat agar plates (Lüttge, 1964) and incubated for several days. In no case was any bacterial colony detected growing and the authors concluded that the pitcher fluid is sterile. However, this conclusion was challenged, at least for *N. alata*, when a few bacteria were found in closed pitchers by Sota *et al.* (1998). Moreover, for *Sarracenia* spp. the presence of endophytic fungi has been described (Glenn and Brodi, 2012). In any case, the presence of microbes cannot be excluded completely by such simple experiments because most micro-organisms cannot be grown in culture (Riesenfeld *et al.*, 2004).

In closed as well as in open pitchers any contamination by unwanted microbes will stress the plant and, probably more important, represent a population of organisms that compete with the plant for nutrients from the pitcher fluid. Thus, it seems necessary to generate an environment that is at least unsuitable or even hostile to microbes. The presence of pathogen-related proteins in the pitcher fluid that have no obvious hydrolytic function in the digestion of caught prey suggests that these proteins might be directed against micro-organisms (Hatano and Hamada, 2008; Mithöfer, 2011). Moreover, inducible low molecular-weight compounds with antimicrobial properties could be identified in the fluid of *N. khasiana*, droserone and 5-*O*-methyl-droserone (Eilenberg *et al.*, 2010). These findings strongly suggest that *Nepenthes* plants try to

keep their pitchers free from bacteria as long as possible to avoid the growth of microbial competitors and cheaters to ensure that all nutrients available from the pitchers only benefit the plant. However, such questions have not been addressed experimentally.

Here, we analysed the composition of *Nepenthes* digestive fluid from closed pitchers to examine whether or not pitchers are really sterile inside and how these plants manage to keep microbial growth under control. Therefore, beyond proteins, inorganic ion compositions as well as secondary metabolites were studied. In addition, the effect of pitcher fluid on microbial growth was investigated. Our results reveal that the fluid of closed *Nepenthes* pitchers is so composed as to gain antimicrobial growth conditions.

MATERIALS AND METHODS

Plants

Nepenthes plants (*N. alata*, *N. fusca*, *N. gracilis*, *N. mirabilis*, *N. superba*, *N. thorelii* and *N. ventricosa*) were grown either in the greenhouses of the Botanical Gardens in Jena and Munich, Germany, or at the MPI for Chemical Ecology. Plants grew at 24–30 °C, at a humidity of 60–90 %, with a minimum of 12 h and a maximum of 16 h light. Due to the limited number of well-developed but still closed pitchers and the limited volumes of pitcher fluid (often <0.5 mL) available from them, various *Nepenthes* species had to be included in this study. However, as will be seen from the results, in all experiments where different species were investigated in parallel, the results obtained were strikingly similar suggesting that all results are very likely representative for the genus *Nepenthes*.

Analysis of *Nepenthes* pitcher fluid for the presence of bacterial 16S-rDNA

The digestive fluids of closed *Nepenthes* pitchers of *N. alata*, *N. fusca*, *N. mirabilis*, *N. superba*, *N. thorelii* and *N. ventricosa* were sampled with sterile syringes and stored at –80 °C till further analysis. For lyses of bacterial cells, the pitcher fluid was mixed 1 : 1 with the Lyse and Go reagent (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) and treated according to the manufacturer's instructions. Two microlitres of the treated pitcher fluid was added to a final volume of 25 µL PCR mixture [1 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.8 % (v/v) Nonidet P40, 0.025 U Taq polymerase and 4 µM forward (E334F: 5'-AGA CTC CTA CGG GAG GCA GC-3'; Baker and Smith, 2003, modified from Rudi *et al.*, 1997) and reverse primer (U529R: 5'-ACC GCG GCK GCT GGC-3'; DasSarma and Fleischmann, 1995; Baker and Smith, 2003)]. The bacterial 16S-rRNA gene was amplified as follows: initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 25 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 60.5 °C for 1 min, amplification at 72 °C for 1 min and a final amplification step at 72 °C for 7 min. No-templates were included as negative controls in every PCR. Positive controls contained 2 µL of pitcher fluid and *Escherichia coli* cells. Reactions were checked for positive

amplification by gel electrophoresis on 1 % agarose gels stained with ethidium bromide.

Microbial growth analyses

Pitcher fluids were tested *in vitro* for antimicrobial effects on the growth of *E. coli* and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, as well as on yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Therefore, 500 μL of overnight cultures from these strains were inoculated in 10 mL fresh LB-medium (Luria Bertani medium: 5 g L^{-1} yeast extract, 10 g L^{-1} trypton, 10 g L^{-1} NaCl) for *E. coli* and *P. syringae*, and ME-medium (malt extract broth: 17 g L^{-1} malt extract, 3 g L^{-1} pepton) for *S. cerevisiae*, respectively, and incubated at 37 °C (*E. coli*) or 30 °C (*P. syringae*, *S. cerevisiae*), shaking at 220 rpm up to an OD_{600} of 0.5. For microbial-growth analyses, 20 μL of these cultures plus 80 μL LB- or ME-medium and 100 μL of pitcher fluid from closed or just opened (i.e. maximum 16 h after opening) *Nepenthes* pitchers were incubated in cavities of a 96-well microtiter plate at the respective temperatures. As a positive control we used 100 μL H_2O (pH 4) instead of pitcher fluid; as a negative control 100 μL of pitcher fluid plus 100 μL LB/ME-medium was used. The respective cultures' growth was determined for up to 20 h at OD_{600} using a SPECTRAMax 250-Photometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) against a reference (100 μL H_2O plus 100 μL LB-/ME-medium) and documented every hour. Six technical replicates were carried out and the experiments were repeated independently three times.

For *in vivo* growth analyses, 100 μL of *S. cerevisiae* and *P. syringae* cultures (OD_{600} approx. 0.5), respectively, were injected into the fluid of closed pitchers and gently slewed. Immediately after injection, 100 μL of this suspension was harvested (0 h, t_0) and after 72 h (t_{72}) a second sample was taken to determine the number of living bacteria and yeast cells. For a control, cultures were also injected into sterile pitcher fluid of closed pitchers after removal from the living plant and left with the *Nepenthes* plants in the greenhouse to have identical growth conditions. The collected samples were diluted and plated on LB-/ME-medium on Petri dishes. After incubation for 24 h, the colony-forming units (cfu) were counted and the ratio of cfu t_{72}/t_0 was calculated. Data are from experiments carried out in triplicate.

Anions and nitrogen analyses

Fluoride, chloride, bromide, nitrate, phosphate and sulfate measurements were performed on the ion chromatography system DX-500 (Dionex, Idstein, Germany), equipped with an electrical conductivity detector (CD40) with auto-regenerating anion suppressor (ASRS[®] 300) and UV/VIS-detector (AD20). The stationary phase consisted of a guard column (IonPac[®] AG14, 4 \times 50 mm; Dionex) and an analytical column (IonPac[®] AS14, 4 \times 250 mm; Dionex). As the mobile phase, a 3.5-mm sodium carbonate/1.0-mm sodium bicarbonate solution with a flow rate of 1.2 mL min^{-1} was used. An integrated sample pre-treatment and pre-concentration unit working with an OnGuard[®] cartridge (OnGuard[®] II RP; Dionex) and

ultra-low-pressure trace-anion-concentrator column (TAC-ULPI[®]; Dionex) allowed detection of small amounts of the analytes in samples, which were potentially contaminated with aromatic dyes, lipids, aromatic carboxylic acids, hydrocarbons, surfactants or other contaminants.

Sample measurements were performed in duplicate, using a sample volume of 50 μL for each injection. Because of different ionic concentrations from traces up to several hundred mg L^{-1} , pitcher fluids were analysed in different dilution steps. Statistical parameters of the measurements such as the limit of detection and the limit of quantification were calculated using the signal-to-noise ratio and the corresponding multi-point calibrations, respectively. Acceptable instrument performance, long-term precision and accuracy of measurements were verified by analysing quality-control samples, e.g. anion standard solutions (Fluka, grade: TraceCERT[®], for ion chromatography; Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, MO, USA), and certified reference material, e.g. river water MISSISSIPPI-03 (Environment Canada, Burlington, Canada).

Measurements of total bound nitrogen were performed using the sum parameter analyser TN-100 (Mitsubishi; a1-envirosciences GmbH, Düsseldorf, Germany) which was equipped with a high-temperature reaction unit where both inorganic and organic nitrogen compounds were oxidized to NO_x and converted subsequently into NO (temperature, 800 °C; catalyst, platinum; carrier/reaction gas, oxygen 5-0). After drying, NO reacts in the chemiluminescence cell with ozone to NO_2 and hv. This emitted light was detected using a photomultiplier tube. Pitcher fluids were measured in triplicate with a selectable sample volume of 30 μL for each injection. Using a multi-point calibration, statistical parameters (limits of detection and quantification) were calculated. Acceptable instrument performance, long-term precision and accuracy of measurements were verified by analysing quality-control samples, e.g. NH_4^+ standard solution (CertiPUR[®]; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and certified reference material, e.g. Nutrients QCI-042-2 (RT Corp, Laramie, WY, USA).

Inductively coupled plasma–optical emission spectroscopy

To analyse the elements in the pitcher fluid, an OptimaTM 3300 DV inductively coupled plasma–optical emission spectroscope (PerkinElmer Inc., Shelton, CT, USA) equipped with a 40-MHz, free-running RF-generator and an array detector or allowing for the simultaneous determination of the elements was used. According to Boumans (1987) and DIN EN ISO 11885 (1998), the wavelengths listed in Supplementary Data Table S1 were selected for element determination.

A two-point calibration (at 0.25 mg L^{-1} and 2.5 mg L^{-1} for Al, B, Cu, Fe, Mn, Ni, Si, Sr and Zn; at 5.0 and 50 mg L^{-1} for Na, P and S; at 10 and 100 mg L^{-1} for Mg; and at 25 and 250 mg L^{-1} for Ca and K) was carried out using a multi-element standard solution (Spex CertiPrep, Metuchen, NJ, USA). Except for K and Na, which were analysed using the radial plasma viewing mode, all other elements were analysed using the axial viewing plasma mode. Other instrumental operating parameters are summarized in Supplementary Data

Table S2. The fluid from five closed *N. alata* pitchers was collected and combined for the analyses.

Secondary-metabolite analysis of *Nepenthes pitcher fluid*

Pitcher fluid collected from *N. ventricosa* was transferred into a 150-mL Erlenmeyer flask and 50 mL of dichloromethane was added. The flask was subsequently sealed with a piece of aluminium foil and kept on a shaker at room temperature overnight. Then, the organic phase was transferred into a 100-mL round bottom flask and removed under vacuum to dryness. The residue was reconstituted with 1 mL of methanol and subjected to HPLC-MS and NMR analyses.

HPLC-MS analysis. Metabolites extracted from *Nepenthes* pitcher juices were separated on a Nucleodur Isis RP18ec column (250 × 4.6 mm, 5- μ m particle size; Macherey Nagel, Düren, Germany) using an Agilent 1100 series HPLC (Agilent Technologies GmbH, Böblingen, Germany). The flow rate for chromatographic separation was 0.8 mL min⁻¹. Column temperature was maintained at 25 °C. The metabolites were separated using 0.1 % (v/v) formic acid and methanol as mobile phases A and B, respectively, with the following elution profile: 0–1 min, 100 % A; 1–41 min, 0–100 % B in A; 41–50 min 100 % B; 50–55 min, 100–0 % B in A and 55–60 min 100 % A. Compound detection and quantification were accomplished with an Esquire 3000 ESI ion-trap mass spectrometer (MS) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Flow coming from the column was diverted in a ratio of 3 : 1 before entering the mass spectrometer electrospray chamber. The MS was operated in positive mode scanning *m/z* between 150 and 1500 with an optimal target mass of 200 *m/z*. The mass spectrometer was operated using the following specifications: skimmer voltage, 60 V; capillary voltage, 4000 V; nebulizer pressure, 35 psi; drying gas, 12 L min⁻¹; gas temperature, 330 °C. Capillary exit potential was kept at 121 V. Compounds in chromatograms were identified based on retention time and their *m/z* ratio.

NMR analysis. ¹H NMR, ¹³C NMR, ¹H-¹H COSY, HMBC and HSQC spectra were measured on a Bruker Avance 500 NMR spectrometer (Bruker Biospin, Karlsruhe, Germany), operating at 500.13 MHz for ¹H and 125.75 MHz for ¹³C. A TCI cryoprobe (5 mm) was used to measure spectra at a probe temperature of 300 K. Spectra are referenced to the residual solvent signals of acetone-*d*₆ at δ 2.04/206.0 ppm and compared with spectra of standard compounds. Standard tubes (5 mm i.d.) and capillary tubes (2 mm i.d.) were used for all NMR measurements.

Structural modelling

For homology modelling of protein structure, 3-dimensional models of thaumatin-like protein (TLP) were calculated using SWISS-MODEL, an automated comparative modelling program (<http://swissmodel.expasy.org/workspace>) (Guex and Peitsch, 1997; Schwede et al., 2003; Arnold et al., 2006). As homologous protein template for *Nepenthes gracilis* TLP (EMBL: ABC73397.1), the crystal structure of TLP from banana (*Musa acuminata*) (Ban-TLP, 1Z3Q_A, (Leone et al., 2006) was used as a template.

RESULTS

Sterility and microbial growth properties of closed pitcher fluids from *Nepenthes*

Due to the fact that often less than half of bacterial phylotypes present in a sample grow on plates, a molecular approach was employed to identify bacteria in the fluid of closed pitchers. Using a PCR technique with domain-specific primers of highly conserved bacterial 16S-rDNA sequences that cover about half a million bacteria species (Baker and Smith, 2003), it was only in the positive *E. coli* control that the bacterial DNA could be proved to be the expected 200-bp PCR product detected (Fig. 2). None of the six *Nepenthes* species tested showed amplification of DNA fragments. Based on dilution series of *E. coli*, the detection limit for this method was determined to be 150 cells.

Further, to analyse the impact of closed pitcher fluid on microbial growth, *in vitro* growth curves with two bacteria species, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Fig. 3A) and *E. coli* (Fig. 3B), were recorded. Therefore, pitcher fluid from *N. mirabilis*, growth medium, and bacteria suspension cultures were incubated in a 10 : 8 : 2 ratio. Both bacterial species showed typical growth behaviour. No obvious difference in growth was detected when the pitcher fluid was replaced by water, pH 4, indicating that the liquid did not affect the growth conditions (Fig. 3). To exclude bacterial contamination of the liquid, growth medium and pitcher fluid was mixed 1 : 1 and analysed. No growth was detected (Fig. 3). To test fungal growth in addition, *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast), was used in a similar approach (Fig. 4). Here, the presence of fluid from closed pitchers clearly affected, by delaying, yeast growth. Because open pitchers are expected to contain higher biological activities, the experiment was repeated with fluid from just opened pitfalls. As shown in Fig. 4, in this case, inhibition of *S. cerevisiae* growth was even stronger. This result forced us to carry out similar experiments *in vivo*, i.e. within closed *N. mirabilis* pitchers. *Pseudomonas syringae* as well as *S. cerevisiae* cultures were injected into closed pitchers. An aliquot was harvested directly (*t*₀, 0 h) and 72 h (*t*₇₂) after injection to determine the number of colony forming units (cfu). The ratio of cfu (*t*₇₂/*t*₀) was calculated to deduce the growth of the particular microbes. For *P. syringae*, in the pitchers the ratio (*t*₇₂/*t*₀) was determined to be 0.1 ± 0.06; for *S. cerevisiae*, this ratio was 1.1 ± 0.2. These results indicate that bacteria incubated within the pitfall trap died because



FIG. 2. Proof of the absence of bacteria in *Nepenthes* pitcher fluids. PCR-based amplification of highly conserved 16S-rDNA sequence (200 bp) using selected domain-specific primers. Lanes: 1, *N. alata*; 2, *N. fusca*; 3, *N. mirabilis*; 4, *N. superba*; 5, *N. thorelii*; 6, *N. ventricosa*; M: 100-bp DNA ladder; NC, negative control without cells; PC, positive control using *E. coli* cells.

the ratio (t_{72}/t_0) was lower than 1.0; whereas the yeast cells with a ratio (t_{72}/t_0) of about 1.0, did not die but they also did not grow. In the controls where the cultures were injected in removed pitcher fluid, both *P. syringae* and *S. cerevisiae*

grew with ratios (t_{72}/t_0) of 18.1 and 2.7, respectively. Thus, we concluded that the pitcher fluid has bactericide as well as fungistatic properties if challenged with the injection of microbes.

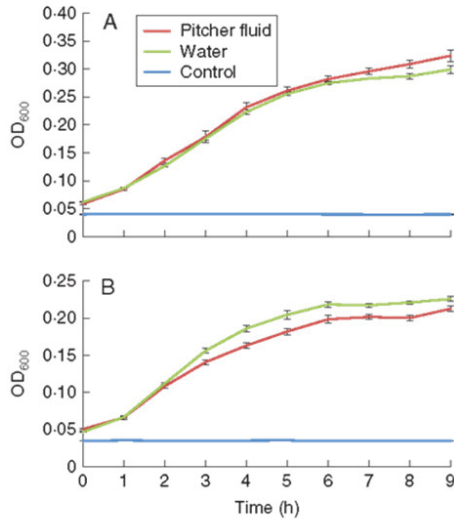


FIG. 3. Bacterial growth analyses (measured as OD₆₀₀) in the presence and absence of *Nepenthes* pitcher fluid: (A) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*; (B) *E. coli*. Growth was monitored for 9 h in a total volume of 200 μ L, consisting of 100 μ L growth medium + 20 μ L bacterial suspension culture + 80 μ L pitcher fluid or water, pH 4, as indicated in the key. For a control of contamination, 100 μ L growth medium + 100 μ L pitcher fluid were incubated.

Anion and element composition in *Nepenthes* pitcher fluid

To understand better why the microbes hardly grow or even die in the pitcher fluid, a detailed investigation of the inorganic ion composition in closed pitchers was performed for three different *Nepenthes* species with a focus on nitrogen- and phosphorus-containing anions. Because the differences among the three species tested were quite small their results are combined and summarized in Table 1 showing the average anion composition in *Nepenthes*. Both phosphate and nitrate were hardly detectable, although the total nitrogen content (inorganic + organic) could be determined at a low concentration of 2.5 ± 2.0 mg L⁻¹. Using inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy, the element composition in fluid collected from pitchers of *N. alata* was also analysed (Table 2). Actually, the liquid represents an approx. 25-mm KCl solution with 2.5 mm calcium, 1.0 mm magnesium, sodium, sulfate and traces of a few other elements.

Antimicrobial compounds in *Nepenthes* pitcher fluid

The limitation of mineral nutrients (N, P) in the pitcher liquid can explain why the yeast cells did not grow. However, the question why the bacteria died had to be solved. The presence of defence-related proteins including pathogenesis-related proteins has already been described (Mithöfer, 2011). Among them, cDNAs and/or encoding genes of TLP were isolated from pitchers for nine different *Nepenthes* species, including all *Nepenthes* species used in

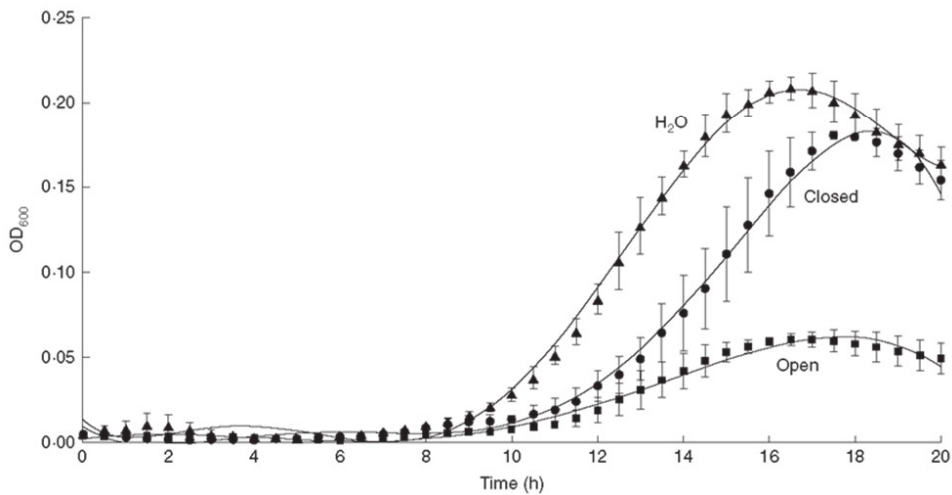


FIG. 4. *Saccharomyces cerevisiae* growth analysis (measured as OD₆₀₀) in the presence and absence of *Nepenthes* pitcher fluid. Growth was monitored for 20 h in a total volume of 200 μ L, consisting of 100 μ L growth medium + 20 μ L *S. cerevisiae* suspension culture + 80 μ L closed pitcher fluid, open pitcher fluid, or water, as indicated on the graph. The 100 μ L growth medium + 100 μ L pitcher fluids did not show any growth.

380

Buch et al. — *Nepenthes pitcher fluid is unsuitable for microbial growth*TABLE 1. Anion composition of pitcher fluids from the genus *Nepenthes*

Anions	mg L ⁻¹
F	Trace
Cl	873 ± 105
Br	0.7 ± 0.2
NO ₃	Trace
PO ₄ ³⁻	Trace
SO ₄ ²⁻	1.8 ± 3.0

Mean values ± s.d. are given, calculated from the values of three species, *N. alata*, *N. gracilis* and *N. mirabilis*.
Trace: below the detection limit of 0.1 mg L⁻¹.

TABLE 2. Mineral nutrients composition of fluid from closed *Nepenthes alata* pitchers

Nutrient	mg L ⁻¹
Elements	
Al	nd
B	1.36
Ca	99.3
Cu	0.08
Fe	0.48
K	1019
Mg	26.7
Mn	0.35
Na	39.8
Ni	0.02
P	nd
S	2.41
Si	0.35
Sr	0.10
Zn	0.04
Anions	
F	Trace
Cl	995
Br	0.61
NO ₃	Trace
PO ₄ ³⁻	nd
SO ₄ ²⁻	5.44

nd, not detectable. Trace: below the detection limit of 0.1 mg L⁻¹.

the present study (Hatano and Hamada, 2008; Rottloff *et al.*, 2009). A comparison of all the respective amino acid sequences showed a similarity of at least 92%. Because antimicrobial activity has yet to be demonstrated for any of these TLPs, an *in silico* approach was chosen to test whether or not the *Nepenthes* TLPs are structurally similar to other known TLPs with biological activities. Structural modelling using the *N. gracilis* TLP revealed that they all belong to the group of L-type TLPs showing the 16 conserved cysteine residues of the Thaumatin_2-motif (Prosite no. PS51367) that can form eight putative disulfide bonds which stabilize the protein structure (Liu *et al.*, 2010). In addition, it consists of three domains (I, II and III). The spatial structure of this *N. gracilis* TLP was modelled by comparative modelling based on the known X-ray crystallography-solved structure of TLPs from banana (Ban TLP, 1Z3Q_A; Leone *et al.*, 2006) (Fig. 5). In both TLPs, a highly similar surface-exposed

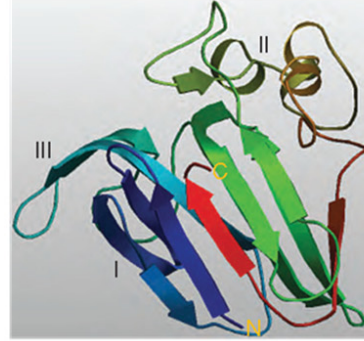


FIG. 5. Calculated 3-D structure of the thaumatin-like protein (TLP) from *Nepenthes gracilis*. The structure was suggested by the SWISSMODEL web server upon comparative modelling using a TLP from banana (*Musa acuminata*; Ban-TLP, 1Z3Q_A) as the homologous template structure. The model shows three domains (I, II and III): domain I which is a β -sandwich consisting of 11 β -sheets; domain II which contains one α -helix and one β -sheet; domain III which forms a hair-pin, built by two β -sheets.

electronegative cleft is formed between domains I and II, which could be responsible for antifungal activities (Leone *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011). This suggests an antimicrobial activity for *Nepenthes* TLPs as well.

In addition to such defensive proteins, low molecular-weight compounds that belong to the naphthoquinones were identified in the pitcher fluid of *N. ventricosa*. Both compounds, plumbagin and 7-methyl-juglone (Fig. 6), could be detected, especially in the liquid of open pitchers containing debris of formerly trapped insects, and only in very low concentrations in the fluid from closed pitchers. Since both compounds show a (*m/z*) of 189 in positive-mode ESI-MS, further structure determination by NMR was necessary. Both naphthoquinones exhibit distinct signals in the ¹H NMR spectrum (Fig. 6). For plumbagin, four characteristic multiple signals appear at δ 7.73, δ 7.58, δ 7.27 (all *dd*, *J* = 7.5/1.0 Hz), together with another signal at δ 6.92 (*dd*, *J* = 3.0/1.5 Hz). The latter couples to a methyl doublet (*J* = 1.5 Hz) at δ 2.15. Characteristic signals for 7-methyl-juglone appear at δ 7.37, δ 7.13 (both broad singlets), and at δ 7.02 and δ 6.98 (both *d*, *J* = 10.0 Hz). The methyl singlet appears at δ 2.47. Both structures were further determined by 2-D heteronuclear experiments. As described for other naphthoquinones, such compounds exhibit antimicrobial activities (Didry *et al.*, 1994; Eilenberg *et al.*, 2010). However, droserone and 5-*O*-methyl droserone, described for *N. khasiana* (Eilenberg *et al.*, 2010), could not be detected in our study.

DISCUSSION

Sterility of pitcher fluid

It has been previously claimed that the fluid from closed *Nepenthes* pitchers is sterile (Hepburn, 1918; Lüttge, 1964). Unfortunately, the growth assays used for those studies were not suitable to prove the absence of micro-organisms since it is not possible to cultivate most of them (Riesenfeld *et al.*, 2004). Recently, there has been some debate about this issue

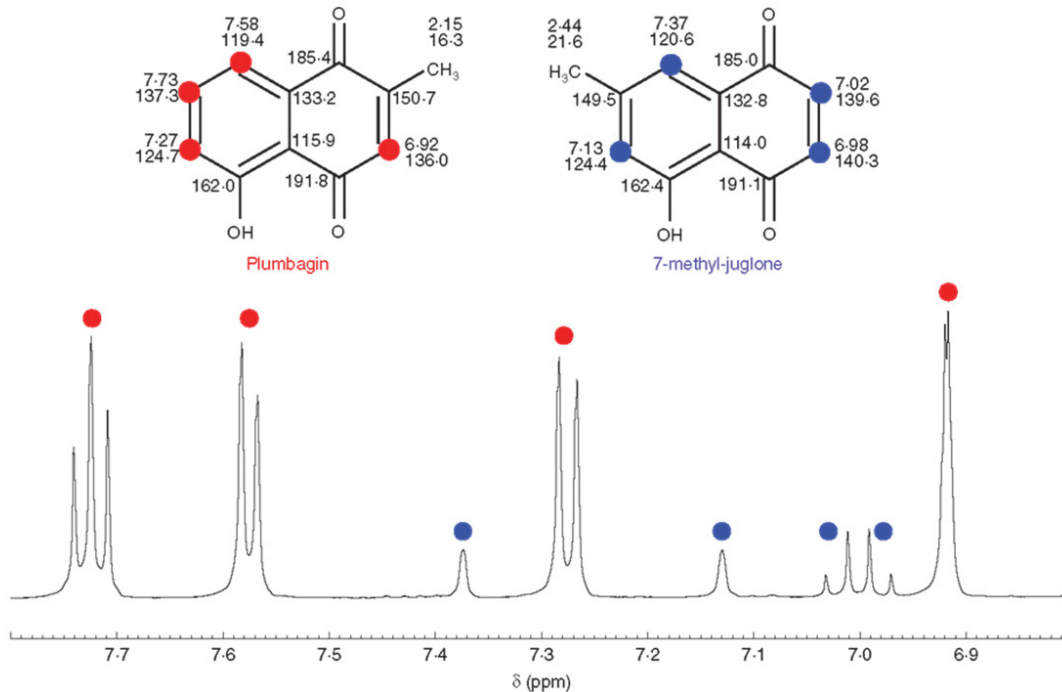


FIG. 6. Structures and characteristic ¹H-NMR signals of plumbagin and 7-methyl-juglone isolated from *N. alata* pitcher tissue. Characteristic multiple signals for plumbagin: four signals at δ 7.73, δ 7.58, δ 7.27 (*dd*, *J* = 7.5/1.0 Hz) and at δ 6.92 (*dd*, *J* = 3.0/1.5 Hz). The latter corresponds to a methyl signal (*d*, *J* = 1.5 Hz) at δ 2.15. Characteristic signals for 7-methyl-juglone: at δ 7.37 and δ 7.13 (broad singlets), together with two signals (*d*, *J* = 10.0 Hz) at δ 7.04 and δ 7.00. A methyl singlet appears at δ 2.44. The positions in the molecule and their respective ¹H-NMR signals are indicated by different colours (red, plumbagin; blue, 7-methyl-juglone).

because, using microscopic techniques, bacteria have been found in unopened *N. alata* pitchers (Sota *et al.*, 1998). However, these authors themselves critically discussed this finding as they could not rule out contamination. As a consequence, the application of an assay based on molecular traits such as the PCR-amplification of highly conserved 16S-rDNA seemed to be the better approach. As shown in Fig. 2, neither in the fluid from *N. alata* nor from any other *Nepenthes* species was the amplification of bacterial DNA detected. The number of bacteria detected in the work of Sota *et al.* (1998), 1.6×10^7 cells mL⁻¹, would have been easily detected by our approach as the detection limit was about 150 cells, suggesting that it was indeed contamination. Thus, the bacteria-free nature of fluid from closed *Nepenthes* pitchers suggests that the closed pitchers are sterile inside.

Nepenthes pitcher fluid and microbial growth

The ability of *Nepenthes* pitcher fluid to affect microbial growth was further investigated both *in vitro* with collected fluid and *in vivo* within the pitchers. As shown in Fig. 3, *in vitro*, bacterial growth was not affected by the fluid as *E. coli* as well as *P. syringae* grew as the controls did. However, *S. cerevisiae* growth was only slightly inhibited in the presence of fluid from closed pitchers but was more so

in the presence of fluid from open pitchers (Fig. 4). These results suggested that the composition of the pitcher fluid was changing, probably due to the particular developmental stage or challenge. Further experiments did support this idea, when either bacteria or yeast cells were injected into closed pitchers and, after 3 d of incubation, the number of microbial cell was determined and compared with the particular controls. Clearly, bacterial cells died; yeast cells did not grow inside the pitcher but survived. These results reveal two features of *Nepenthes* pitcher fluid: (1) it is a dynamic system that is able to react to the challenge of microbe injections; (2) the fluid can exhibit bactericide as well as fungistatic properties.

There are two conceivable reasons why the yeast did not grow within the pitcher: (1) the presence of compounds that actively inhibit the growth; and (2) there are not sufficient nutrients in the fluid. To follow up this latter hypothesis, the mineral content of the pitcher fluid was analysed. Up to now only two studies addressed such an analysis: Morrissey (1955) quantified the chloride concentration in newly opened pitchers as between 600 and 900 mg L⁻¹ (17–26 mM) and Nemček *et al.* (1966) found a chloride concentration of 19.5 mM in closed pitchers; both represented the same range detected by us (Table 1). In addition to chloride, we also determined other anions and found that there were actually neither phosphate nor nitrate detectable (Table 1). The total amount of

bound nitrogen present in inorganic and organic forms – 2.5 mg L^{-1} – was very low. Actually, when compared with the data from Table 2, the pitcher fluid is a 25-mM KCl solution with few additional ions. Moreover, the NMR analysis showed that there were almost no detectable sugar signals (C. Paetz, MPI Chemical Ecology, Jena, Germany, pers. comm.) Taken together, these results indicate that the fluid from closed or newly opened pitchers *per se* is an extremely poor substrate, lacking phosphate and nitrogen sources and thus unsuitable for microbial growth.

However, this finding cannot completely explain why bacteria died during inoculation within the pitchers. Here, additional components are necessary. The presence of antimicrobial compounds in the fluid such as the naphthoquinones, droserone and 5-*O*-methyl droserone (Eilenberg *et al.*, 2010), can provide this explanation. Both compounds are described as inducible (Eilenberg *et al.*, 2010; Raj *et al.*, 2011), a fact that strengthens our finding that the bacteria only die when inoculated within the pitcher, not when grown outside. It might be interesting to mention that in *N. ventricosa* pitcher fluid we did not find the naphthoquinones described for *N. khasiana* but two other derivatives, plumbagin and 7-methyl-juglone (Fig. 6), indicating the metabolic plasticity of the genus *Nepenthes*.

It is generally accepted that pitcher fluid is responsible for the digestion of trapped prey to make nutrients available for the plant. This is due to the activities of various hydrolytic enzymes. However, these proteins also play a role in affecting microbial growth within the pitcher fluid (Eilenberg *et al.*, 2006; Hatano and Hamada, 2008, 2012; Mithöfer, 2011). Similar to the naphthoquinones, some of those enzymes are inducible by prey or chitin such as the type I basic chitinases Nkchit1b in *N. khasiana*, the class III acid endochitinase NrChit1 in *N. mirabilis*, and class III peroxidase from *N. alata* (Eilenberg *et al.*, 2006; Rottloff *et al.*, 2011; Hatano and Hamada, 2012). Such a point of view is supported by the presence of additional proteins in the pitcher fluid, which have no known hydrolytic activities but are antimicrobial, e.g. the pathogenesis-related TLPs (Hatano and Hamada, 2008; Rottloff *et al.*, 2009; Mithöfer, 2011). It is tempting to speculate that the TLPs also contribute to the antimicrobial activities in the pitcher fluid. On-going experiments with fruit flies as prey have already shown that a 2-fold induction of TLP-mRNA could be observed in *N. mirabilis*. All these results, as well as the results with the naphthoquinones, demonstrate how dynamically *Nepenthes* plants can react in order to adapt the fluid to the particular needs.

Open pitchers, microbes and food webs

Once the pitchers are open, unwanted micro-organisms can enter the traps just by chance. They are introduced by rain or directly from the air into the traps. Probably, most of the microbes are carried by caught prey where they live on the surface or inside the body. Besides the various micro-organisms such as bacteria, yeast, algae and protozoa, many arthropod species are often present (Shivas and Brown, 1989; Adlassnig *et al.*, 2011). Eventually, when opened *Nepenthes* pitchers grow older, they are often colonized and even food webs might be generated (Beaver, 1985; Kitching,

2001; Sota *et al.*, 1998). Interestingly, this is possible although the pitcher fluid appears toxic or unsuitable for most organisms. But, obviously, some species are adapted to this environment, live inside the pitcher and subsist on the captured prey. Such colonizers might contribute to the digestion of prey but they are also consumers of nutrients and, therefore, competitors for nutrients. In particular, microbes are competing with the plants, whereas many arthropods feed on the micro-organisms (Ratsirarson and Silander, 1996; Sota *et al.*, 1998). Once the arthropods die inside the pitcher, they are digested and available for the plant again. Therefore, the presence of micro-communities in pitchers is not necessarily negative for the plant. However, it seems that, at least in the beginning when the pitfall traps start to open and to catch prey, the plant tries to control the microbial colonization. Actually the selective influence of the pitcher fluid provides a possibility of affecting and, maybe, selecting certain organisms. For instance, after prey capture the pH of the pitcher fluid decreases in *Nepenthes*. This occurs when the number of bacteria has reached its maximum so as to inhibit further bacterial growth (Higashi *et al.*, 1993), which is in agreement with our results of the dynamic defence reactions in *Nepenthes*. Only later can the number of microbes be too high and not manageable any more. In such a situation, more investment in defensive compounds could be too costly for the plant and might also affect other members of the food web. An established food web might suppress high microbial densities more efficiently by predation (Sota *et al.*, 1998). This aspect will be investigated in further studies.

Conclusions

In the present study, we addressed some old but still-open questions concerning the sterility and putative antimicrobial properties of the digestive fluid from closed and just-opened pitchers of the genus *Nepenthes*. Using different independent approaches, we analysed the chemical composition of the fluid, on one hand, and, on the other hand, we investigated its abilities to affect microbes. Our results reveal that the secreted fluid of *Nepenthes* pitchers is a bacteria-free, very likely sterile liquid and is unsuitable of serving as an environment for microbial growth. Thus, the plants can avoid, at least to some extent, the growth of microbes that compete with the plant for the prey-derived nutrients that are available in the pitcher.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available online at www.aob.oxfordjournals.org and consist of the following. Table S1: wavelengths used for element determination. Table S2: operating parameters of Optima™ 3300 DV, used for element determination.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Birgit Arnold and the whole greenhouse team at the MPI for Chemical Ecology for growing *Nepenthes* plants, the Botanical Gardens in Jena and Munich for providing plants and samples, Florian Turini for collecting pitcher fluid, and Wilhelm Boland and the Max Planck Society for support.

We also thank the two anonymous reviewers for their stimulating comments on our manuscript.

LITERATURE CITED

- Adlassnig W, Peroutka M, Lendl T. 2011. Traps of carnivorous pitcher plants as a habitat: composition of the fluid, biodiversity and mutualistic activities. *Annals of Botany* 107: 181–194.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. 2006. The SWISS MODEL Workspace: a web based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22: 195–201.
- Baker GC, Smith JJ. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55: 541–555.
- Beaver RA. 1985. Geographical variation in food web structure in *Nepenthes* pitcher plants. *Ecological Entomology* 10: 241–248.
- Bohn HF, Federle W. 2004. Insect aquaplaning: *Nepenthes* pitcher plants capture prey with the peristome, a fully wettable water-lubricated anisotropic surface. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 101: 14138–14143.
- Boumans PWJM. 1987. Inductively coupled plasma emission spectrometry. Part I. New York, NY: John Wiley & Sons.
- Darwin C. 1875. *Insectivorous plants*. London: John Murray.
- DasSarma S, Fleischmann EF. 1995. *Archaea: a laboratory manual – halophiles*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Didry N, Dubrevil L, Pinkas M. 1994. Activity of anthraquinonic and naphthoquinonic compounds on oral bacteria. *Pharmazie* 49: 481–483.
- DIN EN ISO 11885. 1998. *Determination of 33 elements by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*. Brussels: European Committee for Standardization.
- Eilenberg H, Pnini-Cohen S, Schuster S, Movtchan A, Zilberstein A. 2006. Isolation and characterization of chitinase genes from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *Journal of Experimental Botany* 57: 2775–2784.
- Eilenberg H, Pnini-Cohen S, Rahamim Y, et al. 2010. Induced production of antifungal naphthoquinones in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *Journal of Experimental Botany* 61: 911–922.
- Gaume L, Gorb S, Rowe N. 2002. Function of epidermal surfaces in the trapping efficiency of *Nepenthes alata* pitchers. *New Phytologist* 156: 479–489.
- Glenn A, Brodi MS. 2012. Fungal endophyte diversity in *Sarracenia*. *PLoS One* 7: e32980. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0032980>.
- Guex N, Peitsch MC. 1997. SWISS MODEL and the Swiss PdbViewer: an environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18: 2714–2723.
- Hatano N, Hamada T. 2008. Proteome analysis of pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Journal of Proteome Research* 7: 809–816.
- Hatano N, Hamada T. 2012. Proteomic analysis of secreted protein induced by a component of prey in pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Journal of Proteomics* 75: 4844–4852.
- Hepburn JS. 1918. Biochemical studies of the pitcher liquor of *Nepenthes*. *Proceedings of the American Philosophical Society* 57: 112–129.
- Heslop-Harrison Y. 1975. Enzyme release in carnivorous plants. In: Dingle JT, Dean RT. eds. *Lysozymes in biology and pathology*. Amsterdam: North Holland Publishing Company, 525–578.
- Higashi S, Nakashima A, Ozaki H, Abe M, Uchiumi T. 1993. Analysis of feeding mechanism in a pitcher of *Nepenthes hybrida*. *Journal of Plant Research* 106: 47–54.
- Juniper BE, Robins RJ, Joel DM. 1989. *The carnivorous plants*. London: Academic Press.
- Kitching RL. 2001. Food webs in phytotelmata. *Annual Reviews of Entomology* 46: 729–760.
- Leone P, Menu-Bouaouiche L, Peumans WJ, et al. 2006. Resolution of the structure of the allergenic and antifungal banana fruit thaumatin-like protein at 1.7-Å. *Biochimie* 88: 45–52.
- Liu J, Sturrock R, Ekramoddoullah AKM. 2010. The superfamily of Thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Reports* 29: 419–436.
- Lüttge U. 1964. Untersuchungen zur Physiologie der Carnivoren-Drüsen. *Planta* 63: 103–117.
- Mithöfer A. 2011. Carnivorous pitcher plants: insights in an old topic. *Phytochemistry* 72: 1678–1682.
- Morrissey S. 1955. Chloride ions in the secretion of the pitcher plant. *Nature* 176: 1220–1221.
- Nemčok O, Sigler K, Kleinzeller A. 1966. Ion transport in the pitcher of *Nepenthes henryana*. *Biochimica et Biophysica Acta* 126: 73–80.
- Owen TP Jr, Lennon KA. 1999. Structure and development of the pitchers from the carnivorous plant *Nepenthes alata* (Nepenthaceae). *American Journal of Botany* 86: 1382–1390.
- Raj G, Kurup R, Hussain AA, Baby S. 2011. Distribution of naphthoquinones, plumbagin, droserone and 5-O-methyl droserone in chitin-induced and uninduced *Nepenthes khasiana*: molecular events in prey capture. *Journal of Experimental Botany* 62: 5429–5436.
- Ratsirarson J, Silander JA Jr. 1996. Structure and dynamics in *Nepenthes madagascariensis* pitcher plant micro-communities. *Biotropica* 28: 218–227.
- Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J. 2004. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annual Reviews of Genetics* 38: 525–552.
- Rottloff S, Müller U, Kilper R, Mithöfer A. 2009. Micropreparation of single secretory glands from the carnivorous plant *Nepenthes*. *Analytical Biochemistry* 394: 135–137.
- Rottloff S, Stieber R, Maischak H, Turini FG, Heubl G, Mithöfer A. 2011. Functional characterization of a class III acid endochitinase from the traps of the carnivorous pitcher plant genus, *Nepenthes*. *Journal of Experimental Botany* 62: 4639–4647.
- Rudi K, Skulberg OM, Larsen F, Jacobsen KS. 1997. Strain classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from variable regions V6, V7 and V8. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2593–2599.
- Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. 2003. SWISS MODEL: an automated protein homology modeling server. *Nucleic Acids Research* 31: 3381–3385.
- Shivas RG, Brown JF. 1989. Yeasts associated with fluid in pitchers of *Nepenthes*. *Mycological Research* 93: 96–100.
- Sota T, Mogi M, Kato K. 1998. Local and regional-scale food web structure in *Nepenthes alata* pitchers. *Biotropica* 30: 82–91.
- Wang Q, Li F, Zhang X, et al. 2011. Purification and characterization of a CK1 β protein from *Cynanchum komarovii* seeds that confers antifungal activity. *PLoS One* 6: e16930. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016930>.

Zusätzliche Informationen (Supplementary data) zu Manuskript 1:

Franziska Buch, Matthias Rott, Sandy Rottloff, Christian Paetz, Ines Hilke, Michael Raessler, Axel Mithöfer (2013): Secreted pitfall-trap fluid of carnivorous *Nepenthes* plants is unsuitable for microbial growth. *Annals of Botany* **111**: 375 – 383.

Table S1-S2

SUPPLEMENTARY DATA

TABLE S1: Wavelengths used for element determination

Element	Detection wavelength (nm)
Al	396.153
B	208.957
Ca	315.887
Cu	324.752
Fe	259.939
K ¹	766.490
Mg	279.077
Mn	257.610
Na ¹	589.592
Ni	231.604
P	177.434
S	181.975
Si	251.611
Sr	460.733
Zn	213.857

¹ Analysed using the radial plasma viewing mode

TABLE S2: Operating parameters of Optima™ 3300 DV, used for element determination

Parameter	Set-up
RF power	1300 Watts
Plasma gas	15 L min ⁻¹
Auxiliary gas	0.5 L min ⁻¹
Nebulizer gas	0.8 L min ⁻¹
Pump rate	1.8 mL min ⁻¹
Nebulizer	Cross-flow
Spray chamber	Scott-type, Rytan
Plasma view	Axial (except K, Na)
Viewing distance	15 mm

Manuskript 2



Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytochem

Characterization and heterologous expression of a PR-1 protein from traps of the carnivorous plant *Nepenthes mirabilis*



Franziska Buch^a, Yannick Pauchet^b, Matthias Rott^a, Axel Mithöfer^{a,*}

^a Department of Bioorganic Chemistry, Max Planck Institute for Chemical Ecology, 07745 Jena, Germany

^b Department of Entomology, Max Planck Institute for Chemical Ecology, 07745 Jena, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 June 2013

Received in revised form 17 January 2014

Available online 14 February 2014

Keywords:

Pathogenesis-related proteins

PR-1 protein

Carnivorous plants

Nepenthes

Pitcher fluid

Antibacterial activity

Glycosylation

Sf9 insect cell expression

ABSTRACT

Carnivorous plants capture and digest prey to obtain additional nutrients. Therefore, different trapping mechanisms were developed in different species. Plants of the genus *Nepenthes* possess pitfall-traps filled with a digestive fluid, which is secreted by the plants themselves. This pitcher fluid is composed of various enzymes to digest the captured prey. Besides hydrolytic enzymes, defense-related proteins have been identified in the fluid. The present study describes the identification and heterologous expression of a pathogenesis-related protein, NmPR-1, from pitchers of *Nepenthes mirabilis* with features that are unusual for PR-1 proteins. In particular, it was proven to be highly glycosylated and, furthermore, it exhibited antibacterial instead of antifungal activities. These properties are probably due to the specific environment of the pitcher fluid.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

In 1875, Charles Darwin published the standard work on insectivorous plants that still covers a major part of our knowledge on these fascinating organisms (Darwin, 1875). Insectivory, or in a broader sense carnivory, in plants depends on a successful capture of prey, mainly arthropods, and contributes to the nutrition of the plants, which usually live on poor soils. Different trapping mechanisms have been identified and described (Darwin, 1875; Juniper et al., 1989). Among them, so-called pitfall traps can be found in pitcher plants of the New-World (*Sarracenia* spp., *Heliamphora* spp., *Darlingtonia californica*) as well as in the species-rich genus *Nepenthes* that is distributed primarily in South-East Asia. At least in *Nepenthes*, the fluid of closed pitchers is sterile and completely plant derived (Buch et al., 2013).

Pitfall traps or pitchers are specialized organs originated from leaves and can be divided into zones which include: (i) a lid and a peristome both involved in attracting and trapping prey (Juniper et al., 1989), (ii) a slippery waxy zone for trapping and preventing prey from escaping (Gaume et al., 2002; Riedel et al., 2003), and (iii) a digestive zone at the bottom equipped with bifunctional glands to secrete digestive enzymes and take up the nutrients

(Heslop-Harrison, 1975; Juniper et al., 1989; Mithöfer, 2011). When visiting the pitchers, insects fall into the traps, drown and are digested by the enzyme cocktail of the pitcher fluid to provide nutrients such as nitrogen and phosphate for the plant.

In recent years, significant progress has been made concerning the analysis of the digestive pitcher fluid. Not only its mineral content was exemplarily determined for *Nepenthes alata*, indicating that the fluid is a 25 mM KCl solution that is supplemented with traces of other ions (Buch et al., 2013) but also antimicrobial secondary metabolites, naphthoquinones, could be identified (Buch et al., 2013; Eilenberg et al., 2010). Additionally, the protein composition of the digestive fluid was studied in detail; among the identified proteins many pathogenesis related (PR) proteins were found (Eilenberg et al., 2006; Hatano and Hamada, 2008, 2012; Mithöfer, 2011; Rottloff et al., 2011). For almost 140 years it is known that enzymes with proteolytic activities are present in insectivorous plants (Darwin, 1875). This also holds true for *Nepenthes* spp.; here, proteases as well as other hydrolytic activities were described (ribonuclease, esterase, phosphatase, different chitinases) (Eilenberg et al., 2006; Heslop-Harrison, 1975; Juniper et al., 1989; Rottloff et al., 2011) or at least suggested (β -1,3-glucanase, β -D-xylosidase, peroxidase) (Hatano and Hamada, 2008, 2012; see Mithöfer, 2011, for an overview). Interestingly, besides such hydrolytic enzymes that are involved in digestion of caught prey, other PR proteins with antimicrobial function but without known enzymatic activities have been identified in the pitcher fluids,

* Corresponding author. Tel.: +49 (0)3641 571263; fax: +49 (0)3641 571256.

E-mail addresses: fbuch@ice.mpg.de (F. Buch), ypauchet@ice.mpg.de (Y. Pauchet), matthias.rot@hotmail.de (M. Rott), amithoef@ice.mpg.de (A. Mithöfer).

e.g. thaumatin-like proteins (Buch et al., 2013; Hatano and Hamada, 2008; Rottloff et al., 2009). In addition, the presence of a PR-1 protein in the pitcher fluid was mentioned (Mithöfer, 2011).

The PR-1 protein family is highly conserved and appears to occur in almost all plant species. The PR-1 family represents the first discovered PR proteins with molecular masses of about 15–17 kDa (van Loon and van Strien, 1999). All PR-1 proteins share a similar structure, having four α -helices and one β -sheet formed by four β -strands, and possess a number of strictly conservative residues, including six cysteines forming three disulfide bridges (van Loon et al., 2006). Two groups of PR-1 proteins are known, acidic and basic ones. In tobacco, acidic PR-1 proteins seem to be localized in the apoplast, whereas the basic form accumulates in the vacuole (Bol et al., 1990). However, this cannot be generalized. In plants, PR-1 proteins have been proposed to be involved in defenses, e.g. preventing virus diffusion, restricting fungal invasion, or protection against oomycete infection (Cutt et al., 1989; Rauscher et al., 1999; van Loon et al., 2006). Strikingly, the exact biochemical functions and mode of action of PR-1 are yet not clear.

Here, we report on the characterization of a PR-1 protein from the pitfall trap of carnivorous *Nepenthes mirabilis* plant, NmPR-1. The encoding cDNA was heterologously expressed in Sf9 insect cells and the recombinant protein obtained was used for further biochemical investigation and the determination of its antimicrobial activities both revealing unusual PR-1 properties.

Results and discussion

Characterization and heterologous expression of NmPR-1

A peptide sequence (n-TWDDTVAAYA(I/L)NYANQR-c) obtained from a protein sample that was harvested from digestive fluids of closed *Nepenthes* traps showed clearly similarities with PR-1 proteins from various other plant species (*Nicotiana tabacum*, *Cap-sicum annuum*, *Vitis vinifera*, *Glycine max*, *Populus trichocarpa*), which was detected by blast searches (NCBI database). In order

to study a PR-1 protein from *Nepenthes* in detail, the full-length cDNA of NmPR-1 was cloned (EMBL Accession No. for RNA: GQ337079). It showed an open reading frame of 498 bp corresponding to 165 amino acid residues (NCBI Accession No. for protein: ACT99721), including the conserved PR-1-like domain (aa 28–165) (Fig. 1A). Therein, an amino acid motif that is typical for PR-1 proteins is present (aa 122–136): n-HYTQVWV[R/K]X[S/T][V/T]XGC-c (van Loon and van Strien, 1999; van Loon et al., 2006), although in NmPR-1 an additional Leu-134 was found. Also present are six highly conserved cysteine residues, responsible for disulfide bridges and, thus, for secondary structure (Fig. 1A). Further sequence analyses (SignalP 4.1) predicted the presence of an N-terminal region, representing a signal peptide; this peptide first directs the protein to the endoplasmic reticulum and eventually causes secretion. The predicted cleavage site is between aa Ala-27 and Gln-28 (Fig. 1A) (Bendtsen et al., 2004). Without the signal peptide, the protein comprises 136 amino acids, a mass of 15,392 Da and a calculated isoelectric point (pI) of 6.5. Thus, NmPR-1 neither belongs to the basic (pI 8–10) nor to the acidic (pI 4–5), often secreted type of PR-1.

Secretion of the protein is further confirmed by the fact that the PR-1 protein-related peptide (n-TWDDTVAAYA(I/L)NYANQR-c) was determined in a sample from pitcher fluid. Its aa sequence is well-fitting to the deduced sequence of NmPR-1 (aa 51–68; Fig. 1A); the deduced sequence also indicated a Leu at position 61. Only two N-terminal aspartate residues identified in the peptide are replaced by asparagine in the deduced sequence. This might be due to the fact that the micro-sequencing was done on pooled proteins from different *Nepenthes* species (Rottloff et al., 2011). A single nucleotide exchange in the codon GA[U/C] to AA[U/C] (asparagine) causes an exchange from Asp to Asn and is easily conceivable within the evolution of *Nepenthes* species.

As the 3D-structure of a PR-1 protein from tomato, P14a, is solved by NMR-analysis (Fernández et al., 1997), the spatial structure of the NmPR-1 was modeled by comparative modeling using the sequence of that tomato P14a protein (Swiss Prot: P04284) as homologous template structure. Considering the level of

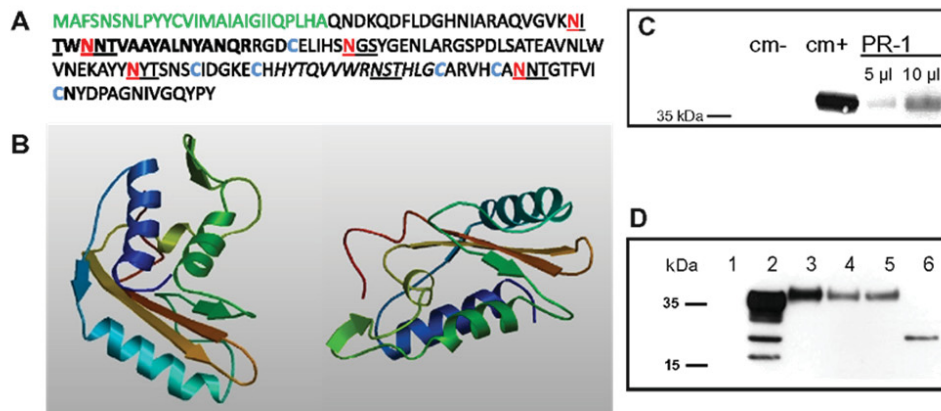


Fig. 1. (A) Deduced amino acid (aa) sequence of PR-1 gene from *Nepenthes mirabilis*. The predicted signal peptide (aa 1–27) is indicated in green. The aa (asparagine, N) of the predicted N-glycosylation sites is shown in red. Related N-X-S/T sequons are underlined. A PR-1-typical and conserved aa sequence motif (aa 122–136) is presented in italics and all six highly conserved cysteines are indicated in blue and bold. The sequenced peptide from the pitcher fluid (aa 51–67) is shown in bold. (B) Calculated 3D structure of the NmPR-1 protein. Structure was suggested by SWISS-MODEL web server upon comparative modeling using the PR-1 sequence from P14a of tomato (Swiss Prot: P04284) as the homologous template structure. The modeled residue range is without signal peptide from aa 28 to 165. Two different views of the modeled structure are shown. (C) Western blot of recombinant *N. mirabilis* PR-1, expressed in Sf9 insect cell line, using an anti-V5 horseradish peroxidase antibody and ECL for detection. Negative (cm–, only cell culture medium, 5 μ l) and positive (cm+, recombinant catalase with V5-tag, 5 μ l) controls are included, in comparison to the Sf9 line stably expressing NmPR-1/Sf9, pointed out with 5 μ l and 10 μ l, respectively. (D) Western blot detection of recombinant *N. mirabilis* PR-1, expressed in Sf9 insect cell line with a V5-tag, after various treatments. Negative control (only cell culture medium, lane 1); positive control (recombinant catalase with V5-tag, lane 2); NmPR-1/Sf9 without treatment (lane 3); NmPR-1/Sf9 treated with 8 M urea (lane 4); NmPR-1/Sf9 undergoing deglycosylation procedure without PNGase F (lane 5); PNGase F treated NmPR-1/Sf9 (lane 6).

sequence similarities between the template and NmPR-1, the model was obviously evaluated to be a good quality structure employing SWISS-MODEL web server. The modeled residue range was without the signal peptide. The sequence of NmPR-1 was then structurally compatible with the fold of PR-1 proteins. Similar to other PR-1, the predicted NmPR-1 structure was composed of four α -helices and five β -strands, four of which forming a β -sheet localized in the same plane and surrounded by the α -helices. Thus, the typical architecture of PR-1 proteins was suggested, an α - β - α sandwich (Fernández et al., 1997). The predicted fifth β -strand can be found outside that structure (Fig. 1B) and does not affect the core structure.

Using the NCBI Conserved Domain Search due to a 136 aa long stretch between aa 32 and aa 165, the predicted NmPR1 protein was classified as SCP (sperm coating protein)-PR-1-like: SCP-like extracellular protein domain, PR-1 like subfamily (Marchler-Bauer et al., 2011). The family of SCP containing proteins includes PR-1 from plants but also many other proteins such as CRISPs, mammalian cysteine-rich secretory proteins and various venom proteins (Cantacessi et al., 2009).

For further characterization, isolated RNA from *N. mirabilis* pitcher tissue was used for cDNA synthesis. With this template, a 414 bp fragment of NmPR-1 lacking the signal peptide-encoding region was amplified by PCR using specific primers (see above), cloned into pMIB/V5-His vector B, and transfected into Sf9 insect cell line for heterologous expression with a C-terminal V5-tag. Successful expression was confirmed by Western blot using the anti-V5 horseradish peroxidase antibody (Fig. 1C). The expected size of the recombinant protein consisting of NmPR-1, V5 epitope and 6xHis region was about 19 kDa. However, as shown in Fig. 1B, a molecular mass of ~36 kDa was detected. Although Western blot analysis was carried out after denaturing SDS-PAGE, this result could not exclude the possibility that the PR-1 protein from *N. mirabilis* might constitute as a dimer as recently shown for a PR-1-5 protein from wheat (*Triticum aestivum*) (Lu et al., 2013), or for the human Golgi-associated plant pathogenesis related protein, GAPR-1, (Serrano et al., 2004). For PR-1-5, dimerization was shown to provide higher protease resistance; for GAPR-1, a catalytic triad for serine protease activity at the dimer interphase was proposed. However, in both cases under denaturing conditions dimers were not detectable (Lu et al., 2013; Serrano et al., 2004). By contrast, neither stronger reducing conditions (5% 2-mercaptoethanol, 5 mM dithiothreitol) nor the presence of 8 M urea as an effective chaotropic agent were able to reduce the detectable mass of NmPR-1/Sf9 protein (Fig. 1D), suggesting a different reason for that finding. Secreted proteins often undergo glycosylation, which contributes to their stability by making them more polar, hinder access for proteases and also may be helpful for correct folding (Shental-Bechor and Levy, 2008). In order to examine whether the higher mass was due to protein glycosylation, firstly a prediction of N-glycosylation sites with NetNGlyc program was carried out revealing that there are 5 to 6 putative N-glycosylation sites in NmPR-1 protein (Fig. 1A). To test this prediction, a PNGase F treatment was performed, where N-linked glycans were successfully removed (Fig. 1D) resulting in a protein of about 19 kDa and indicating a high level of glycosylation of the NmPR-1/Sf9 protein (approximately 17 kDa, ~100% of the NmPR-1 protein mass). The only other experimentally proved example for PR-1 protein glycosylation, the Cyn d 24 protein from Bermuda grass (*Cynodon dactylon*) pollen, has a carbohydrate content of about 5.7% (Chow et al., 2005). Particularly in the environment of the digestive pitcher fluid consisting of various hydrolytic enzymes it is easily conceivable that plant-derived proteins need to be protected against digestion by endogenous proteases. Glycosylation of proteins might be a mechanism to achieve this goal.

In order to investigate the expression status of NmPR-1, real time PCR was performed. The pitcher-carrying part of *Nepenthes* plants actually represents a leaf metamorphosis. The leaf morphology consists of a photosynthetic part, originally the enlarged leaf base, and a tendril that at its end develop a pitcher. The leaf base was analyzed and taken as the control tissue. This was compared to both the upper part and the lower, glands harboring part of a closed pitcher. As can be seen in Fig. 2, no significant difference was detectable between the two parts of the pitcher but an about ten-fold higher expression level compared to the leaf base tissue. The result indicates that even in closed pitchers without contact to insect prey there is a constitutive high level of NmPR-1. Moreover, the presence or absence of glands made no difference. This supports the results of a recent study showing that mRNA of other PR proteins, a chitinase and a thaumatin-like protein, also accumulate in all pitcher tissue (Rottloff et al., 2011). The conclusion from those experiments was that all pitcher tissues might be employed in the generation of enzymes, but only the glands can secrete them into the digestion fluid (Rottloff et al., 2011).

Phylogenetic analysis

To investigate to which level the PR-1 protein sequence of *N. mirabilis* is homolog to other plant species, a molecular phylogenetic analysis by Maximum Likelihood and Neighbor-Joining method was performed. The analysis involved the PR-1 protein sequences from 23 different plant species, including *N. mirabilis* (Supplementary Fig. 1). Using MUSCLE software for alignment and MEGA5 program to reconstruct the evolutionary histories of the applied species, in Fig. 3A the bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates is shown (Felsenstein, 1985). Here, ML and NJ method were combined in one tree regarding to the bootstrap values, pointed out next to each branch in Fig. 3A (ML value/NJ value). One lineage consists of *N. mirabilis* (NEM1), *V. vinifera* (VIV1) and *Ricinus communis* (RICO1) with bootstrap support values of 52% and 65% respectively, to NEM1. Bootstrap values of *N. mirabilis* with respect to the other tested species were lower than 50%. To address the feature of glycosylation sites found in NmPR-1 protein,

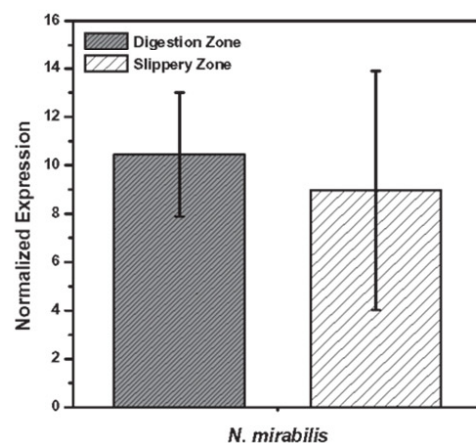


Fig. 2. Real-time PCR analyses for the expression level of the NmPR-1 gene in two different parts of a pitcher (digestion zone, slippery zone) and in *Nepenthes mirabilis* leaf base tissue. The calculation and normalization of the pitcher data were carried out against the leaf base datasets (control tissue) including two internal genes for actin and 18S rRNA. Results are expressed in x-fold difference compared to the control tissue (leaf base) set to one.

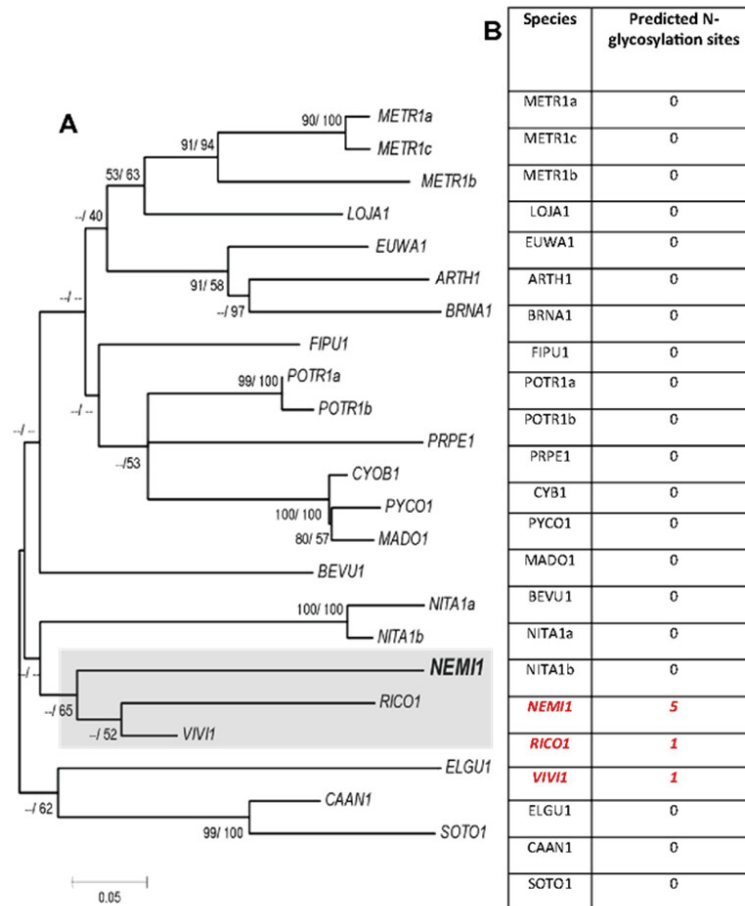


Fig. 3. (A) Phylogenetic tree of PR-1 proteins from different plants based on ML (Maximum Likelihood) and NJ (Neighbor Joining) methods. Both methods were combined in one tree regarding to the bootstrap values. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. The percentages of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. One particular lineage covers *Nepenthes mirabilis* (NEM1), *Vitis vinifera* (VIVI1) and *Ricinus communis* (RICO1) with bootstrap support values from 52% and 65% similarity from NEM1 to RICO1 and VIVI1, respectively. Bootstrap values outgoing from *N. mirabilis* to the other tested species were almost lower than 50%. (B) Predicted N-glycosylation sites in PR-1 amino acid sequences of different plant species. Prominent is, that no PR-1 protein sequences were predicted to be glycosylated except *N. mirabilis* (NEM1) PR-1 with at least five predicted N-glycosylation sites and the two species in the same lineage, *R. communis* and *V. vinifera*, both with one predicted N-glycosylation site. Full names of the species included as well as the accession numbers of related PR-1 protein sequences are given in Fig. S1.

all other 22 protein sequences were further analyzed using the NetNGlyc program. Strikingly, the two neighboring species, *R. communis* and *V. vinifera*, that form a lineage with *N. mirabilis* were predicted to contain one N-glycosylation site each (Fig. 3B). To our knowledge, NmPR-1 is the first example of a highly glycosylated PR-1 protein in plants.

Biological activity of NmPR-1

To gain insight into the function of NmPR-1 in the pitcher fluid of *N. mirabilis*, the recombinant protein was applied to various bioassays to test for any biological activities. Accordingly, PR-1/Sf9 was used at protein concentrations of 15, 30, and 75 µg/ml, respectively, in agar diffusion assays against two fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Penicillium roqueforti*, against a yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture, and the Gram negative bacteria *Pseudomonas*

syringae and *Escherichia coli* as well as Gram positive *Bacillus subtilis*. The arrangement of controls and different PR-1/Sf9 concentrations on the Petri dishes is shown in Fig. 4A. After 24 h (bacteria, yeast) and 72 h (fungi) of incubation, the zone of growth inhibition was determined. As shown in Fig. 4B, growth of *S. cerevisiae* was not affected. The same result was obtained for bacterial growth in the case of *E. coli* (Fig. 4C; however the presence of PR-1/Sf9 did show an effect on the growth of both *B. subtilis* and *P. syringae* (Fig. 4C). Here, growth inhibition zones were visible and their sizes were determined to be 1.0, 1.28, 1.80 cm for *B. subtilis* and 1.34, 1.70, 1.94 cm for *P. syringae* (at 15, 30, 75 µg/ml of PR-1/Sf9 protein) indicating that the level of inhibition was depending on the concentrations of PR-1/Sf9. Strikingly, no growth inhibition was detectable for the fungi tested (Fig. 4D). In an additional assay all three bacterial species were tested for their growth in liquid cultures in the absence and presence of PR-1/Sf9 (Fig. 4E). Whereas

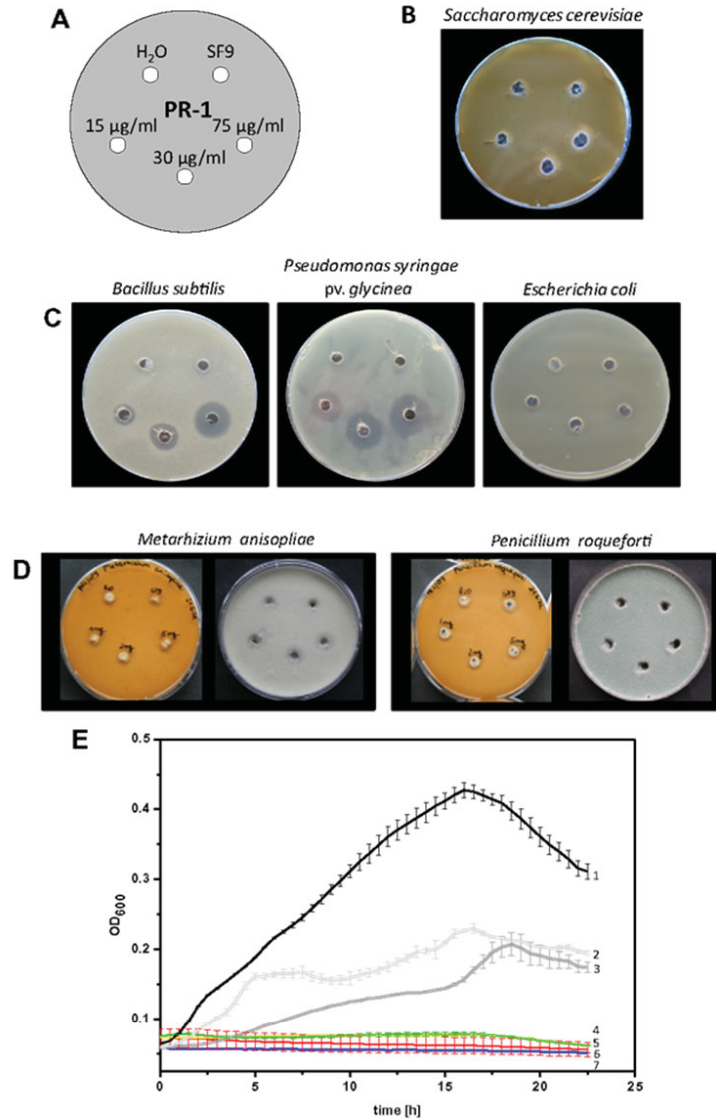


Fig. 4. (A) Distribution pattern of controls and different PR-1/Sf9 protein concentrations being tested on Petri dishes. Shown are 5 cavities for 50 ml each, 2 for control samples, water and Sf9 cell culture medium, and 3 for the different concentrations of PR-1/Sf9 protein (15, 30, 75 µg/ml). (B) Agar plates cultivating *S. cerevisiae* (72 h); (C) Plates with three bacteria cultures, *B. subtilis*, *P. syringae* and *E. coli* (24 h); (D) Plates with two fungi, *M. anisopliae* and *P. roqueforti* (72 h); all microorganisms were grown in the presence of different concentrations of PR-1/Sf9. After the time indicated the growth inhibition zones were measured. (E) Bacterial growth assay in a microtiter plate testing antimicrobial property of NmPR-1/Sf9 on *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *Escherichia coli* cultures. Culture growth (at 30 °C) was measured every 30 min for 22 h with and without PR-1/Sf9. OD₆₀₀ of the inhibited cultures did not reach a value above 0.1.

without PR-1/Sf9 the bacteria grew well (Fig. 4E, line 1, 2, 3), in the presence of PR-1/Sf9 the growth of all three species was strongly affected (Fig. 4E, line 4, 5, 6). These results confirmed the results of agar diffusion assay, except that here in addition the growth of *E. coli* was inhibited as well.

Often the activities of PR-1 proteins have been studied in transgenic systems where the proteins were constitutively expressed. For example, in tobacco, transformed plants became slightly more resistant to various diseases induced by oomycetes, but not to diseases caused by a fungus, *Cercospora nicotianae*, or the bacterium *P. syringae* pv. *tabaci* (Broekaert et al., 2000). In contrast, overexpres-

sion of a TMV-inducible basic PR-1-encoding gene from pepper in tobacco enhanced tolerance not only to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, but also to the bacteria *Ralstonia solanacearum* and *P. syringae* pv. *tabaci* (Sarowar et al., 2005). A direct antibacterial effect due to the presence of a PR-1 is shown in the present study for the first time and may offer biotechnological approaches.

Very recently, it has been shown that the pitcher fluid in *Nepenthes* is an unsuitable environment for microbes, exhibiting fungistatic and bactericidal activities, very likely in order to suppress the presence of nutrient competitors (Buch et al., 2013). A combination of antimicrobial secondary compounds and the presence of

proteins without known hydrolytic but antimicrobial activities such as thaumatin-like proteins (Buch et al., 2013; Hatano and Hamada, 2008; Rottloff et al., 2009) seems to accomplish this feature. Thus, it is tempting to speculate that PR-1 proteins contribute to the antimicrobial activities in the pitcher fluid of *Nepenthes* as well. To what extent the glycosylation of NmPR-1 might have an effect on its antibacterial activity remains to be elucidated in further studies where the protein will be expressed in a plant system to ensure similar glycosylation pattern like the one occurring in *Nepenthes*.

Conclusions

The presence of defense-related compounds in the pitcher fluid of *Nepenthes* suggests that the plant actively generates an environment which is unsuitable for microbes. Consequently, PR-proteins are employed as well, including PR-1. In case of NmPR-1, the presence of a signal peptide, the identification of a related peptide in the pitcher fluid, as well as its glycosylation strongly indicates that NmPR-1 is secreted into the digestive fluid. Due to the strong proteolytic activities in the digestive fluid it is comprehensible that many plant-derived proteins need to be protected by modifications such as glycosylation as it has been found for NmPR-1. Its antibacterial, in place of antifungal, activity however was an unexpected feature that nicely indicates the importance for a detailed analysis of obviously known proteins.

Experimental

Organisms, culture conditions and chemicals

N. mirabilis plants were grown in the greenhouse of the Max Planck Institute for Chemical Ecology in Jena under controlled conditions: photoperiod of 15 h light/9 h dark; day/night temperature of 18–20 °C/16–18 °C; about 55% humidity. Plants were sprayed every day and watered every second day using rain water.

Sf9 insect cells were used for transfection and expression of PR-1 protein. This cell line was originated from the IPLBSF-21 cell line, which was derived from the pupal ovarian tissue of the moth species *Spodoptera frugiperda*. Sf9 cells were cultured at 27 °C in SF-900 II serum-free medium (Gibco®) containing 50 µg/ml gentamycin.

Microorganisms for agar diffusion assays were grown on agar plates with respective media; *B. subtilis* and *E. coli* on LB- (Luria Bertani) medium (5 g/l yeast extract; 10 g/l trypton; 10 g/l NaCl), incubated at 37 °C; *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, cultured and maintained on King's B agar (King et al., 1954) at 28 °C. The yeast, *S. cerevisiae*, and both fungi, *M. anisopliae* and *P. roqueforti* were cultured on YM- (Yeast medium; 3 g/l yeast extract, 3 g/l malt extract, 5 g/l pepton, 10 g/l glucose) agar at 28 °C.

All chemicals used were of analytical grade and purchased from Roth (Karlsruhe, Germany), if not specified otherwise.

RNA preparation and cDNA synthesis

Plant tissue was collected by cutting off a pitcher and using only the lower third with multicellular glands for homogenization. Total RNA was isolated using the InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit (Stratag Molecular, Berlin, Germany) following the manufacturer's protocol. Total RNA was further cleaned-up and concentrated using RNeasy MinElute Cleanup Kit (Quiagen, Hilden, Germany). First-Strand cDNA was synthesized applying SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Darmstadt, Germany) using 2 µg total RNA, according to the manufacturer's protocol.

Cloning and heterologous expression

Degenerate primers, which were designed according to conserved protein sequences of known plant PR-1 proteins (NCBI GenBank), were used for amplification of a fragmental cDNA sequence. Cloning the 5'- and 3'-end of *N. mirabilis* PR-1 (*NmPR-1*) cDNA was accomplished by rapid amplification of cDNA ends (RACE PCR) using total RNA and the FirstChoice® RLM-RACE Kit (Applied Biosystems/Ambion, Darmstadt, Germany) guided by the manufacturer's protocol. Primers were designed by using DNASTAR Lasergene® Software (GATC BIOTECH, Konstanz, Germany). The resulting amplified products were cloned into a pCR4®-TOPO®-vector, and the resulting plasmid was subjected to nucleotide sequencing (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany). The complete *NmPR-1* cDNA sequence was amplified by PCR using Pfu DNA Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), and the primers: forward 5'-CCAAATGGCTTTTCCAACCTC-3' and reverse 5'-TCAGGTCACATAACAAGACATGAA-3' (PCR-protocol: 0.5 min at 98 °C; 35 cycles of 10 s at 98 °C, 15 s at 66 °C, 15 min at 72 °C; and 5 min at 72 °C).

The open reading frame lacking the signal peptide from *N. mirabilis* PR-1 was amplified by PCR using AccuPrime™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Darmstadt, Germany) and cDNA as a template with the following primers: forward 5'-TAATGCATGCAGAACGACAAACAAGAC TCCT-3', containing SphI restriction site (underlined) and reverse 5'-ATTACCGCGGTACGG ATACTGTCGACAATA-3', containing SacII restriction site (underlined), designed according to the conserved protein sequence of PR-1 from *N. mirabilis* (Genbank Accession No. GQ337079); (PCR-protocol: 1 min at 95 °C; 30 cycles of 15 s at 95 °C, 30 s at 60 °C, 1 min at 68 °C; and 5 min at 68 °C).

The NmPR-1 PCR product obtained was further cloned into pMIB/V5-His vector B (Invitrogen) in order to provide a C-terminal peptide that contains both a V5 epitope for immunoblot-based detection, a His-tag for purification, and the feature that expressed proteins are secreted into the medium. The correct insertion of the PCR product was verified by DNA sequencing (Eurofins MWG Operon; Ebersberg, Germany). Sf9 cells were transfected in 60-mm diameter Petri dishes with 4 µg of plasmid DNA using Insect Gene Juice (Novagen®, Nottingham, UK) as transfection reagent. 48 h post-transfection, cells were splitted 1:5 in a new 60-mm diameter Petri dish and were selected with 80 µg/ml blasticidin until they reached confluency. PR-1/Sf9 cell culture medium was harvested after 4 days of culturing past splitting. Subsequently, 80 ml of PR-1/Sf9 culture media were concentrated 10-fold using Pierce® Concentrator 20 ml/9 K (MWCO: 9000), and subsequently dialyzed using Slide-A-Lyzer® 10 K (MWCO: 10,000) Dialysis Cassettes (Thermo Scientific, Rockford, USA), following the manufacturer's protocol.

Protein biochemistry

Protein analysis of collected fluids of various *Nepenthes* species using SDS-PAGE of TCA-precipitated proteins followed by in-gel tryptic digestion, desalting and concentration (ZipTip columns, C18-RP, Millipore, Schwalbach, Germany) and subsequent micro-sequencing of peptides obtained was done exactly as described (Rottloff et al., 2011). Expression of the recombinant NmPR-1 protein in stably transfected Sf9 cells (NmPR-1/Sf9) was analyzed by Western blot after SDS-PAGE and transfer of the proteins on PVDF-membranes using the anti-V5 horseradish peroxidase antibody (Invitrogen) for detection. For treatments of PR-1/Sf9 protein, either 8 M urea or the peptide-N-glycosidase PNGase F (NEB, Frankfurt/Main, Germany) was used following exactly the manufacturer's protocol. Such experiments were analyzed via Western blot using an anti-V5 horseradish

peroxidase-labeled antibody (Invitrogen) and ECL (enhanced chemoluminescence) for detection.

Real-time PCR

Total RNA was isolated from *N. mirabilis* leaf base and from two different parts of a closed pitcher: the slippery zone at the top and the digestive zone at the bottom, using the InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit (Stratag Molecular, Berlin, Germany), following the manufacturer's protocol. cDNA synthesis was performed as described above using 300 ng total RNA. Actin (*NmAct*) and 18S rRNA (*Nm18SrRNA*) were chosen as internal control genes. The following primers were used: *NmAct*_f: 5'-CTCTAACCCTAAAGCAAACAGG-3', *NmAct*_r: 5'-GTGAGAGAACAGCCTGGATG-3' Rottloff et al. (2011); *Nm18SrRNA*_f: 5'-CTTGATTCTATGGGTGGTGGTG-3', *Nm18SrRNA*_r: 5'-GTTAGCAGGCTGAGGTCTC-3' Rottloff (2011). Primers for *NmPR-1* were designed using Primer3Plus software (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>): *NmPR-1*_f: 5'-ACTGTGGCGCTTATGCTCT-3' and *NmPR-1*_r: 5'-GCTGATAAGTCGGGTGATCC-3'. Quantitative real-time PCR was performed on a CFX96™ Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, Munich, Germany). The process was done with Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) using 60 ng of cDNA following the manufacturer's guidelines. The following PCR-program was used: initial polymerase activation at 95 °C for 3 min, 40 cycles at 95 °C for 30 s, 60 °C for 1 min and 72 °C for 1 min. Relative RNA levels were calibrated and normalized with the levels of actin- and 18S rRNA mRNA by determining the efficiency of every single reaction using the CFX Manager™ Software (Version 3.0, BIO-RAD). Calculation of expression levels and statistical analyses were also performed with the BIO-RAD-software. Data are from triplicates.

Analysis of antimicrobial activities of PR-1

NmPR-1/Sf9 protein was tested at different concentrations in agar diffusion assays against various bacteria, *P. syringae* pv. *glycinea* strain 1a, *B. subtilis* and *E. coli*, against yeast *S. cerevisiae*, and against two fungi, *M. anisopliae* and *P. roqueforti*. Because PR-1/Sf9 culture medium was diluted with pure water to get different protein concentrations, a H₂O control was included. In addition, culture medium from untransfected Sf9 cells that was treated as the PR-1/Sf9 cell culture medium was used as a control as well.

To receive suitable results, five replicates for each strain were used. All organisms were grown on agar plates providing their specific composition (see above). From that, fresh cells were taken, resuspended in 3 ml pure water and set to an OD₆₀₀ value of 1. Two ml of each cell suspension were given to 48 ml, 50 °C tempered organism-specific medium, mixed and filled in Petri dishes (ø 135 mm). Per plate, 5 holes (ø 7–8 mm) were stamped and filled with 50 µl test- and control solution. After a certain incubation time (24 h for bacteria and yeast cells; 72 h for fungi), growth inhibition zone was measured and documented.

NmPR-1/Sf9 was further tested for antimicrobial effects on bacteria, *B. subtilis*, *P. syringae* pv. *glycinea* and *E. coli*. Therefore, 100 µl of PR-1/Sf9 solution (75 µg protein/ml) and 80 µl LB-medium were pipetted in a sterile 96-well microtiter plate and filled up with 20 µl of freshly grown bacterial cultures (OD₆₀₀ ≈ 0.5–0.6) to a final volume of 200 µl. As a control, 100 µl NmPR-1/Sf9 solution with only 100 µl LB-medium was used. For this test six technical replicates were used. Bacterial growth was determined at OD₆₀₀ for 22 h every 30 min by using the SPECTRAMax 250-Photometer against the control.

Bioinformatics and phylogenetic analysis

The putative signal peptide was predicted using the SignalP 4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) (Bendtsen et al., 2004). Prediction of putative N-glycosylation sites was done employing NetNGlyc server available at: (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). For homology modeling a three-dimensional model of NmPR-1 was built with the automated comparative modeling program SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/workspace>, Arnold et al., 2006; Schwede et al., 2003). As homologous protein template, the NMR solution structure of P14a (Swiss Prot: P04284) a PR-1 protein from tomato (*Solanum lycopersicon*) (Fernández et al., 1997), with a sequence similarity to NmPR-1 of 68% was used. For identification and prediction of protein domains the NCBI Conserved Domain Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?>) was used (Marchler-Bauer et al., 2011).

For phylogenetic analysis, the amino acid sequence of PR-1 from *N. mirabilis* was blasted against protein sequences of other plants (NCBI), followed by a protein alignment using MUSCLE 3.7, which was available at (http://www.phylogeny.fr/version2.cgi/one-task.cgi?task_type=muscle) (Dereeper et al., 2008). To carry out comparative analysis of the molecular data set of PR-1, "Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 5" (MEGA5) software (Tamura et al., 2011) was used to reconstruct the evolutionary histories of species and to infer phylogenetic relationships. After loading the aligned PR-1 sequences, a Maximum Likelihood (ML) analyses for inferring evolutionary trees was done and in parallel a Neighbor-Joining tree was built. The Maximum Likelihood method based on the before selected best-fit substitution model called Whelan and Goldman model (Whelan and Goldman, 2001). For this a discrete gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites. ML as well as NJ analysis involved 23 PR-1 amino acid sequences. In addition, for NJ method (Saitou and Nei, 1987), the evolutionary distances were computed using the JTT matrix-based technique (Jones et al., 1992) and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. The rate variation among sites was modeled with a gamma distribution. In this study the ML and NJ method were combined in one tree regarding to the bootstrap values. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed. The percentages of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein, 1985).

In addition, a prediction of N-glycosylation sites for the other tested plant species was done with NetNGlyc software.

Acknowledgements

We thank Birgit Arnold and the whole greenhouse team at the MPI for Chemical Ecology for growing *Nepenthes* plants, the Botanical Gardens in Jena and Munich for providing plants and samples, and Wilhelm Boland and the Max Planck Society as well as Ralf Oelmüller, FS University Jena, for support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.01.014>.

References

- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T., 2006. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22, 195–201.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S., 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340, 783–795.

- Bol, J.F., Linthorst, H.J.M., Cornelissen, B.J.C., 1990. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 113–138.
- Broekaert, W.F., Terras, F.R.G., Cammue, B.P.A., 2000. Induced and preformed antimicrobial proteins. In: Slusarenko, A.J., Fraser, R.S.S., van Loon, L.C. (Eds.), *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Kluwer, Dordrecht, pp. 371–477.
- Buch, F., Rott, M., Rottloff, S., Paetz, C., Hilke, I., Raessler, M., Mithöfer, A., 2013. Secreted pitfall-trap fluid of carnivorous *Nepenthes* plants is unsuitable for microbial growth. *Ann. Bot.* 111, 375–383.
- Cantacessi, C., Campbell, B.E., Visser, A., Geldhof, P., Nolan, M.J., Nisbet, A.J., Matthews, J.B., Loukas, A., Hofmann, A., Otranto, D., Sternberg, P.W., Gasser, R.B., 2009. A portrait of the “SCP/TAPS” proteins of eukaryotes – developing a framework for fundamental research and biotechnological outcomes. *Biotechnol. Adv.* 27, 376–388.
- Chow, L.-P., Chiu, L.-L., Khoo, K.-H., Peng, H.-J., Yang, S.-Y., Huang, S.-W., Su, S.-N., 2005. Purification and structural analysis of the novel glycoprotein allergen Cyn d 24, a pathogenesis-related protein PR-1, from Bermuda grass pollen. *FEBS J.* 272, 6218–6227.
- Cutt, J.R., Harpster, M.H., Dixon, D.C., Carr, J.P., Dunsmuir, P., Klessig, D.F., 1989. Disease response to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco plants that constitutively express the pathogenesis-related PR1b gene. *Virology* 173, 89–97.
- Darwin, C., 1875. *Insectivorous Plants*. John Murray, London.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.-M., Gascuel, O., 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 36, W465–W469.
- Eilenberg, H., Pnini-Cohen, S., Rahamim, Y., Sionov, E., Segal, E., Carmeli, S., Zilberstein, A., 2010. Induced production of antifungal naphthoquinones in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *J. Exp. Bot.* 61, 911–922.
- Eilenberg, H., Pnini-Cohen, S., Schuster, S., Movtchan, A., Zilberstein, A., 2006. Isolation and characterization of chitinase genes from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *J. Exp. Bot.* 57, 2775–2784.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence-limits on phylogenies – an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Fernández, C., Szyperki, T., Bruyère, T., Ramage, P., Mössinger, E., Wüthrich, K., 1997. NMR solution structure of the pathogenesis-related protein P14a. *J. Mol. Biol.* 266, 576–593.
- Gaume, L., Gorb, S., Rowe, N., 2002. Function of epidermal surfaces in the trapping efficiency of *Nepenthes alata* pitchers. *New Phytol.* 156, 479–489.
- Hatano, N., Hamada, T., 2008. Proteome analysis of pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *J. Proteome Res.* 7, 809–816.
- Hatano, N., Hamada, T., 2012. Proteomic analysis of secreted protein induced by a component of prey in pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *J. Proteomics* 75, 4844–4852.
- Heslop-Harrison, Y., 1975. Enzyme release in carnivorous plants. In: Dingle, J.T., Dean, R.T. (Eds.), *Lysozymes in Biology and Pathology*. North Holland Publishing Company, Amsterdam, pp. 525–578.
- Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M., 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* 8, 275–282.
- Juniper, B.E., Robins, R.J., Joel, D.M., 1989. *The Carnivorous Plants*. Academic Press, London.
- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E., 1954. 2 simple media for the demonstration of pycocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44, 301–307.
- Lu, S., Faris, J.D., Sherwood, R., Edwards, M.C., 2013. Dimerization and protease resistance: new insight into the function of PR-1. *J. Plant Physiol.* 170, 105–110.
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.L., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Omelchenko, M.V., Robertson, C.L., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zhang, N., Zheng, C., Bryant, S.H., 2011. CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.* 39 (Suppl.), D225–D229.
- Mithöfer, A., 2011. Carnivorous plants: new insights in an old topic. *Phytochemistry* 72, 1678–1682.
- Rauscher, M., Adam, A.L., Wirtz, S., Guggenheim, R., Mendgen, K., Deising, H.B., 1999. PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. *Plant J.* 19, 625–633.
- Riedel, M., Eichener, A., Jetter, R., 2003. Slippery surfaces of carnivorous plants: composition of epicuticular wax crystals in *Nepenthes alata* Blanco pitchers. *Planta* 218, 87–97.
- Rottloff, S., 2011. *Analyse der Proteinkomposition der Verdauungsflüssigkeit aus Kannen von Nepenthes sp.* (Dissertation). Friedrich-Schiller University, Jena, Germany.
- Rottloff, S., Müller, U., Kilper, R., Mithöfer, A., 2009. Micropreparation of single secretory glands from the carnivorous plant *Nepenthes*. *Anal. Biochem.* 394, 135–137.
- Rottloff, S., Stieber, R., Maischak, H., Turini, F.G., Heubl, G., Mithöfer, A., 2011. Functional characterization of a class III acid endochitinase from the traps of the carnivorous pitcher plant genus, *Nepenthes*. *J. Exp. Bot.* 62, 4639–4647.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method – a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Sarowar, S., Kim, Y.J., Kim, E.N., Kim, K.D., Hwang, B.K., Islam, R., Shin, J.S., 2005. Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell Rep.* 24, 216–224.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., Peitsch, M.C., 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31, 3381–3385.
- Serrano, R.L., Kuhn, A., Hendricks, A., Helms, J.B., Sinning, I., Groves, M.R., 2004. Structural analysis of the human Golgi-associated plant pathogenesis related protein GAPR-1 implicates dimerization as a regulatory mechanism. *J. Mol. Biol.* 339, 173–183.
- Shental-Bechor, D., Levy, Y., 2008. Effect of glycosylation on protein folding: a dose book at thermodynamic stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 8256–8261.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- van Loon, L.C., van Strien, E.A., 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 85–97.
- van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.N.J., 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135–162.
- Whelan, S., Goldman, N., 2001. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol. Biol. Evol.* 18, 691–699.

Zusätzliche Informationen (Appendix A. Supplementary data) zu Manuskript 2:

Franziska Buch, Yannick Pauchet, Matthias Rott, Axel Mithöfer (2014): Characterization and heterologous expression of a PR-1 protein from traps of the carnivorous plant *Nepenthes mirabilis*. *Phytochemistry* **100**: 43-50.

Supplementary material

Figure S1

Full and short names of all plant species included in the phylogenetic analysis as well as the accession numbers of related PR-1 protein sequences.

Short name	Plant Species	Accession no.
ARTH1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_179064.1
BEVU1	<i>Beta vulgaris</i>	CAP66260.1
BRNA1	<i>Brassica napus</i>	AAB06458.1
CAAN1	<i>Capsicum annuum</i>	AAK30143.1
CYOB1	<i>Cydonia oblonga</i>	AFK64734.1
ELGU1	<i>Elaeis guineensis</i>	ACF06544.1
EUWA1	<i>Eutrema wasabi</i>	BAF03626.1
FIPU1	<i>Ficus pumila</i> var. <i>awkeotsang</i>	AFK93500.1
LOJA1	<i>Lotus japonicas</i>	AFK39516.1
MADO1	<i>Malus x domestica</i>	ABC47922.1
METR1a	<i>Medicago truncatula</i>	XP_003593358.1
METR1b	<i>Medicago truncatula</i>	AFK38989.1
METR1c	<i>Medicago truncatula</i>	AFK35640.1
NITA1a	<i>Nicotiana tabacum</i>	CAA29022.1
NITA1b	<i>Nicotiana tabacum</i>	CAA31010.1
POTR1a	<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002313934.1
POTR1b	<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002313935.1
PRPE1	<i>Prunus persica</i>	AEV57468.1
PYCO1	<i>Pyrus communis</i>	AFM76999.1
RICO1	<i>Ricinus communis</i>	XP_002522071.1
SOTO1	<i>Solanum torvum</i>	BAB78476.1
VIVI1	<i>Vitis vinifera</i>	ADN43427.1
NEMI1	<i>Nepenthes mirabilis</i>	ACT99721

Manuskript 3

Title: Nepenthesin protease activity indicates digestive fluid dynamics in carnivorous *Nepenthes* plants

Authors: Franziska Buch¹, Wendy E. Kaman^{2,3}, Floris J. Bikker³, Ayufu Yilamujiang¹, and Axel Mithöfer^{1*}

Affiliations:

¹Department of Bioorganic Chemistry, Max Planck Institute for Chemical Ecology, Hans Knöll Straße 8, D-07745 Jena, Germany.

²Department of Medical Microbiology and Infectious Diseases, Erasmus MC, 's-Gravendijkwal 230, 3015 CE Rotterdam, The Netherlands

³Department of Oral Biochemistry, Academic Centre for Dentistry Amsterdam, University of Amsterdam and VU University Amsterdam, Gustav Mahlerlaan 3004, 1081 LA Amsterdam, The Netherlands

*Running title: Easy detection of proteases in *Nepenthes*

*Author for correspondence: Axel Mithöfer

e-mail: amithoefer@ice.mpg.de; Phone: +49 3641 571263; Fax: +49 3641 571202

Franziska Buch fbuch@ice.mpg.de

Wendy E. Kaman w.kaman@erasmusmc.nl

Floris J. Bikker F.Bikker@acta.nl

Ayufu Yilamujiang ayilamujiang@ice.mpg.de

Submission date: 04.08.2014 words: 5983, figures/tables:7, Suppl. figures/tables: 5

1 Abstract

2 Carnivorous plants use different morphological features to attract, trap and digest
3 prey, mainly insects. Plants from the genus *Nepenthes* possess specialized leaves,
4 pitfall-traps or pitchers. These pitchers are filled with a digestive fluid that is
5 generated by the plants themselves. In order to digest caught prey in their pitchers,
6 *Nepenthes* plants produce aspartic proteases, nepenthesins (Nep). Today, knowledge
7 about the generation and induction of these proteases is limited. Here, we describe a
8 FRET (fluorescent resonance energy transfer)-based technique that uses a synthetic
9 fluorescent substrate for the easy and rapid detection of protease activities in the
10 digestive fluids of various *Nepenthes* species. Inhibitor studies and the heterologously
11 expressed Nep II from *Nepenthes mirabilis* proved that the proteolytic activity relied
12 on aspartic proteases after an acid-mediated auto-activation mechanism. Employing a
13 FRET-based approach, the induction and dynamics of nepenthesin in the digestive
14 pitcher fluid of various *Nepenthes* plants could be studied directly with insect
15 (*Drosophila melanogaster*) prey or plant material. Moreover, we observed that
16 proteolytic activity was induced by the phytohormone jasmonic acid but not by
17 salicylic acid suggesting that jasmonate-dependent signaling pathways are involved in
18 plant carnivory.

19

20 **Keywords:** carnivorous plants; digestive fluid; aspartic protease induction;
21 *Nepenthes*; FRET (fluorescent resonance energy transfer); jasmonic acid

22

23 Introduction

24

25 Charles Darwin's work "Insectivorous Plants" published in 1875 (Darwin, 1875) still
26 contains much of what we know about those specialized plants. However, Darwin did
27 not know about the genus *Nepenthes*, which is distributed primarily in Southeast Asia.
28 *Nepenthes* pitcher plants have so-called pitfall-traps that are divided into *i*) an upper
29 part representing the attraction zone, *ii*) a part in the middle representing the slippery
30 zone, and *iii*) a lower part, the digestion zone. Pitchers are filled with a digestive fluid,
31 or enzyme cocktail, to digest caught prey (Heslop-Harrison, 1975, Juniper BE et al.,
32 1989). Even closed pitchers have such a fluid, which is both plant-derived and sterile
33 (Buch et al, 2013). Since Darwin, scientists have known that hydrolytic activity -- in
34 particular, proteolytic activity -- is present in insectivorous plants. In addition to
35 proteases, the digestive fluid of *Nepenthes* spp. is known to contain various esterases,
36 phosphatases, ribonucleases and different chitinases (e.g. Heslop-Harrison, 1975,
37 Juniper BE et al., 1989, Eilenberg et al., 2006, Rottloff et al., 2013, Mithöfer, 2011).
38 Proteases in digestive fluid from several species of *Nepenthes* have also been
39 described (Vines, 1897), purified and characterized (Steckelberg et al., 1967,
40 Nakayama and Amagase, 1968, Amagase et al., 1969, Jentsch, 1972, Tökés et al.
41 1974). However, only An et al. (2002) cloned nepenthesins from the pitcher tissue of
42 *N. alata*. Two years later nepenthesin I and II from *N. distillatoria* were purified and
43 characterized (Athauda et al., 2004). After the nepenthesin cDNAs were cloned from
44 *N. gracilis* pitchers (Athauda et al., 2004), these proteases were identified as members
45 of a new subfamily of aspartic proteases (Athauda et al., 2004, Takahashi et al., 2005,
46 Takahashi, 2006). In addition, Stephenson and Hogan (2006) reported a cysteine
47 protease in *N. ventricosa*.

48 Otherwise, little is known about the regulation and induction of hydrolytic
49 enzymes involved in the digestive process in carnivorous plants. In recent years, gene
50 induction analyses were carried out on the tissue of the pitcher to search for hydrolytic
51 enzymes (Eilenberg et al., 2006, Rottloff et al., 2013, Kadek et al., 2014). This also
52 holds true for the very prominent aspartic proteases in *Nepenthes* (An et al., 2002),
53 although the proteolytic activity in the pitcher fluid represents an ideal target to follow
54 and study dynamic processes during carnivory in *Nepenthes* pitfalls. But up to now,
55 the low amounts of enzymes in the pitchers have made it impossible to analyze
56 changes in the digestive fluid depending on developmental stages of the pitcher or in
57 response to prey capture.

58 Here, we report on the introduction of a new technique, the highly sensitive
59 FRET (fluorescent resonance energy transfer), for the direct, easy and rapid detection
60 and characterization of protease activity in the digestive fluids of *Nepenthes*. Using a
61 synthetic fluorogenic substrate, i.e. FRET peptide, we investigated the dynamics of
62 protease activity in response to various stimuli. In addition, we cloned and expressed
63 the proteases involved in the enzymatic reaction, nepenthesin I and II.

64

65

66 **Material and methods**

67

68 *Organisms and culture conditions*

69 *Nepenthes* plants (*N. mirabilis*, *N. alata*) were grown in the greenhouse of the Max
70 Planck Institute for Chemical Ecology in Jena under controlled conditions. The plants
71 were cultivated in a growth chamber with a photoperiod of 15 h light/9 h dark,
72 day/night temperature of 18-20 °C/ 16-18 °C and humidity about 55%. Every day,
73 plants were sprayed and every second day they were watered with rain water.

74 Both tissue from the lower part of the pitchers and pitcher fluid from *N.*
75 *mirabilis* and *N. alata* were used for this study. As well, the pitcher fluid of other
76 *Nepenthes* species (*N. reinwardtiana*, *N. distillatoria*, *N. wittei*, *N. hookariana*, *N.*
77 *boschiana*, *N. maxima*, *N. eymae* and the hybrid *N. alata* x *N. ventricosa*), which were
78 grown in the greenhouses of the Botanical Gardens in Jena and Munich, were used for
79 fluorescence intensity measurements. The pitcher fluid samples were collected from
80 closed pitchers using a sterile syringe, from open pitchers by pouring fluid directly
81 into 15 ml sterile Falcon tubes.

82 *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells, derived from the pupal ovarian tissue of the
83 insect and originating from the IPLBSF-21 cell line, were used for the transfection
84 and expression of the *Nepenthes* aspartic proteinases, nepenthesin (Nep) I and II.
85 They were cultured at 27 °C in Sf-900 II serum-free medium (sf- medium) (Gibco®)
86 in presence of 50 µg/ml gentamycin.

87

88 *Measuring protease activity with fluorescent substrate and FRET*

89 Using a small and highly specific FRET peptide substrate (FITC(Ahx)-Val-Val-
90 LysDbc), encoded as PFU-093 by Kaman et al. (2011, 2013), we measured the
91 proteolytic activity of the pitcher fluid. PFU-093, one of many substrates developed to
92 study the presence of bacteria *in situ* (saliva, sputa, serum), was designed with
93 fluorescein isothiocyanate (FITC) operating as a fluorophore and LysDbc acting as its
94 quencher. When both molecules are physically close, the connection made by the two-
95 amino acid bridge quenches the fluorescence and no activity can be detected (Fig.
96 S1A). However, when proteolytic activity separates the fluorophore and quencher,
97 fluorescence intensity can be measured using a microplate reader (Tecan infinite
98 M200, Männedorf, Switzerland) (Fig. S1B). We mixed 50 µl of *Nepenthes* pitcher

99 fluid, 49 μl pure water (GIBCO®) for dilution and 1 μl of 80 μM PFU-093 in black
100 96-well microtiter plates (Greiner Bio-one GmbH®, Frickenhausen, Germany), and
101 measurements were taken for up to 11 h. The fluorescence activity was measured at
102 42 °C and a manual gain of 80 by top reading with an excitation/ emission wavelength
103 of 485 nm/ 530 nm.

104

105 *Biochemical studies*

106 The impact of pH on the FRET method was tested by incubating 500 μl *N. alata*
107 pitcher fluid mixed with 245 μl pure water and 5 μl of 80 μM PFU-093. After 10 h at
108 42 °C, 50 μl each of this mixture was transferred into 10 different wells and mixed
109 with another 50 μl of various 30 mM buffer solutions (pH 2, pH 3, pH 4, up to pH 10)
110 with H₂O as a control. Then fluorescence was measured and the following categories
111 were used: for an acidic range, citrate buffer from pH 2 to 4.9; for an acid-base
112 balance, phosphate buffer from pH 4.9 to pH 8.5; and for a basic pH range, glycine
113 buffer from pH 8.5-10.

114 To verify the stability of the reaction, digestive fluid was pre-incubated with
115 30 mM citrate buffer pH 4.0 for 10 h at 42 °C; as a control, pre-incubation was done
116 with water. For fluorescence measuring, 50 μl of this mixture was either topped up
117 with 30 mM phosphate buffer pH 8 or with 30 mM citrate buffer pH 4.

118 Inhibitor tests were performed by mixing 50 μl of pitcher fluid, 1 μl of 80 μM
119 PFU-093 and various inhibitors at different concentrations: including 100 μM
120 phenanthroline, 100 μM AEBSF, 20 μM E-64 and 100 μM pepstatin A. Samples were
121 topped off with pure water to 100 μl final volume and measured as described earlier,
122 including the inhibitors solvents (DMSO, MeOH, H₂O) and pure pitcher fluid for
123 control.

124

125 *Determination of substrate cleavage site*

126 To determine the cleavage site of PFU-093 substrate cleaved by *Nepenthes* aspartic
127 proteases, Nep I/ II, HPLC-MS was performed. For this measurement, 495 µl pitcher
128 fluid of both *N. mirabilis* and *N. alata*, as well as 5 µl of 80 µM PFU-093 substrate,
129 was added to 1.5 ml safe-lock tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) and
130 incubated for 11 h at 42 °C. This mixture was concentrated by drying and
131 subsequently resolved in 60 µl H₂O. Of the concentrated probe, 20 µl was injected
132 into a Dionex UltiMate 3000 HPLC system, equipped with a Kinetex C18 column and
133 connected to a Thermo Fisher LTQ for MS. ESI-MS in positive ion mode was used
134 for searching three different fragment masses; m/z 397.47, m/z 496.28, m/z 619.8 (Fig.
135 S1C).

136

137 *RNA preparation and cDNA synthesis*

138 Tissue samples were collected by cutting a pitcher for homogenization, using only the
139 lower third, i.e. the part that possesses the multicellular glands (Buch et al., 2014).
140 Total RNA from the lower part of one *N. mirabilis* pitcher was isolated using the
141 InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit (Stratec Molecular, Berlin, Germany) following
142 the manufacturer's protocol. For RNA cleanup and concentration RNeasy MinElute
143 Cleanup Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used. First-strand cDNA was
144 synthesized using SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen,
145 Darmstadt, Germany) as well as up to 5 µg total RNA according to the specified
146 protocol.

147

148

149 *Rapid amplification of cDNA ends (RACE), cloning and sequencing*

150 Known nucleotide nepenthesin sequences from *N. gracilis* and *N. alata* (NCBI
151 genbank accession numbers: NgNepI: AB114914.1, NgNepII: AB114915.1, NaNepI:
152 AB266803.1) were aligned (CLASTALW-software, [http://www.genome.jp/tools/
153 clustalw/](http://www.genome.jp/tools/clustalw/)) and compared. Specific primers for both nepenthesin I and II were designed
154 in regions where 100% identity was found (for primer sequences 1-4, see Tab. S1).
155 These primers were used to amplify fragments of cDNA sequences using *N. mirabilis*
156 cDNA as a template for the PCR reactions. Subsequently, the amplified products were
157 cloned into a pCR® 2.1-TOPO® vector following the described TOPO TA cloning
158 protocol (Invitrogen, Darmstadt, Germany) and sent for sequencing (Eurofins MWG
159 Operon, Ebersberg, Germany). The resulting partial sequences were used to design *N.*
160 *mirabilis* Nep I and II RACE primers via version 4.0.0. of Primer3Web software
161 (Untergrasser et al., 2012) (for RACE primer sequences 5-8, see Tab. S1). For
162 generating 5'- and 3'- RACE-Ready cDNA, the manual of the SMARTer RACE
163 cDNA Amplification Kit (Clontech, Mountain View, CA, Canada/ USA) was
164 followed. The generation of 5' and 3' cDNA fragments of Nep I and II was described
165 as 5'- RACE and 3'- RACE PCR reactions in the manufacturer's manual. To clean
166 and concentrate DNA, DNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research, Irvine, CA,
167 USA) was used. The resulting amplified products were cloned into a pCR® 2.1-
168 TOPO® vector following the described procedure (see above). The resulting plasmids
169 were sequenced by Eurofins MWG Operon. The complete Nep I and II cDNA
170 sequences were identified by using the DNASTAR Lasergene® Software SeqMan
171 Pro (Madison, WI, USA). Subsequently, known Nep I and II protein sequences from
172 *N. gracilis* (*Ng*) and *N. alata* (*Na*) were compared with the sequences of *N. mirabilis*
173 (*Nm*). Protein sequences from NCBI Genbank were aligned by using "Jalview- *Open*

174 *Source* Bioinformatics”- Software (Waterhouse et al., 2009) and “MegAlign
175 (DNASTAR)”- software version 10.1.2.

176

177 *Expression in insect cells and Western blot*

178 For functional identification, cDNA was amplified with primer sequences 9-10 for
179 Nep I and primer sequences 11-12 for Nep. II (see Tab. S1) to obtain an open reading
180 frame (ORF) that lacks the predicted signal peptide (SP). The cDNA from Nep I and
181 II was subcloned in pMIB/V5-His vector A (Invitrogen, Darmstadt, Germany) for
182 transfection into Sf9 cells using lipid-mediated transfection. Cells were transfected in
183 60-mm diameter Petri dishes with 4 µg of plasmid DNA using Insect Gene Juice
184 (Novagen®, Nottingham, UK) as a transfection reagent. After 48 h, cells were split
185 1:5 in a 60-mm diameter Petri dish and selected with 80 µg/ ml blasticidin until they
186 reached confluency. Expression was analyzed by Western blot using the anti-V5
187 horseradish peroxidase antibody (Invitrogen).

188

189 *Auto-activation of Nepenthes mirabilis nepenthesin II*

190 Recombinant nepenthesin II (*NmNepII/Sf9*) from *N. mirabilis*, expressed in Sf9
191 culture medium, was dialyzed against pure H₂O (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes;
192 10.000 MWCO, Thermo Fisher Scientific, Bonn, Germany) for 24 h; the same was
193 done with Sf9 culture medium (Sf9cm) only for a control. Next, 500 µl of the
194 dialyzed *NmNepII/Sf9* and 500 µl of Sf9cm were incubated at room temperature; 60
195 µl 1 M glycine- HCl- buffer (pH 4) was added to promote auto-cleavage of the
196 protease and to get rid of the pro-peptide (in Nep II protein sequence at position 73)
197 by acidification. After 24 h of incubation at pH 4, 100 µl of 100 mM Tris- HCl buffer
198 pH 8.5 was added to both mixtures to achieve a more basic pH range to measure

199 fluorescence. Furthermore, 500 μ l of *NmNepII/SF9* and SF9cm was measured without
200 pre-incubation in pH 4 buffer. Fluorescence intensity measurements of each mixture
201 were taken every 5 min for 6 h in a microplate reader in a black 96-well plate with 5
202 technical replicates.

203

204 *Protease activities in Nepenthes pitcher fluids induced by different treatments*

205 To induce protease activity, the pitcher fluids of two *Nepenthes* species, *N. alata* and
206 *N. mirabilis*, were supplemented with *i)* fruit flies, *Drosophila melanogaster*, as
207 insects represent the natural food, and *ii)* a piece of *Nepenthes* leaf as plant-derived
208 food material. In addition, the phytohormones *iii)* jasmonic acid (JA), and *iiii)*
209 salicylic acid (SA) were also tested for their ability to induce protease activity. In both
210 cases the phytohormones were injected directly into the pitcher fluid.

211 Fluorescence activity was measured first for control values before feeding/ treating
212 *Nepenthes* plants (time point 0 h) and subsequently at different time points (from 24 h
213 to 240 h) samples were taken and analyzed for proteolytic activity using the PFU-093
214 substrate. Ten *D. melanogaster* flies, two pieces of 1.5 x 1.5 cm damaged *Nepenthes*
215 leaf, and approximately 200 μ M each of JA and of SA were added to the pitcher fluid.
216 Usually, three replicates were done; duplicates for feeding with *Nepenthes* leaf
217 material, and four repeats in the case of SA. Experiments were performed under semi-
218 sterile conditions by covering the pitchers with gauze before plants opened their lids
219 (Fig. 1).

220 As an additional experiment, the pH regulation in the digestive fluid was observed *in*
221 *vivo*: 5 pitchers were each challenged with 40 *D. melanogaster* flies. The pH of
222 digestive fluids was measured before (0 h) and at different time points (between 2 and
223 192 h) after treatment by immersing test strips directly into the pitcher fluid.

224 Measurements included two control pitchers without fruit flies. In addition, 200 µl
225 samples taken at various time points (0, 96, 144, 192 h) were tested for protease
226 activity by incubating 50 µl pitcher fluid mixed with 39 µl H₂O and 1 µl of 80 µM
227 PFU-093 substrate per reaction for 5 h at room temperature. Afterwards, probes were
228 topped off with 10 µl of 100 mM Tris- HCl buffer, pH 8.5, to a final volume of 100 µl
229 and pH 8 in each sample, and subsequently, samples were measured in a microplate
230 reader. The removed volume was replaced with 25 mM KCl.

231

232

233 **Results and discussion**

234

235 *Proteolytic activity in Nepenthes pitchers*

236 Employing the FRET technique with PFU-093 as substrate, proteolytic activity was
237 detected in the pitcher fluid of all ten *Nepenthes* species tested although at different
238 intensities (Fig. 2A). Because fluids from closed pitchers were found to be sterile and
239 contain only plant-derived components (Buch et al. 2013, Hepburn, 1918, Lüttge,
240 1964), the digestive fluids from closed and open pitchers of *N. alata* were also
241 compared. In Figure 2B, proteolytic activity was detectable in both samples,
242 indicating that the activity in the closed pitcher originated exclusively from the plant
243 itself. Based on that, sterile digestive fluids from closed or newly opened pitchers
244 (kept semi-sterile with gauze, Fig. 1B) were used for further measurements.

245 The pH of the substrate cleavage reaction was close to 8. This contradicted
246 published results for pitcher fluids containing proteases, describe acidic pH ranges
247 (An et al., 2002, Lüttge, 1964). Therefore, the proteolytic reaction was performed at
248 neutral pH (water) for 10 h, and afterwards the pH was adjusted with buffers of high
249 molarity before the final fluorescence was measured. In the control, only water was

250 added. The result (see Fig. S2A) suggests that the PFU-093 intrinsic fluorescence was
251 quenched under acidic conditions and depended on decreasing pH levels, whereas at
252 neutral and basic pH levels it was detectable. This forced us to keep or adjust the pH
253 value between 7 and 8 in all fluorescence measurements.

254 In order to analyze whether the proteolytic reaction takes place not only at neutral pH
255 but also under acidic conditions, a subsequent incubation experiment at pH 4 was
256 undertaken. Results revealed that it was possible to restore measurable fluorescence
257 simply by adding a strong buffer and adjusting the pH of the sample to 8 directly after
258 incubation (Fig. S2B). This result also demonstrates that the proteases, which cleave
259 the artificial substrate, are stable and active at acidic as well as slightly basic pH
260 ranges, suggesting that these enzymes act like the aspartic proteinases nepenthesin I
261 and II, purified and characterized from several *Nepenthes* species (Vines, 1897.,
262 Nakayama and Amagase, 1968, Steckelberg et al. 1967, Amagase et al., 1969,
263 Jentsch, 1972, Tökés et al., 1974. An et al., 2002, Athauda et al. 2004, Takahashi et
264 al., 2005, Takahashi et al., 2006, Stephenson and Hogan, 2006).

265 Since the most prominent proteases in *Nepenthes* pitcher fluid are nepenthesins, it was
266 conceivable that the activity we measured was due to those aspartic proteases. To
267 challenge this idea, various inhibitors with specificities against different types of
268 proteases were used in combination with the proteolysis assay. The inhibitors for
269 metalloproteases (phenanthroline), serine-proteases (AEBSF), and cysteine-proteases
270 (E-64) showed no or minor effects (Fig. 3). In contrast, the proteolytic activity in the
271 pitcher fluid is strongly inhibited (4.0 to 4.5% remaining activity) by the aspartic
272 protease inhibitor pepstatin A. This result is in agreement with results obtained for
273 pepstatin-inhibition of nepenthesin activity in *N. alata* (An et al., 2002) and *N.*
274 *distillatoria* (Athauda et al., 2004).

275 A detailed analysis of the cleavage reaction determined the cleavage site in the
276 substrate (Fig. S1B,C) shows the putative cleavage sites and the resulting products).
277 An HPLC-MS analysis of the PFU-093 cleavage products after treatment with
278 *Nepenthes* proteases proved that, as expected, the substrate was cleaved between the
279 two valines (Fig. 4). Although the molecular weight of the substrate was 1098 g/mol
280 (Fig. 4B), a fragment ion with m/z 620, corresponding to the FITC(Ahx)-Val fragment
281 (Fig. 4C), was detected after flies were digested in pitcher fluid from both *N. mirabilis*
282 and *N. alata* (Fig. 4A). Searching for a fragment $m/z = 397-398$, we found a smaller
283 peak in the chromatogram (Fig 4B, green line) at R_t 17.1 min. This peak likely
284 represents the “LysDbc” cleavage fragment and indicates that the second valine was
285 also cleaved off. No fragment representing “Val-LysDbc” ($m/z = 497-498$) was
286 detected.

287

288 *Cloning and heterologous expression of nepenthesin*

289 To confirm that nepenthesin is the active protease involved in PFU-093 degradation,
290 the cDNAs of nepenthesin I and II were cloned. First RNA was isolated from *N.*
291 *mirabilis* pitchers. After synthesizing cDNA, RACE PCR was further used to isolate
292 the missing 5' and 3' regions. The resulting complete cDNA sequences of both Nep I
293 and II, which include 5'- and 3'- untranslated regions, had 1570 and 1610 base pairs,
294 respectively. The ORFs for Nep I and II both had 1314 base pairs, encoding 437
295 amino acid proteins (NCBI Acc. No. for protein: AFV26024 (Nep I), AFV26025
296 (Nep II). Both Nep I and II possess a signal peptide for secretion which is predicted to
297 have 24 amino acids (prediction was made using SignalP 4.1 Server (Nordahl et al.,
298 2011). The predicted molecular weights of Nep I and II without signal peptides were
299 calculated with 43.7 and 43.5 kDa, respectively. In addition, Nep I possesses seven

300 predicted N-glycosylation sites (NetNGlyc 1.0 Server, Gupta et al., 2004), whereas
301 Nep II possesses only two. These observations support the fact that the glycosylation
302 of nepenthesin proteins has been previously observed in *Nepenthes distillatoria*
303 (Athauda et al., 2004).

304 To check *N. mirabilis* NmNepI/ II protein sequences for identity to those of *N. alata*
305 and *N. gracilis* NaNepI/ II and NgNepI/ II, protein sequences were aligned with
306 specific software (see above) (Fig. S3), showing identities of NmNepI : NgNepI =
307 94.1%, NmNepI : NaNepI = 99.1% and NmNepII : NgNepII = 96.1%, respectively.
308 The maximum identity is about 66% when sequences of NmNep I are compared to
309 those of NmNep II In figure S3 the predicted signal peptide (SP) cleavage sites
310 (predicted by SignalP- software, Nordahl et al., 2011) are shown to be located
311 between amino acid positions 24 and 25: THS/ TS. Thus, the active proteins start with
312 the amino acids “NGPS” (NepI) and “QSSS” (NepII), respectively. Between the SPs
313 and the active protein, propeptide sequences (Athauda et al., 2004) were detected
314 (Fig. S3). The *N. mirabilis* proteases were found to be typical nepenthesin-aspartic
315 proteases: on one hand they lack the PSI (plant-specific insertion), which is typical for
316 vacuolar APs (Simões et al., 2004), and on the other hand, they possess a special
317 insertion assigned to residues 148-169 and known as ‘the nepenthesin- type AP
318 (NAP)- specific insertion’ (Athauda et al., 2004). This insertion contains four
319 additional cysteine residues (arranged pairwise to form disulphide bonds), shown in
320 Figure S3 as yellow, dark green, light green and orange; these residues contribute to
321 the primary structure (Athauda et al., 2004, Takahashi et al., 2005) and precede the
322 tyrosine residue that is shown as a small green box above the sequence. The other two
323 cysteine residues are red and light red. The two catalytic aspartic acid residues are
324 shown as small black boxes.

325 For heterologous expression in insect Sf9 cells, primers (see above) were used to
326 amplify the ORFs of Nep I and II excluding their native signal peptide and stop
327 codon. These fragments were cloned in frames with the sequence corresponding to the
328 signal peptide from the bee mellitin at the 5'-end and with a V5-(His)₆ tag at the 3'-
329 end. After 72 h, culture medium was harvested and tested by Western blotting, using
330 an anti-V5 horseradish peroxidase antibody that showed the expression of
331 *NmNepII/Sf9* (Fig. S4) but not of *NmNepI/Sf9*. However, *NmNepII/Sf9* did not show
332 proteolytic activity.

333 The proteolytic activity of *NmNepII/Sf9* was activated by an acid-mediated cleavage
334 of the expressed propeptide as described for nepenthesin-1 from *N. gracilis* expressed
335 in *E. coli* (Runeberg-Roos et al., 1991). After being activated, *NmNepII/Sf9* was
336 incubated for 24 h at pH 4; then its protease activity could be measured (Fig. 5) at
337 different protein concentrations (lines 1-3). The control without the presence of PFU-
338 093 substrate (line 4) and the *NmNepII/Sf9* control lacking auto-activation (line 5)
339 show no detectable activity. The activity of *NmNepII/Sf9* confirms our initial
340 assumption that the aspartic proteases in the pitcher fluid, i.e. nepenthesins, are
341 responsible for cleaving the fluorescent substrate.

342 To see a direct correlation between proteolytic activity and the pH of the pitcher fluid,
343 an additional experiment was done in which pitchers were supplemented with fruit
344 flies and pH was determined every time samples were taken (Fig. 6A). In Fig. 6A, the
345 pH of pitcher fluid decreased after flies were added to the fluid, and a value of 4 was
346 reached in only 48 h, a value of around 3 after 96 h. pH continued decreasing until
347 192 h. Just as nepenthesins become auto-activated when the surrounding medium is
348 acidified (Fig. 6) (Kadek et al., 2014), so does protease activity increase when pitcher
349 fluid is acidified by the addition of *D. melanogaster*. In Figure 6B, a significant

350 increase of protease activity is shown 96 h after the addition of fruit flies, confirming
351 the role of nepenthesins as active proteases.

352

353 *Induction of nepenthesins*

354 FRET is a tool to directly analyze proteolytic, namely nepenthesin, levels in the
355 digestive fluids of *Nepenthes*. Compared with others (e.g. An et al., 2002), this
356 method is faster, more convenient, and specific for aspartic proteases. Moreover,
357 kinetics can be easily measured with the same sample. The direct analysis of
358 nepenthesins as one of the most prominent enzymes in the digestive fluid of
359 *Nepenthes* pitchers can be seen as the leading-activity for changes in the pitcher fluid
360 activities that occur, for example, after the plants capture prey. Recently, induction of
361 hydrolytic enzymes in the pitcher was investigated only indirectly by gene induction
362 analyses of the pitcher tissue (Eilenberg et al., 2006, Rottloff et al. 2011, An et al.,
363 2002, Rottloff et al., 2009). Now, we are able to follow such dynamic processes
364 simply by determining the Nep protease activity. Such analyses require pitchers of *N.*
365 *mirabilis* and *N. alata* to first be treated by supplementing them with prey such as *D.*
366 *melanogaster*. This treatment resulted in a significant increase in proteolytic activity
367 after 48 h (Fig. 7A). With some delay, the same effect was visible after supplementing
368 the pitchers with *Nepenthes* leaf material (Fig. 7B). Although the latter finding might
369 suggest a kind of ‘cannibalism’ in *Nepenthes*, this was not surprising because it is
370 known that carnivorous plants actually take whatever they get for their nutrition. For
371 example, *N. ampullaria* is specialized to capture leaf litter from the canopy above
372 (Pavlovič et al., 2011). When phytohormones were added to the pitcher, only the
373 addition of jasmonic acid (JA), not salicylic acid (SA), significantly increased of Nep-
374 activities (Fig. 7C,D).

375 **Conclusion**

376 Carnivorous plants of *Nepenthes*, unlike other plant carnivores, offer the possibility of
377 working with sterile digestive fluids as long as the pitchers are closed or the open
378 pitchers kept somewhat sterile by means of gauze. Here, a novel FRET-based method
379 regarding *Nepenthes* plants was established, optimized and successfully applied by
380 using the fluorogenic PFU-093 substrate for easy and rapid detection of protease
381 activities in digestive fluids of *Nepenthes* species. The specificity of the substrate for
382 aspartic proteases provides a means of unravelling the processes involved in prey
383 digestion in carnivorous pitcher plants and possibly in other carnivorous plants. The
384 ability to measure induced protease activity in pitcher fluids is much more reflecting
385 the digestive process as quantifying transcripts of the corresponding genes.

386

387

388 **Supplementary data**

389 Figure S1. FRET-peptide, -method and putative cleavage sites.

390 Figure S2. Substrate/ product fluorescence dependence on different pH values.

391 Figure S3. *N. mirabilis* nepenthesin I, II (NmNepI/ II) protein alignment compared to
392 *N. gracilis* (Ng) and *N. alata* (Na) nepenthesin amino acid sequences.

393 Figure S4. Western blot of recombinant *N. mirabilis* nepenthesin II.

394 Table S1. List of primer sequences used in this study.

395

396 **Acknowledgments**

397 We thank Birgit Arnold, Tamara Krügel and the greenhouse team for growing
398 *Nepenthes* plants. We also thank Dr. Yannick Pauchet for providing us insect cells
399 and the expression vector. Gerhard Pauls, Dr. Anne Morgenstern and Dr. Stephan H.

400 von Reuß we thank for help with HPLC- MS method and last but not least Wilhelm
401 Boland and the Max Planck Society for continuous support. We also thank Emily
402 Wheeler for editorial assistance.

References

- Amagase S, Nakayama S, Tsugita A.** 1969. Acid protease in *Nepenthes*. II. Study on the specificity of nepenthesin. *J. Biochem.* **66**, 431–439.
- An CL, Fukusaki E, Kobayashi A.** 2002. Aspartic proteinases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco. *Planta* **214**, 661-667.
- Athauda SBP, Matsumoto K, Rajapakshe S, Kuribayashi M., Kojima M, Kubomura-Yoshida N, Iwamatsu A, Shibata C, Inoue H, Takahashi K.** 2004. Enzymic and structural characterization of nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases. *J. Biochem.* **381**, 295-396.
- Buch F, Rott M, Rottloff S, Paetz C, Hilke I, Raessler M, Mithöfer A.** 2013. Secreted pitfall-trap fluid of carnivorous *Nepenthes* plants is unsuitable for microbial growth. *Ann. Bot.* **111**, 375-383.
- Buch F, Pauchet Y, Rott M, Mithöfer A.** 2014. Characterization and heterologous expression of a PR-1 protein from traps of the carnivorous plant *Nepenthes mirabilis*. *Phytochemistry* **100**, 43-50.
- Darwin C.** 1875. *Insectivorous Plants*. London, UK: John Murray.
- Eilenberg H, Pnini-Cohen S, Schuster S, Movtchan A, Zilberstein A.** 2006. Isolation and characterization of chitinase genes from pitchers of the plant *Nepenthes khasiana*. *J. Exp. Bot.* **57**, 2775-2784.
- Gupta R, Jung E, Brunak S.** 2004. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins.
N-glycosylation site predictor available at: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>
- Hepburn JS.** 1918. Biochemical studies of the pitcher liquor of *Nepenthes*. *Proc. Am. Phil. Soc.* **57**, 112-129.
- Heslop-Harrison Y.** 1975. Enzyme release in carnivorous plants. In: Dingle JT, Dean RT. Eds. *Lysozymes in biology and pathology*, 525-578.
- Jentsch J.** 1972. Enzymes from carnivorous plants (*Nepenthes*). Isolation of the protease nepenthacin. *FEBS Lett.* **21**, 273–276.
- Juniper BE, Robins RJ, Joel DM.** 1989. *The carnivorous plants*. London, UK: Academic press.

- Kaman WE, Hulst, AG, van Alphen PTW, Roffel S, van der Schans MJ, Merkel T, van Belkum A and Bikker FJ.** 2011. Peptide-based fluorescence resonance energy transfer (FRET) protease substrates for the detection and diagnosis of *Bacillus* spp. *J. Anal. Chem.* **83**, 2511-2517.
- Kaman WE, Voskamp-Visser I, de Jongh DM, Endtz HP, van Belkum A, Hays JP, Bikker FJ.** 2013. Evaluation of a D-amino-acid-containing fluorescence resonance energy transfer peptide library for profiling prokaryotic proteases. *Anal Biochem.* **441**, 38-43.
- Kadek A, Tretyachenko V, Mrazek H, Ivanova L, Halada P, Rey M, Schriemer DC, Man P.** 2014. Expression and characterization of plant aspartic protease nepenthesin-1 from *Nepenthes gracilis*. *Protein Expr. Purif.* **95**, 121-128.
- Lüttge U.** 1964. Untersuchungen zur Physiologie der Carnivoren- Drüsen. *Planta* **63**, 103-117.
- Mithöfer, A.** 2011. Carnivorous pitcher plants: Insights in an old topic. *Phytochemistry* **72**, 1678-1682.
- Nakayama S, Amagase S.** 1968. Acid protease in *Nepenthes* partial purification and properties of enzyme. *Proc. Jpn. Acad.* **44**, 358–362.
- Nordahl Petersen T, Brunak S, von Heijne G & Nielsen H.** 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* **8**, 785-786.
- Pavlovič A, Slováková L, Šantrůček J.** 2011. Nutritional benefit from leaf litter utilization in the pitcher plant *Nepenthes ampullaria*. *Plant Cell Environ.* **34**, 1865-1873.
- Runeberg-Roos P, Tormakangas K, Ostman A.** 1991. Primary structure of a barley-grain aspartic proteinase. A plant aspartic proteinase resembling mammalian cathepsin D. *Eur. J. Biochem.* **202**, 1021-1027.
- Rottloff S, Müller U, Kilper R, Mithöfer A.** 2009. Micropreparation of single secretory glands from the carnivorous plant *Nepenthes*. *Anal. Biochem.* **394**, 135-137.
- Rottloff S, Stieber R, Maischak H, Turini FG, Heubl G, Mithöfer A.** 2011. Functional characterization of a class III acid endochitinase from the traps of the carnivorous pitcher plant genus, *Nepenthes*. *J. Exp. Bot.* **62**, 4639-4647.
- Steckelberg R, Lüttge U, Weigl J.** 1967. Purification of the proteinase from *Nepenthes* pitcher secretion. *Planta* **76**, 238-241.

- Simões I, Faro C.** 2004. Structure and function of plant aspartic proteinases. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2067-2075.
- Stephenson P and Hogan J.** 2006. Cloning and Characterization of a Ribonuclease, a Cysteine Proteinase, and an Aspartic Proteinase from Pitchers of the Carnivorous Plant *Nepenthes ventricosa* Blanco. *Int. J. Plant Sci.* **167**, 239-248.
- Tökés ZA, Woon WC, Chambers SM.** 1974. Digestive enzymes secreted by the carnivorous plant *Nepenthes macfarlanei* L. *Planta* **119**, 39-46.
- Takahashi K, Athauda SBP, Matsumoto K, Rajapakshe S, Kuribayashi M, Kojima M, Kubomura-Yoshida N, Iwamatsu A, Shibata C, Inoue H.** 2005. Nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases: enzymatic and structural characteristics. *Cur. Protein Peptide Sci.* **6**, 513-525.
- Takahashi K, Tanji M, Shibata C.** 2006. Variations in the content and isozymic composition of Nepenthesin in the pitcher fluids among *Nepenthes* species. *Carniv. Pl. Newslett.* **36**, 73-76.
- Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG.** 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **40**, e115.
- Vines SH.** 1897. The proteolytic enzyme of *Nepenthes*. *Ann. Bot.* **11**, 563-584.
- Waterhouse AM., Procter JB., Martin DMA, Clamp M and Barton G.J.** 2009. "Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench". *Bioinformatics* **25**, 1189-1191.

Figure legends

Figure 1 *Nepenthes alata* pitchers. **A** Without and **B** covered with gauze. Pitchers/pitcher fluid of *Nepenthes* species can be kept under semi-sterile conditions by using gauze.

Figure 2 **Proteolytic activity in *Nepenthes*.** **A** Samples of the pitcher fluid of ten different *Nepenthes* species were investigated for their PFU-093 cleaving activity. **B** Kinetics of proteolytic PFU-093 cleaving activity in pitcher fluid from open (grey line) and closed (black line) pitchers of *Nepenthes alata*. Relative fluorescence was measured over 12 h at 42°C.

Figure 3 **Inhibitor experiments.** Different protease inhibitors -- phenanthroline, AEBSF, E-64 and pepstatin A -- were tested for their ability to inhibit protease activity responsible for PFU-093 cleavage. Individual working concentrations are indicated in brackets. Pitcher fluid from *N. mirabilis* without any inhibitor was used as a control (from left, first bar). Additional controls were carried out with the particular solvents of the inhibitors (DMSO, MeOH, H₂O). Statistics was done using one-way ANOVA, All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method), $P < 0.05$; different letters indicate significant differences.

Figure 4 **Determination of protease cleavage site.** A sample of PFU-093 after digestion with pitcher fluid proteases (*N. mirabilis* and *N. alata*) was analyzed by HPLC-MS. **A** Single ion chromatograms for mass ranges $m/z = 620-621$ amu (black line), $m/z = 497-498$ amu (red line) and $m/z = 398-399$ amu (green line). **B** Mass spectrum of PFU-

093 (FITC(Ahx)-Val-Val-LysDbc). **C** Mass spectrum of the FITC(Ahx)-Val fragment after cleavage of PFU-093, FITC(Ahx)-Val-Val-LysDbc (MS was done with ESI in the positive ion mode).

Figure 5 Proteolytic activity of recombinant *N. mirabilis* Nepenthesin II (*NmNepII/Sf9*). PFU-093 fluorescence was measured over 6 h every 5 min after pre-incubation at pH 4 for 24 h for auto-activation. Different concentrations of *NmNepII/Sf9* were tested with constant concentrations of PFU-093 substrate. Line 1: 99 μ l of *NmNepII/Sf9*; line 2: 49 μ l *NmNepII/Sf9* ; line 3: 24.5 μ l *NmNepII/Sf9* . All were topped off with pure H₂O and 1 μ l of 80 μ M fluorescent substrate to a total volume of 100 μ l per well. Controls: line 4: 99 μ l *NmNepII/Sf9* and H₂O without the addition of fluorescent substrate; line 5: 99 μ l *NmNepII/Sf9* and 1 μ l of 80 μ M PFU-093 without pre-incubation/auto-activation in pH 4 glycine-buffer.

Figure 6 Influence of *Drosophila melanogaster* on pitcher fluid- pH and nepenthesin levels. Pitchers were supplemented with 40 fruit flies each. **A** The pitcher fluid pH was continuously determined at different time points until 192 h after treatment (black line); control without treatment (gray line). **B** Protease activity was measured before (0 h) and after the addition of fruit flies (96, 144, 192 h; gray bars) by using PFU-093 substrate for each sample. Measurement included 2 control pitchers (white bars). For **B** One-way ANOVA, $P < 0.05$, Post Doc Test *_SNK*, was performed.

Figure 7 Induction of nepenthesin protease activity in *Nepenthes mirabilis* pitcher fluid. Proteolytic activity was measured with PFU-093 substrate at different time points after various treatments: **A** supplementation with *D. melanogaster* ($n=3$); **B**

supplementation with *Nepenthes* leaf ($n=2$); **C** injection of jasmonic acid (200 μM end concentration) ($n=3$) **D** injection of salicylic acid (end concentration 200 μM) ($n=4$). Statistics employed one-way ANOVA, $P<0.05$, Post Hoc Tests *SNK* (**A**, **C**, **D**), Dunnett T3 (**B**).

Figures 1-7

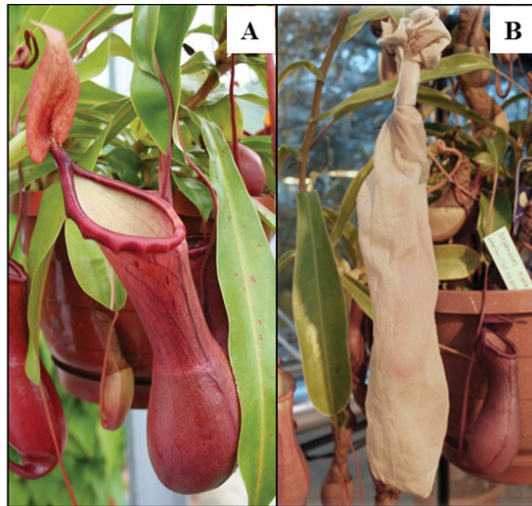


Figure1

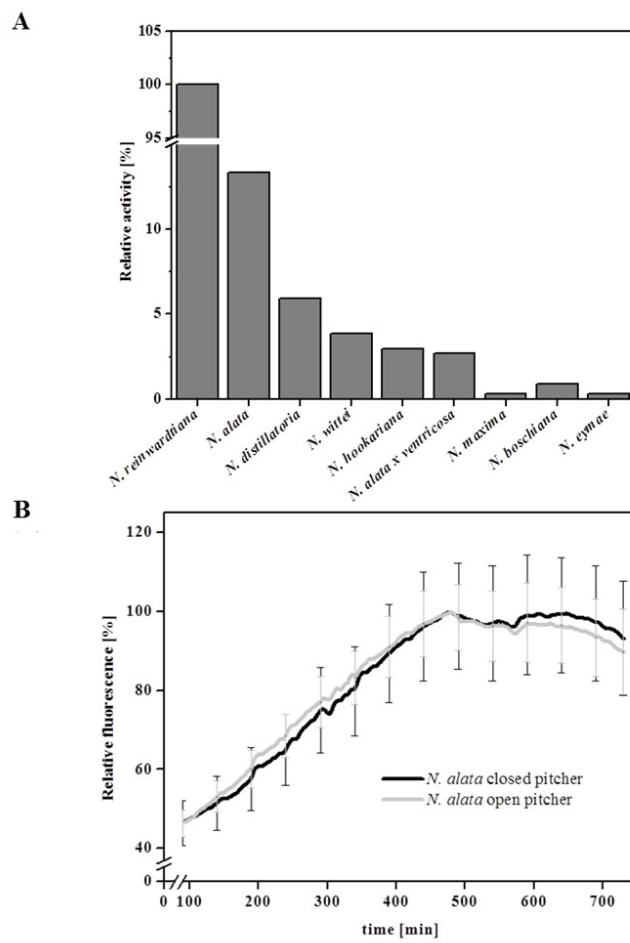


Figure 2

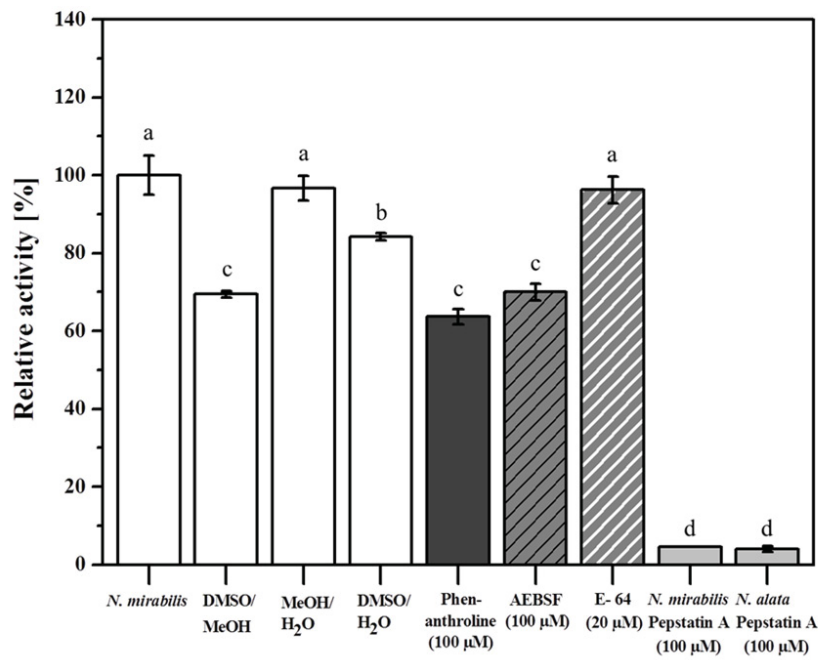


Figure 3

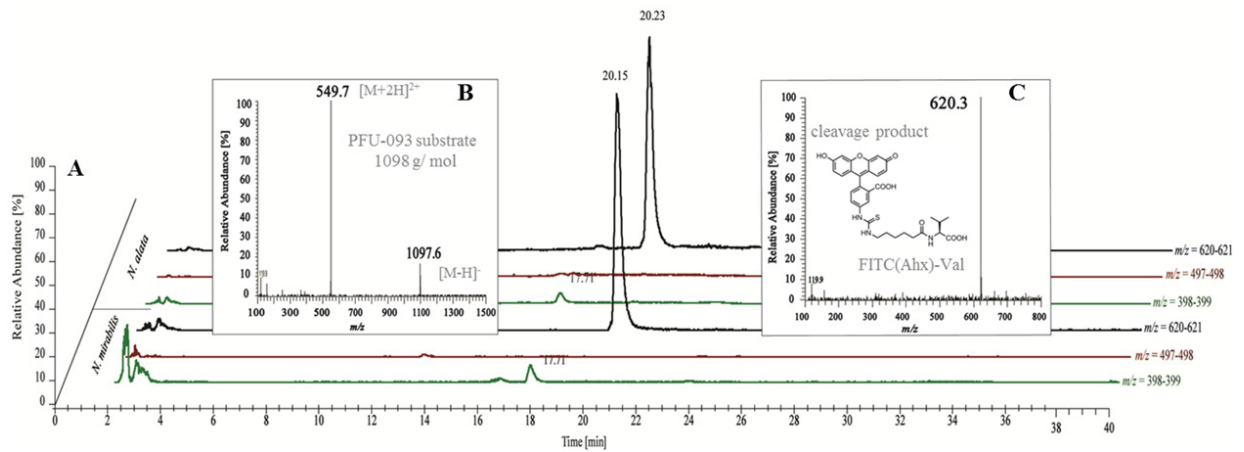


Figure 4

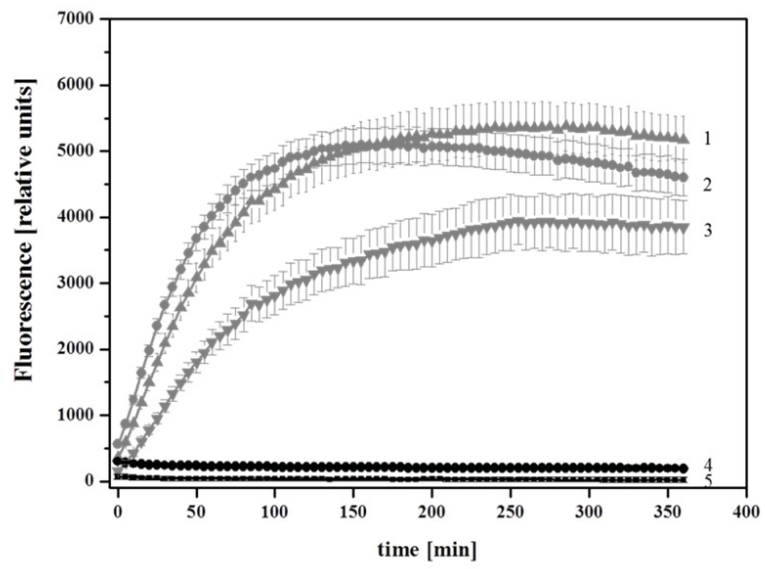


Figure 5

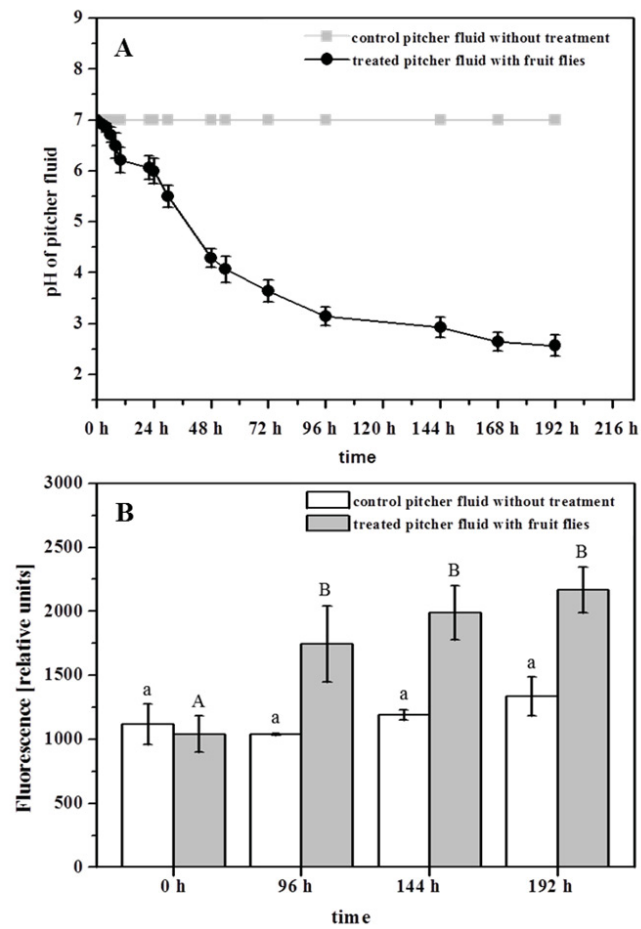


Figure 6

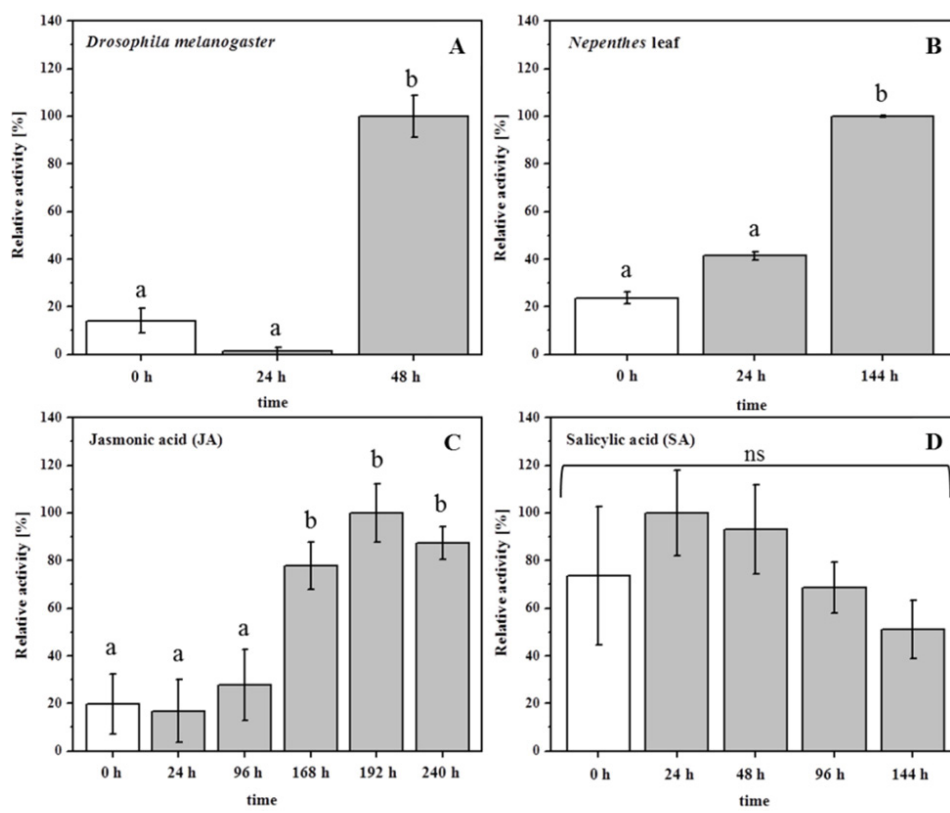


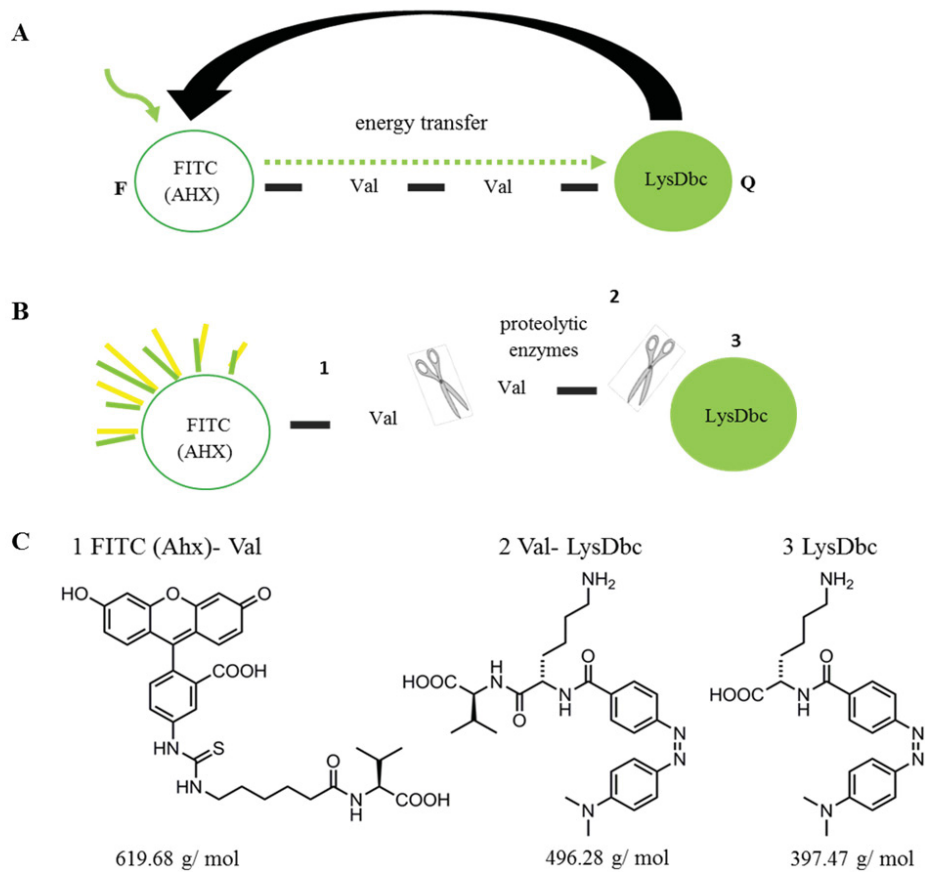
Figure 7

Zusätzliche Informationen (Supplementary Material) zu Manuskript 3:

Franziska Buch, Wendy E. Kaman, Floris J. Bikker, Ayufu Yilamujiang, and Axel Mithöfer:
Nepenthesin protease activity displays the digestive fluid dynamics in carnivorous *Nepenthes*
plants

Figures S1-S4

Table S1

**Figure S1**

FRET-peptide, -method and putative cleavage sites. **A** Simplified structure of the artificial substrate PFU-093, according to Kaman et al. [19]. The substrate contains a fluorescein isothiocyanate (FITC) as fluorophore (F) and Lysin-Dabcyl (LysDbc) as its quencher (Q) connected by a two valine (Val) bridge. The close vicinity of Q to F quenches the fluorescence. **B** Putative proteolytic cleavage sites of PFU-093 substrate either between the two Val or between the last Val and the LysDbc, resulting in cleavage products: 1) FITC-Val, 2) Val-LysDbc, 3) LysDbc; **C** predicted molecular masses of these products: 1) 619.68 g/mol, 2) 496.28 g/mol and 3) 397.47 g/mol.

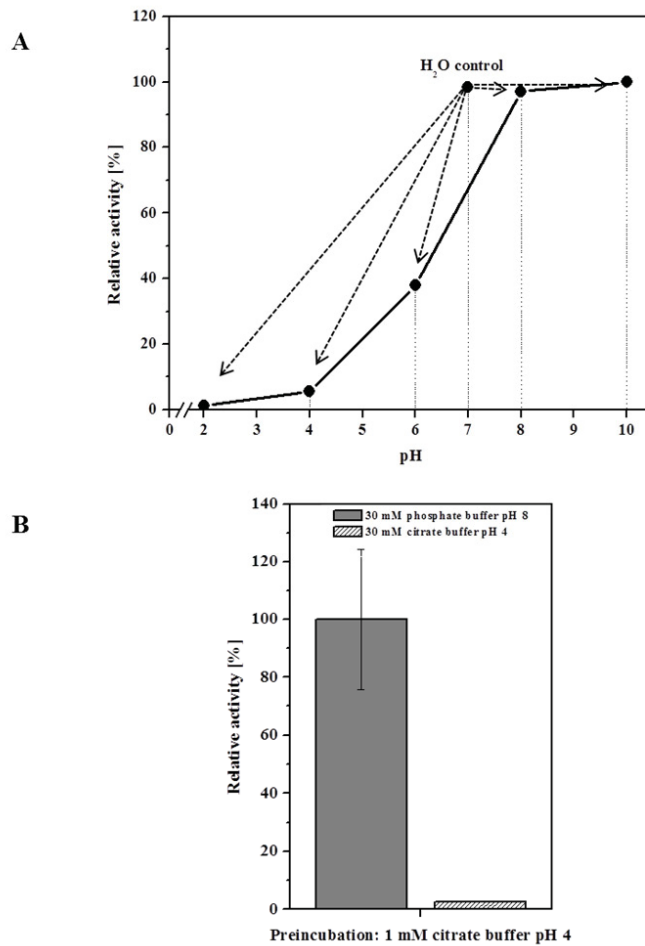


Figure S2

Substrate/ product fluorescence dependence on different pH values. **A** Pitcher fluid was incubated with PFU-093 substrate and pure water at 42 °C for 10 h. 50 µl each of this mixture were given in different wells and mixed with additional 50 µl of 30 mM buffer solutions to adjust the final pH (2, 4, 6, 8, 10, black dots), before fluorescence was measured. Control with water instead of buffer was included, representing the original fluorescence. Arrows indicate the pH-depending change of fluorescence.

B Digestive fluid and PFU-093 substrate were incubated in 1 mM citrate buffer pH 4, for 10 h at 42 °C. Subsequently, the mixture was split up and pH was adjusted by topping with either 30 mM phosphate buffer, pH 8, (dark grey bar) or 30 mM citrate buffer, pH 4, (striped) before fluorescence measurement.

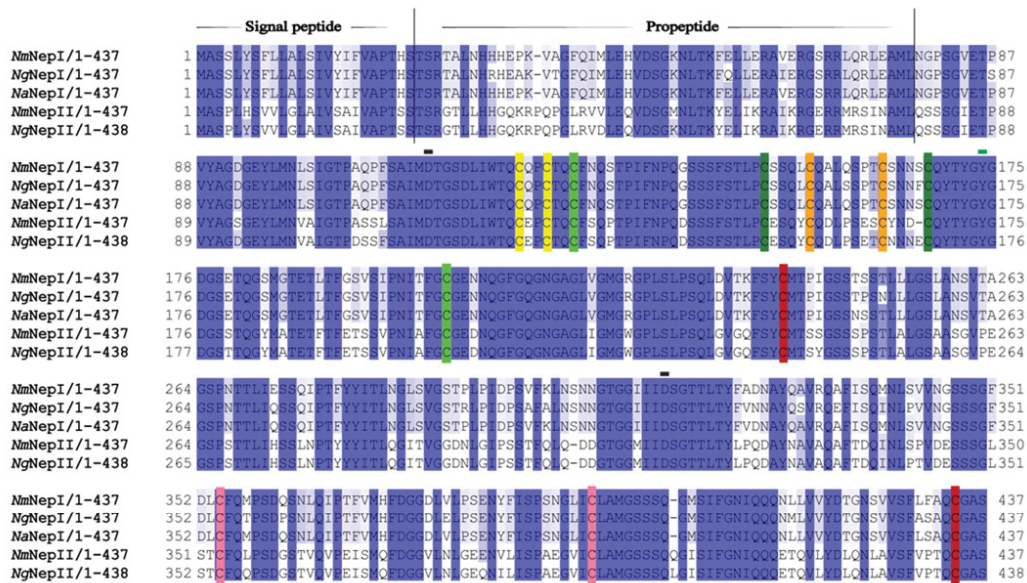


Figure S3

N. mirabilis nepenthesin I, II (NmNepI/ II) protein alignment compared to *N. gracilis* (Ng) and *N. alata* (Na) nepenthesin amino acid sequences. The four levels of shading used are: blue > 80 % sequence identity, mid-blue > 60 % identity, light blue > 40 % identity and no shading < 40 %. Regions of predicted signal peptides and propeptides are named and the endings marked by a black stroke. Aspartic acid residues of the active center are indicated by a small black box and the flap tyrosine residue by a small green box, both above the sequences. The cysteine residues are represented through the colors: yellow, orange, green, light green, red and light red. The colored pairing of the residues show the disulphide bond arrangements in the primary structures of nepenthesin

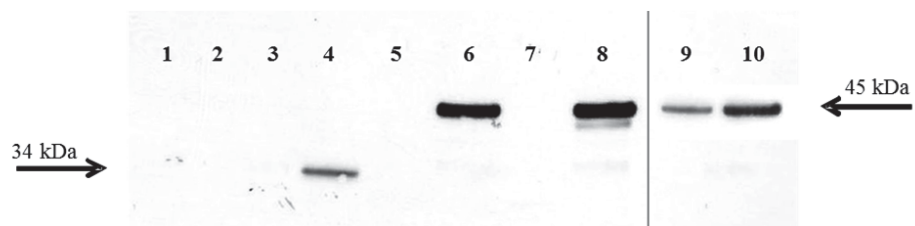


Figure S4

Western blot of recombinant *N. mirabilis* nepenthesin II. *NmNepII/Sf9* was expressed in Sf9 insect cell line, using an anti-V5 horseradish peroxidase antibody and ECL for detection. Lanes represent 1) lysate, negative control, 2) culture medium, negative control, 3) lysate, positive control, 4) culture medium, positive control (CAT, catalase of 34 kDa); the blot also contains duplicates (clone 1 and 2) shown by the lanes 5) *NmNepII/Sf9*, clone 1, lysate, 6) *NmNepII/Sf9*, clone 1, culture medium, 7) *NmNepII/Sf9*, clone 2, lysate, 8) *NmNepII/Sf9*, clone 2, culture medium, all in comparison to the Sf9 cell line stably expressing *NmNepII/Sf9*, pointed out with 5 μ l (lane 9) and 10 μ l (lane 10), respectively. Line between Nr. 8 and 9 denotes two different western blots.

Table S1
List of primer sequences used in this study.

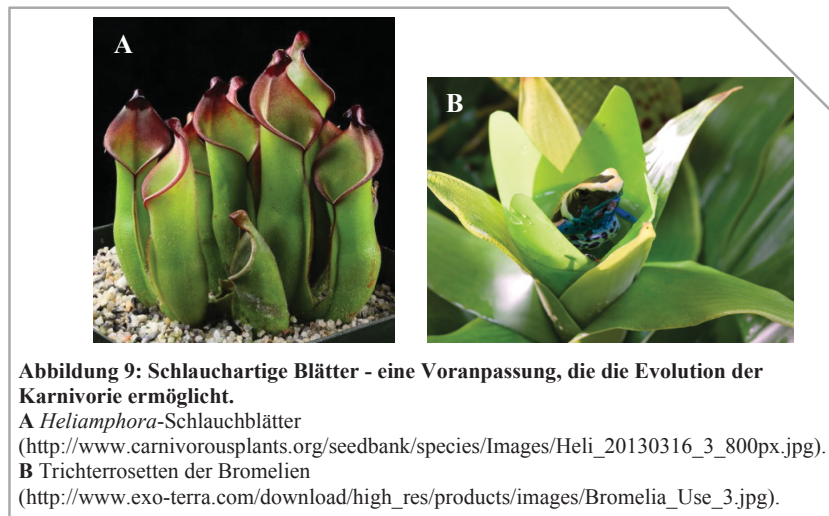
1_NepI_forward_partialSequence	5' CGGGCAAAAACCTTAACCAA 3'
2_NepI_reverse_partialSequence	5' ACCGTCAAAATGCATCACAA 3'
3_NepII_forward_partialSequence	5' TTCCTTGGCAGAGCCAGTAT 3'
4_NepII_reverse_partialSequence	5' GCTGCTGGATATCCCAAAA 3'
5_NepI_3'-RACE	5' GTGCTGTCGAAAGGGGAGTCGTAG 3'
6_NepI_5'-RACE	5' CGGAGAAAGGTTGTCCGGAGTC 3'
7_NepII_3'-RACE	5' CTCCTCACCCAGCACTTCGCACTT 3'
8_NepII_5'-RACE	5' ACCGCATTGTAAGCGTCTTGGAAG 3'
9_NepI_forward_pMIB/V5-HisAvector	5' TAATGCATGCTAACGTCAAGAACAGCTCTCAATC 3'
10_NepI_reverse_pMIB/V5-HisAvector	5' ATTATCTAGACGACGCACCACATTGAGCAC 3'
11_NepII_forward_pMIB/V5-HisAvector	5' TAATGCATGCTAACCTCAAGAGGAACCCCTTCTCATCAT 3'
12_NepII_reverse_pMIB/V5-HisAvector	5' ATTATCTAGACGACGCACCACACTGAGTAGGAACGAA 3'

4. Abschlussdiskussion

In Millionen Jahren der Evolution entstanden sonderbare Kreationen im Pflanzenreich, wobei die vermutlich außergewöhnlichsten denjenigen Pflanzen angehören, die ihre Beutetiere zuerst anlocken, fangen, anschließend verdauen und folgend als Karnivoren, Darwins „*most wonderful plants in the world*“ (Darwin, 1875), bezeichnet werden.

Wo liegt aber der Ursprung dieser Karnivorie und wie haben sich ihre Merkmale im Laufe der Zeit herausgebildet? Basierend auf Sequenzanalysen, entwickelte sich die Karnivorie mehrfach in der Klasse der Angiospermen. Die 600 bekannten karnivoren Pflanzenarten verteilen sich auf vier Großgruppen der Angiospermen und sind in 5 Ordnungen vertreten. Über 95% aller Karnivoren gehören zu den Ordnungen Lamiales und Caryophyllales, wobei zu letzteren die Nepenthaceae gehören (Abb. 3) (Ellison & Gotelli, 2009). Vergleichende DNA-Sequenz-Analysen belegten eine monophyletische Herkunft der Karnivorie innerhalb der Caryophyllales. Basierend auf morphologischen-, anatomischen-, palynologischen-, karyologischen- und phytochemischen Untersuchungen, konnte eine Hypothese des evolutionären Prozesses hinsichtlich Karnivorie dargelegt werden (Bsp. Metcalfe, 1951; Erdtman, 1958; Schmid, 1963; Chanda, 1965; Kondo, 1973; Williams *et al.*, 1994; Bringmann *et al.*, 1998; Schlauer *et al.*, 2005). Aus diesen Gründen kann angenommen werden, dass ein gemeinsamer Vorfahre der karnivoren Caryophyllales für Karnivorie „vor-angepasst“ war. Schwestertaxa wie bspw. *Plumbago* und *Frankenia* werden durch multizelluläre Drüsen, die klebrigen Schleim oder Salz produzieren, charakterisiert. Diese sekretorischen Absonderungen sind besonders wichtig für, i) die Anpassung an salzige Bedingungen, ii) Epizoochorie, die Verbreitung der Samen durch Anhaftung an Tiere, und iii) den Schutz gegen Tiere, genauer gegen ein Prädationsverhalten von Insekten (Heubl *et al.*, 2006). Dies wird auch „*defence trapping*“ (Juniper *et al.*, 1989), ein Fangen der Insekten, welches der Verteidigung dient, genannt (Heubl *et al.*, 2006). Außerdem soll das Fangen kriechender Insekten eine Fremdbestäubung durch fliegende Gliedertiere begünstigen (Schlauer, 1997). Möglicherweise fand eine Translokation der klebrigen Drüsen von der Blütenregion zur Blattoberfläche statt, oder die Drüsen entwickelten sich zeitgleich auch an den Blättern (Heubl *et al.*, 2006). Zudem war ein Umwandlungsprozess von den klebrigen Blättern zu Fangapparaturen, in denen der Verdau der Beute möglich werden konnte, von Nöten. Eine Voranpassung, die die Evolution eines „Karnivorensyndroms“ (Barthlott *et al.*, 2004) ermöglicht ist bspw. der Besitz klebriger Drüsenhaare, wie bei *Drosera*, *Dionaea* und *Aldrovanda*, sowie bei der präkarnivoren *Roridula* ohne Enzymausstattung und bei anderen. Auch der Besitz schlauchblattförmiger Blätter stellt eine Voranpassung dar. Die Entstehung der Karnivorie durch die Ausbildung von Gleitfallen lässt sich schon früh bei Sarraceniaceae erkennen. Ein anderes Beispiel sind *Heliophora*-

Pflanzen, mit ihren Schlauchblatt-förmigen Blättern, in denen sich das Wasser sammelt und wo gelegentlich Tiere hineinfallen (Abb. 9A). Verdauungsenzyme wurden hier noch nicht nachgewiesen, jedoch sind absorbierende Strukturen entstanden. Ein anderes Beispiel sind die Bromelien-Gewächse, die Trichterrosetten bilden und das Wasser darin sammeln (Abb. 9B). Über Saugschuppen können diese Pflanzen Wasser absorbieren. Unter den Bromeliaceae sind nur 2 Arten bekannt, die als präkarnivor gelten, *Brocchinia reducta* und *Catopsis berteroniana* (Barthlott *et al.*, 2004).



Die Entstehung einer Gleitfalle bei *Nepenthes*-Pflanzen hingegen lässt sich an der Entwicklung der Blatt- und Insekten-fangenden Kanne beschreiben. Die Kannen entstanden durch Epiascidiation, dem Einrollen der Drüsenblätter, gefolgt von einer Verschmelzung der Randleisten. Bei dieser Blattumwandlung wird die Blattoberseite mit den multizellulären Drüsen ins Innere der Kanne verlagert und Teile davon mit epidermalemem Gewebe bedeckt. Ein Vorteil entstand möglicherweise durch neue Wasserspeicherkapazitäten und mehr Raum für Nährstoffaufnahme (Heubl *et al.*, 2006). *Nepenthes* und andere „fleischfressende Pflanzen“ würden durch das Fangen von Beute einen kleinen Vorteil gegenüber anderen Pflanzen erzielen und evolutionäre Selektion, für verbesserten Beutefang und bessere Nährstoffabsorption, würde einsetzen (Grunwald, 2011). Ökologisch extrem spezialisiert, dient diesen Karnivoren ihre Beute als Nahrung und erlaubt ihnen an nährstoffarmen Standorten zu überleben und zu wachsen.

Bezüglich *Nepenthes* dienen unter anderem Flavonoide und Anthocyane der Färbung und somit der Anlockung in die Gleitfalle. Die Verdauung der Beutetiere erfolgt anschließend im Inneren mithilfe von pflanzeigenen Enzymen (Barthlott *et al.*, 2004; Mithöfer, 2011). Diese werden kontinuierlich über die Verdauungsdrüsen sekretiert, was eine permanente Verdauung der Beute im „digestive pool“ (Joel, 1986), dem Verdauungsbecken, ermöglicht (Barthlott *et al.*, 2004). Schon frühzeitig begann die Identifizierung von Proteinen aus der Verdauungsflüssigkeit

(Steckelberg *et al.*, 1967; Amagase *et al.*, 1969; Amagase, 1972; Amagase *et al.*, 1972; Jentsch, 1972; Jentsch *et al.*, 1989; Juniper *et al.*, 1989; Stephenson & Hogan, 2006). Wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, nahm bis heute auch der Nachweis von Proteinen auf molekularbiologischer Ebene zu (Athauda *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2005; Eilenberg *et al.*, 2006; Stephenson & Hogan, 2006; Hatano & Hamada, 2008; Rottloff *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu anderen Karnivoren mit Gleitfallen (z.B. *Sarracenia*), ist das Spektrum eigener Verdauungsenzyme bei *Nepenthes*-Pflanzen sehr groß. Während *Nepenthes* selbst Nährstoffe erschließen kann, sind andere Gattungen dieses Fallentypes von Enzymen verschiedener Organismen abhängig, die auf der Pflanze leben (Bakterien, Pilze, Kommensalen) (Barthlott *et al.*, 2004). Während *Nepenthes*-Pflanzen aber von Kommensalen profitieren können, stellen Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze für sie in erster Linie Konkurrenz um Nährstoffe dar (Clarke, 2006).

In diesem Zusammenhang wurde die Kannenflüssigkeit bezüglich ihrer nicht proteinären Zusammensetzung auf Sterilität und ihren Einfluss auf mikrobielles Wachstum getestet und darüber hinaus exemplarisch auf zwei in ihr vorhandene Proteine funktionell charakterisiert.

Die Nepenthes-Kannenflüssigkeit und ihre Eigenschaften

Der Verdauungssaft geschlossener Kannen steht in keinem direkten Kontakt zur Umwelt und wurde schon frühzeitig durch Untersuchungen von Hepburn (1918) und Lüttge (1964) für steril erklärt. Der Kannensaft wurde zum einen auf einfachem Nähragar (Hepburn, 1918) und zum anderen auf Fleischagar (Lüttge, 1964) ausplattiert und inkubiert. In keinem Fall wurde bakterielles Wachstum verzeichnet und somit die Sterilität bewiesen. Mit der Arbeit von Sota *et al.* (1998) kam dieses Thema erneut auf, da im Saft ungeöffneter Kannen von *N. alata*, Bakterien gefunden wurden. Die Autoren diskutierten diesen Punkt sehr kritisch, da sie eine Kontamination nicht ausschließen konnten. Zu bedenken ist allerdings, dass die meisten Mikroorganismen/Bakterien sich nicht kultivieren lassen und selbst Vollmedien-Agarplatten nur zum Teil einen geeigneten Nährboden darstellen (Riesenfeld *et al.*, 2004). Mit den Experimenten von Hepburn (1918) und Lüttge (1964) konnte die Anwesenheit von Bakterien im Kannensaft also nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde im Rahmen vorliegender Untersuchung nach alternativen Nachweismethoden gesucht. Um das Problem der Kultivierbarkeit zu umgehen, wurde eine PCR-basierte Detektionsmethode angewendet. Als Zielsequenz wurde die kleine Untereinheit des Ribosoms kodierende 16S-Gen gewählt. Mit dieser Technik können über eine halbe Millionen bakterielle Spezies nachgewiesen und selbst nah verwandte Arten unterschieden werden (Baker *et al.*, 2003). Grund hierfür ist eine hoch konservierte Sequenz (16S-rDNA), die über lange Zeiträume nur sehr kleine strukturelle Änderungen aufweist. Mit der hier gewählten Methode war bei verschiedenen *Nepenthes*-Spezies

keine bakterielle DNA nachweisbar (Manuskript 1, Abbildung 2). Das Innere geschlossener Kannen mit den sekretierten Verdauungssäften konnte hier auf molekularbiologischem Level als steril beschrieben werden.

In vitro Experimente zeigten, dass der entnommene Kannensaft von *Nepenthes sp.* keine Wirkung auf Bakterien (*E. coli*, *P. syringae*) hat, jedoch Hefewachstum inhibiert wird (Manuskript 1, Abbildung 3/4). Interessant war folglich, wie *Nepenthes*-Pflanzen einen Mikrobenbefall *in vivo* bewältigen können. Nach Injektion von Bakterien- oder Hefezellen in ungeöffnete Kannen zeigten sich stark Bakterien tötende sowie Hefen hemmende Eigenschaften der Kannenflüssigkeit (Manuskript 1). Die Fangvorrichtungen mit sekretierten Verdauungsflüssigkeiten fungieren demnach als dynamische Systeme, welche auf Veränderungen reagieren und Konkurrenten um eigene Nährstoffe durch gezieltes Entgegenwirken abtöten oder stark im Wachstum hemmen können.

Wie bzw. durch was genau wird dieses Entgegenwirken bewerkstelligt und wie versuchen diese karnivoren Pflanzen ihre Kannen bakterienfrei zu halten? Um diese Fragestellung beantworten zu können, ist die Kannensaftzusammensetzung von wichtiger Bedeutung. Einzig zwei Studien existierten zu den mineralischen Komponenten der Flüssigkeit. Morrissey (1955) und Nemcek *et al.* (1966) quantifizierten eine 17-26 mM bzw. 19.5 mM Chlorid-Konzentration in geschlossenen Kannen. Wir stellten in *Nepenthes*-Kannensaft 25 mM KCl fest, welcher trotz weiteren von uns im mikromolarem Bereich detektierten Anionen und Kationen ein an Inhaltsstoffen extrem armes Medium darstellt (Manuskript 1, Tabelle 1). Das nährstoffarme Milieu kann eine mögliche Erklärung für das Absterben von Mikroorganismen sein, darf jedoch nicht als alleinige Begründung dafür herangezogen werden. Antimikrobielle Kannensaftkomponenten wie Naphthochinone, Droseron und 5-*O*-Methyldroseron, beschrieben von Eilenberg (2010), spielen hierbei anscheinend eine große Rolle. Wir konnten nachweisen, dass lediglich nach Injektion von Bakterien in das System „Kanne“, eine Abtötung dieser Mikroorganismen zu verzeichnen war, nicht aber bei zuvor entnommener Flüssigkeit, welche mit Bakterienkultur inkubiert wurde. Diese Feststellung geht konform mit der in früheren Publikationen beschriebenen Induzierbarkeit dieser Kannensaftkomponenten (Eilenberg, 2010; Raj *et al.*, 2011). Unterschiede in der Kannensaftkomposition zwischen *Nepenthes*-Arten wurden deutlich, da wir statt den von Eilenberg *et al.* (2010) für *N. khasiana* beschriebenen Naphthochinon, Droseron und 5-*O*-Methyldroseron, für *N. ventricosa* zwei andere Naphthochinon-Derivate, 7-Methyl-Juglon und Plumbagin, identifizierten (Manuskript 1, Abbildung 6). Nach phytochemischen Analysen wurde die Präsenz von Plumbagin in früheren Studien neben den Nepenthaceae auch für Droseraceae, Drosophyllaceae, Dioncophyllaceae, etc. nachgewiesen (Hegnauer & Hegnauer, 1990). Wie schon für andere Naphthochinone belegt, weisen auch Plumbagine antimikrobielle Aktivität auf (Didry *et al.*, 1994; Eilenberg, 2010). So tragen auch diese Substanzen höchstwahrscheinlich zur Abwehr von potenziellen

Nahrungskonkurrenten und zum Schutz vor Infektionen in der Kanne bei und haben sich im Evolutionsverlauf in speziell diesen Pflanzen etabliert.

Neben diesen niedermolekularen Kannensaftkomponenten weisen auch Proteine in der Verdauungsflüssigkeit antimikrobielle Aktivitäten auf. Eines davon ist das PR-Protein „PR-1“, identifiziert in *Nepenthes mirabilis* (*NmPR-1*). Dieses dient wie das TLP als Abwehrprotein in der Verdauungsflüssigkeit und wird nicht im Verdauvorgang der Beute benötigt. Da bis heute die genaue Funktion von PR-1 in Bezug auf Karnivorie noch unbekannt war, wurde hier an dessen Charakterisierung gearbeitet. Nach ausführlicher molekularer Beschreibung der für PR-1 Proteine typischen Sequenz, wurde *via* 3D- Struktur- Modellierung auch die Architektur als „typisch“ für solche festgestellt. Diese ist als α - β - α Sandwich beschrieben (Fernandez *et al.*, 1997). Für die weitere Charakterisierung exprimierte ich das *NmPR-1* heterolog. Zuvor war es aber primär notwendig, ein geeignetes Expressions-system zu finden.

Wahl eines geeigneten Expressionssystems für das NmPR-1 Protein

Proteinisolierung im Allgemeinen, aber speziell aus der Pflanze, kann sehr kostspielig, schwierig und zeitaufwendig sein. Heterologe Expression ist aus diesem Grund eine geeignete Alternative, da sie die Produktion großer Proteinmengen erlaubt und folglich biochemische Eigenschaften untersucht werden können. Jedoch ist die Wahl eines Expressionssystems und eines dafür nutzbaren Expressionsplasmids ein kritischer Schritt, in dem Vor- und Nachteile verschiedener Faktoren mit einbezogen werden müssen.

Die erste Entscheidung fiel auf das prokaryotische Expressionssystem *Escherichia coli*. Dieses gilt als das meist genutzte System dieser Art für heterologe Proteinexpression (Frommer & Ninnemann, 1995). Die Vorteile lagen hier in der Einfachheit des Nutzens, der hohen Wachstumsrate und der geringen Kosten. Außerdem sind umfassende biochemische und genetische Informationen vorhanden, welche beim Expressieren von Bedeutung sein können. Das *NmPR-1* ließ sich allerdings nicht im *E. coli* System exprimieren. Selbst nach mehrmaligem Wechsel des *E. coli* Stammes, der Expressionsvektoren und einigen Änderungen im Verfahren selbst gelang dies nicht. Nachteile dieses prokaryotischen Expressionssystems liegen in der Unfähigkeit posttranslationale Modifikationen (PMTs) wie z.B. Glykosylierungen, Phosphorylierungen oder auch Disulfid-Isomerisierungen durchzuführen, was für das rekombinante Protein bspw. eine inkorrekte Faltung oder/und eine Beeinträchtigung der Funktion zur Folge haben kann (Lueking *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2007). Da die Synthese des rekombinanten Proteins *NmPR-1* wahrscheinlich ohne jene Modifizierung bzw. korrekte Faltung in *E. coli* nicht möglich war, musste auf höhere, eukaryotische Expressionssysteme ausgewichen werden. Neben den anderen bekannten Systemen wie Hefe-, Menschen- und Pflanzenzellen, habe ich mich für eine Expression in Insektenzellen entschieden. Die Expression in Insektenzellen ermöglicht eine

verhältnismäßig starke Expression mit der Fähigkeit zur Durchführung der meisten posttranslationalen Modifikationen (Jones & Morikawa, 1996). Konkret fiel die Entscheidung auf die Insektenzellen *Sf9*, ein Klon aus dem Isolat von *Spodoptera frugiperda* *Sf21* Zellen (IPLB-SF21-AE), welche aus dem Gewebe der Ovarien im Puppenstadium stammen (Vaughn *et al.*, 1977). Beispiele für erfolgreiche Expressionen von Pflanzengen in *Sf9*-Insektenzellen sind die *Arabidopsis thaliana* Reduktase-Isoformen (Mizutani & Ohta, 1998) und die Ethylen-induzierende Xylanase aus der Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum*). Kloniert wurde *NmPR-1* in den pMIB/V5-His Vektor B, folgend in *Sf9* Insektenzellen transfiziert und erfolgreich heterolog exprimiert. Die Klonierung erfolgte ohne das PR-1 eigene Signalpeptid, denn im genutzten Expressionsvektor befindet sich eine Signalsequenz (*Honeybee melittin secretio signal*, HBM), welche eine Sekretion bzw. Expression des Zielgens in Insektenzellen möglich macht und steuern kann (Tessier *et al.*, 1991). Die erfolgreiche Expression wurde über einen Western Blot *via* Nutzung eines geeigneten Antikörpers zur Detektion des rekombinanten Proteins sichergestellt (Manuskript 2, Abbildung 1C). Die angenommene Größe des rekombinanten *NmPR-1* Proteins lag mit zugehörigem V5-Epitop und einer 6xHis- Region bei zirka 19 kDa. Entgegen der Erwartung detektierte ich eine molekulare Masse von 36 kDa (Manuskript 2, Abbildung 1C). Wie von Lu *et al.* (2013) für ein PR-1-5 Protein aus Weizen, oder von Serrano *et al.* (2004) für das GAPR-1 Protein (*Golgi-associated plant pathogenesis related protein*) beschrieben, bestand auch hier die Möglichkeit einer Dimerisierung des *NmPR-1* Proteins. PR-1-5 und auch GAPR-1 wiesen nach Dimerisierung beide eine höhere Stabilität gegenüber Proteaseaktivitäten auf, jedoch waren beide Dimere unter denaturierenden Bedingungen nicht mehr detektierbar (Serrano *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2013). Konträr dazu zeigte *NmPR-1* selbst unter stark denaturierenden Bedingungen wie 5% 2-Mercaptoethanol, 5 mM Dithiothreitol und 8 M Urea (Harnstoff) keine Reduktion seiner molekularen Masse (Manuskript 2, Abbildung 1D), was weitere Untersuchungen zur Folge hatte. Da Glykosylierung eine der am häufigsten auftretenden PMTs darstellt und sekretorische Proteine oft glykosyliert werden (Shental-Bechor & Levy, 2008), wurde dies auch für *NmPR-1* analysiert.

Glykosylierung und antimikrobielle Eigenschaften von NmPR-1

Glykosylierung ist nicht nur eine der am häufigsten auftretenden PMTs sondern auch eine der wichtigsten und erfolgt als komplexer Prozess während oder nach der Proteinbiosynthese (Lis & Sharon, 1993; Varki, 1993). Um für *NmPR-1* eine eventuelle Glykosylierung zu ermitteln, untersuchte ich das Protein mithilfe eines Programmes (NetNGlyc) auf vorhandene N-Glykosylierungsstellen. Das Programm durchsucht die Sequenz anfangs auf ein vorhandenes Signalpeptid, da wie oben erwähnt sekretorische Proteine oft eine Glykosylierung erfahren. Wird ein Signalpeptid erfolgreich detektiert, wird gezielt nach Asparaginresten (N) gesucht, welche unbedingt als Teil einer bestimmten Tripeptid Sequenz, Asn(N)-X-Ser/Thr, vorliegen müssen.

Dabei kann „X“ kann jede Aminosäure außer Prolin darstellen (Hubbard & Ivatt, 1981). In *NmPR-1* wurden ein Signalpeptid und 5-6 putative N-Glykosylierungsstellen detektiert (Manuskript 2, Figur 1A). Um diese Vorhersage zu verifizieren, wurde *NmPR-1* einer PNGase F Behandlung unterzogen. PNGase F ist eine rekombinante Glukosidase, welche vorhandene N-Glykane am *NmPR-1* Protein erfolgreich entfernt, was wiederum zu der anfangs vorhergesagten Reduktion der Molmasse auf 19 kDa führte (Manuskript 2, Figur 1D). Dieses Ergebnis impliziert eine starke N-Glykosylierung von *NmPR-1/Sf9*, denn die angelagerten Zucker machen allein nahezu die Hälfte des Gesamtgewichtes aus (17 kDa ~ 100% der *NmPR-1* Masse) (Manuskript 1). Zuckieranlagerungen können die Proteinfaltung beeinflussen, was wiederum wichtig für die Funktionalität der Proteine ist (Dwek, 1996). Zudem sorgen die Zucker für mehr Schutz und Stabilität der Proteinstruktur (Shental-Bechor & Levy, 2008). Die einzige experimentelle Bestätigung eines glykosylierten PR-1 Proteins stellt das „Cyn d 24“ Protein vom Bermudagrass dar (Chow *et al.*, 2005). Nach heutiger Kenntnis ist das *NmPR-1* das erste Beispiel für ein so hoch glykosyliertes PR-1 Protein im Pflanzenreich. Eine gute Begründung dafür könnte der *Nepenthes*-Kannensaft sein, in dem ein Verdau des eigenen PR-1 Proteins erst einmal verhindert werden muss, damit es eindringende Organismen abwehren kann. Da allerdings das hier untersuchte Pflanzenprotein die N-Glykosylierung nach Expression in Insektenzellen zeigte, sollten im Folgenden einige Punkte erwähnt werden.

N-Glykosylierung bzw. die N-Glykan-Struktur, welche eventuell an die des Proteins bindet, ist die zum höchsten Grad konservierteste Form einer Glykosylierung in Eukaryoten (Wilson, 2002), so auch zwischen Pflanzen und Insekten. Ein Unterschied liegt also nicht in der Möglichkeit einer Glykosylierung des *Nepenthes* PR-1 Proteins, da 6 potentielle Glykosylierungsstellen (N-X-Ser/Thr) in der *NmPR-1* Sequenz gefunden wurden. Maximal die N-Glykan verarbeitenden Enzyme unterscheiden sich in verschiedenen Organismen, was eine Spezies-spezifische N-Glykan Struktur zur Folge hat. So können aufgrund des im Expressionssystem genutzten Zelltyps und der Nutzung verschiedener Zelllinien, die Zuckerverzweigungen und Muster einen Unterschied in der Glykosylierung zur Folge haben (Dwek, 1996). Dies könnte sich in der Größe des Proteins widerspiegeln.

Da die N-Glykosylierung einen Einfluss auf korrekte Faltung und somit auf Funktionalität haben kann, untersuchte ich das *NmPR-1/Sf9* Protein auf seine Funktion im Kannensaft und prüfte es gegen mikrobielles Wachstum. Wachstumsuntersuchungen bei Präsenz von *NmPR-1/Sf9* via Agar-Diffusion-Tests und Flüssigkulturen zeigten starke Wachstumshemmungen von Bakterien (Manuskript 2, Abbildung 4 C/E), im Gegensatz zu Pilzen und Hefen (Manuskript 2, Abbildung 4 B/D). PR-1 Aktivitäten wurden laut Literatur schon häufiger in transgenen Systemen getestet. Beispielsweise zeigten transformierte Tabakpflanzen Resistenz gegen Infektionen durch Oomyceten, aber nicht gegen den Pilz *Cercospora nicotianae* bzw. das Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Broekaert *et al.*, 2000). Eine gesteigerte Toleranz zu *Phytophthora parasitica*

var. *nicotianae* und den Bakterien *Ralstonia solanacearum* und *P. syringae* pv. *tabaci* konnte auch für ein PR-1- kodierendes Gen (TMV- induzierbar) von Pfeffer in Tabak gezeigt werden (Sarowar *et al.*, 2005). Eine direkte antibakterielle Wirkung durch die Präsenz eines PR-1 Proteins wurde in vorliegender Studie erstmalig gezeigt und ist somit möglicherweise für biotechnologische Ansätze interessant. Die beschriebene antibakterielle Wirkung könnte möglicherweise Grund für die gescheiterte Expression in *E. coli* darstellen. Spekulativ kann zusätzlich als Ursache für die fehlgeschlagene Expression auch die benötigte Glykosylierung von *NmPR-1* genannt werden, da *E. coli* nicht in Lage ist Zuckeranlagerungen durchzuführen. Aufgrund des vorhandenen Signalpeptides, der Identifikation eines zugehörigen Peptides im Kannensaft und der vorgefundenen N-Glykosylierung, ist es nahezu sicher, dass *NmPR-1* ein in die Verdauungsflüssigkeit sekretiertes Protein darstellt. *NmPR-1* muss sich, wie oben bereits erwähnt, gegen zusätzlich zum Verdau der Beute vorhandene hydrolytische Enzyme schützen. Diese sind unter anderem die in der Flüssigkeit nachgewiesenen Aspartatproteasen, Nepenthesin I und II (z.B. Steckelberg *et al.*, 1967; Nakayama & Amagase, 1968; Jentsch, 1972), welche neben einer Cysteinproteinase (Stephenson & Hogan, 2006) als einzig bisher existierende Proteasen im Kannensaft beschrieben wurden und dem Verdau der Beute dienen.

Optimierung einer Methode

In Bezug auf den Verdauungsprozess der Beutetiere ist die Regulation und Produktion der Nepenthesine noch nicht geklärt. Ein Grund dafür stellt die im Allgemeinen geringe Proteinkonzentration von $\sim 1 \mu\text{g/ml}$ im *Nepenthes*-Kannensaft dar (Rottloff, 2006). Daraus kann abgeleitet werden, dass viel Kannensaft benötigt wird, um Proteine zu isolieren und aufzureinigen. Athauda *et al.* (2004) sammelten beispielsweise zirka 30 Liter der Verdauungsflüssigkeit, um die Proteine Nepenthesin I und II überhaupt isolieren zu können. Ein weiterer Punkt stellt die Begrenztheit der Flüssigkeit pro Kanne dar. Aus einer Kanne, der für diese Studie genutzten Arten, war nur zirka 1-3 ml Saft zu entnehmen.

Um die enzymatischen Aktivitäten von diesen in geringen Konzentrationen vorkommenden Proteasen hinsichtlich stattfindender Karnivorie schneller und mit weniger Materialkosten untersuchen zu können, wurde an dieser Stelle eine sensitivere Methode zur Analyse *in vivo* etabliert und optimiert. Die Methode basiert auf FRET (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer), und einem für Proteasen spezifischen, fluoreszierenden Substrat, PFU-093 (Kaman *et al.*, 2014), das im Kannensaft gespalten wird. Da die Nepenthesine die prominentesten Proteasen des Verdauungssaftes darstellen, war die Annahme sehr groß, dass die im Kannensaft gemessenen Aktivitäten auf diesen Aspartatproteasen beruhen. Jedoch fehlte noch der endgültige Beweis für diese Idee. Um sicherzustellen, dass Nepenthesin die aktive Protease im Abbau des fluoreszierenden Substrates ist, wurden zuerst die cDNAs von NepI/II kloniert (Manuskript 3). Da

PR-1 erfolgreich in Insekten exprimiert wurde und beide Nepenthesine, wie PR-1 auch, auf mögliche N-Glykosylierung positiv getestet wurden, fiel auch hier die Entscheidung für eine Expression in Insektenzellen. Vermutet wurde eine N-Glykosylierung dieser Proteine auch zuvor für *N. distillatoria* (Athauda *et al.*, 2004). Eine Expression konnte nur für *Nepenthes mirabilis* Nepenthesin II (*NmNepII*) gezeigt werden (Manuskript 3, Abbildung S4). Warum Nepenthesin I nicht in der Insektenzelllinie exprimiert werden konnte ist bis jetzt unklar. Die konzentrationsabhängige Aktivität von *NmNepII/Sf9* zeigt (Manuskript 3, Abbildung 5), dass die Aspartatproteasen im Verdauungssaft wie vermutet für das Degradieren des fluoreszierenden Substrates PFU-093 verantwortlich sind.

Ein wichtiger Punkt im Optimierungsprozess der FRET-basierenden Methode für Proteaseaktivitätsmessungen in *Nepenthes* waren die Einstellungen des richtigen pH-Wertes während des Messvorgangs. Die Proteasen im Kannensaft bevorzugen einen eher sauren pH-Wert (Lüttge, 1964; An *et al.*, 2002), was dem widersprach, was als Optimum in der Substrat-degradierenden Reaktion zu messen war. Hier wurde ein Optimum von pH 8 verzeichnet (Manuskript 3, Abbildung S2 A), was allerdings zur Folge hatte, dass die proteolytische Reaktion bei einem neutralen pH durchgeführt werden musste. Im sauren pH-Bereich war keine Substrat-Fluoreszenz mehr zu sehen, da diese höchstwahrscheinlich unterdrückt wurde. Alle folgenden Messungen wurden aus diesem Grund im neutralen Puffer als Medium durchgeführt. Um den Nachweis zu geben, dass die proteolytische Reaktion nicht nur unter neutralen Bedingungen stattfinden konnte, sondern wie im natürlichen Medium Kannensaft auch im sauren Bereich, wurde die Reaktion bei pH 4 angesetzt und inkubiert. Nach Hinzugabe von starkem pH 8-Puffer, konnte ein Wiederherstellen der Fluoreszenz erreicht werden (Manuskript 3, Abbildung S2 B) und somit als experimenteller Nachweis für das Ablaufen der Reaktion im sauren pH-Bereich gelten. Resultierend sind die Proteasen, die das Substrat letzten Endes spalten bzw. abbauen, sowohl unter sauren-, als auch unter leicht basischen pH-Bedingungen stabil und aktiv (Manuskript 3). Außer der gezeigten Aktivität von *NmNepII/Sf9*, weist dies zusätzlich auf die Beteiligung der Nepenthesine am Abbau des Substrates hin, da sie mit jenen Eigenschaften schon von bspw. Vines (1897), Steckelberg *et al.* (1967), Jentsch (1972) und Kadec *et al.* (2014) beschrieben wurden. Mit dieser Methode kann in Zukunft ein einfaches und schnelles Detektieren von Proteaseaktivitäten im Kannensaft verschiedener *Nepenthes*-Spezies gewährleistet werden.

Nach Optimierung wurde die FRET-Methode erfolgreich für *Nepenthes*-Pflanzen angewendet. Das Messen von Induzierbarkeiten der Nepenthesine ist dadurch direkt in Kannensäften möglich und wurde bspw. anhand von Pflanzenmaterial und Fruchtfliegen dargestellt (Manuskript 3, Abbildung 7). Sowohl pflanzliche Reste, als auch *Drosophila*-Fliegen zeigten einen signifikanten Anstieg der Nepenthesin-Enzymaktivität nach mehreren Stunden. Eine Induzierbarkeit dieser Enzyme ist vollkommen schlüssig, da Insekten (die meisten *Nepenthes*-Arten) und auch Blattmaterial (speziell *N. ampullaria*) natürliche Nährstoffquellen

dieser karnivoren Pflanzen sind. Außerdem wird in Manuskript 3 (Abbildung 7) deutlich, dass ein Induzieren der Expression von Nepenthesin durch Jasmonsäure (JA) aber nicht durch Salicylsäure (SA) erfolgt. Interessant ist, dass Jasmonate als Pflanzenhormone normalerweise an Abwehrreaktionen gegen Herbivorie und Verwundung beteiligt sind. Bei den karnivoren *Nepenthes*-Pflanzen ist JA jedoch in die Verdauung der Beute und dem dadurch Verfügbar machen der Nährstoffe involviert. Dies wurde zuvor auch für den Sonnentau (*Drosera*) beschrieben (Nakamura *et al.*, 2013). Die Rolle der Jasmonate im Regulieren der proteolytischen Aktivität als Antwort auf verschiedene Stimuli der gefangenen Beute wurde außerdem für die Venusfliegenfalle (*Dionaea*) dokumentiert (Libiakova *et al.*, 2014). Dies gibt Hinweis darauf, dass sich die Rolle der Jasmonate möglicherweise in Bezug auf die Karnivorie dieser Pflanzen (*Nepenthes* siehe Manuskript 3, *Drosera*, *Dionaea*) im Laufe der Evolution verlagerte. Wie für *Drosera* in Mithöfer *et al.* (2014) beschrieben, sind die Jasmonate an Insekten-induzierten Reaktionen beteiligt, einschließlich Reaktionen bezüglich Herbivorie und Karnivorie.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde für *Nepenthes* eine Induktion hydrolytischer Enzyme nur indirekt über Geninduktionsanalysen vom Kannengewebe durchgeführt. Mit der hier vorgestellten Methode (Manuskript 3) war erstmalig die Möglichkeit gegeben, induzierte Enzymaktivitäten direkt in Kannensäften zu analysieren, was den Verdauungsprozess in Bezug auf Karnivorie viel besser widerspiegelt, als andere bisher angewendete Methoden (z.B. in Athauda *et al.* 2004). Neben der weiteren Analyse der Kannensaftigenschaften und neu hinzugefügten Kannensaftkomponenten (Manuskript 1), ist ein Ergänzen der Tabelle 1 (Seite 17) vom einleitenden Teil dieser Arbeit für die PR-1 und PR-7 Familien vergleichend in Tabelle 2 zu sehen. Für das hier untersuchte *Nepenthes mirabilis* PR-1 Protein konnte eine antibakterielle Eigenschaft experimentell belegt werden (Manuskript 2). Des Weiteren wurden für eine weitere *Nepenthes*-Art (*N. mirabilis*) die Verdauungsproteine Nepenthesin I und II beschrieben und die cDNA-Sequenzen in der NCBI-Genbank hinterlegt (Manuskript 3). Außerdem wurde eine für *Nepenthes* neue Methode optimiert und etabliert, durch diese eine direkte Detektion von Proteaseaktivitäten im Kannensaft möglich wurde.

Familie	Typ	Eigenschaften	Gensym./Akzession-Nr.	Referenz
PR-1	PR-1a (Tabak)	antimykotisch	<i>Ypr1</i>	
	PR-1 (<i>Nepenthes mirabilis</i>)	<u>antibakteriell</u>	<i>NmPR-1/ACT99721</i>	<u>Manuskript 2</u>
PR-7	P69 (Tomate)	Endoproteinase	<i>Ypr7</i>	
	Nepenthesin (I) & Nepenthesin (II) (<i>N. gracilis</i>)	Aspartat Proteinase	<i>nep1/BAD07474</i> <i>nep2/BAD07475</i>	(Athauda <i>et al.</i> , 2004)
	<u>Nepenthesin I & Nepenthesin II (<i>N. mirabilis</i>)</u>	“ “	<u><i>NmNepI/AFV26024</i></u> <u><i>NmNepII/AFV26025</i></u>	<u>Manuskript 3</u>

Tabelle 2: Familien 1 und 7 der PR-Proteine (grün) mit Vertretern in *Nepenthes* sp. (rot hinterlegt). Ergänzungen sind vergrößert und unterstrichen dargestellt.

4.1 Ausblick

Wie in vorliegender Arbeit beschrieben, können karnivore *Nepenthes*-Pflanzen die in die Kannen eindringenden Mikroben bis zu einem bestimmten Grad kontrollieren bzw. hemmen oder gar töten. Steigt die Dichte der Eindringlinge zu stark an, ist auch die Konkurrenz um vorhandene Nährstoffe dementsprechend hoch. Eine Investition in eigene Abwehrsubstanzen wäre in solch einem Fall zu kostspielig für die Pflanze selbst und würde unter Umständen auch andere Vertreter des bestehenden Nahrungsnetzwerkes angreifen. Ein Nahrungsnetz (*food web*) repräsentiert auf Nahrung bezogene Interaktionen zwischen Arten (*Nepenthes* und Infauna), die in einem Habitat oder einer Gemeinschaft leben. Im Falle einer Übersättigung an Mikroben in der Kanne ist ein gut ausgebautes *food web* von Vorteil, da es einen weiteren Anstieg der Dichte, beispielsweise durch Prädation, unterdrücken kann. Dieser Punkt sollte neben der grundlegenden Analyse von Kannensaftkomponenten ein Thema weiterführender Studien sein.

Weiterhin könnte *NmPR-1* als Abwehr bezogenes Protein ergänzend untersucht werden. Dies betrifft vor allem seine hohe N-Glykosylierung. Um zu schauen, ob das in Insektenzellen exprimierte Pflanzenprotein ähnliche N-Glykosylierungsmuster in Pflanzen aufweist, sollte es z.B. in *Nicotiana bentamiana* exprimiert und über Western Blot ausgewertet werden. Dies soll ausschließen, dass die Glykosylierung Einfluss auf die hier beschriebene antibakterielle Wirkung hat. Diese Experimente sind bereits im Prozess.

Um zu testen, ob sich das *NmPR-1* durch seine Zuckeranlagerungen wie vermutet gegen im Kannensaft pflanzeigene Proteasen schützen kann, könnte es in Kontakt zu dem in derselben Insektenzelllinie exprimierten *NmNepII* (*Nepenthes*-Aspartatprotease) gebracht werden. Als Kontrolle müsste ein Kontakt zum unglykosylierten *NmPR-1* erfolgen, welches ohne Zuckeranlagerungen von *NmNepII* abgebaut werden müsste. Beides könnte im Western Blot vergleichend ausgewertet werden.

Mit der hier für *Nepenthes* optimierten FRET-basierenden Methode ist unter Verwendung eines sehr spezifischen Substrates ein selektives Werkzeug zur direkten Beobachtung der dynamisch verlaufenden Prozesse in der Kanne seitens der Insektenverdauung etabliert worden. Die Methode kann in Zukunft auf karnivore Kannenpflanzen angewendet werden und ist höchstwahrscheinlich auch auf andere Karnivoren im Pflanzenreich übertragbar. Induzierbare Enzymaktivität kann nun unmittelbar im Verdauungssaft gemessen werden, was den natürlichen Prozess der Insektenverdauung besser beschreiben kann, als es ein bisheriges Arbeiten mit isolierten Enzymen zeigen konnte. Mit der Herstellung weiterer Substrate, welche spezifisch für andere Enzyme des Kannensaftes sind, könnte die Methode fortführend angewendet werden.

5. Zusammenfassung

Ein großer Vorteil im Arbeiten mit karnivoren „*Nepenthes*“ gegenüber anderen Fleischfressern im Pflanzenreich ist der sterile Verdauungssaft, welcher in geschlossenen Kannen ohne Kontamination vom Umfeld von der Pflanze eigens produziert wird. Seine Sterilität wurde hier erstmalig auf molekularem Level gezeigt. Der Kannensaft wird vorliegend anhand seiner bakteriziden und fungistatischen Eigenschaften als ein dynamisches System beschrieben, welches in der Lage ist auf eindringende Mikroorganismen zu reagieren und diese bis zu einem bestimmten Grad zu kontrollieren. Dies wird zum einen durch im Saft enthaltene antimikrobielle Substanzen, wie die in vorliegender Arbeit für *Nepenthes ventricosa* neu beschriebenen Naphthochinonderivate, Plumbagin und 7-Methyl-Juglon, bewerkstelligt. Zum anderen existieren zusätzlich Proteine im Kannensaft, welche interessanterweise alle den PR-Familien zugeordnet werden können. Eines davon ist das abwehrbezogene PR-1, welches hier über einen proteomischen Ansatz kombiniert mit molekularbiologischen Analysen für *N. mirabilis* (*NmPR-1*) charakterisiert wurde. Im Gegensatz zu anderen PR-1 Proteinen weist das in *Sf9*-Zellen exprimierte, rekombinante Protein antibakterielle statt antimykotische Wirkung auf und zeigt zudem ein ausgesprochen hohes Level an N-Glykosylierung. Diese Eigenschaften wurden noch nicht für andere PR-1 Proteine aus dem Pflanzenreich beschrieben, was vermutlich auch an dem speziellen Medium „Kannensaft“ liegt. Andere in der Verdauungsflüssigkeit vorkommenden PR-Proteine sind für den Verdau der Beute verantwortlich und weisen hydrolytische Aktivitäten auf. Auf Grund der geringen Proteinkonzentration in Kannensäften, der damit verbundenen Schwierigkeit einer Proteinisolierung und nicht zuletzt aus Gründen des hinzukommendem Zeitaufwandes für Isolierung und Proteinaufreinigung, wurde für *Nepenthes* eine alternative Methode zur Proteaseaktivitätsmessung gesucht, nachfolgend optimiert und erfolgreich angewendet. Diese Methode beruht auf ist FRET (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) und ist mit der Verwendung eines für Proteasen spezifischen, synthetisch hergestellten Substrates hoch sensitiv. Somit ist der Zeitaufwand minimal und Proteaseaktivitäten können nun direkt im Kannensaft verschiedener *Nepenthes*- Spezies detektiert werden. Die hier gewonnene Möglichkeit induzierte Enzymaktivität in Kannensäften zu messen, beschreibt den Verdauungsprozess bezüglich Karnivorie weitaus besser, als es bisher verwendete Techniken wie z. B indirekte Geninduktionsanalysen vom Kannengewebe taten. Nach Klonierung von Nepenthesin I und II (*NmNepI/II*) und der erfolgreichen heterologen Expression von *NmNepII* in *Sf9*-Insektenzellen, wurde *NmNepII/Sf9* als pflanzeigene Aspartatprotease positiv auf die Beteiligung im Degradierungsprozess des Substrates getestet. Nepenthesin konnte folglich durch Beimpfen der Kannen mit verschiedenen Materialien bzw. Organismen einfach auf seine Induzierbarkeit, z.B.

durch Jasmonate, getestet werden. Da die Nepenthine die prominentesten Enzyme im *Nepenthes*-Kannensaft darstellen, reflektieren die messbaren Aktivitätsänderungen nach dem Beutefang direkt die proteolytischen Aktivitäten. Diese FRET-basierte Methode ist höchstwahrscheinlich auch auf andere Karnivoren des Pflanzenreiches anwendbar. Die zukünftige Entwicklung ähnlicher FRET-basierender Substrate, welche auf andere hydrolytische Enzyme abzielen, könnte für bessere Einblicke in den dynamischen Verdauungsmechanismus von karnivoren *Nepenthes*-Pflanzen sorgen.

6. Summary

A big advantage working with plants of the genus *Nepenthes* compared to other carnivorous plants resides in the production of a sterile, plant-derived digestion fluid, which is protected from any contact with the environment and is therefore exempt from any contamination coming from outside. In the present work the sterility of this digestion fluid was for the first time experimentally proved on a molecular level. Here, the detected bactericide and fungistatic characteristics show that pitcher fluids are dynamic systems, which can react to and, to a certain level, also control invasive microbes. On the one hand, this is achieved by the presence of antimicrobial compounds such as the two recently described naphthoquinone derivatives, plumbagin and 7-methyl-juglone, from *Nepenthes ventricosa*. On the other hand, many different proteins have been described in the digestive fluid, which interestingly all belong to pathogenesis-related (PR)- families. One of those, the PR-1 protein from *Nepenthes mirabilis* (*NmPR-1*), was characterized via proteomic approaches combined with molecular analyses in the present study. Unlike other plant-derived PR-1 proteins, *NmPR-1* shows antibacterial instead of antifungal activities and exhibits an exceptionally high level of N-glycosylation. Such properties have never been described before in the plant kingdom for a PR-1 protein. This is presumably due to the specificity of the “pitcher fluid”. In this fluid, several categories of hydrolytic enzymes, including proteases, are responsible for prey digestion and high level of N-glycosylation might be a way to protect endogenous pitcher fluid proteins from being degraded by the plant’s own proteolytic enzymes. Because of the very low protein concentration observed in pitcher fluids, isolation and purification of proteins has proved to be very difficult and extremely time-consuming. Until now, only indirect methods such as gene induction analyses and heterologous protein expression have been employed to analyze digestive processes in *Nepenthes*. For those reasons, an alternative method allowing a direct investigation of these digestive processes in *Nepenthes* plants was sought, found, optimized and successfully applied. This method is FRET (fluorescence energy resonance transfer)-based by using a synthetic, fluorescent substrate which is very sensitive to proteases. From now on, protease activities can directly be detected in *Nepenthes* pitcher fluids more simple and in less time. These results gain the possibility to describe the digestive process during carnivory much better than previously used standard techniques. After cloning and successful expression of *N. mirabilis* nepenthesin I and II (*NmNepI/II*) in insect cells, the *NmNepII/S79* as a plant derived aspartic protease was positively proved to be involved in degrading the fluorogenic substrate. Nepenthesins can therefore simply be tested for their inducibility after adding different materials or organisms in the pitcher, as already shown for jasmonates. Because nepenthesins are the most prominent proteolytic enzymes present in pitcher

fluids, the measureable changes in activities observed after prey capture reflect the activity of proteases. This FRET-based method can be most likely applied also to other carnivorous plants and the future development of similar FRET-based substrates targeting other hydrolytic enzymes will certainly help in getting better insights into the digestion mechanisms evolved in *Nepenthes* plants.

7. Referenzen

Adams, RM & Smith, GW (1977): S.E.M. Survey of 5 carnivorous pitcher plant genera. *American Journal of Botany*, **64**, 265-272.

Adlassnig, W, Peroutka, M & Lendl, T (2011): Traps of carnivorous pitcher plants as a habitat: composition of the fluid, biodiversity and mutualistic activities. *Annals of Botany*, **107**, 181-194.

Adlassnig, W, Koller-Peroutka, M, Bauer, S, Koshkin, E, Lendl, T & Lichtscheidl, IK (2012): Endocytotic uptake of nutrients in carnivorous plants. *Plant Journal*, **71**, 303-313.

Amagase, S (1972): Digestive enzymes in insectivorous plants III. Acid proteases in genus *Nepenthes* and *Drosera peltata*. *Journal of Biochemistry*, **72**, 73-81.

Amagase, S, Nakayama, S & Tsugita, A (1969): Acid Protease in *Nepenthes* II. Study on specificity of Nepenthesin. *Journal of Biochemistry*, **66**, 431-439.

Amagase, S, Mori, M & Nakayama, S (1972): Digestive enzymes in insectivorous plants IV. Enzymatic digestion of insects by *Nepenthes* Secretion and *Drosera peltata* extract. Proteolytic and chitinolytic activities. *Journal of Biochemistry*, **72**, 765-767.

An, CI, Fukusaki, E & Kobayashi, A (2001): Plasma-membrane H⁺-ATPases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco. *Planta*, **212**, 547-555.

An, CI, Takekawa, S, Okazawa, A, Fukusaki, E & Kobayashi, A (2002): Degradation of a peptide in pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco. *Planta*, **215**, 472-477.

Antoniw, JF & Pierpoint, WS (1978): The purification and properties of one of the 'b' proteins from virus-infected tobacco plants. *Journal of General Virology*, **39**, 343-350.

Athauda, SBP, Matsumoto, K, Rajapakshe, S, Kuribayashi, M, Kojima, M, Kubomura-Yoshida, N, Iwamatsu, A, Shibata, C, Inoue, H & Takahashi, K (2004): Enzymic and structural characterization of nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases. *Biochemical Journal*, **381**, 295-306.

Aung, HH, Chia, LS, Goh, NK, Chia, TF, Ahmed, AA, Pare, PW & Mabry, TJ (2002): Phenolic constituents from the leaves of the carnivorous plant *Nepenthes gracilis*. *Fitoterapia*, **73**, 445-447.

Baker, GC, Smith, JJ & Cowan, DA (2003): Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, **55**, 541-555.

- Barthlott, W, Porembski, S, Seine, R & Theisen, I (2004):** Karnivoren. Biologie und Kultur Fleischfressender Pflanzen. *Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart*, 0-176.
- Bauer, U, Bohn, HF & Federle, W (2008):** Harmless nectar source or deadly trap: *Nepenthes* pitchers are activated by rain, condensation and nectar. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **275**, 259-265.
- Bauer, U, Willmes, C & Federle, W (2009):** Effect of pitcher age on trapping efficiency and natural prey capture in carnivorous *Nepenthes rafflesiana* plants. *Annals of Botany*, **103**, 1219-1226.
- Bauer, U, Grafe, TU & Federle, W (2011):** Evidence for alternative trapping strategies in two forms of the pitcher plant, *Nepenthes rafflesiana*. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 3683-3692.
- Bauer, U, Clemente, CJ, Renner, T & Federle, W (2012a):** Form follows function: morphological diversification and alternative trapping strategies in carnivorous *Nepenthes* pitcher plants. *Journal of Evolutionary Biology*, **25**, 90-102.
- Bauer, U, Di Giusto, B, Skepper, J, Grafe, TU & Federle, W (2012b):** With a flick of the lid: A novel trapping mechanism in *Nepenthes gracilis* pitcher plants. *Plos One*, **7**, e38951.
- Bazile, V, Moran, JA, Le Moguedec, G, Marshall, DJ & Gaume, L (2012):** A carnivorous plant fed by its ant symbiont: A unique multi-faceted nutritional mutualism. *Plos One*, **7**, e36179.
- Beaver, RA (1979):** Biological studies of the fauna of pitcher plants [*Nepenthes*] in West Malaysia. *Annales De La Societe Entomologique De France*, **15**, 3-17.
- Benz, MJ, Gorb, EV & Gorb, SN (2012):** Diversity of the slippery zone microstructure in pitchers of nine carnivorous *Nepenthes* taxa. *Arthropod-Plant Interactions*, **6**, 147-158.
- Bohlmann, H, Clausen, S, Behnke, S, Giese, H, Hiller, C, Reimannphilipp, U, Schrader, G, Barkholt, V & Apel, K (1988):** Leaf-specific thionins of barley - a novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involved in the defence mechanism of plants. *EMBO Journal*, **7**, 1559-1565.
- Bohn, HF & Federle, W (2004):** Insect aquaplaning: *Nepenthes* pitcher plants capture prey with the peristome, a fully wettable water-lubricated anisotropic surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 14138-14143.
- Bol, J, Linthorst, H & Cornelissen, B (1990):** Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annual Review of Phytopathology*, **28**, 113-138.

- Bonhomme, V, Gounand, I, Alaux, C, Jouselin, E, Barthelemy, D & Gaume, L (2011a):** The plant-ant *Camponotus schmitzi* helps its carnivorous host-plant *Nepenthes bicalcarata* to catch its prey. *Journal of Tropical Ecology*, **27**, 15-24.
- Bonhomme, V, Pelloux-Prayer, H, Jouselin, E, Forterre, Y, Labat, J-J & Gaume, L (2011b):** Slippery or sticky? Functional diversity in the trapping strategy of *Nepenthes* carnivorous plants. *New Phytologist*, **191**, 545-554.
- Borad V & S, S (2008):** Pathogenesis-related proteins for the plant protection. *Asian Journal of Experimental Sciences*, **23**, **3**, 189-196.
- Bringmann, G, Francois, G, Assi, LA & Schlauer, J (1998):** Acetogenic isoquinoline alkaloids, part 106; The alkaloids of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae). *Chimia*, **52**, 18-28.
- Bringmann, G, Rischer, H, Wohlfarth, M, Schlauer, J & Assi, LA (2000):** Droserone from cell cultures of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae) and its biosynthetic origin. *Phytochemistry*, **53**, 339-343.
- Broekaert, WF, Terras, FRG & Cammue, BPA (2000):** Induced and preformed antimicrobial proteins. *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*, 371-477.
- Buel, JW (1887):** Sea and Land. *Toronto. J.S. Robertson*, 1-833.
- Burbidge, FW (1880):** The gardens of the sun: or a naturalist's journal on the mountains and in the forests and swamps of Borneo and the Sulu Archipelago. *London. J. Murray*, 1-369.
- Castro, MS & Fontes, W (2005):** Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein and Peptide Letters*, **12**, 13-18.
- Chanda, S (1965):** The pollen morphology of Droseraceae with special reference to taxonomy. *Pollen Spores*, **7**, 509-528.
- Chase, MW, Christenhusz, MJM, Sanders, D & Fay, MF (2009):** Murderous plants: Victorian Gothic, Darwin and modern insights into vegetable carnivory. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **161**, 329-356.
- Chia, TF, Aung, HH, Osipov, AN, Goh, NK & Chia, LS (2004):** Carnivorous pitcher plant uses free radicals in the digestion of prey. *Redox Report*, **9**, 255-261.
- Chin, L, Moran, JA & Clarke, C (2010):** Trap geometry in three giant montane pitcher plant species from Borneo is a function of tree shrew body size. *New Phytologist*, **186**, 461-470.

- Chow, LP, Chiu, LL, Khoo, KH, Peng, HJ, Yang, SY, Huang, SW & Su, SN (2005):** Purification and structural analysis of the novel glycoprotein allergen Cyn d 24, a pathogenesis-related protein PR-1, from *Bermuda* grass pollen. *FEBS Journal*, **272**, 6218-6227.
- Christensen, AB, Cho, BH, Naesby, M, Gregersen, PL, Brandt, J, Madriz-Ordenana, K, Collinge, DB & Thordal-Christensen, H (2002):** The molecular characterization of two *Barley* proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology*, **3**, 135-144.
- Clarke, C (1997):** The effects of pitcher dimorphism on the metazoan community of the carnivorous plant *Nepenthes bicalcarata* Hook. f. *Malayan Nature Journal*, **50**, 149-157.
- Clarke, C (2006):** *Nepenthes* of Borneo. *Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. Natural History Publications (Borneo)*, 1-207.
- Clarke, C, Moran, JA & Chin, L (2010):** Mutualism between tree shrews and pitcher plants. *Plant Signaling & Behavior*, **5**, 1187-1189.
- Clarke, CM (1992):** The ecology of metazoan communities in *Nepenthes* pitcher plants in Borneo, with special reference to the community of *Nepenthes bicalcarata* Hook. f. *PhD. thesis, Armidale, Australia, University of New England*, 1-269.
- Clarke, CM (2001):** *Nepenthes* of Sumatra and Peninsular Malaysia. *Natural History Publications (Borneo)*, 1-326.
- Clarke, CM & Kitching, RL (1995):** Swimming ants and pitcher plants - a unique ant-plant interaction from Borneo. *Journal of Tropical Ecology*, **11**, 589-602.
- Clarke, CM, Bauer, U, Lee, CiC, Tuen, AA, Rembold, K & Moran, JA (2009):** Tree shrew lavatories: a novel nitrogen sequestration strategy in a tropical pitcher plant. *Biology Letters*, **5**, 632-635.
- Cornelissen, BJ, Horowitz, J, van Kan, JA, Goldberg, RB & Bol, JF (1987):** Structure of *tobacco* genes encoding pathogenesis-related proteins from the PR-1 group. *Nucleic Acids Res*, **15**, 6799-6811.
- Cresswell, JE (1998):** Morphological correlates of necromass accumulation in the traps of an Eastern tropical pitcher plant, *Nepenthes ampullaria* Jack, and observations on the pitcher infauna and its reconstitution following experimental removal. *Oecologia*, **113**, 383-390.
- Darwin, C (1875):** Insectivorous plants. *London, J. Murray*, 1-462.
- Davies, DR (1990):** The Structure and Function of the aspartic proteinases. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, **19**, 189-215.

Di Giusto, B, Grosbois, V, Fargeas, E, Marshall, DJ & Gaume, L (2008): Contribution of pitcher fragrance and fluid viscosity to high prey diversity in a *Nepenthes* carnivorous plant from Borneo. *Journal of Biosciences*, **33**, 121-136.

Didry, N, Dubreuil, L & Pinkas, M (1994): Activity of anthraquinonic and naphthoquinonic compounds on oral bacteria. *Die Pharmazie*, **49**, 681-683.

Donaldson, PA, Anderson, T, Lane, BG, Davidson, AL & Simmonds, DH (2001): Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (*germin*) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **59**, 297-307.

Dubois, R, , (1890): Sur le prétendu pouvoir digestif du liquide d l'urne des *Nepenthes*. *Comptes Rendus des Séances de L'Academie des Sciences*, **111**, 315-317.

Dunn, B (1997): Splitting image. *Nature Structural & Molecular Biology*, **4**, 969-972.

Dunn, BM (2002): Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chemical Reviews*, **102**, 4431-4458.

Dwek, RA (1996): Glycobiology: toward understanding the function of sugars. *Chemical Reviews*, **96**, 683-720.

Eilenberg, H (2010): Induced production of antifungal naphthoquinones in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 911-922.

Eilenberg, H, Pnini-Cohen, S, Schuster, S, Movtchan, A & Zilberstein, A (2006): Isolation and characterization of chitinase genes from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes khasiana*. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 2775-2784.

Ellison, AM & Gotelli, NJ (2009): Energetics and the evolution of carnivorous plants - Darwin's 'most wonderful plants in the world'. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 19-42.

Epple, P, Apel, K & Bohlmann, H (1995): An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiology*, **109**, 813-820.

Erdtman, G (1958): A note on the pollen morphology in the Ancistrocladaceae and Dioncophyllaceae. *Geobotanisches Institut Rübel, Zürich, Heft 33*, 47-49.

Fernandez, C, Szyperski, T, Bruyere, T, Ramage, P, Mosinger, E & Wuthrich, K (1997): NMR solution structure of the pathogenesis-related protein P14a. *Journal of Molecular Biology*, **266**, 576-593.

- Frazier, C (2000):** The Enduring Controversies Concerning the Process of Protein Digestion in *Nepenthes* (Nepenthaceae). *Carnivorous Plant Newsletter*, **29**, 56–61.
- Frommer, WB & Ninnemann, O (1995):** Heterologous expression of genes in bacterial, fungal, animal, and plant cells. *Annual Review of Plant Biology*, **46**, 419-444.
- Garcia-Olmedo, F, Molina, A, Segura, A & Moreno, M (1995):** The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends in Microbiology*, **3**, 72-74.
- Gaume, L & Forterre, Y (2007):** A viscoelastic deadly fluid in carnivorous pitcher plants. *Plos One*, **2**, e1185.
- Gaume, L, Gorb, S & Rowe, N (2002):** Function of epidermal surfaces in the trapping efficiency of *Nepenthes alata* pitchers. *New Phytologist*, **156**, 479-489.
- Gianinazzi, S, Martin C & JC, V (1970):** Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana xanthi* n.c. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, **270**, 2383-2386.
- Gorb, E, Kastner, V, Peressadko, A, Arzt, E, Gaume, L, Rowe, N & Gorb, S (2004):** Structure and properties of the glandular surface in the digestive zone of the pitcher in the carnivorous plant *Nepenthes ventrata* and its role in insect trapping and retention. *Journal of Experimental Biology*, **207**, 2947-2963.
- Gorb, EV & Gorb, SN (2006):** Physicochemical properties of functional surfaces in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco (Nepenthaceae). *Plant Biology*, **8**, 841-848.
- Gorb, EV & Gorb, SN (2011):** The effect of surface anisotropy in the slippery zone of *Nepenthes alata* pitchers on beetle attachment. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, **2**, 302-310.
- Grafe, TU, Schoener, CR, Kerth, G, Junaidi, A & Schoener, MG (2011):** A novel resource-service mutualism between bats and pitcher plants. *Biology Letters*, **7**, 436-439.
- Greenwood, M, Clarke, C, Lee, CiC, Gunsalam, A & Clarke, RH (2011):** A unique resource mutualism between the giant bornean pitcher plant, *Nepenthes rajah*, and members of a small mammal community. *Plos One*, **6**, e21114.
- Grunwald, I (2011):** Biological adhesive systems: from nature to technical and medical application. *University of Vienna, D.F.L.S., Springer*, 1-305.
- Guisande, C, Granado-Lorencio, C, Andrade-Sossa, C & Duque, SR (2007):** Bladderworts. *Functional Plant Science and Biotechnology*, **1**, 58–68.

- Harborne, JB (1988):** Introduction to ecological biochemistry. 3rd. Ed. Pub., Academic Press, 1-356.
- Hatano, N & Hamada, T (2008):** Proteome analysis of pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Journal of Proteome Research*, **7**, 809-816.
- Hatano, N & Hamada, T (2012):** Proteomic analysis of secreted protein induced by a component of prey in pitcher fluid of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Journal of Proteomics*, **75**, 4844-4852.
- Hegnauer, R & Hegnauer, M (1990):** Chemotaxonomie der Pflanzen: Eine Übersicht über die Verbreitung und die systematische Bedeutung der Pflanzenstoffe. *Birkhäuser Basel*, 1-508.
- Hepburn, JS (1918):** Biochemical studies of the pitcher liquor of *Nepenthes*. *Proceedings of the American Philosophical Society*, **57**, 112-129.
- Hepburn, JS (1922):** Biochemical observations on certain insectivorous plants. *Journal of the Franklin Institute*, **194**, 771-781.
- Hepburn, JS, St. John, EQ & Jones, FM (1927):** The biochemistry of the American pitcher plants. *Transactions of the Wagner Free Institute of Sciences of Philadelphia*, **11**, 1-95.
- Heubl, G, Bringmann, G & Meimberg, H (2006):** Molecular phylogeny and character evolution of carnivorous plant families in Caryophyllales - revisited. *Plant Biology*, **8**, 821-830.
- Higashi, S, Nakashima, A, Ozaki, H, Abe, M & Uchiumi, T (1993):** Analysis of feeding mechanism in a pitcher of *Nepenthes hybrida*. *Journal of Plant Research*, **106**, 47-54.
- Hooker, J (1874):** The carnivorous habits of plants. *Nature (London)*, **10**, 366-372.
- Hooker, JD (1873):** Ordo CLXXV bis. Nepenthaceæ. *A. de Candolle Prodrromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis*, **17**, 90-105.
- Hu, X, Bidney, DL, Yalpani, N, Duvick, JP, Crasta, O, Folkerts, O & Lu, G (2003):** Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiology*, **133**, 170-181.
- Hubbard, SC & Ivatt, RJ (1981):** Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry*, **50**, 555-583.
- Jebb, M & Cheek, M (1997):** A skeletal revision of *Nepenthes* (Nepenthaceae). *Blumea*, **42**, 1-106.

- Jebb, MHP (1991):** An account of *Nepenthes* in New Guinea. *Science in New Guinea*, **17**, 7–54.
- Jentsch, J (1972):** Enzymes from carnivorous plants (*Nepenthes*): Isolation of protease Nepenthacin. *FEBS Letters*, **21**, 273-276.
- Jentsch, J, Meierkord, S & Hammer, M (1989):** The enzymes from carnivorous plants *Nepenthes* properties and characterization of the acid protease Nepenthacin. *Planta Medica*, **55**, 227.
- Joel, D (1986):** Glandular structures in carnivorous plants: their role in mutual and unilateral exploitation of insects. *Insects and the plant surface*, 219-234.
- Jones, I & Morikawa, Y (1996):** Baculovirus vectors for expression in insect cells. *Current Opinion in Biotechnology*, **7**, 512-516.
- Juniper, BBE, Robins, RJ & Joel, DM (1989):** The Carnivorous Plants. *Academic Press, Inc.*, 1-368.
- Kadek, A, Tretyachenko, V, Mrazek, H, Ivanova, L, Halada, P, Rey, M, Schriemer, DC & Man, P (2014):** Expression and characterization of plant aspartic protease nepenthesin-1 from *Nepenthes gracilis*. *Protein Expression and Purification*, **95**, 121-128.
- Kaman, WE, Hays, JP, Endtz, HP & Bikker, FJ (2014):** Bacterial proteases: targets for diagnostics and therapy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **33**, 1081-1087.
- Kato, M (1993):** Floral biology of *Nepenthes gracilis* (Nepenthaceae) in Sumatra. *American Journal of Botany*, **80**, 924-927.
- Kaul, RB (1982):** Floral and fruit morphology of *Nepenthes lowii* and *Nepenthes villosa*, Montane Carnivores of Borneo. *American Journal of Botany*, **69**, 793-803.
- Khan, AR & James, MN (1998):** Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Science*, **7**, 815-836.
- Koiwa, H, Bressan, RA & Hasegawa, PM (1997):** Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science*, **2**, 379-384.
- Kondo, K (1973):** The chromosome numbers of *Striga asiatica* and *Triphyophyllum peltatum*. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, **31**, 1-2.
- Kubota, K, Metoki, Y, Athauda, SBP, Shibata, C & Takahashi, K (2010):** Stability profiles of nepenthesin in urea and guanidine hydrochloride: Comparison with porcine pepsin A. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **74**, 2323-2326.

Ley, W (1955): Salamanders and other wonders: Still more adventures of a romantic naturalist *Viking Press*, 1-293.

Libiakova, M, Flokova, K, Novak, O, Slovakova, L & Pavlovic, A (2014): Abundance of cysteine endopeptidase Dionain in digestive fluid of Venus Flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis) is regulated by different stimuli from prey through jasmonates. *Plos One*, **9**, e104424.

Lis, H & Sharon, N (1993): Protein glycosylation. *European Journal of Biochemistry*, **218**, 1-27.

Liu, J-J & Ekramoddoullah, AKM (2006): The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **68**, 3-13.

Liu, Q & Xue, Q (2006): Computational identification of novel PR-1-type genes in *Oryza sativa*. *Journal of Genetics*, **85**, 193-198.

Lloyd, FE (1942): The carnivorous plants. *Chronica Botanica Company, Waltham, Mass.*, 1-376.

Lobareva, LS, Rudenska.Gn & Stepanov, VM (1973): Pepsin-Like Protease from Insectivorous Plant *Nepenthes*. *Biokhimiya*, **38**, 640-642.

Lu, S, Faris, JD, Sherwood, R & Edwards, MC (2013): Dimerization and protease resistance: New insight into the function of PR-1. *Journal of Plant Physiology*, **170**, 105-110.

Lueking, A, Holz, C, Gotthold, C, Lehrach, H & Cahill, D (2000): A system for dual protein expression in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, **20**, 372-378.

Lüttge, U (1964): Untersuchungen Zur Physiologie der Carnivoren-Drüsen. *Planta*, **63**, 103-117.

MacFarlane, JM (1893): Observations on pitcher insectivorous plants (part II). *Annual Botany*, **7**, 403-441.

Matthews, REF (1960): A ribonuclease from *Nepenthes spp.* *Biochimica Et Biophysica Acta*, **38**, 552-553.

McPherson, SR (2009): Pitcher plants of the Old World. *Redfern Natural History Productions*, 2 volumes., Poole., 1-500.

Meimberg, H & Heubl, G (2006): Introduction of a nuclear marker for phylogenetic analysis of Nepenthaceae. *Plant Biology*, **8**, 831-840.

- Meimberg, H, Wistuba, A, Dittrich, P & Heubl, G (2001):** Molecular phylogeny of Nepenthaceae based on cladistic analysis of plastid *trnK* intron sequence data. *Plant Biology*, **3**, 164-175.
- Merbach, MA, Merbach, DJ, Maschwitz, U, Booth, WE, Fiala, B & Zizka, G (2002):** Carnivorous plants - Mass march of termites into the deadly trap. *Nature*, **415**, 36-37.
- Merbach, MA, Zizka, G, Fiala, B, Merbach, D, Booth, WE & Maschwitz, U (2007):** Why a carnivorous plant cooperates with an ant - Selective defense against pitcher-destroying weevils in the myrmecophytic pitcher plant *Nepenthes bicalcarata* Hook. f. *Ecotropica (Bonn)*, **13**, 45-56.
- Metcalfe, CR (1951):** The anatomical structure of the Dioncophyllaceae in relation to the taxonomic affinities of the family. *Kew Bulletin*, **6**, 351-368.
- Mithöfer, A (2011):** Carnivorous pitcher plants: Insights in an old topic. *Phytochemistry*, **72**, 1678-1682.
- Mithöfer, A, Boland, W & Maffei, ME (2009):** Chemical ecology of plant–insect interactions: Molecular aspects of plant disease resistance. *Annual Plant Reviews*, **34**, 261-291.
- Mithöfer, A, Reichelt, M & Nakamura, Y (2014):** Wound and insect-induced jasmonate accumulation in carnivorous *Drosera capensis*: Two sides of the same coin. *Plant Biology*, **16**, 982-987.
- Mitsuhashi, I, Iwai, T, Seo, S, Yanagawa, Y, Kawahigashi, H, Hirose, S, Ohkawa, Y & Ohashi, Y (2008):** Characteristic expression of twelve rice PR1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (121/180). *Molecular Genetics and Genomics*, **279**, 415-427.
- Mizutani, M & Ohta, D (1998):** Two isoforms of NADPH: Cytochrome P450 reductase in *Arabidopsis thaliana*. Gene structure, heterologous expression in insect cells, and differential regulation. *Plant Physiology*, **116**, 357-367.
- Moiseyev, GP, Fedoreyeva, LI, Zhuravlev, YN, Yasnetskaya, E, Jekel, PA & Beintema, JJ (1997):** Primary structures of two ribonucleases from ginseng calluses - New members of the PR-10 family of intracellular pathogenesis-related plant proteins. *FEBS Letters*, **407**, 207-210.
- Moran, JA (1996):** Pitcher dimorphism, prey composition and the mechanisms of prey attraction in the pitcher plant *Nepenthes rafflesiana* in Borneo. *Journal of Ecology*, **84**, 515-525.
- Moran, JA & Clarke, MC (2010):** The carnivorous syndrome in *Nepenthes* pitcher plants. Current state of knowledge and potential future directions. *Plant Signaling & Behavior*, **5:6**, 644-648.

- Moran, JA, Booth, WE & Charles, JK (1999):** Aspects of pitcher morphology and spectral characteristics of six bornean *Nepenthes* pitcher plant species: Implications for prey capture. *Annals of Botany*, **83**, 521-528.
- Moran, JA, Clarke, CM & Hawkins, BJ (2003):** From carnivore to detritivore? Isotopic evidence for leaf litter utilization by the tropical pitcher plant *Nepenthes ampullaria*. *International Journal of Plant Sciences*, **164**, 635-639.
- Moran, JA, Hawkins, BJ, Gowen, BE & Robbins, SL (2010):** Ion fluxes across the pitcher walls of three Bornean *Nepenthes* pitcher plant species: Flux rates and gland distribution patterns reflect nitrogen sequestration strategies. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 1365-1374.
- Moran, JA, Gray, LK, Clarke, C & Chin, LJ (2013):** Capture mechanism in Palaeotropical pitcher plants (Nepenthaceae) is constrained by climate. *Annals of Botany*, **112**, 1279-1291.
- Morrissey, S (1955):** Chloride ions in the secretion of the pitcher plant. *Nature*, **176**, 1220-1221.
- Nakamura, Y, Reichelt, M, Mayer, VE & Mithofer, A (2013):** Jasmonates trigger prey-induced formation of 'outer stomach' in carnivorous sundew plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **280**, 20130228.
- Nakayama, S & Amagase, S (1968):** Acid protease in *Nepenthes* - Partial purification and properties of enzyme. *Proceedings of the Japan Academy*, **44**, 358-362.
- Nemcek, O, Sigler, K & Kleinzel, A (1966):** Ion Transport in Pitcher of *Nepenthes henryana*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **126**, 73-80.
- Niderman, T, Genetet, I, Bruyere, T, Gees, R, Stintzi, A, Legrand, M, Fritig, B & Mosinger, E (1995):** Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of *tobacco* with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology*, **108**, 17-27.
- Osborn, CS (1924):** Madagascar: Land of the man-eating-tree. *Republic Publishing Company, New York*, 1-443.
- Owen, TP & Lennon, KA (1999):** Structure and development of the pitchers from the carnivorous plant *Nepenthes alata* (Nepenthaceae). *American Journal of Botany*, **86**, 1382-1390.
- Owen, TP, Lennon, KA, Santo, MJ & Anderson, AN (1999):** Pathways for nutrient transport in the pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata*. *Annals of Botany*, **84**, 459-466.
- Passardi, F, Penel, C & Dunand, C (2004):** Performing the paradoxical: How plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*, **9**, 534-540.

- Pavlovič, A (2012):** Adaptive radiation with regard to nutrient sequestration strategies in the carnivorous plants of the genus *Nepenthes*. *Plant Signaling & Behavior*, **7**, 295-297.
- Pavlovič, A, Slováková, L & Šantrůček, J (2011):** Nutritional benefit from leaf litter utilization in the pitcher plant *Nepenthes ampullaria*. *Plant, Cell & Environment*, **34**, 1865-1873.
- Phillipps, A & Lamb, A (1996):** Pitcher plants of Borneo *Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu.*, 1-171.
- Plachno, BJ, Adamec, L, Lichtscheidl, IK, Peroutka, M, Adlassnig, W & Vrba, J (2006):** Fluorescence labelling of phosphatase activity in digestive glands of carnivorous plants. *Plant Biology*, **8**, 813-820.
- Raj, G, Kurup, R, Hussain, AA & Baby, S (2011):** Distribution of naphthoquinones, plumbagin, droserone, and 5-O-methyl droserone in chitin-induced and uninduced *Nepenthes khasiana*: Molecular events in prey capture. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 5429-5436.
- Riedel, M, Eichner, A & Jetter, R (2003):** Slippery surfaces of carnivorous plants: Composition of epicuticular wax crystals in *Nepenthes alata* Blanco pitchers. *Planta*, **218**, 87-97.
- Riedel, M, Eichner, A, Meimberg, H & Jetter, R (2007):** Chemical composition of epicuticular wax crystals on the slippery zone in pitchers of five *Nepenthes* species and hybrids. *Planta*, **225**, 1517-1534.
- Riesenfeld, CS, Schloss, PD & Handelsman, J (2004):** Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annual Review of Genetics*, **38**, 525-552.
- Rischer, H, Hamm, A & Bringmann, G (2002):** *Nepenthes insignis* uses a C-2-portion of the carbon skeleton of L-alanine acquired via its carnivorous organs, to build up the allelochemical plumbagin. *Phytochemistry*, **59**, 603-609.
- Rott, M (2009):** Analyse der Proteinkomposition im Verdauungssaft der karnivoren Pflanze *Nepenthes*. *Diplomarbeit, Universität Bonn*, 1-72.
- Rottloff, S (2006):** Proteinanalyse des Verdauungsssekrets von *Nepenthes* sp.. *Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität, Jena*, 1-93.
- Rottloff, S (2012):** Analyse der Proteinkomposition der Verdauungsflüssigkeit aus Kannen von *Nepenthes* sp.. *Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität, Jena*, 1-116.
- Rottloff, S, Müller, U, Kilper, R & Mithöfer, A (2009):** Micropreparation of single secretory glands from the carnivorous plant *Nepenthes*. *Analytical Biochemistry*, **394**, 135-137.

- Rottloff, S, Stieber, R, Maischak, H, Turini, FG, Heubl, G & Mithöfer, A (2011):** Functional characterization of a class III acid endochitinase from the traps of the carnivorous pitcher plant genus, *Nepenthes*. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 4639-4647.
- Runeberg-Roos, P, Tormakangas, K & Ostman, A (1991):** Primary structure of a barley-grain aspartic proteinase. A plant aspartic proteinase resembling mammalian cathepsin D. *European Journal of Biochemistry*, **202**, 1021-1027.
- Ryan, CA (1990):** Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **28**, 425-449.
- Sarowar, S, Young, JK, Eui, NK, Ki, DK, Byung, KH, Islam, R & Shin, JS (2005):** Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in *tobacco* plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell Reports*, **24**, 216-224.
- Schlauer, J (1997):** "New" data relating to the evolution and phylogeny of some carnivorous plant families. *Carnivorous Plant Newsletter*, **26**, 34-38.
- Schlauer, J, Nerz, J & Rischer, H (2005):** Carnivorous plant chemistry. *Acta Botanica Gallica*, **152**, 187-195.
- Schmid, R (1963):** Die Systematische Stellung der Dioncophyllaceen. *PhD thesis, Zürich*, 1-57.
- Scholz, I, Bueckins, M, Dolge, L, Erlinghagen, T, Weth, A, Hischen, F, Mayer, J, Hoffmann, S, Riederer, M, Riedel, M & Baumgartner, W (2010):** Slippery surfaces of pitcher plants: *Nepenthes* wax crystals minimize insect attachment via microscopic surface roughness. *Journal of Experimental Biology*, **213**, 1115-1125.
- Schulze, W, Frommer, WB & Ward, JM (1999):** Transporters for ammonium, amino acids and peptides are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes*. *Plant Journal*, **17**, 637-646.
- Sels, J, Mathys, J, De Coninck, BMA, Cammue, BPA & De Bolle, MFC (2008):** Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 941-950.
- Serrano, RL, Kuhn, A, Hendricks, A, Helms, JB, Sinning, I & Groves, MR (2004):** Structural analysis of the human Golgi-associated plant pathogenesis related protein GAPR-1 implicates dimerization as a regulatory mechanism. *Journal of Molecular Biology*, **339**, 173-183.
- Shental-Bechor, D & Levy, Y (2008):** Effect of glycosylation on protein folding: A dose book at thermodynamic stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 8256-8261.

Simões, I & Faro, C (2004): Structure and function of plant aspartic proteinases. *European Journal of Biochemistry*, **271**, 2067-2075.

Sitte, P, Weiler, EW, Kadereit, JW, Bresinsky, A & Körner, C (2002): Strasburger, Lehrbuch der Botanik. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin*, **35**, Spektrum/Gustav Fischer.

Sota, T, Mogi, M & Kato, K (1998): Local and regional-scale food web structure in *Nepenthes alata* pitchers. *Biotropica*, **30**, 82-91.

Steckelberg, R, Lüttge, U & Weigl, J (1967): Purification of the proteinase from *Nepenthes* pitcher secretion. *Planta*, **76**, 238-241.

Stephenson, P & Hogan, J (2006): Cloning and characterization of a ribonuclease, a cysteine proteinase, and an aspartic proteinase from pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes ventricosa* blanco. *International Journal of Plant Sciences*, **167**, 239-248.

Stern, KG & Stern, E (1932): Über die Proteinase insektivorer Pflanzen (On the proteinase from insectivorous plants). *Biochemische Zeitschrift*, **252**, 81-96.

Stevens, PF (2001 onwards): Angiosperm Phylogeny Website. **Version 12**, <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.

Takahashi, K, Chang, WJ & Ko, JS (1974): Specific inhibition of acid proteases from brain, kidney, skeletal muscle, and insectivorous plants by diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester and by pepstatin. *Journal of Biochemistry*, **76**, 897-899.

Takahashi, K, Athauda, SBP, Matsumoto, K, Rajapakshe, S, Kuribayashi, M, Kojima, M, Kubomura-Yoshida, N, Iwamatsu, A, Shibata, C & Inoue, H (2005): Nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases: Enzymatic and structural characteristics. *Current Protein & Peptide Science*, **6**, 513-525.

Takahashi, KT, Masao; Shibata, Chiaki (2007): Variations in the content and isozymic composition of Nepenthesin in the pitcher fluids among *Nepenthes* species. *Carnivorous Plant Newsletter*, **36** 73-76.

Terras, FRG, Eggermont, K, Kovaleva, V, Raikhel, NV, Osborn, RW, Kester, A, Rees, SB, Torrekens, S, Vanleuven, F, Vanderleyden, J, Cammue, BPA & Broekaert, WF (1995): Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: Their role in host defense. *Plant Cell*, **7**, 573-588.

Tessier, DC, Thomas, DY, Khouri, HE, Laliberié, F & Vernet, T (1991): Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene*, **98**, 177-183.

Thatcher, LF, Anderson, JP & Singh, KB (2005): Plant defence responses: what have we learnt from *Arabidopsis*? *Functional Plant Biology*, **32**, 1-19.

Thornhill, AH, Harper, IS & Hallam, ND (2008): The development of the digestive glands and enzymes in the pitchers of three *Nepenthes* species: *N. alata*, *N. tobaica*, and *N. ventricosa* (Nepenthaceae). *International Journal of Plant Sciences*, **169**, 615-624.

Tischutkin (1892): Über die Rolle der Mikroorganismen bei der Ernährung der insectenfressenden Pflanzen. *Botanisches Zentralblatt*, **1** 304-305.

Tökés, ZA, Woon, WC & Chambers, SM (1974): Digestive enzymes secreted by the carnivorous plant *Nepenthes macfarlanei* L. *Planta*, **119**, 39-46.

Van Loon, L, Pierpoint, W, Boller, T & Conejero, V (1994): Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*, **12**, 245-264.

Van Loon, LC & Van Kammen, A (1970): Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN': II. Changes in protein constitution after infection with *tobacco mosaic virus*. *Virology*, **40**, 199-211.

Van Loon, LC & Van Strien, EA (1999): The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55**, 85-97.

Van Loon, LC, Rep, M & Pieterse, CMJ (2006): Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, **44**, 135-162.

Varki, A (1993): Biological roles of oligosaccharides: All of the theories are correct. *Glycobiology*, **3**, 97-130.

Vaughn, JL, Goodwin, RH, Tompkins, GJ & McCawley, P (1977): The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro*, **13**, 213-217.

Vigers, AJ, Roberts, WK & Selitrennikoff, CP (1991): A new family of plant antifungal proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **4**, 315-323.

Vines, SH (1877): On the digestive ferment of *Nepenthes*. *Journal of the Linnean Society (Botany)*, **15**, 427-431.

Vines, SH (1897): The proteolytic enzymes of *Nepenthes*. *Annals of Botany*, **11**, 563-584

Vines, SH (1901): The Proteolytic Enzyme of *Nepenthes* (III). *Annals of Botany*, **15**, 563-573

Wang, L, Zhou, Q, Zheng, Y & Xu, S (2009): Composite structure and properties of the pitcher surface of the carnivorous plant *Nepenthes* and its influence on the insect attachment system. *Progress in Natural Science*, **19**, 1657-1664.

Wells, K, Lakim, MB, Schulz, S & Ayasse, M (2011): Pitchers of *Nepenthes rajah* collect faecal droppings from both diurnal and nocturnal small mammals and emit fruity odour. *Journal of Tropical Ecology*, **27**, 347-353.

Williams, SE, Albert, VA & Chase, MW (1994): Relationships of Droseraceae: A cladistic analysis of *RbcL* sequence and morphological data. *American Journal of Botany*, **81**, 1027-1037.

Wilson, IB (2002): Glycosylation of proteins in plants and invertebrates. *Current opinion in structural biology*, **12**, 569-577.

Woessner, JF (1998): Nepenthesin. *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J. F.) 846-848.

Yin, J, Li, G, Ren, X & Herrler, G (2007): Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, **127**, 335-347.

8. Anhang

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Franziska Buch (M.Sc.)
 Geburtstag: 06.08.1983
 Geburtsort: Friedrichroda
 Nationalität: deutsch
 Adresse: Hans-Knöll-Straße 8, 07745 Jena (dienstlich)
 E-Mail: frenzebuch@googlemail.com
 Telefon: 03641/ 571261 (dienstlich)

Bildung

<p>seit 07/2009 (Elternzeit von 08/2012 – 09/2013)</p>	<p>Doktorand am MPI für Chemische Ökologie, Jena Titel: “Molekulare Analyse des Kannensaftes von <i>Nepenthes</i> Spezies” Betreuer: PD Dr. Axel Mithöfer (MPI Jena), Prof. Dr. R. Oelmüller (FSU Jena)</p>
<p>11/2007 - 06/2009</p>	<p>Wissenschaftlicher Mitarbeiter/ Hilfwissenschaftler an der Biologisch- Pharmazeutische Fakultät FSU, Jena, Institut für Spezielle Zoologie und Evolutionsbiologie (Prof. Dr. M. Fischer)</p>
<p>10/2003 – 11/2008</p>	<p>Studium der Biologie an der FSU Jena Hauptfach - Biologie, Nebenfächer – Biolog. Anthropologie, Humangeografie Abschluss: Magistra Scientiarum (M.Sc.)</p>
<p>08/2002</p>	<p>Abschluss: Abitur, Gymnasium Gleichense Ohrdruf</p>

Weiterbildung

<p>05/2012</p>	<p>“Introduction to the GxPs – with special focus on GMP and GLP”</p>
<p>03/2012</p>	<p>“Gene Safety Project Leader Certificate” (Gentechnik Sicherheit, Projektleiter)</p>

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Publikationen

2014

Buch, F., Kaman, W.E., Bikker, F.J., Yilamujiang, A., Mithöfer, A. **Nepenthesin protease activity displays the digestive fluid dynamics in carnivorous *Nepenthes* plants.** Eingereicht am 04.08.2014, *Journal of Experimental Botany*.

Buch, F., Pauchet, Y., Rott, M., Mithöfer, A. (2014). **Characterization and heterologous expression of a novel PR-1 protein from traps of the carnivorous plant *Nepenthes mirabilis*.** *Phytochemistry*, 100, 43-50. doi:10.1016/j.phytochem.2014.01.014. [BOL592] pubman (pdf - internal use only).

2013

Buch, F., Rott, M., Rottloff, S., Paetz, C., Hilke, I., Raessler, M., Mithöfer, A. (2013). **Secreted pitfall-trap fluid of carnivorous *Nepenthes* plants is unsuitable for microbial growth.** *Annals of Botany*, 111(3), 375-383. doi:10.1093/aob/mcs287. [BOL551] pubman (pdf pdf - internal use only).

Poster Presentationen

2014

Buch, F., Yilamujiang, A., Mithöfer, A. **Molecular regulation of carnivory in *Nepenthes* spec..** *SAB Meeting 2014, MPI for Chemical Ecology, Jena, DE, Mai 2014.*

Yilamujiang, A., **Buch, F.**, Reichelt, M., Mithöfer, A.: **Towards promoter analysis for pathogenesis-related (PR) protein genes in carnivorous plants.** *13th IMPRS Symposium, MPI for Chemical Ecology, Dornburg, DE, Feb 2014.*

2013

Yilamujiang, A., **Buch, F.**, Reichelt, M., Mithöfer, A.: **A role of phytohormones in carnivory in pitcher plants.** *Botanikertagung 2013, Deutsche Botanische Gesellschaft, Tübingen, DE, Oct 2013.*

2012

Buch, F., Nakamura, Y., Rottloff, S., Mithöfer, A.: **Plant-Insect Interaction - The carnivorous plants syndrome.** *SAB Meeting 2012, MPI for Chemical Ecology, Jena, DE, Oct 2012.*

2011

Buch, F., Rott, M., Rottloff, S., Mithöfer, A.: **Analysis of Nepenthes pitcher fluid - Identification of PR-1 protein.** *24th Conference of Molecular Biology of Plants, Dabringhausen, DE, März 2011.*

Buch, F., Kaman-van Zanten, W.E., Bikker, F.J., Mithöfer, A.: **And then there was light...employing a fluorescent substrate to investigate proteases in Nepenthes.** *Botanikertagung 2011, German Botanical Society, Freie Universität Berlin, Berlin, DE, Sep 2011.*

Lehre

Betreuung von Schülern und einer Studentin im Rahmen der Doktorarbeit.

Franziska Buch

Danksagung

„Wenn der Mensch erfolgreich ist, produziert das Gehirn Endorphine, Glückshormone.“
(Enkelmann, NB)

Und - GLÜCKLICH - fühle ich mich gerade beim Schreiben der letzten Sätze meiner Doktorarbeit. Nicht zuletzt sehr, sehr wichtige Sätze, denn alle Menschen die sich folgend hier wiederfinden, haben mich sowohl finanziell/fachlich, als auch freundschaftlich/emotional beim Forschen und/oder Zusammenschreiben unterstützt.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Axel Mithöfer, der mir dieses spannende „fleischige“ Thema überlies, mich während der gesamten Zeit fachlich betreute, Anregungen gab und immer bereit für konstruktive Diskussionen war. Danke auch an Prof. Dr. Ralf Oelmüller für die Betreuung seitens der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Gedankt sei auch Prof. Wilhelm Boland für die Finanzierung der Dissertation in seiner Abteilung und die Freigabe der dazu notwendig gewordenen Laborarbeit.

Ein ganz großes Danke an das Gewächshausteam vom MPI ICE unter Tamara Krügel für die ausgezeichnete Pflege der *Nepenthes*- Pflanzen. Danke auch für die fortlaufenden Saftspenden der Botanischen Gärten in Jena und München.

Danke auch dem IT-Team für die Hilfe am Computer und beim Drucken dieser Arbeit.

Besten Dank an Moni Heyer, die mir den Hinweis auf eine freie Stelle in Axels Arbeitsgruppe gab! Lieben Dank auch an Matthias Rott und Sandy Rottloff für das Einarbeiten ins Laborgeschehen und die Tipps im Arbeiten mit unserer Pflanze der Begierde! Danke an meine früheren und folgenden Laborplatznachbarn Moni, Holger (der auch irgendwie immer, überall war ;)), Ilka, Anne, Sandra und Janine, für das gemeinsame Arbeiten und den Labor-Spaß nebenbei.

Für fachliche Diskussionen und Hilfe bei Frustration im Labor, danke ich „übelst“ Yannick (rund um Insektenzellen), Janine (rund um Agar-Diff.-Tests) und Sandra (rund um bspw. Western Blots).

Für chemische Fragezeichen und deren Aufklärung danke ich Anne M., Gerhard P. und Stephan H. v. R.. Für das tolle Arbeitsklima besten Dank an die gesamte Abteilung „Bioorganische Chemie“.

Großes Danke natürlich auch an dich Grit, für deinen Plan in allen Lebenslagen eines Doktoranden und die Pläuschchen nebenbei. Vielen Dank auch für den Spaß und die ausgezeichnete Atmosphäre im Büro an unsere hilfsbereite Andrea, Ilham, Jyothi, Sandra, Moni, Matthias R., Sandy und Axel.

Für die tollen Gespräche und die hervorragende Ablenkung (wenn man sie mal brauchte) in der Labor-Endphase und dem Dissertation-Zusammen-Schreib-Stress, danke ich allen voran Cornelius, Franzi, Nadja, Sandra, Ilham, Stephan, Janine, Anne-K., Gerhard, Holger und Anja S. Danke euch allen auch für gesellige, flüssige Abende in der Wagnergasse oder auf der hiesigen Terrasse.

Für das Korrektur-Lesen danke ich Axel, Sandy und Sandra und Yannick.

Vielen, vielen Dank an meine lieben Freunde Netti, Diana, Kay, Franzi, Chrissi, Sonne, Kathrin, Oli, Moni, Judith, Leene, Anke, Anke T., Christian und Armin außerhalb dieses Arbeitsalltags für das Verständnis in Sachen „wenig Zeit“ und Vergesslichkeit, die Motivation und die aufmunternden Worte in Phasen der Frustration, in denen nix mehr ging, aber auch während des Zusammenschreib-Prozesses, das Ziel in Sicht.

An dieser Stelle möchte ich meiner Familie so gut es mit Worten möglich ist danken. Meinen Eltern ein mega-Dankeschön dafür, dass sie so sind, wie sie sind; mir zu jeder Zeit den Rücken stärken, mich motivieren und an mich glauben, egal wo ich gerade bin und was ich gerade mache. Ein doppeltes Danke auch dafür, dass ich „einfach“ sein und werden kann, wer ich bin und werden will!

Ein riesengroßes Danke an dich, mein Yannick – eigentlich für alles! Aber zuerst dafür, dass du nach Jena kamst und an meiner Bürotür klopfst ☺. Ein übergroßes Danke für dein Vertrauen und deine Motivation.

Und das Wichtigste zum Ende: Das für mich größte Glück der Welt - unser kleiner Leonas. Danke, kleiner Sonnenschein, dass du mir jeden Tag so viel Freude bereitest. Das erfüllt mein Leben und macht es eeeeeextraaaaaa-farbig ☺!!!

Durch EURE Hilfe, emotional und fachlich, ist das „DING“ jetzt fertig.

Eigenständigkeitserklärung

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

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

Alle Personen, die an den Manuskripten durch Experimente, Auswertung und Schreiben mitgewirkt haben, sind im Kapitel „Übersicht zu den Manuskripten“ mit ihrem jeweiligen Anteil aufgelistet.

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 zu einer staatlichen oder anderen wissenschaftlichen Prüfung eingereicht. Ferner habe ich auch nicht versucht, die gleiche, eine in wesentlichen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation einzureichen.

Franziska Buch

