

Evolution der Verteidigungsstrategien von Blattkäferlarven (Chrysomelidae) unter Nutzung pflanzlicher Vorstufen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



vorgelegt von
Carmen Michalski
Kiel, 2011

Referent Prof. Dr. Dietrich Ober

Koreferent Prof. Dr. Wolfgang Blaschek

Tag der mündlichen Prüfung 19.10.2011

Zum Druck genehmigt 19.10.2011

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dietrich Ober danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die großzügige wissenschaftliche Freiheit bei der Bearbeitung. Die wissenschaftlichen Diskussionen und seine persönliche Unterstützung waren eine große Bereicherung für mich. Sein Optimismus war stets wohlthuend und motivierend.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Blaschek danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Jaques Pasteels danke ich für das stete Engagement beim Käfersammeln und für das Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Dr. Manfred Nimtz danke ich für die ständige Bereitschaft zur Peptidsequenzierung und den anschließenden Diskussionen. Frau Rita Getzlaf danke ich für die Durchführung der N-terminalen Sequenzierungen.

Herrn Bernd Lübbers danke ich für die geduldige Einweisung in die Gaschromatographie sowie die ausführliche Beantwortung aller technischen Fragen.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Botanischen Instituts, insbesondere denen der Arbeitsgruppe Ober, die zu einem freundschaftlichen und damit guten Arbeitsklima beigetragen haben. Frau Brigitte Schemmerling danke ich für die Mitarbeit bei der Larvenpräparation sowie der Probenvorbereitung zur REM. Ihre Herzlichkeit ließ so manchen schiefgelaufenen Versuch schnell wieder vergessen. Frau Margret Dose danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Labor und für die Vorbereitung des freitäglichen Frühstücks, was der Arbeitswoche das i-Tüpfelchen aufsetzte.

Besonders möchte ich Diplom Apothekerin Dr. Dagmar Enß für die grenzenlose Freundschaft danken, die mit der Montag-Morgen-Analyse und anschließender Verkostung diverser EtOH-haltiger Fruchtsaftgetränke begann und im Beistand beim Essen des Tamarindensorbets in Merida (Mexiko) gipfelte. Das alles wäre wahrlich nie passiert ohne*Prosecco*.

Herrn Apotheker Joachim Ramge danke ich für das in mich gesetzte Vertrauen seine Adler-Apotheke in Kappeln weiterführen zu dürfen. Seiner Frau Helga Ramge danke ich für die geduldige Austreibung des Fehlerteufels und beiden für die ständige Motivierung weiterzuschreiben.

Der größte Dank gebührt jedoch meinen Eltern Anette und Peter Michalski, die mich in jeder erdenklichen Weise unterstützt haben und seit jeher allen Unfug geduldig ertragen! Ein großes Dankeschön geht auch an meinen Bruder Christian und all meine Freunde, die mir das Abtauchen in den letzten Monaten zur Fertigstellung dieser Arbeit hoffentlich nachsehen werden. Extra special thanks go to my American family: the Grays. Thank you for supporting me through all the years and the wonderful time we spent together all over the world.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Anpassungsfähigkeiten adulter Blattkäfer	2
1.2	Chemische Wehrmechanismen der Blattkäferlarven.....	5
1.2.1	Synthese der Iridoiden Monoterpene.....	6
1.2.2	Sequestrierung phenolischer Glucoside	8
1.2.3	Veresterung von Buttersäure-Derivaten mit pflanzlichen Alkoholen.....	10
1.3	Evolution der Wehrsekret-Synthese	12
1.4	Ziele der Arbeit.....	14
2.	Material und Methoden	16
2.1	Herkunft und Haltung der Insekten	16
2.2	Chemikalien	17
2.2.1	8-Hydroxygeraniol-Synthese.....	17
2.3	Plasmide	18
2.4	Bakterienkulturen.....	21
2.4.1	<i>E. coli</i> -Stämme	21
2.4.2	Medien für <i>E. coli</i> -Zellen	21
2.4.2.1	<i>Lysogeny broth</i> (LB).....	21
2.4.2.2	SOC-Medium	22
2.4.3	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	22
2.5	Hefekulturen	23
2.5.1	Hefestämme.....	23
2.5.2	Medien für <i>K. lactis</i>	24
2.5.3	Medien für <i>S. cerevisiae</i>	25
2.5.4	Herstellung kompetenter <i>K. lactis</i> und <i>S. cerevisiae</i> Zellen	25
2.6	Primer	26
2.7	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	27
2.8	Molekularbiologische Methoden.....	27
2.8.1	Isolierung genomischer DNA.....	27
2.8.2	Isolierung der Gesamt-RNA.....	27
2.8.2.1	Präparation einzelner Gewebe von Larven mit anschließender Isolierung der Gesamt-RNA ..	28

Abkürzungsverzeichnis

2.8.3	cDNA-Synthese mit Hilfe Reverser Transkriptasen	28
2.8.4	5'-RACE Technik	29
2.8.5	Polymerase Ketten Reaktion	30
2.8.5.1	Standard-PCR	31
2.8.5.2	Reverse-Transkriptase (RT)-PCR.....	31
2.8.6	Inverse PCR	32
2.8.7	Agarosegelelektrophorese	33
2.8.8	Reinigung von DNA-Fragmenten	33
2.8.8.1	Direkte Reinigung über eine Silikamembran	34
2.8.8.2	Reinigung über Agarosegel und Silikasuspension oder -membran.....	34
2.8.9	Klonierung in pGEM [®] -T Easy-Vektor.....	34
2.8.10	Klonierung in Expressionsvektoren.....	35
2.8.10.1	Hydrolyse der DNA mit Restriktionsendonukleasen	35
2.8.10.2	Ligation.....	35
2.8.11	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	35
2.8.12	Selektion positiver Kolonien	36
2.8.12.1	Blau-Weiß-Selektion	36
2.8.12.2	Restriktionsanalyse	36
2.8.12.3	PCR-Screening	37
2.8.13	Plasmidisolierung.....	37
2.8.13.1	Minipräparation.....	37
2.8.13.2	Wizard [®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)	38
2.8.13.3	NucleoBond [®] Xtra Midi Plasmid DNA Purification (Machery-Nagel)	38
2.8.14	Heterologe Expression in <i>E. coli</i> -Zellen	38
2.8.15	Heterologe Coexpression von Chaperonen in <i>E. coli</i> -Zellen	39
2.8.16	Solubilisierung und Renaturierung von <i>inclusion bodies</i>	39
2.8.17	Zellfreie heterologe Expression	40
2.8.18	Transformation kompetenter <i>K. lactis</i> -Zellen	40
2.8.19	Selektion positiver <i>K. lactis</i> -Zellen	42
2.8.20	Heterologe Expression in <i>K. lactis</i> -Zellen	42
2.8.21	Transformation kompetenter INVSC1-Zellen.....	43
2.8.22	Heterologe Expression in <i>S. cerevisiae</i>	43
2.8.23	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	43
2.8.24	Sequenzierung	44
2.8.25	Sequenzanalyse.....	44
2.9	Biochemische Methoden	46
2.9.1	Affinitätsreinigung über Metallchelatchromatographie	46

Abkürzungsverzeichnis

2.9.1.1	Nickel-Affinitätschromatographie.....	47
2.9.1.2	Cobalt-Affinitätsreinigung.....	49
2.9.2	Umpuffern und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen	49
2.9.3	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	49
2.9.4	Proteinfällung mit Trichloressigsäure	50
2.9.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	50
2.9.6	Blotten von SDS-Gelen	51
2.9.7	Proteinfärbung.....	52
2.9.8	N-terminale Sequenzierung von Proteinen	52
2.9.9	ESI-MS/MS Sequenzierung.....	52
2.9.10	Enzymassay zur Aktivitätsbestimmung der SAO	53
2.9.11	Produktidentifizierung mittels GC-MS	54
2.9.12	Glucoseoxidase-Assay	54
3.	Ergebnisse	56
3.1	Identifizierung und Charakterisierung der Salicylalkohol-Oxidase (SAO) aus <i>C. tremulae</i>.....	56
3.1.1	Identifizierung und Klonierung des cDNA-Transkriptes der CtSAO	57
3.1.2.	Expression der SAO aus <i>C. tremulae</i> in <i>E. coli</i> -Zellen	58
3.1.3.	Umklonierung der SAO aus <i>C. tremulae</i> mit anschließender Expression in <i>E. coli</i> -Zellen	59
3.1.4	Coexpression der SAO aus <i>C. tremulae</i> mit Chaperonen	60
3.1.5	Aktivitätsmessung der SAO aus <i>C. tremulae</i>	63
3.1.6	Bestimmung der Substratspezifität der CtSAO	66
3.1.7	Untersuchungen der posttranslationalen Modifikationen der CtSAO.....	67
3.1.7.1	Heterologe Expression der CtSAO in <i>K. lactis</i> -Zellen.....	67
3.2	Identifizierung und Charakterisierung der Salicylalkohol-Oxidase aus <i>C. populi</i>	70
3.2.1	Identifizierung des cDNA-Transkriptes der SAO aus <i>C. populi</i>	71
3.2.2	Klonierung der cDNA-Transkripte der CpSAO.....	73
3.2.3	Expression der CpSAO in <i>E. coli</i> -Zellen.....	76
3.2.4	Coexpression der CpSAO mit Chaperonen in <i>E. coli</i> -Zellen	76
3.2.5	Aktivitätsmessung der CpSAO.....	77
3.2.6	Bestimmung der Substratspezifität der CpSAO	78
3.3	Identifizierung einer weiteren GMC-Sequenz aus <i>C. populi</i>.....	79
3.3.1	Gewebespezifische Lokalisation der cDNA-Transkripte der CpSAO2 und CpGMC mit Hilfe von RT-PCR.....	81
3.4	Identifizierung und Charakterisierung der SAO aus <i>P. vitellinae</i>.....	85
3.4.1	Identifizierung des cDNA-Transkriptes der SAO aus <i>P. vitellinae</i>	85

Abkürzungsverzeichnis

3.4.2	Klonierung des cDNA-Transkriptes der PvSAO in Expressionsvektoren	87
3.4.3	Coexpression der PvSAO mit Chaperonen in <i>E. coli</i> -Zellen	88
3.4.4	Sequenzmodifizierung des cDNA-Transkriptes der PvSAO mit anschließender Klonierung in pET-22b(+)-modMCS und Expression in <i>E. coli</i> -Zellen.....	89
3.4.5	Renaturierung der PvSAO aus <i>inclusion bodies</i>	91
3.4.6	Zellfreie Expression der PvSAO	92
3.5	Ansätze zur Identifizierung einer GMC-homologen Sequenz aus <i>P. cochleariae</i> und <i>G. viridula</i>.....	93
3.6	Vervollständigung der genetischen Information weiterer Enzyme, die an der Biosynthese des Wehrsekretes von <i>C. populi</i> beteiligt sind	98
3.6.1	Versuche zur Identifizierung des cDNA-Transkriptes der β -Glucosidase aus dem Wehrapparat	99
3.6.1.1	Identifizierung eines β -Glucosidase-homologen cDNA-Transkriptes.....	99
3.6.1.2	Identifizierung einer weiteren β -Glucosidase aus dem cDNA-Pool des Wehrapparates.....	101
3.6.1.3	<i>Full-length</i> -Amplifizierung der β -Glucosidase aus dem Wehrapparat mit anschließender Klonierung und Expression in <i>E. coli</i> -Zellen	103
3.6.1.4	Expression der CpGLUWA2 in <i>S. cerevisiae</i> -Zellen.....	105
3.6.1.5	Gewebespezifische Lokalisation der cDNA-Transkripte der CpGLUWA2 und CpGLU.....	107
3.6.2	Versuche zur Identifizierung des cDNA-Transkriptes der Katalase aus dem Wehrapparat....	109
3.6.2.3	Ansatz zur Identifizierung der genetischen Information der Katalase auf Ebene der genomischen DNA.....	112
4.	<i>Diskussion</i>.....	114
4.1	Identifizierung und Charakterisierung der SAO aus <i>C. tremulae</i> und <i>C. populi</i>.....	114
4.1.1	Biochemische Charakterisierung der CtSAO und CpSAO	116
4.1.2	Ursprung und Entwicklung der CtSAO und CpSAO	119
4.1.3	Funktionen weiterer GMC-Sequenzen unterschiedlicher Organismen	122
4.1.4	Identifizierung einer weiteren SAO aus <i>C. populi</i>	123
4.1.5	Identifizierung einer weiteren GMC-homologen Sequenz aus <i>C. populi</i>	125
4.1.5.1	Gewebespezifische Lokalisation GMC-homologer Sequenzen	125
4.2	Identifizierung der β-Glucosidase und Katalase aus dem Wehrapparat von <i>C. populi</i>	126
4.3	Identifizierung der SAO aus <i>P. vitellinae</i>	129
4.4	Synthese Iridoider Monoterpene als Abwehrstoffe.....	131
4.5	Ausblick.....	133

5. Zusammenfassung	136
5.1 Deutsche Zusammenfassung	136
5.2 Abstract	137
6. Literaturverzeichnis.....	139
7. Anhang.....	151

Abkürzungsverzeichnis

AAP	Abridged-Anchor-Primer
AUAP	Abridged-Universal-Anchor-Primer
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
CAU	Christian-Albrechts-Universität
CAPS	Cyclohexylaminopropansulfonsäure
cDNA	<i>copy</i> -DNA
CpGLU	β -Glucosidase aus <i>Chrysomela populi</i>
CpGLUWA	β -Glucosidase aus dem Wehrapparat von <i>Chrysomela populi</i>
CpKAT	Katalase aus <i>Chrysomela populi</i>
<i>C. populi</i>	<i>Chrysomela populi</i>
CpSAO	Salicyl-Alkohol-Oxidase aus <i>Chrysomela populi</i>
<i>C. tremulae</i>	<i>Chrysomela tremulae</i>
CtSAO	Salicyl-Alkohol-Oxidase aus <i>Chrysomela tremulae</i>
DCIP	Dichlorindophenol
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DHS	Desoxyhyposin-Synthase
DMADP	Dimethylallyldiphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	Desoxycholat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Elektronenionisation
eIF5A	Eukaryontischer Initiationsfaktor 5A
EP	Expressionsprimer
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FID	Flammenionisationsdetektor
FMO	Flavinabhängige Monooxygenase
GC	Gaschromatographie
GMC	Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktase
GSP	genspezifischer Primer
<i>G. viridula</i>	<i>Gastrophysa viridula</i>
His	Histidin
HSS	Homospermidin-Synthase
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
IDP	Isopentenylidiphosphat
IP	Integrationsprimer
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

Abkürzungsverzeichnis

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
MCS	<i>Muliple-cloning-site</i>
min	Minuten
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
MS	Massenspektroskopie
Ni-NTA	Nickel-Nitrolotriessigsäure
OD	optische Dichte
OLR	offener Leserahmen
PA	Pyrrrolizidin-Alkaloid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
<i>P. cochleariae</i>	<i>Phaedon cochleariae</i>
<i>P. vitallinae</i>	<i>Phratora vitellinae</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PvSAO	Salicyl-Alkohol-Oxidase aus <i>Phratora vitelinae</i>
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunden
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAO	Salicylalkohol-Oxidase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
<i>T. castaneum</i>	<i>Tribolium castaneum</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
% (v/v)	Prozent Masse pro Volumen
% (w/v)	Volumenprozent
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid

1. Einleitung

Einst wurde der Biologe und Genetiker J.B.S. Haldane von Theologen gefragt, welche Schlüsse man über Gott aus seiner Schöpfung ziehen könne. Er beantwortete die Frage mit: „*Eine übermäßige Vorliebe für Käfer*“.

Die Aussage bezieht sich auf die Tatsache, dass 25% aller bislang beschriebenen Tiere Käfer (Coleoptera) sind. Folglich sind die Käfer mit über 350.000 Arten auch die weltweit größte Ordnung aus der Klasse der Insekten (Insecta). Der bislang älteste Fund fossiler Käfer ist etwa 265 Millionen Jahre alt und stammt aus dem Perm. Aufgrund der Vielzahl und langen Evolution der Käfer übersteigt ihre Diversität die jeder anderen Tier- und Pflanzenordnung. Noch heute wird jährlich eine hohe Anzahl neuer Arten entdeckt, wobei Schätzungen von bis zu 8 Millionen Käferarten weltweit ausgehen (Campell, 2003).

Lange glaubte man, dass sich die Insekten parallel zur Radiation der Blütenpflanzen vor 65 Millionen Jahren differenzierten. Doch mittlerweile besteht die Annahme, dass dies lange vor der Kreidezeit verlief. So hätten die Insekten als Bestäuber die enorme Radiation der Angiospermen forciert (Labandeira and Sepkoski, 1993).

Unumstritten ist jedoch die Tatsache, dass eine Koevolution zwischen Pflanzen und Insekten besteht. Den Käfern gelang also das, was die Dinosaurier nicht schafften: sich im Laufe der Erdgeschichte immer wieder an die kontinuierlich wechselnden klimatischen Verhältnisse anzupassen. Sie sind in der Lage fremde ökologische Standorte und verschiedenste neue Futterquellen zu erschließen. Die beeindruckende Anpassungsfähigkeit sichert den Käfern das Überleben seit vielen Millionen Jahren und ermöglichte ihnen nahezu jede Klimazone der Erde zu erobern (Farrell, 1998; Labandeira and Sepkoski, 1993).

Eine mit circa 450 Arten in Deutschland beheimatete Familie der Coleoptera ist die der Blattkäfer (Chrysomelidae). Ihre Namensgebung und Einordnung in die Systematik geschah bereits 1802 durch den französischen Insektenkundler P.A.L. Latreille, den die zahlreichen metallisch leuchtenden Farben der Blattkäferarten faszinierten. Die Benennung leitet sich aus zwei griechischen Wörtern her: *Chrysos* (χρυσός) zu Deutsch Gold und *melolanthion* (σκαθάρι) Käfer.

In den folgenden Kapiteln wird anhand einiger Merkmale der Chrysomeliden verdeutlicht, warum die Käfer zu Recht als „Meister der Evolution“ bezeichnet werden.

1.1 Anpassungsfähigkeiten adulter Blattkäfer

Der Körperbau der Käfer unterscheidet sich optisch von der üblichen sichtbaren dreigliedrigen Bauweise der anderen Insekten. Diese gliedert sich auch in Kopf, Brust und Hinterleib, allerdings bilden der Meso- und Metathorax des Brustbereiches mit dem Hinterleib eine Einheit, die von den Deckflügeln überlagert wird. Die Art des Körperbaus ist sehr vielförmig. Neben langen, schlanken Formen gibt es auch gedrungene, kurze Typen. Dabei treten flache bis kugelige Körper auf. Allein die Körperform befähigt die Käfer sich an verschiedene Lebensräume anzupassen. So haben zum Beispiel im Wasser lebende Käfer immer eine stromlinienförmige Gestalt.

Die Flugfähigkeit erlangten die Insekten im Carbon und Perm. Dies war der sogenannte Schlüssel zum Erfolg. Flieger können Lebensräume schneller erobern als Läufer, außerdem ermöglicht ihnen diese Fähigkeit Räubern effektiver zu entkommen und Geschlechtspartner lassen sich auf diese Weise leichter finden. Vermutlich haben sich die Flügel aus kurzen, beweglichen Ausstülpungen der Cuticula entwickelt, jedoch ist bis heute ungeklärt, wozu diese Ausstülpungen ursprünglich dienten (Campbell, 2003). Die beiden Flügelpaare unterscheiden sich bei den Käfern deutlich voneinander. Die Hinterflügel (Alae) entspringen am hinteren Thoraxsegment. Sie sind häutig und nur an den Flügeladern chitiniert. Die Vorderflügel (Elytren) entspringen dem mittleren Thoraxsegment und sind stark chitiniert. Sie beschirmen die empfindlichen Hinterflügel und schützen durch ihre Härte den gesamten Käfer vor schädlichen Umwelteinflüssen. Dabei kommt ihnen nicht nur die Konsistenz der Flügeldecken zugute, sondern auch deren Färbung. Viele Elytren der Blattkäfer haben eine grünliche Farbe, die ihnen auf ihrer Futterpflanze eine optimale Tarnung vor Fraßfeinden bietet. Daneben gibt es Arten, die eine auffällige Färbung zeigen. Diese sogenannte aposematische Färbung warnt potentielle Feinde vor ihrer Giftigkeit. Abweichend von anderen Insektengruppen, wie zum Beispiel den Lepidoptera, gibt es bei den Blattkäfern hinsichtlich der Färbung keinen geschlechtlichen Dimorphismus (Pasteels et al., 1989).

Neben der aposematischen Färbung besitzen diverse Blattkäferarten zur Abschreckung ihrer Fraßfeinde ein Wehrsekret (Hollande, 1905), welches in speziellen Drüsenzellen gebildet wird. Blattkäfer besitzen eine Vielzahl dieser Drüsenzellen, deren Öffnungen perlschnurartig über das gesamte Pronotum und die Elytren verteilt sind (Abbildung 1 A). Sowohl die Bildung des Wehrsekretes als auch die Anordnung der Drüsenzellen dieser Insekten ist ungewöhnlich. Üblicherweise findet man, wie z.B. bei den Blattkäferlarven, ein Reservoir unterhalb der Cuticula, das mit Wehrsekret gefüllt ist (1.2). Meist wird eine Vorstufe des Sekretes über sekretorische Zellen in das Reservoir sezerniert. Erst im Reservoir findet der letzte Biosyntheseschritt zum giftigen Wehrsekret statt (Pasteels et al., 1982). In adulten Blattkäfern akkumuliert das Wehrsekret nicht in

einem Reservoir, sondern in den Vakuolen der sekretorischen Zellen, die an einem länglichen Gang zusammenlaufen. Dieser mündet an der Körperoberfläche (Abbildung 1 B).

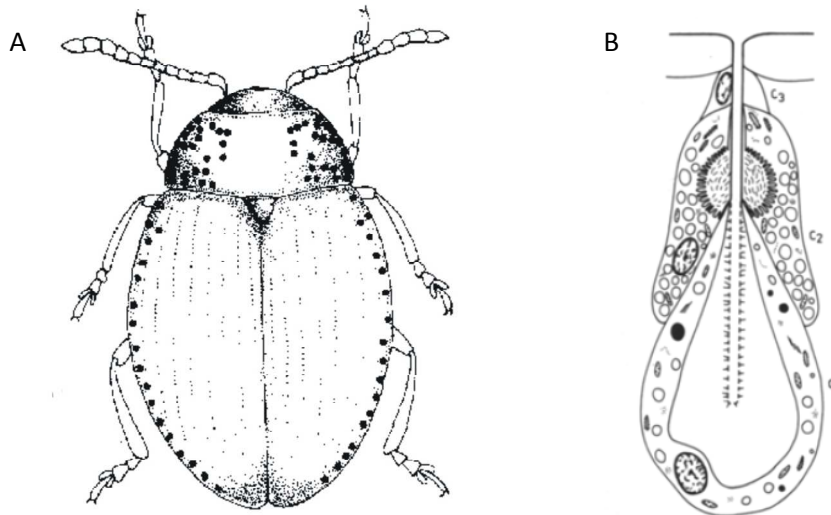


Abbildung 1: A: Anordnung der Wehrdrüsen bei *Phaedon cochleariae* (Deroe and Pasteels, 1982). B: Morphologischer Längsschnitt durch eine Wehrdrüse von *Gastrophysa viridula* (Pasteels et al., 1989): C₁ und C₂: Drüsenzellen. C₃: Kanalzelle.

Bislang konnten Wehrdrüsenzellen bei vier Unterfamilien der Chrysomelidae identifiziert werden. Die chemische Zusammensetzung des Wehrsekretes variiert innerhalb dieser Unterfamilien sehr stark. In folgender Tabelle sind einige Beispielarten mit ihrer Futterpflanze sowie der chemischen Zusammensetzung des Wehrsekretes aufgeführt.

Tabelle 1: Unterfamilien der Chrysomelidae mit Beispielarten sowie deren Futterpflanzen und chemische Zusammensetzung des Wehrsekretes (Pasteels et al., 1989).

Unterfamilien mit Beispielarten	Futterpflanzen	Aktive Komponente des Wehrsekretes
Criocerinae		
<i>Liloceris lillii</i>	Liliaceae	Phenylalanin-Derivate
Chrysomelinae		
<i>Chrysomela populi</i>	Salicaceae	Isoxazolinon
<i>Chrysolina coerulans</i>	Lamiaceae	Cardenolide
<i>Oreina cacaliae</i>	Asteraceae	Pyrrolizidin-Alkaloide
Galerucinae		
<i>Diabrotica balteata</i>	Cucurbitaceae	Cucurbitacine
<i>Longitarsus jacobaeae</i>	Asteraceae	Pyrrolizidin-Alkaloide
Alticinae		
<i>Diabolia borealis</i>	Lamiaceae	Iridoide Glucoside

Das effiziente Zusammenspiel zwischen der aposematischen Färbung und dem Wehrsekret bietet den Blattkäfern einen enormen Vorteil. Dank der Wehrkombination sind sie ideal vor Fraßfeinden aus der Luft geschützt. Zudem bieten ihre metallisch leuchtenden Farben durch Reflektion und Adsorption Schutz vor Überhitzung und schädlicher UV-Strahlung. So sind die Blattkäfer in der Lage gefahrlos junge Triebe an den ungeschützten Spitzen ihrer Futterpflanzen zu fressen (Pasteels et al., 1989).

Im Zuge der Koevolution gilt es sich nicht nur gegen seine Fraßfeinde zu behaupten, sondern auch die Abwehrstrategien der vorhandenen Futterquellen zu überlisten. Wie in Tabelle 1 beispielhaft aufgeführt wurde, fressen bestimmte Blattkäferarten bevorzugt Korbblütler (Asteraceen), auf die sie sich spezialisiert haben. Diese Arten der Korbblütler besitzen Pyrrolizidin-Alkaloide (PAs) als sekundäre Inhaltsstoffe. PAs werden als ungiftige, hydrophile *N*-Oxide in der Zellvakuole einiger Pflanzenorgane gespeichert. Werden sie jedoch von Insekten gefressen, findet im alkalischen Milieu des Darms eine unspezifische Reduktion zum lipophilen, tertiären Alkaloid statt. Aufgrund der Lipophilie wird diese protoxische Form des Alkaloids aus dem Darm resorbiert und gelangt dadurch in die Hämolymphe, wo die eigentliche Giftungsreaktion stattfindet. Die protoxische Form wird durch Cytochrom-P-450-Monooxygenasen in giftige Pyrrolderivate umgewandelt. Diese wirken mutagen auf adulte Tiere und Larven (Chen et al., 2010; Frei et al., 1992). PAs dienen auf diese Weise der Pflanze als Abwehrstoffe. Wie ist es möglich, dass einige Blattkäfer giftige, PA-haltige Pflanzen als Nahrungsquelle nutzen können ohne dabei Schaden zu erleiden?

Oreina cacaliae lebt auf dem PA-haltigen Grauen Alpendost (*Adenostyles alliariae*) und nimmt die PA-*N*-Oxide über dessen Blätter auf. Im Darm erfolgt keine Reduktion zur protoxischen Form des Alkaloids, stattdessen werden die *N*-Oxide über spezifische Transporter in die Hämolymphe aufgenommen (Hartmann et al., 1999; Narberhaus et al., 2004a). Von dort aus gelangt die nicht giftige Form der Alkaloide in Speichergewebe, die die exokrinen Wehrdrüsen bedienen.

Untersuchungen an *Longitarsus*-Arten haben gezeigt, dass diese Arten die protoxische Form über den Darm in die Hämolymphe resorbieren. Dort findet eine spezifische *N*-Oxidation zum ungiftigen Alkaloid statt (Narberhaus et al., 2003). Das Phänomen der *N*-Oxidation ist bei anderen PA-adaptierten Insekten hinreichend bekannt. In unserer Arbeitsgruppe konnte das dafür verantwortliche Enzym bereits in der Raupe des Jakobskrautbärs *Tyria jacobaeae* (Lepidoptera, Arctiidae) identifiziert und biochemisch charakterisiert werden (Lindigkeit et al., 1997; Naumann et al., 2002). Es handelt sich um eine flavinabhängige Monooxygenase (FMO), die ebenfalls in den Raupen des Bärenspinners *Grammia geneura* (Lepidoptera, Arctiidae) (Sehlmeyer et al., 2010) nachgewiesen wurde. Das für die *N*-Oxidation in *Longitarsus*-Arten verantwortliche Enzym konnte

bislang nicht ausgemacht werden, neuere Analysen sprechen dennoch dafür, dass es der FMO anderer Insekten ähnlich sein muss (Narberhaus et al., 2004b).

Die Anpassungsstrategien dieser beiden Blattkäfervertreter zeigen beispielhaft, wie Insekten die Abwehr ihrer Futterpflanzen umgehen und sich damit eine exklusive Futterquelle erschlossen haben. Und nicht nur das: Zusätzlich haben sie die Fähigkeit entwickelt die Abwehrstoffe ihrer Wirtspflanzen zu sequestrieren, das heißt sie aufzunehmen und zu speichern. So machen sie sich pflanzliche Sekundärmetabolite zu eigen und setzen diese selbst gegen ihre Feinde ein.

Neben ihrem Eigenschutz müssen adulte Tiere auch ihre Nachkommenschaft schützen, damit der Fortbestand gesichert wird. Die Eier der Insekten sind angesichts ihrer Unbeweglichkeit eine leichte Beute, die durch ihren hohen Proteingehalt sehr beliebt ist. Daher benötigen sie einen besonderen Schutz. Eine interessante Vorgehensweise betreiben dabei die Ameisen-Sackkäfer (*Clytra laeviuscula*), deren Weibchen die Eier mit einer Kothülle (Skatoconche) auskleiden. Fällt das Skatoconche auf den Boden, wird es von der Roten Waldameise (*Formica rufa*) in ihr Nest getragen. Die Larven schlüpfen dort und ernähren sich von Resten abgestorbener Tiere sowie von Ameiseneiern, wenn diese erreichbar sind. Sie sondern Pheromone ab, welche den Duftstoffen der Ameiseneier ähnlich sind. Auf diese Weise werden die Larven nicht als Parasiten erkannt und können die gesamte Dauer der Larvenentwicklung (2-4 Jahre) unerkannt im Ameisennest verbringen. Zur Verpuppung ziehen sich die Larven wieder in die Kothülle zurück, die dazu von ihnen ausgebaut wurde. Die jungen Imagines verlassen die Kothülle erst, wenn ihr Chitinpanzer vollkommen ausgehärtet ist. Nur auf diese Weise können sie gefahrlos das Ameisennest verlassen. (Perny, 2007). Einige Blattkäferweibchen legen ihre Eier bevorzugt auf der Blattunterseite oder in kleine Blattvertiefungen ab, sodass sie außerhalb der Sichtweite von Angreifern aus der Luft sind. Zudem enthalten die Eier einiger *Chrysomela*-Spezies und die des Kleinen Weidenblattkäfers (*Phratora vitellinae*) die Wehrsubstanz Salicin. Die Salicinkonzentration eines einzelnen Eis ist so hoch, dass sie auf eine Ameise tödlich wirken kann (Pasteels et al., 1986).

Die aus den Eiern geschlüpften Larven haben im Laufe der Evolution einen eigenen Wehrmechanismus entwickelt. Dieser wird im folgenden Kapitel eingehend erläutert.

1.2 Chemische Wehrmechanismen der Blattkäferlarven

Innerhalb der Chrysomelidae sind viele Arten bekannt, bei denen sich nicht nur die adulten Tiere, sondern auch die Larven chemisch verteidigen. Die Larven der Gattungen *Chrysomelina* und *Phyllodectina* besitzen neun am Rücken gelegene Drüsenpaare, die sich über den Meso- und Metathorax sowie über die folgenden sieben abdominalen Segmente erstrecken. Eine Drüse besteht

aus einem Reservoir, das unterhalb der Cuticula liegt (Abbildung 2). Das Reservoir enthält das Wehrsekret, welches bei Gefahr über Muskelkontraktion durch die Öffnung nach außen gedrückt wird, wo es tröpfchenförmig hervortritt (Abbildung 11 B, Kapitel 3.1). Ist die Gefahr gebannt, wird das Sekret wieder zurück in das Reservoir eingezogen und steht zum erneuten Gebrauch zur Verfügung. An das Reservoir grenzen viele kleine Drüsenzellen, über die Ausgangsstoffe und Enzyme zur Bildung der Wehrsubstanz in das Reservoir sezerniert werden. Folglich findet die eigentliche Biosynthese der Wehrsubstanz im wässrigen Wehrsekret statt, das sich extrazellulär im Reservoir befindet. Durch den charakteristischen, beißenden Geruch der Wehrsubstanz dient das Wehrsekret den Larven als Repellent.

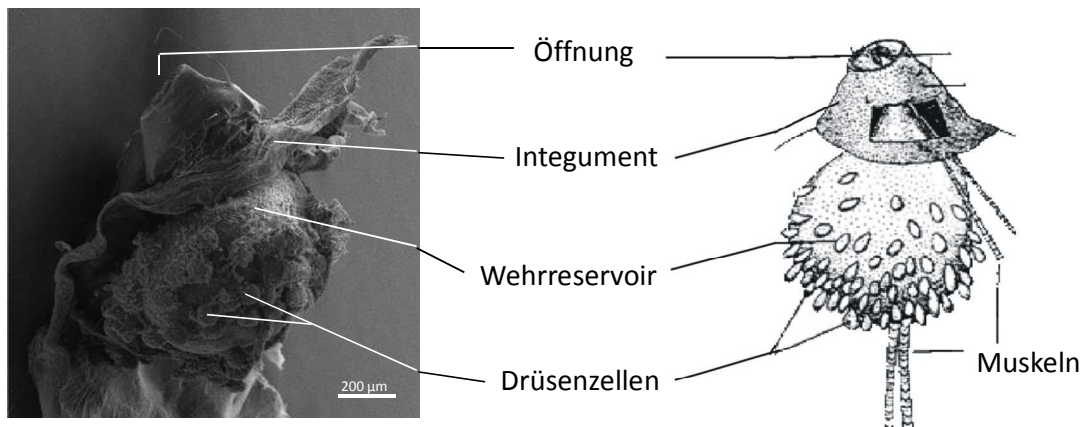


Abbildung 2: Abbildungen eines Wehrapparates von *C. populi*. Links: REM-Aufnahme eines Wehrapparates (2.7). Rechts: Detailzeichnung eines Wehrapparats, modifiziert nach Hinton (1915).

1662 wurden erstmals die Wehrdrüsen der Larven von *Chrysomela populi*, dem Pappelblattkäferlarven, beschrieben (Claus, 1662). Das Wehrsekret wurde damals aufgrund seines Geruchs und sauren Verhaltens auf Lackmuspapier als blausäurehaltig identifiziert. Weiterführende Studien über die Wehrdrüsen verschiedener Arten widerlegten dies. Sie zeigten, dass die Morphologie und Histologie der Wehrdrüsen der unterschiedlichen Taxa konstant ist. Jedoch unterscheiden sich die Wehrsekrete sowohl in der Zusammensetzung als auch in der Biosynthese.

1.2.1 Synthese der Iridoiden Monoterpene

Das Vorkommen Iridoider Monoterpene im Wehrsekret einer Larve wurde erstmals bei dem Breiten Weidenblattkäfer (*Plagiodera versicolora*) von Meinwald und Mitarbeitern (1977) beschrieben. Als geruchsgebende Komponente wurde Plagiodial identifiziert. Ein weiteres Iridoides Monoterpen, das

zum Beispiel bei den Larven des Meerrettichlattkäfers (*Phaedon cochleariae*) ausgemacht wurde, ist das Chrysomelidial (Pasteels et al., 1982).

Die Synthese der aktiven Komponenten geschieht im Wehrreservoir selbst (Abbildung 3). Von der Ausgangssubstanz 8-Hydroxygeraniol-8-O- β -D-glucosid wird in einem ersten Schritt der Glucoserest enzymatisch abgespalten. Das so entstandene 8-Hydroxygeraniol wird wiederum durch eine Oxidase enzymatisch zu 8-Oxocitral umgewandelt. Den letzten Schritt zum Plagiodial und Chrysomelidial katalysiert eine Cyclase respektive eine Cyclase und Isomerase (Soe et al., 2004; Veith et al., 1994).

Die Synthese der Iridoiden Monoterpene wird auch als *de novo* Synthese bezeichnet, da die Vorstufe, das 8-Hydroxygeraniol-8-O- β -D-glucosid, unter hohem Energieaufwand vom Käfer selber gebildet wird. Dies geschieht im Fettkörper unter Verwendung von Isopentenylidiphosphat (IDP) und Dimethylallyldiphosphat (DMADP), welche dem Acetat-Mevalonat-Weg entspringen. IDP und DMADP kondensieren zu Geranyldiphosphat, aus dem durch Dephosphorylierung Geraniol gebildet wird (Oldham et al., 1996). Geraniol wird durch Hydroxylierung und Glycosylierung zum 8-Hydroxygeraniol-8-O- β -D-glucosid umgewandelt (Daloze and Pasteels, 1994; Veith et al., 1997). Über einen selektiven Transporter gelangt das Glucosid in die Hämolymphe, von wo aus es erneut per spezifischem Transport über die Drüsenzellen in das Reservoir gelangt (Burse et al., 2009; Feld et al., 2001).

Neben der Gefahr durch andere Tier bedrohen auch pathogene Bakterien und Pilze die Larven. Während Bakterien nicht die Barriere der Cuticula überwinden können, vermögen Pilze diese mit Hilfe ihrer Enzyme zu durchdringen. Mikrobiologische Studien haben gezeigt, dass Chrysomelidial als Hauptkomponente des Wehrsekrets antibakterielle und fungizide Eigenschaften besitzt. Die antibakterielle Wirkung konnte für das gramnegative Bakterium *Escherichia coli* belegt werden, jedoch nicht für grampositive Bakterien, wie zum Beispiel *Micrococcus luteus*. Als Fungizid weist Chrysomelidial eine ähnlich starke Wirkung wie das kommerziell erhältliche Nystatin auf. Die Testergebnisse beruhen auf Versuchen mit dem Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae* (Gross et al., 1998).

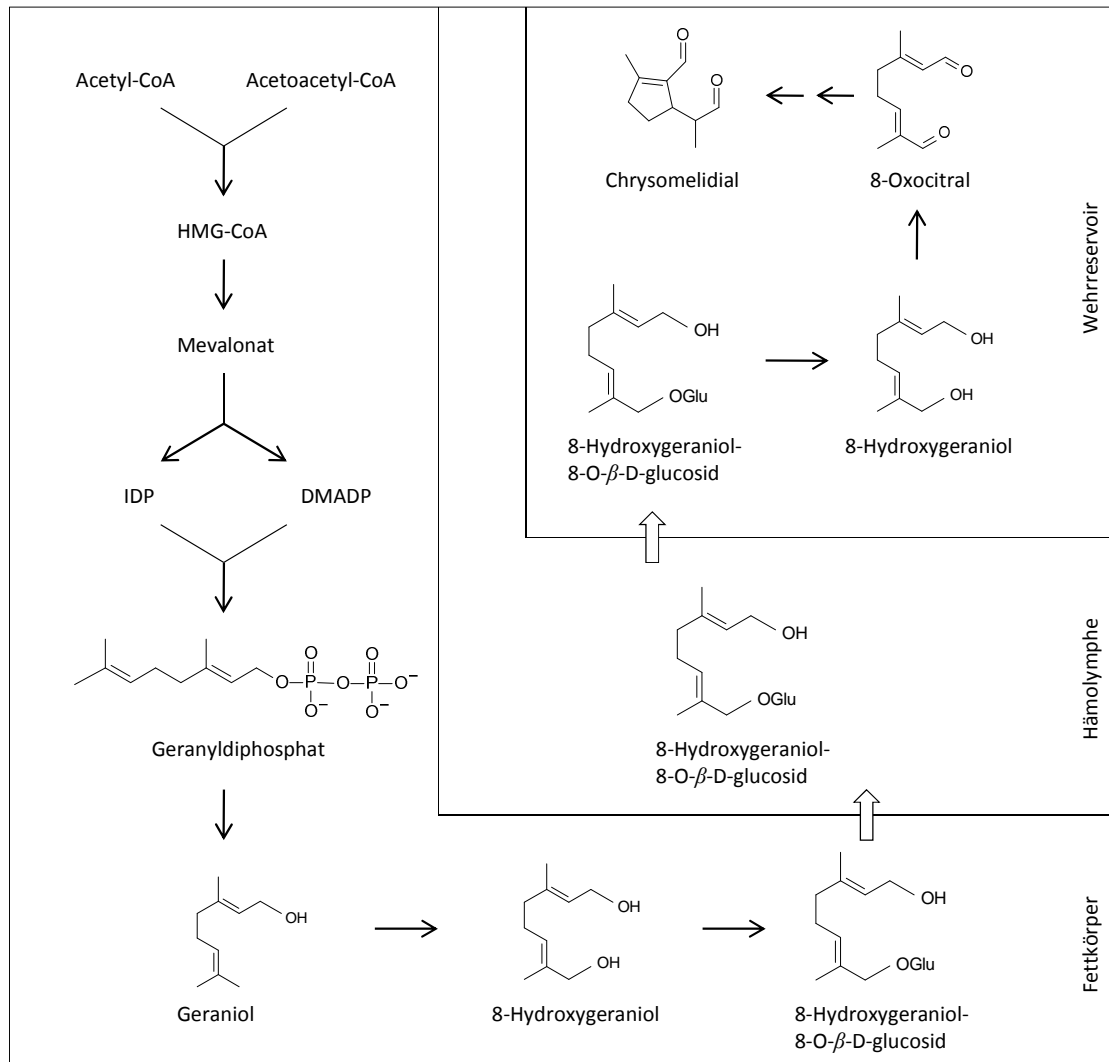


Abbildung 3: Synthese, Transport und Umsetzung der Ausgangssubstanz für die Bildung Iridoider Monoterpe. 8-Hydroxygeraniol-8-O-β-D-glucosid wird im Fettkörper der Larven gebildet und über die Hämolymphe in das Wehrreservoir eingebracht. Dort findet die Umwandlung zum Chrysolmelidial statt. Die Blockpfeile stellen jeweils den spezifischen Transport des 8-Hydroxygeraniol-8-O-β-D-glucosid in die Hämolymphe bzw. in das Wehrreservoir dar (Glu, Glucose).

1.2.2 Sequestrierung phenolischer Glucoside

Einige Larven der Gattung *Chrysomela* sowie die Larven von *P. vitellinae* sind in der Lage sekundäre Inhaltsstoffe ihrer Wirtspflanze zu sequestrieren (Hollande, 1905; Pasteels et al., 1983). Sie fressen Blätter von Weiden- und Pappelgewächsen, die das phenolische Glucosid Salicin enthalten. Fütterungsversuche mit Thiosalicin haben bei *Chrysomela populi* gezeigt, dass das Salicin vom Darm über einen unspezifischen Glucosid-Transporter in die Hämolymphe aufgenommen wird. Der Transfer von der Hämolymphe in die Wehrdrüse geschieht jedoch über einen spezifischen Transporter (Discher et al., 2009; Kuhn et al., 2004). Nach Sezernierung in das Drüsenreservoir wird der Zuckerrest des Salicins von einer β-Glucosidase abgespalten. Das so entstandene Saligenin

(Salicylalkohol) wird anschließend durch eine Salicylalkoholoxidase (SAO) in Salicylaldehyd umgewandelt (Brückmann, 2002b; Pasteels et al., 1990). Als Nebenprodukt entsteht Wasserstoffperoxid, das durch eine Katalase entgiftet wird.

Die gebildete Menge an Salicylaldehyd im Wehrsekret ist so hoch, dass es eine eigene organische Phase bildet, die sich deutlich von der wässrigen enzymhaltigen Phase abgrenzt. Als flüchtiges, sehr intensiv duftendes Reagenz eignet sich der Aldehyd ideal als Repellent.

Neben der unspezifischen Aufnahme des Glucosids in die Hämolymphe sind die Larven auch fähig überschüssiges Salicin wieder auszuscheiden. Dazu wird das Salicin über einen unspezifischen Transporter in die Malpighischen Gefäße aufgenommen. Diese dienen als Exkretionsorgan und geben ihren Inhalt in den Dickdarm ab. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass die protoxische Form nicht im Insektenkörper unkontrolliert akkumuliert (Discher et al., 2009).

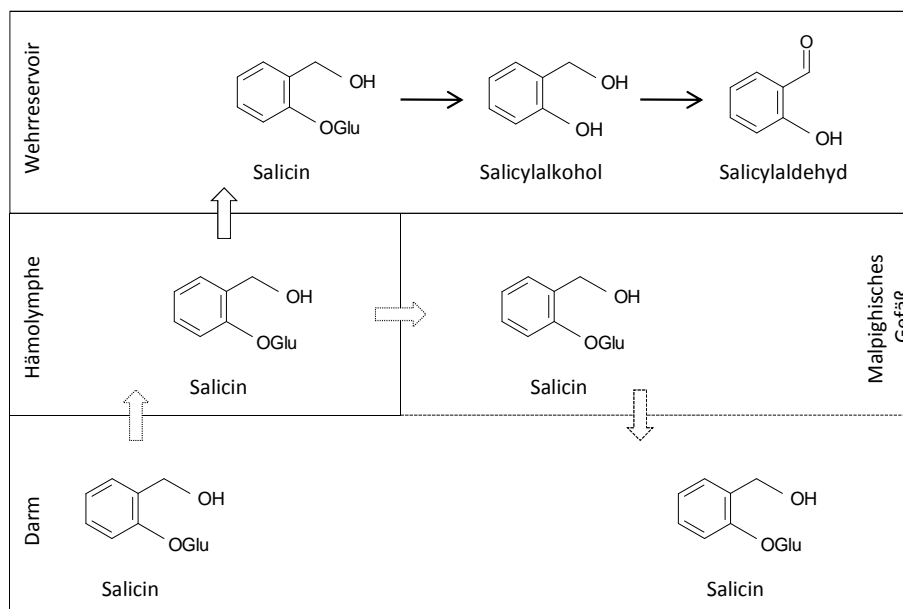


Abbildung 4: Transport des Salicins durch die verschiedenen Kompartimente des Larvenkörpers und Umsetzung zum Salicylaldehyd im Wehrreservoir. Gestrichelte Blockpfeile stellen den unspezifischen Transport des Salicins dar, der Blockpfeil mit durchgezogener Linie symbolisiert die spezifische Aufnahme in das Wehrreservoir (Glu, Glucose).

Wie auch *Chrysomelidial* besitzt Salicylaldehyd antibakterielle und fungizide Eigenschaften (Gross et al., 2002). Darüber hinaus wurden zytotoxische Effekte gegenüber Insektenzellkulturen beobachtet. Das leicht flüchtige Agens Salicylaldehyd kann in der Gasphase zoopathogene Pilze wie *Saccharomyces cerevisiae* über eine Distanz von 45 mm abtöten. Folglich ist der komplette Larvenkörper vor invasiven Hyphen geschützt.

Chrysomelidae sind also in der Lage ihre Wirtspflanze nicht nur als Nährstoffquelle, sondern auch als Apotheke zu nutzen. Aus ihr holen sie sich den pflanzlichen Sekundärstoff Salicin und binden diesen

in den eigenen Stoffwechsel mit ein. Nach geringfügigen Modifikationen steht ihnen das einst pflanzliche Abwehrmittel nicht nur als Repellent, sondern auch als Antibiotikum und Fungizid zur Verfügung.

1.2.3 Veresterung von Buttersäure-Derivaten mit pflanzlichen Alkoholen

In der Gattung *Chrysomela* wird auch noch eine dritte Strategie hinsichtlich der chemischen Abwehr verfolgt. Erstmals stellten Blum und Mitarbeiter 1972 fest, dass das Wehrsekret der Larven von *Chrysomela interrupta* aus einer Mischung von Estern der Isobuttersäure und der (S)-2-Methylbuttersäure mit 2-Phenylethanol besteht (Blum et al., 1972). Untersuchungen an Larven von *Chrysomela lapponica* zeigen, dass das Wehrsekret sogar aus 69 unterschiedlichen Estern der Isobuttersäure und der (S)-2-Methylbuttersäure besteht (Hilker and Schulz, 1994). Hauptsächlich kondensieren die Säuren mit Benzylalkohol, 2-Phenylethanol oder 8-Hydroxylinalool. Einen kleinen Anteil bilden zum Beispiel Diolester und Kondensate mit (Z)-3-Hexenol und Linalooloxid.

In einer Studie von Schulz *et al.* (1997) konnte gezeigt werden, dass die Säurekomponente des Esters aus dem Stoffwechsel der Larve stammt. Die Isobuttersäure wird aus der Aminosäure Valin generiert und 2-Methylbuttersäure aus Isoleucin. Die für die Veresterung benötigten Alkohole stammen hingegen aus der Wirtspflanze, welche teilweise als Glucoside aufgenommen werden. Aufgrund des Zusammenwirkens körpereigener Substanzen mit körperfremden Stoffen wird die Esterbildung auch als gemischte Wehrsekret-Synthese bezeichnet. Es konnte beobachtet werden, dass nur primäre und sekundäre Alkohole diese Reaktion eingehen, während tertiäre Alkohole und phenolische Hydroxylgruppen unverestert bleiben.

Einleitung

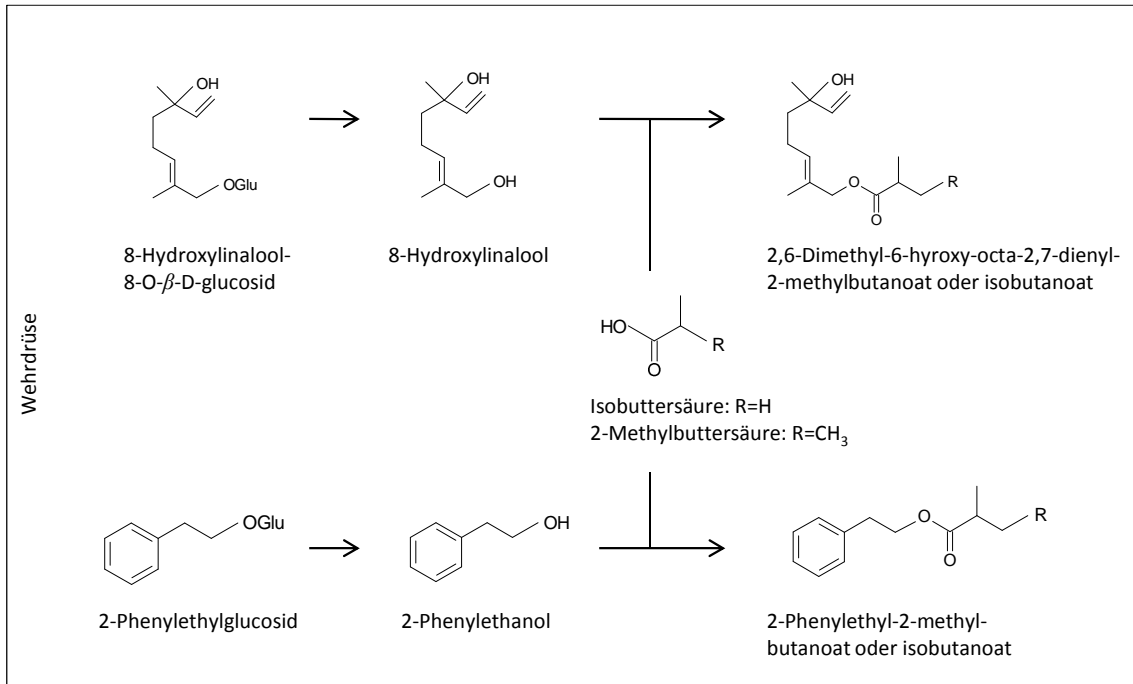


Abbildung 5: Synthese der Buttersäure-Derivate in der Wehrdrüse. Beispielhaft wird hier gezeigt, wie die pflanzlichen Sekundärstoffe 8-Hydroxylinalool-8-O- β -D-glucosid und 2-Phenylethylglucosid in ihre entsprechenden Alkohole umgewandelt und anschließend mit Isobuttersäure bzw. 2-Methylbuttersäure verestert werden (Glu, Glucose).

Der Transport der pflanzlichen Glucoside vom Darmlumen bis ins Wehrreservoir findet auf gleiche Weise wie der des Salicins statt. Der Transporter, der die Aufnahme der Glucoside in die Drüsenzelle bewirkt, besitzt eine geringe Substratspezifität, da er eine Vielzahl an Glucosiden in die Drüsenzelle einbringen muss (Kuhn et al., 2007). Da das Vorhandensein der Glucoside im Wehrreservoir belegt ist, liegt es nahe, dass auch hier eine β -Glucosidase den Alkohol freisetzt und die Esterbildung ebenfalls im Wehrreservoir stattfindet. In welchem Kompartiment die Isobuttersäure und die 2-Methoxybuttersäure gebildet werden und wie sie in das Reservoir gelangen, ist bis heute ungeklärt.

Während die Larven von *Chrysomela interrupta* nur auf salicinfreien Birken fressen, sind die Larven von *Chrysomela lapponica* auf Birken und Weiden zu finden. So lässt sich bei den Populationen, die auf Weiden fressen, zusätzlich Salicylaldehyd im Wehrsekret identifizieren. Dies deutet daraufhin, dass *C. lapponica* in der Lage ist Salicylaldehyd zu bilden als auch die Esterbildung zu katalysieren. Salicylaldehyd spielt jedoch bei mitteleuropäischen Larven von *Chrysomela lapponica* als Repellent eine untergeordnete Rolle. Allerdings konnte überraschenderweise bei finnischen Larven dieser Art, die auf Weiden leben, Salicylaldehyd als Hauptkomponente des Wehrsekrets identifiziert werden (Gross, 1994,1995).

1.3 Evolution der Wehrsekret-Synthese

Phylogenetische Untersuchungen anhand der 12S- und 16S-Untereinheiten der mitochondrialen ribosomalen RNA (rRNA) adulter Tiere deuten darauf hin, dass die autogene Bildung der Iridoiden Monoterpene die ursprüngliche Wehrsekret-Synthese ist (Termonia et al., 2001). Im Laufe der Evolution entwickelte sich aus ihr die wirtspflanzenabhängige Salicylaldehyd-Synthese. Vermutlich geschah dies zweimal unabhängig voneinander. Aus der Gattung *Phratora* gelang es *P. vitellinae* sich parallel zu mehreren Arten der Gattung *Chrysomela* an salicinhaltige Pflanzen anzupassen.

Vorteil dieser evolutionären Errungenschaft pflanzliche Vorstufen zur eigenen Verteidigung zu nutzen, ist die Erschließung einer neuen exklusiven Nahrungsquelle und ein damit verbundener ökonomischerer Energiehaushalt. Erstens entfällt die energieaufwendige Synthese des 8-Hydroxygeraniol-8-O- β -D-glucosids, zweitens dient die abgespaltene Glucose des zugeführten Salicins als Energielieferant (Rowell-Rahier and Pasteels, 1986). Ein augenscheinlicher Nachteil besteht darin, dass die Larven, die die Sequestrierung phenolischer Glucoside aus der Pflanze verfolgen, komplett von ihrer Wirtspflanze abhängig sind. Diese Problematik konnte bei der eigenen Kultivierung von *C. populi* beobachtet werden. Sie fressen ausschließlich Blätter der Balsam-Pappel (*Populus balsamifera*, Salicaceae) oder junge Blätter der Schwarz-Pappel (*Populus nigra*, Salicaceae). Ein Angebot fremder Weidengewächse oder salicinfreier Blätter führt nicht nur zum Unvermögen der Wehrsekret-Synthese, sondern die Larven akzeptieren keine andere Nahrungsquelle und verenden.

Beeindruckenderweise führte der Neuerwerb der wirtspflanzenabhängigen Wehrsekret-Synthese und die damit verbundene Abhängigkeit dennoch nicht in eine evolutionäre Sackgasse. Termonia et al. (2001) gelang es zu zeigen, dass die gemischte Wehrsekret-Synthese (Veresterung von Iso- oder 2-Methylbuttersäure mit Alkoholen pflanzlichen Ursprungs) aus der wirtspflanzenabhängigen Strategie (Bildung des Salicylaldehyds aus Salicin) hervorging. Den Larven, die die gemischte Wehrsekret-Synthese entwickelt haben, steht eine große Bandbreite an Pflanzenarten für die Nährstoffaufnahme zur Verfügung. Individuen, die auf Salicaceen geblieben sind, üben sowohl die Bildung von Salicylaldehyd als auch die Esterkondensation aus. Betulaceen, die für gewöhnlich salicinfrei sind, beherbergen dagegen Populationen, die lediglich die Veresterung der Buttersäurederivate mit pflanzlichen Alkoholen betreiben.

Einleitung

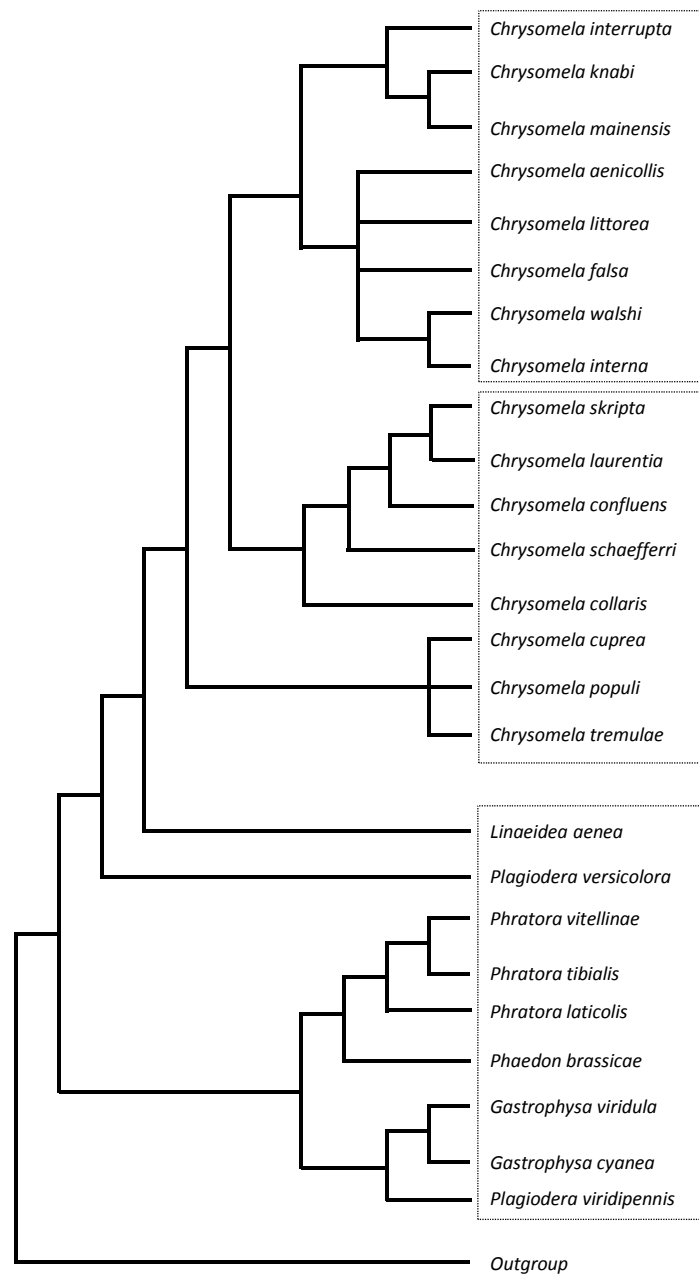


Abbildung 6: Phylogenie nach Termonia et al. (2001), modifiziert. Blattkäferarten, deren Larven zur Veresterung von Buttersäure-Derivaten mit pflanzlichen Alkoholen befähigt sind, sind im oberen Kasten eingeordnet. Im mittleren Kasten befinden sich die Käferarten, deren Larven die wirtspflanzenabhängige Wehrsekretsynthese betreiben. Vertreter der Synthese Iridoider Monoterpene sind im unteren Kasten zu finden.

Die Abbildung 6 der Phylogenie hebt die Sonderstellung von *P. vitellinae* hervor. Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben ist, konnte eindeutig belegt werden, dass die Larven dieser Art Salicylaldehyd als Wehrsubstanz produzieren. Anhand der erstellten Phylogenie von Termonia et al. (2001) ordnet sich *P. vitellinae* jedoch bei den Arten ein, die Iridoider Monoterpene im Wehrsekret aufweisen. Schon vorangegangene Untersuchungen an dem Wehrsekret deckten auf, dass nicht nur Salicylalkohol

verstoffwechselt werden kann, sondern auch extern zugeführtes 8-Hydroxygeraniol zu 8-Oxocitral oxidiert wird (Soetens et al., 1993; Veith et al., 1997). Dies wird als evolutionäres Überbleibsel der *de novo* Synthese interpretiert. Die Frage, ob die Oxidase des Wehrsekretes gleichermaßen Salicylalkohol und 8-Hydroxygeraniol als Substrat erkennt oder ob zwei unterschiedliche Oxidasen existieren, bleibt unbeantwortet.

1.4 Ziele der Arbeit

Ein Vergleich der Synthese der Iridoiden Monoterpene mit der des Salicylaldehyds verdeutlicht, dass beide Synthesewege auf enzymatischer Ebene nahezu identisch sind. Die Glucose der Ausgangssubstanzen 8-Hydroxygeraniol-8-O- β -D-glucosid und Salicin wird von einer β -Glucosidase abgespalten. Es entsteht 8-Hydroxygeraniol respektive Salicylalkohol. Die Reaktion der Alkohole zu den Aldehyden 8-Oxocitral und Salicylaldehyd wird jeweils von einer Oxidase katalysiert (Pasteels et al., 1990). Unter Einbeziehung der Erkenntnis von Termonia *et al.* (2001), dass sich die Umsetzung des pflanzlichen Salicins von der Synthese der Iridoiden Monoterpene ableitet, wird deutlich, dass dies durch eine Änderung der Substratspezifität der beiden Enzyme erfolgt sein könnte (Laurent et al., 2003).

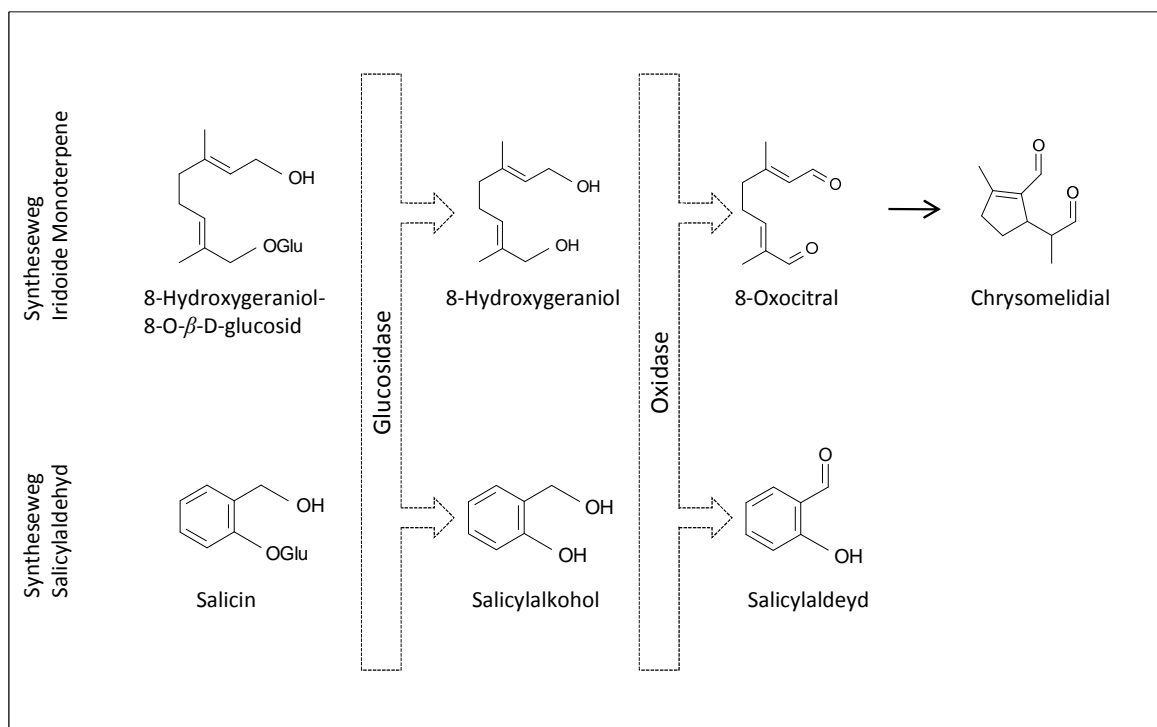


Abbildung 7: Vergleich der erforderlichen Enzyme für die *de novo* Synthese Iridoider Monoterpene mit denen der Synthese des Salicylaldehyds. Bei der Gegenüberstellung beider Synthesewege wird deutlich, dass jeweils eine Glucosidase und eine Oxidase die ersten zwei Reaktionsschritte bestimmen. Der Syntheseweg des Salicylaldehyds könnte also durch Substratänderung und die damit verbundene Anpassung der Enzyme aus dem Syntheseweg der Iridoiden Monoterpene hervorgegangen sein.

Während der Reaktion vom Alkohol zum Aldehyd entsteht in beiden Synthesewegen das Nebenprodukt Wasserstoffperoxid. Da Wasserstoffperoxid zellschädigend wirkt, ist seine Entgiftung durch eine Katalase unerlässlich. Bei der Inaktivierung entstehen Wasser und Sauerstoff.

Die Synthese der Iridoiden Monoterpene wird durch eine Cyclase und eine Isomerase vervollständigt.

Die Ergebnisse der phylogenetischen Untersuchung von *Termonia et al.* (2001) beruhen auf einem Sequenzvergleich von 12S- und 18S-Untereinheiten mitochondrialer rRNA adulter Tiere. Um tiefergehende Aussagen über die Evolution der Wehrsekret-Synthesen treffen zu können, bedarf es der genetischen Analyse eines Enzyms, das direkt an der Wehrsekret-Synthese beteiligt ist.

Dazu wurden Untersuchungen an *C. populi* und *P. vitellinae* durchgeführt (Brückmann, 2002b). Dabei konnte die Oxidase, die die Reaktion vom Salicylalkohol zum Salicylaldehyd katalysiert, isoliert und biochemisch teilcharakterisiert werden. Aufgrund der Substratspezifität wird das Enzym Salicylalkohol-Oxidase (SAO) genannt. Aufbauend auf diese Ergebnisse konnte eine Teilsequenz der genetischen Information der SAO von *C. populi* identifiziert werden. Darüberhinaus gelang es ein *full-length*-cDNA-Transkript der SAO aus *C. tremulae* zu amplifizieren (Mohagheghi, 2007). Erste Sequenzanalysen ergaben eine Zugehörigkeit der SAOs zur Familie der Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktasen (GMCs).

Um diese vorläufigen Ergebnisse zu untermauern, sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst die cDNA-Teilsequenz von *C. populi* vervollständigt werden. Für einen funktionellen Nachweis sollten beide SAOs heterolog exprimiert und biochemisch charakterisiert werden.

Für zusätzliche phylogenetische Untersuchungen wurden weitere Tiere zu den Analysen hinzugezogen. Aus den Vertretern der Synthese der Iridoiden Monoterpene wurden *P. cochleariae* und der Grüne Sauerampferkäfer (*Gastrophysa viridula*) gewählt. Ebenfalls wurde *P. vitellinae* als Vertreter beider Wehrsekret-Synthesen in die Untersuchungen mit einbezogen. Von den Larven dieser drei Arten sollte auf gleiche Weise die an der Wehrsekret-Synthese beteiligte Oxidase identifiziert werden und mit den bereits bekannten SAOs auf biochemischer und genetischer Ebene verglichen werden.

Um die komplette genetische Information des Syntheseweges des Salicylaldehydes zu erhalten, wurden von Brückmann (2002a) und Mohagheghi (2007) bereits wertvolle Voruntersuchungen zur Identifizierung der β -Glucosidase und der Katalase aus *C. populi* und *C. tremulae* durchgeführt. In dieser Arbeit wurde an die Versuche angeknüpft, um die genetische Information der β -Glucosidase und der Katalase aus *C. populi* zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1 Herkunft und Haltung der Insekten

Adulte Tiere von *C. populi* wurden in Kiel gesammelt (Tabelle 2) und in großvolumigen Plastikschaalen gehalten, die mit Papiertüchern ausgelegt waren. Zur Belüftung diente ein in den Deckel gefrästes Loch, das mit Fliegengitter verdeckt wurde. Gefüttert wurden die Insekten hauptsächlich mit Blättern der Balsampappel (*Populus balsamifera*), von der junge Triebe zu einem Strauß zusammengesteckt wurden. Dieser kam in einen kleinen Glasbehälter, der mit Wasser gefüllt war. Auf diese Weise blieben die Blätter einige Tage frisch. Falls keine Balsampappelblätter zur Verfügung standen, konnte auf die Schwarzpappel (*Populus nigra*) ausgewichen werden. Hierbei war darauf zu achten, dass lediglich die ganz jungen Blätter, die noch eine leichte Rotfärbung aufwiesen, von den Käfern gefressen wurden.

Die Eiablage erfolgte auf der Unterseite der Pappelblätter, welche beim Reinigen der Boxen in große Petrischalen gelegt wurden. Dort konnten die Larven schlüpfen und täglich mit frischen Pappelblättern versorgt werden.

Da sich Blattkäfer während der kalten Jahreszeit in den Winterschlaf begeben, wurden sie im Herbst wieder an ihren Fundort zurückgebracht.

C. tremulae wurde freundlicherweise von Herrn Jaques Pasteels aus Belgien zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden wie *C. populi* gehalten und gefüttert.

Larven sowie adulte Tiere von *P. vitellinae* und *G. viridula* kommen ebenfalls in der natürlichen Fauna Kiels vor (Tabelle 2). Da die Haltung in Plastikschaalen nicht gelang, wurden die Tiere bei Bedarf von ihrer Futterpflanze gesammelt und direkt zu analytischen Zwecken eingesetzt.

Adulte Tiere von *P. cochleariae* wurden vom Max-Planck-Institut für chemische Ökologie in Jena bereitgestellt. Die Futterpflanze Chinakohl (*Brassica rapa ssp. pekinensis*) ist ganzjährig im Handel verfügbar, so konnten die Tiere ständig in Plastikschaalen gezüchtet werden. Larven und adulte Tiere wurden separat gehalten, da adulte Tiere keine Blätter fressen, auf denen Larven sitzen (Rostas and Hilker, 2002).

Die Koordinaten der Fundorte wurden mit „Google Earth“ ermittelt und sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Koordinaten der Käferfundorte

Käfer	Fundort	Bemerkung
<i>C. populi</i>	54°20'44.40" N 10°06'33.12" E 54°20'36.40" N 10°07'21.92" E	- -
<i>P. vitellinae</i>	54°20'49.78" N 10°06'55.29" E	Weide wurde im Zuge einer Baumaßnahme entfernt (2010)
<i>G. viridula</i>	54°20'54.32" N 10°06'52.31" E	-

2.2 Chemikalien

Handelsübliche Chemikalien wurden in der Reinheit *pro analysi* bei folgenden Firmen bestellt:

Fluka	Applichem	Merck
Sigma-Aldrich	Th.-Geyer	Roth

Zudem wurden Gase für die GC über die Firmen Airliquid und Westfalen bezogen.

Alle in dieser Arbeit hergestellten Lösungen oder Verdünnungen wurden mit Reinstwasser (Arium 611, Sartorius) angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert (Systec V150, Systec). Lösungen mit thermolabilen Stoffen wurden durch einen Celluloseacetatfilter (45 µm, Roth) sterilfiltriert.

2.2.1 8-Hydroxygeraniol-Synthese

8-Hydroxygeraniol wurde als Substrat für die rekombinat erzeugte SAO aus *P. vitellinae* benötigt. Da es im Handel nicht mehr erhältlich ist, wurde es aus Geranylacetat chemisch synthetisiert (Abbildung 8). Die Umsetzung des verfügbaren Geranylacetats zu 1-O-Acetyl-8-hydroxygeraniol wurde nach Kitagawa *et al.* (1983) durchgeführt.

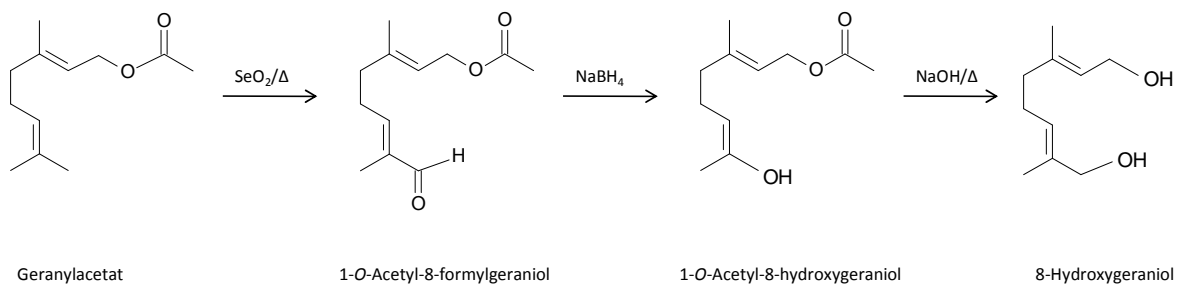


Abbildung 8: Syntheseweg des 8-Hydroxygeraniols aus Geranylacetat

Eine Mischung aus 14,6 g Geranylacetat in 25 ml Ethanol wurde mit einer Lösung von 8,75 g Selendioxid in 75 ml 80%igem Ethanol versetzt und 1 Stunde unter Rückfluss erhitzt. Der Reaktionsansatz wurde im Rotationsverdampfer auf 25 ml eingeeengt und mit 30 ml Ether ausgeschüttelt. Die Etherfraktion wurde nacheinander mit 25 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 25 ml Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Nacht auf Magnesiumsulfat-Monohydrat getrocknet. Nach Zugabe von 1 ml Methanol wurde der Ansatz tropfenweise über einen Zeitraum von 30 Minuten mit 0,61 g Natriumborhydrid in 15 ml Ether/Methanol (10:1) unter Eiskühlung versetzt. Anschließend wurden 4 ml 5%ige Salzsäure hinzugefügt und mit 30 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde erneut sukzessive mit 25 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 25 ml Natriumchlorid-Lösung gewaschen und im Rotationsverdampfer eingeeengt. Das entstandene gelbe Öl (1-*O*-Acetyl-8-hydroxygeraniol) wurde zur Spaltung des Esters der alkalischen Hydrolyse unterworfen. Dazu wurde der Ansatz mit 50 ml Ethanol versetzt und mit 100 ml Natriumhydroxid-Lösung [0,5 M] gemischt. Die Hydrolyse erfolgte unter Rühren bei 45°C im Wasserbad. Das 8-Hydroxygeraniol wurde mit Ethylacetat ausgeschüttelt, wobei das Lösungsmittel anschließend wieder im Rotationsverdampfer entfernt wurde.

2.3 Plasmide

pGEM[®] - T Easy-Vektor (Promega)

Der pGEM[®] - T Easy-Vektor ist ein Vektor für die Klonierung von PCR-Amplifikaten. Der Vektor wurde von Firmenseite mit *EcoRV* linearisiert und an beiden 3'-Enden mit einem einzelnen Thymidin ergänzt. Dies verhindert die Rezyklisierung des Vektors und begünstigt gleichzeitig die Ligation des PCR-Produktes, sofern dieses mit einer DNA-Polymerase amplifiziert wurde, die einen Adenosin-Überhang am 3'-Ende erzeugt.

Die Klonierungsstelle liegt innerhalb des *lacZ*-Gens, das für eine β -Galactosidase codiert. Durch die Integration des PCR-Produktes wird das *lacZ*-Gen unterbrochen, womit eine Blau-Weiß-Selektion (2.8.12.1) ermöglicht wird.

pET-Vektoren (Novagen)

pET-Vektoren wurden für die Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*-Zellen entwickelt, wobei das Zielgen unter Kontrolle des T7-Promotors steht und die Expression nach Induktion der T7-RNA-Polymerase erfolgt. Die T7-RNA-Polymerase wird dabei von dem Wirtszellgenom codiert.

Die einzelnen pET-Vektoren unterscheiden sich u.a. hinsichtlich ihrer *multicloningsite* (MCS) und ihres Selektionsmarkers. Zusätzlich besteht die Möglichkeit ein Fusionsprotein zu erzeugen, das ein

His-Tag am *C*- oder *N*-Terminus trägt. Der pET-22b(+)-Vektor enthält eine für den *pelB*-Leader kodierende Sequenz, der optional mit dem Zielprotein ein Fusionsprotein bildet. Unter Verwendung des *pelB*-Leaders wird das Protein in den periplasmatischen Raum des gramnegativen Bakteriums *E. coli* translokalisiert, wo die *pelB*-Peptidase den *N*-terminalen *pelB*-Leader vom Fusionsprotein abspaltet.

Wichtige Charakteristika der verwendeten pET-Vektoren sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete pET-Vektoren

Vektor	Resistenz	His-Tag	pelB-Leader
pET-22b(+)	Ampicillin	C-terminal	möglich
pET-22b(+) modMCS	Ampicillin	C-terminal	nein
pET-28a(+)	Kanamycin	C/N-terminal	nein
pET-28a(+) modAmp	Ampicillin	C/N-terminal	nein

Der Vektor pET-22b(+)
wurde im Rahmen dieser Arbeit zu pET-22b(+)
modMCS umkloniert. Die MCS wurde gegen die des pET-23a(+)-Vektors ausgetauscht. Auf diese Weise war eine Klonierung mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen möglich.

Der pET-28a(+)-Vektor wurde von Cleo Pietschke im Rahmen ihrer Bachelorarbeit dahingehend modifiziert, dass das ursprüngliche kanamycinresistenzvermittelnde Gen gegen das eines β -Lactamase-Gens ausgetauscht wurde, was eine Ampicillinresistenz vermittelt (Pietschke, 2009). Auf diese Weise entstand der Vektor pET-28a(+)
modAmp.

pTYB1 (NEB)

Der pTYB1-Vektor enthält neben der MCS einen Sequenzbereich, der für einen Intein-Tag und ein β -Lactamase-Gen codiert. Nach Klonierung des cDNA-Transkriptes und erfolgreicher Expression entsteht ein Intein-Fusionsprotein, das den Intein-Tag am *N*-Terminus trägt. Der Intein-Tag enthält eine Chitin-Bindestelle, wodurch eine Affinitätsreinigung des Fusionsproteins über eine chitinhaltige Säule ermöglicht wird. Findet die Reinigung in Gegenwart von Dithiothreitol (DTT) statt, wird die spezifische Abspaltung des Intein-Tags initiiert. Der Intein-Tag verbleibt an der Säule, wohingegen das Zielprotein eluiert wird. Auf diese Weise können Proteine exprimiert und gereinigt werden, die keine zusätzlichen künstlichen Aminosäuren enthalten und damit dem nativen Protein entsprechen.

pRDKJG und pRep4-groESL

Diese beiden Vektoren wurden von Caspers und Mitarbeiter erstellt und beschrieben (Caspers et al., 1994). pRDKJG codiert für die Hitzeschockproteine DnaK, DnaJ und GrpK, die zur Hsp70 Familie gehören. pRep4-groESL codiert für die Hsp60 Proteine GroEL und GroES. Hitzeschockproteine sind in

der Lage die Sekundärstruktur anderer Proteine so zu beeinflussen, dass deren Löslichkeit bei Expression in *E. coli*-Zellen wesentlich begünstigt werden kann.

In dieser Arbeit wurden pRDKJG und pRep4-groESL zur Coexpression (2.8.15) mit pET-Vektoren eingesetzt.

pKLAC1 (NEB)

Der pKLAC1-Vektor wurde so konzipiert, dass die Replikation in *E. coli*-Zellen möglich ist, aber auch die stabile Integration in das Genom des Hefestamms *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*). Für die Vermehrung in *E. coli*-Zellen trägt der Vektor den pMB1-Ori und das β -Lactamase-Gen, das für die Ampicillin-Resistenz nötig ist. Die *K. lactis* α -mating factor secretion leader sequence (α -MF), der LAC4 transcription terminator und der ADH2-Promotor, der die Expression des Acetamidase-Selektionsmarker-Gens (*amdS*) bewirkt, ermöglichen die Expression des Zielgens in *K. lactis*. Eine aktive Acetamidase ist in der Lage Stickstoff aus Acetamid freizusetzen. Da Stickstoff für Hefezellen essentiell ist und den verwendeten Medien keine weitere Stickstoffquelle zugesetzt wird, sind nur die Zellen in der Lage zu wachsen, die mit dem pKLAC1 Vektor erfolgreich transformiert wurden.

pYES2 (Invitrogen)

Der pYES2-Vektor wurde für die Expression des Zielgens in dem Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ausgelegt. Die MCS enthält keinen *His-Tag*. Daher wurde in dieser Arbeit ein N-terminaler bzw. ein C-terminaler *His-Tag* über die Expressionsprimer in das Plasmid eingebracht.

Ein *GAL1*-Promotor ermöglicht die Überexpression des Zielgens in der Hefezelle, wobei ein *CYC1 transcriptional terminator* die Transkription beendet. Zusätzlich enthält der Vektor ein *URA3*-Gen, das für die Orotidin 5-Phosphatdecarboxylase (ODCase) codiert. Ein Verlust der ODCase-Aktivität inhibiert das Zellwachstum, es sei denn, Uracil wird dem Wachstumsmedium beigesetzt. Dieses Gen wurde bei dem Hefestamm INVSC1 (2.5) eliminiert, sodass nur die Zellen auf uracilfreiem Medium zum Wachstum befähigt sind, die den Vektor nach Transformation aufgenommen haben.

Um auf die Integrität des Zielgens im Vektor zu prüfen, lässt sich pYES2 ebenfalls in *E. coli*-Zellen transformieren. Dafür wurde in den Vektor ein *f1*-Ori und das β -Lactamase-Gen integriert.

2.4 Bakterienkulturen

2.4.1 *E. coli*-Stämme

TOP10 (Invitrogen)

TOP10-Zellen eignen sich zur Vermehrung von Plasmid-DNA und ermöglichen in Kombination mit einem geeigneten Vektor auch die Blau-Weiß-Selektion (2.8.12.1). Daher konnten sie zur Klonierung (2.8.9 und 2.8.10) aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide (2.2.1) eingesetzt werden.

BL21(DE3) (Novagen)

E. coli-Zellen dieses Stammes besitzen ein T7-RNA-Polymerase-Gen, das unter Kontrolle des *lacUV5* Promotors steht und damit durch IPTG (Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid) induzierbar ist. Nach Induktion der zelleigenen T7-RNA-Polymerase kann diese wiederum die Expression von rekombinaten Proteinen induzieren, deren Transkript unter Kontrolle des T7-Promotors steht.

E. coli-BL21(DE3)-Zellen wurden zur Transformation von pET-Vektoren und pTYB1 verwendet, um anschließend die in den Vektor klonierte cDNA-Sequenz zu exprimieren.

2.4.2 Medien für *E. coli*-Zellen

2.4.2.1 *Lysogeny broth* (LB)

Alle *E. coli*-Stämme wurden in LB-Flüssigmedium nach Bertani (1951) oder auf LB-Platten kultiviert. Zur Anzucht wurden sie bei 37°C inkubiert (innova 4230, New Brunswick Sciencific) und zur Lagerung bei 4°C aufbewahrt.

Tabelle 4: Bestandteile des LB-Mediums

<i>LB-Medium</i>	
Trypton	1,0% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	1,0% (w/v)

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt, das Medium abgefüllt, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Für die Herstellung von Festmedien in Petrischalen wurde dem Flüssigmedium vor dem Autoklavieren 1,2% (w/v) Agar zugefügt. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium auf circa 50°C abgekühlt und unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren wurden diese bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Zur Selektion wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Aufgrund der praktischen Anwendung wurden Antibiotikastammlösungen mit Millipore-Wasser hergestellt, sterilfiltriert und in Aliquots bei -20°C gelagert.

Tabelle 5: Konzentrationsangaben der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	verwendete Endkonzentration
Ampicillin	10 mg/ml	50-100 µg/ml
Ampicillin	50 mg/ml	50-100 µg/ml
Kanamycin	10 mg/ml	10-50 µg/ml
Streptomycin	50 mg/ml	50-100 µg/ml

Für die Langzeitlagerung wichtiger Klone wurden 750 µl der jeweiligen LB-Kultur mit 250 µl LB-Medium, das 60% Glycerin (v/v) enthielt, versetzt und bei -80°C gelagert.

2.4.2.2. SOC-Medium

Das SOC-Medium besteht aus dem Super Optimal Broth (SOB-Medium), dem zusätzlich Glucose beigefügt wurde. Es ist ein komplexes Nährmedium, das zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet wurde.

Tabelle 6: Zusammensetzung des SOC-Mediums

SOC-Medium	
Trypton	2,0% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

Die ersten vier Bestandteile wurden in Wasser gelöst und autoklaviert. Magnesiumchlorid und Magnesiumsulfat wurden jeweils zu einer 1 M Stammlösung gelöst und nach dem Autoklavieren zu der erkalteten Mischung sterilfiltriert. Analog wurde eine 0,1 M Glucose-Lösung angefertigt, die ebenfalls durch Sterilfiltration dem Medium beigefügt wurde.

2.4.3 Herstellung kompetenter *E. coli* -Zellen

E. coli-Zellen besitzen keine natürliche Kompetenz, d.h. sie sind nicht in der Lage fremde DNA ohne besondere Vorbehandlung aufzunehmen. Um dies zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit die

modifizierte Calciumchlorid-Methode nach Cohen (1972) verwendet. Die dadurch erzeugten kompetenten Zellen sind während der exponentiellen Wachstumsphase in der Lage Plasmid-DNA über die Membran aufzunehmen.

Zur Anzucht wurden 50 ml LB-Medium mit einigen Zellen inokuliert und bei 37°C unter Schütteln (230 rpm) inkubiert. Nach Erreichen der optischen Dichte (OD_{600}) von 0,6-1,0 wurde der Ansatz für 10 Minuten auf Eis gestellt und anschließend für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert (3500 rpm). Die abzentrifugierten Zellen wurden in 25 ml eiskalter Calciumchlorid-Lösung [0,1 M] aufgenommen, erneut 10 Minuten auf Eis gelegt und erneut 10 Minuten unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml 0,1 M Calciumchlorid-Lösung, die 15% Glycerin (v/v) enthielt, langsam resuspendiert. Nach 20 stündiger Inkubation bei 4°C wurde die Zellsuspension aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Zellen wurden bei -80°C gelagert.

2.5 Hefekulturen

2.5.1 Hefestämme

Kluyveromyces lactis GG799 (NEB)

Der *K. lactis* Hefestamm gehörte zum Lieferumfang des *K. lactis* Protein Expression Kits (NEB) und wurde in Verbindung mit dem pKLAC1 Vektor (2.2.1) zur heterologen Expression eingesetzt. Nach Transformation des linearisierten pKLAC1 Vektors wird dieser einfach oder mehrfach in das Genom von *K. lactis* integriert. Bei der Expression entsteht ein Fusionsprotein mit der α -MF Domain. Diese enthält ein Signalpeptid, das die Translokation des Proteins in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) bewirkt. Im ER wird das Signalpeptid durch eine Signalpeptidase abgespalten. Nachdem das Protein über sekretorische Vesikel in den Golgi-Apparat gelangt ist, spaltet dort eine Kex-Endoprotease die α -MF Domain vom Protein ab. Ein erneuter vesikulärer Transport bringt das Protein zur Plasmamembran, von wo aus es in das Medium sezerniert wird.

Saccharomyces cerevisiae INVSc1 (Invitrogen)

Dieser *S. cerevisiae* Hefestamm wurde gentechnisch so verändert, dass er auxotroph gegenüber Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil ist. Um eine Selektion nach Transformation mit dem pYES2-Vektor (2.2.1) zu ermöglichen, wurde dem Vektor ein *URA3*-Gen inseriert. So sind Zellen, die den Vektor enthalten, in der Lage auf uracilfreiem Medium zu wachsen.

2.5.2 Medien für *K. lactis*

Bei Handhabung der *K. lactis* Zellen wurde zwischen einem Anzuchtsmedium (YPGlu) und einem Induktionsmedium (YPGal) unterschieden. Im Anzuchtsmedium konnten die Zellen optimal vermehrt werden, während das Induktionsmedium die Expression des Zielgens initiierte.

Tabelle 7: Zusammensetzung des YPGlu- und YPGal-Mediums

YPGlu-Medium		YPGal-Medium	
Hefeextrakt	1% (w/v)	Hefeextrakt	1% (w/v)
Trypton	2% (w/v)	Trypton	2% (w/v)
Glucose	2% (w/v)	Galactose	2% (w/v)

Zur Herstellung beider Medien wurden zunächst der Hefeextrakt und Trypton in Wasser gelöst und autoklaviert. Die Monosaccharide wurden getrennt gelöst, sterilfiltriert und nach Erkalten der autoklavierten Lösung untergemischt. Die Medien wurden bei 4°C gelagert.

Nach der Transformation wurden die Zellen auf einem speziellen Selektionsmedium ausplattiert.

Tabelle 8: Bestandteile des YCB Selektionsmediums für *K. lactis*

YCB Selektionsmedium	
Natriumphosphatpuffer [1 M] pH 7,0	15 ml
<i>Yeast carbon base</i>	5,85 g
Agar	10 g
Acetamid [0,5 M]	5 ml
dH ₂ O	ad 500 ml

Die Herstellung des YCB Selektionsmediums für *K. lactis*-Zellen erfolgte durch Zugabe des Natriumphosphatpuffers, der *Yeast Carbon base* und dem Agar in 495 ml Wasser. Nach Autoklavieren der Lösung wurde diese auf ca. 50°C abgekühlt und die Acetamidlösung nach Sterilfiltration beigemischt. Das Medium wurde in Petrischalen gegossen, die bei 4°C über einen Zeitraum von 6 Monaten gelagert werden konnten.

2.5.3 Medien für *S. cerevisiae*

Für die Anzucht von *S. cerevisiae* Zellen wurde ein SC-Minimalmedium gewählt.

Tabelle 9: Bestandteile des SC-Minimalmediums

SC-Minimalmedium	
Yeast carbon base (ohne Aminosäuren)	0,67% (w/v)
Glucose	2% (w/v)
Adenin, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Threonin, Thryptophan und Uracil	je 0,01% (w/v)
Asparaginsäure, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin und Valin	je 0,05% (w/v)
Agar (nur für Festmedium)	2% (w/v)

Die *Yeast Carbon base* und Aminosäuren wurden in Wasser gelöst und autoklaviert. Für die Herstellung von Festmedium wurde vor dem Autoklavieren der Agar zugesetzt. Die Glucose wurde separat gelöst und nach Sterilfiltration zur erkalteten autoklavierten Lösung gegeben.

Nach Transformation der Hefezellen mit dem pYES2-Vektor wurden die Zellen auf einem Selektionsmedium ausplattiert, das sich vom SC-Minimalmedium (Tabelle 9) durch das Fehlen von Uracil unterschied.

Für die Expression des Zielgens wurde ein flüssiges Induktionsmedium hergestellt. Die Herstellung erfolgte wie das SC-Minimalmedium, wobei die Glucose gegen Galactose ausgetauscht wurde. Zusätzlich enthielt das Medium Raffinose, Uracil wurde dagegen ausgelassen.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Induktionsmediums für *S. cerevisiae*

Induktionsmedium	
Yeast carbon base (ohne Aminosäuren)	0,67% (w/v)
Galactose	2% (w/v)
Raffinose	1% (w/v)
Adenin, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Threonin, Thryptophan	je 0,01% (w/v)
Asparaginsäure, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin und Valin	je 0,05% (w/v)

2.5.4 Herstellung kompetenter *K. lactis* und *S. cerevisiae* Zellen

Die Herstellung kompetenter *K. lactis* (GG799)-Zellen und *S. cerevisiae* (INVSc1)-Zellen erfolgte auf gleiche Weise nach der Lithiumacetat-Methode. Dafür wurde eine einzelne Kolonie, die auf festem YPGlu-Medium angezogen wurde, in 10 ml YPGlu-Medium (Tabelle 7) überführt und 16 Stunden

unter Schütteln (230 rpm) bei 30°C inkubiert. Nach Bestimmung der optischen Dichte der Kultur bei 600 nm wurde diese zu einer OD₆₀₀ von 0,4 in 50 ml verdünnt und erneut für 2-4 Stunden unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden bei 2500 rpm abzentrifugiert und in 40 ml 1X TE Puffer (Tabelle 11) resuspendiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, wobei die Zellen anschließend in 1X LiAc/0,5X TE Puffer (Tabelle 12) aufgenommen wurden. Diese Suspension wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und direkt zur Transformation (2.8.17 und 2.8.21) eingesetzt.

Tabelle 11: Zusammensetzung des 10X und 1X TE Puffers

10X TE Puffer		1X TE Puffer	
Tris-Base	1,21 g	10X TE Puffer	10 ml
EDTA	0,37 g	dH ₂ O	ad 100 ml
dH ₂ O	ad 100 ml		

Die Herstellung des 10X TE Puffers erfolgte durch Lösen der Bestandteile in Wasser. Nach Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,5 wurde die Lösung autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Zur Herstellung des 1X TE Puffers wurde der 10X TE Puffer 1:10 mit autoklaviertem Wasser verdünnt.

Tabelle 12: Bestandteile des 10X LiAc Puffers sowie des 1X LiAc/0,5X TE Puffers

10X LiAc Puffer		1X LiAc/0,5 TE Puffer	
Lithiumacetat	10,2 g	10X LiAc Puffer	10 ml
dH ₂ O	ad 100 ml	10X TE Puffer	5 ml
		dH ₂ O	ad 100 ml

Der 10X LiAc Puffer entstand durch Lösen des Lithiumacetats in Wasser mit anschließender pH-Wert Einstellung auf pH 7,5. Die Herstellung des 1X LiAc/0,5 TE Puffers erfolgte durch Mischung der angegebenen Bestandteile, eine erneute pH-Wert Einstellung war nicht notwendig.

2.6 Primer

Die in dieser Arbeit benutzten Primer wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon AG in HPSF Qualität synthetisiert und in gefriergetrocknetem Zustand versendet. Nach Erhalt wurden sie mit Tris-HCl (10 mM, pH 8) gelöst, sodass eine Stammlösung von 100 pmol/μl entstand. Vor der Verwendung wurde diese mit Tris-HCl (10 mM, pH 8) auf 10 pmol/μl oder in Ausnahmefällen auf 1 pmol/μl verdünnt. Alle Primerlösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.7 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die REM-Aufnahmen des Wehrapparates von *C. populi* (Abbildung 2) wurden mit freundlicher Unterstützung von Brigitte Schemmerling durchgeführt. Dazu wurden Wehrapparate aus den Larven wie unter Kapitel 2.8.2.1 beschrieben isoliert, in absoluten Ethanol überführt und zur Entwässerung im Exsikkator mit Molekularsieb (3 Å, 0,3 nm, Perform von Roth) unter Vakuum aufbewahrt. Nach der Entwässerung wurden die Präparate in die Druckkammer des Kritischen-Punkt-Trockners (Bal-tec CPD 030) eingebracht und über den Kritischen Punkt getrocknet. Direkt im Anschluss wurden die getrockneten Proben auf Probenteller (Plano) mit Leit-Tabs (Plano) fixiert und im Sputter-Coater (Bal-tec SCD 050) mit einer Goldschicht (180 Å) beschichtet. Die auf dem Probenteller befestigten Proben wurden in das Rasterelektronenmikroskop DSM 940 (Zeiss) eingebracht und mit Hilfe des Softwareprogrammes Orion dargestellt.

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA aus Larven wurden 4 Tiere über Nacht zur Darmentleerung in eine leere Petrischale gesetzt. Unmittelbar vor der Isolierung wurden die Wehrsekretbehälter mit einer Kapillare geleert. Für den Zellaufschluss wurden die Larven in flüssigem Stickstoff gemörsert und zur Gewinnung der genomischen DNA mit dem Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) weiterbehandelt. Die Durchführung erfolgte nach dem „*Isolating Genomic DNA from Tissue Culture Cells and Animal Tissue*“-Protokoll.

Die genomische DNA wurde für die Inverse PCR (2.8.6) eingesetzt und bei -20°C gelagert.

2.8.2 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA-Isolierung erfolgte stets mit Trizol® (Invitrogen), wobei die Durchführung nach Herstellerangaben erfolgte.

Am Vorabend wurden 3-4 Larven des 2. Larvenstadiums in eine leere Petrischale gesetzt, damit über Nacht der Darm vollständig entleert werden konnte. Darminhalte können eventuell die RNA-Isolierung stören. Kurz vor der Isolierung wurde das Wehrsekret mit einer Kapillare abgesaugt, da es sich ebenfalls als störend erwies.

Die Larven wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, gemörsert und in Trizol®-Reagenz aufgenommen. Trizol® enthält Phenol und Guanidinisoithiocyanat in einer einphasigen Lösung, welche die RNA vor Degradierung schützt. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation ergaben sich drei Phasen. Die RNA befand sich im wässrigen Überstand. Die DNA befand sich in der

Interphase, sowie in der organischen Fraktion, die ebenfalls Proteine enthält. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und die darin enthaltene RNA mit Isopropanol gefällt, in Ethanol gewaschen, getrocknet und mit RNase-freiem Wasser gelöst.

Die Gehaltsbestimmung der isolierten RNA erfolgte UV-metrisch (2.8.23).

2.8.2.1 Präparation einzelner Gewebe von Larven mit anschließender Isolierung der Gesamt-RNA

Um gewebespezifische RT-PCRs (2.8.5.2) durchführen zu können wurden einzelne Gewebe aus den Larven präpariert. Dazu wurden die Larven zur Betäubung in ein Falcontube gesetzt, das einen mit Ether getränkten Wattebausch enthielt. Die betäubten Larven wurden danach rücklings in eine Petrischale gelegt, die mit steriler isotoner Kochsalzlösung gefüllt war. Unter einer Sterolupe (Wild M8, Wild Heerbrugg) wurden die Larven mit Präpariernadeln festgesteckt und ventral aufgeschnitten. Nach Entfernung des Darms konnten weitere Gewebe, wie die Wehrapparate, das Fettgewebe und das Exoskelett präpariert werden (Abbildung 17, Kapitel 3.3.1). Die einzelnen Gewebe wurden in Eppendorf-Tubes überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das gefrorene Gewebe wurde im Eppendorf-Tube mit einem Eppendorf-Tube-Mörser zerkleinert und mit 1 ml Trizol® aufgenommen. Die weitere Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte wie unter Kapitel 2.8.2 beschrieben.

Um eine ausreichende Menge an Gesamt-RNA zu erhalten wurde von einer Larve das Exoskelett präpariert. Aus 4 Larven wurden das Fettgewebe und der Darm und aus 20 Larven die Wehrapparate entnommen.

2.8.3 cDNA-Synthese mit Hilfe Reverser Transkriptasen

Reverse Transkriptasen (auch RNA-abhängige DNA-Polymerasen genannt) katalysieren die Umschreibung von RNA in DNA. Dabei entsteht nach Anlagerung eines Primers zunächst aus einem RNA-Einzelstrang ein RNA-DNA-Hybridstrang. Durch Zugabe des Enzyms RNaseH wird die RNA abgebaut und es bleibt ein cDNA-Einzelstrang übrig, der mittels PCR zum Doppelstrang vervollständigt und anschließend vervielfältigt werden kann.

Als Primer bei der Reversen Transkription diente entweder der Oligo(dT)₁₇-Primer (Tabelle 13) oder ein genspezifischer Primer (GSP). Der Oligo(dT)₁₇-Primer ist komplementär zum Poly-A-Schwanz der mRNA. So wird bei Verwendung dieses Primers der gesamte mRNA-Pool des verwendeten Organismus vom 3'-Ende her umgeschrieben.

Unter Zuhilfenahme des GSPs wird gezielt die mRNA umgeschrieben, die mit dem Primer hybridisiert. Dieses Verfahren findet bei der 5'-RACE Technik (2.8.4) Verwendung und wird dort genauer erläutert.

Wenn nicht anders beschrieben wurde 1 µg gesamt RNA (2.8.2) mit Superscript® III Reverse Transkriptase (Invitrogen), Transcriptor High Fidelity Reverse Transkriptase (Roche) oder RevertAid™ Premium Reverse Transkriptase (Fermentas) nach Herstellerangaben umgeschrieben.

Tabelle 13: Sequenz des Oligo(dT)₁₇-Primers.

Primer	Sequenz
Oligo(dT) ₁₇	5'-GTCGACTCGAGAATCTTTTTTTTTTTTTTTTTT -3'

2.8.4 5'-RACE Technik

Die 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) Technik ermöglicht es das unbekanntes 5'-Ende eines bekannten cDNA-Fragmentes zu identifizieren (Frohman et al., 1988; Scotto-Lavino et al., 2006). Dazu wurde zunächst die Gesamt-RNA eines Tieres oder eines Gewebes isoliert (2.8.2). Mit Hilfe eines reversen GSPs und einer reversen Transkriptase (2.8.3) wurde zielgerecht die RNA zu einem cDNA-Einzelstrang umgeschrieben, die mit dem GSP hybridisiert. Nach Degradierung der RNA mit RNaseH und Reinigung des cDNA-Einzelstrangs (2.8.8), wird dieser am 3'-Ende mit der Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) (Invitrogen) um 20-100 Desoxynukleotide verlängert. In dieser Arbeit wurde der cDNA-Einzelstrang stets mit der Nukleinbase Cytosin durch Einsatz von Desoxycytidintriphosphat (dCTP) verlängert.

Zum Erhalt eines cDNA-Doppelstrangs und zur Vervielfältigung wurde eine Standard-PCR (2.8.5.1) durchgeführt, die den cDNA-Einzelstrang als Template beinhaltet. Als *forward*-Primer kam der Abridged-Anchor-Primer (AAP) zum Einsatz, der am angefügten Poly-C-Schwanz des cDNA-Einzelstrangs bindet. Ein zweiter GSP wurde als *reverse*-Primer eingesetzt.

Zur Erhöhung der Spezifität des Produktes wurde im Anschluss eine weitere Standard-PCR durchgeführt, die den Abridged-Universal-Anchor-Primer (AUAP) enthält, der ebenfalls an das Poly-C-Ende bindet. Ein dritter GSP stellt den *reverse*-Primer dar.

Die genaue Durchführung der 5'-RACE Technik lässt sich dem Handbuch *5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0* (Invitrogen) entnehmen.

Tabelle 14: Primersequenzen von AAP und AUAP.

Primer	Sequenz
AAP	5'-GGCCACGCGTCTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGGGIIG-3'
AUAP	5'-GGCCACGCGTCTCGACTAGTAC-3'

2.8.5 Polymerase Ketten Reaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch: *Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist eine Methode, mit der DNA-Abschnitte *in vitro* vervielfältigt werden können (Saiki et al., 1988).

Nach einer initialen Denaturierung schließen sich 20-30 Zyklen an, die wie folgt gegliedert sind:

Denaturierung

Das Reaktionsgemisch wird auf 95 – 98°C erhitzt, um die DNA-Doppelstränge zu trennen.

Annealing Phase

Die im Reaktionsgemisch befindlichen Oligonukleotide (Primer) lagern sich an ihren Komplementärstrang an. Die Annealingtemperatur wurde so gewählt, dass sie etwa 5°C unter der Schmelztemperatur der Primer lag.

Elongation

Während der Elongation werden die angelagerten Oligonukleotide durch eine DNA-Polymerase vom 5'- zum 3'-Ende verlängert, sodass erneut ein DNA-Doppelstrang entsteht. Die Temperatur richtet sich nach der verwendeten Polymerase und die Elongationszeit nach der Länge des Templates.

Nach den maximal 35 Zyklen schließt sich eine finale Elongation von 10 Minuten an. Danach wurde der Ansatz bis zur Entnahme aus dem Gerät bei 15°C gekühlt.

Die Bezeichnung „Kettenreaktion“ bezieht sich auf die Tatsache, dass in jedem Zyklus die vorliegenden DNA-Stränge des vorherigen Zyklus verdoppelt werden. So wird während der PCR die DNA exponentiell vervielfältigt.

Tabelle 15: Verwendete PCR-Geräte

Verwendete PCR-Geräte	Hersteller
Mastercycler Gradient	Eppendorf
Mastercycler Personal	Eppendorf
Primus 25/96	MWG-BIOTECH AG

2.8.5.1 Standard-PCR

In dieser Arbeit wurden DNA-Polymerasen unterschiedlicher Hersteller für die Standard-PCRs verwendet (Tabelle 16). Die Durchführung erfolgte jeweils nach Herstellerangabe, andernfalls sind Abweichungen im Text erläutert. Ein Beispiel für die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes sowie für das Temperaturprogramm ist in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 16: Verwendete Polymerase mit Herstellerangabe

DNA-Polymerase	Hersteller
AccuTaq™	Sigma
GoTaq®	Promega
KAPAHiFi™	peqlab
iProof™ High Fidelity	BIO-RAD
Platinum® Pfx	Invitrogen
Taq	Invitrogen
Pfu	Fermentas
High Fidelity PCR Enzyme Mix	Fermentas

Tabelle 17: Zusammensetzung einer Standard-PCR mit Temperaturprogramm. * Die Annealingtemperatur richtete sich nach den Schmelztemperaturen des eingesetzten Primerpaares. In der Regel lag sie 5°C unter der niedrigeren Schmelztemperatur.

Zusammensetzung	Temperaturprogramm
0,5 - 1,5 µl Forward Primer [10 mM]	94 - 98°C 30 s - 3 min
0,5 - 1,5 µl Reverse Primer [10 mM]	94 - 94°C 10 s - 2 min
x µl cDNA	* °C 15 s - 2 min
0,5 - 1,75 µl dNTP [10 mM]	68 - 72°C 1 min - 20 min
2,5 µl 10X Puffer	68 - 72°C 5 min - 10 min
0,25 - 0,5 µl DNA-Polymerase	15°C ∞
γ µl dH ₂ O	

} 20 – 35 x

2.8.5.2 Reverse-Transkriptase (RT)-PCR

RT-PCRs wurde durchgeführt, um die gewebespezifische Expression unterschiedlicher GMCs und Glucosidasen zu untersuchen. Dazu wurden zunächst verschiedene Gewebe aus den Larven von *C. populi* präpariert und deren Gesamt-RNA isoliert (2.8.2). Folgende Gewebearten wurden in die Analysen mit einbezogen: Wehrapparate, Exoskelett, Darm und Fettgewebe. Die isolierte Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben (2.8.3), welche als Template einer Standard-PCR diente, die mit der GoTaq® DNA-Polymerase (Tabelle 16) in 30 und 35 Zyklen durchgeführt wurde.

Die Durchführung der Standard-PCR erfolgte zusätzlich mit Positiv- und Negativkontrollen. Als Template einer Positivkontrolle wurde Plasmid-DNA verwendet, die den zu amplifizierenden Sequenzbereich enthielt. Für die Negativkontrollen wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Ein Ansatz enthielt keine Template-DNA, während der zweite Ansatz Plasmid-DNA mit einem cDNA-Transkript einer zweiten GMC oder Glucosidase beinhaltete, an die die sequenzspezifischen Primer nicht binden sollten.

2.8.6 Inverse PCR

Die Inverse PCR ermöglicht es unbekannte genomische DNA-Sequenzen zu identifizieren, die einen bekannten DNA-Bereich flankieren, (Ochman et al., 1990). Dafür wurde die genomische DNA zunächst mit einer Restriktionsendonuklease in kleine Fragmente hydrolysiert. Die Wahl des Enzyms wurde so getroffen, dass die Erkennungssequenz nur einmal im bekannten Sequenzteil vorkommt. Vor der anschließenden Ligation wurde die Restriktionsendonuklease durch Hitzeeinwirkung deaktiviert. Der Ligationsansatz wurde verdünnt (Tabelle 18), um die ringförmige Selbstligation kleinerer DNA-Fragmente zu begünstigen. Nach erfolgter Ligation wurde die DNA mit Isopropanol gefällt, in Tris-HCl (10 mM, pH 8) gelöst und als Template für die Inverse PCR eingesetzt.

Die Durchführung erfolgte wie die einer Standard-PCR (2.8.5.1), die Primerbereiche wurden jedoch unterschiedlich festgelegt. Zur Identifizierung der in 5'-Richtung gelegenen Sequenzbereiche liegt bei der Inversen PCR der *forward*-Primer unmittelbar vor (gen 5'-Ende) der Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease, der *reverse*-Primer wiederum direkt vor dem *forward*-Primer. Durch die entgegengesetzte Orientierung der Primer wurde gewährleistet, dass nur die zirkulären Ligationsprodukte, die auch den bekannten DNA-Teil enthielten, amplifiziert wurden. Das PCR-Produkt enthält damit den bekannten DNA-Teil sowie den unbekanntem 5'-Bereich der genomischen DNA.

Tabelle 18: Pipettierschema der Probenvorbereitung zur Inversen PCR

Restriktion		Ligation		Fällung	
gen. DNA	5 µg	Restriktionsansatz	20 µl	Ligationsansatz	250 µl
10X Puffer	2 µl	10X Puffer	25 µl	Ammoniumacetat	125 µl
Restriktionsenzym	2 µl	Ligase	6 µl	[7,5 M]	
dH ₂ O	ad 20 µl	dH ₂ O	ad 250 µl	Ethanol	750 µl

2.8.7 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung und Isolierung von Nucleinsäuren wurde die Agarosegelelektrophorese genutzt. Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an negativ geladenen Phosphatgruppen pro DNA-Fragment und aufgrund der jeweiligen Größe wandern diese unterschiedlich weit in einem elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt damit von der Molekülgröße ab.

In dieser Arbeit wurden, wenn nicht anders beschrieben, 1%ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1X TBE-Puffer suspendiert und bei 800 W für 1-2 Minuten in einer Mikrowelle gelöst. Nach kurzer Abkühlung wurde der Lösung Ethidiumbromid [1µl/25ml] zugesetzt und gut durchmischt. Zum Erstarren wurde die noch warme Lösung in einen Gelschlitten gegossen und mit einem Gelkamm versehen, der zur Bildung der Probenaschen diente.

Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit dem gleichen Volumen Ladepuffer gemischt und in die Probenaschen des Gels eingebracht. Als Größenmarker wurde zusätzlich bei jedem Gel eine 100 bp und/oder 1 kb DNA-Leiter aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in der Mini-Sub® Cell GT oder Wide Mini-Sub® Cell (BIO-RAD) in 1X TBE-Puffer bei 80 V bis die Bromphenolblau-Front circa zweidrittel des Gels durchlaufen hatte.

Die Auswertung geschah unter UV-Licht (Multiimage™ Light Cabinet, Biozym), da dort das Ethidiumbromid in Verbindung mit Nucleinsäuren einen orange leuchtenden Komplex eingeht.

Tabelle 19: Zusammensetzung des DNA-Ladepuffers sowie des 10X TBE-Puffers

DNA-Ladepuffer		10X TBE-Puffer	
Xylencyanol	0,25 g	Tris-Base	108,0 g
Bromphenolblau	0,25 g	Borsäure	55,0 g
EDTA	1,46 g	EDTA	7,3 g
Ficoll 400	25,00 g	dH ₂ O	ad 1000 ml
dH ₂ O	ad 100 g		

Der 10X TBE-Puffer wurde vor Verwendung 1:10 mit Wasser zu 1X TBE-Puffer verdünnt.

2.8.8 Reinigung von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente, wie zum Beispiel PCR-Produkte (2.8.5), weiterzuverarbeiten, ist es oft nötig die DNA von Pufferzusätzen und Enzymen des vorherigen Reaktionsgemisches zu trennen. Die gereinigte DNA kann wiederum in neuen PCR-Reaktionen eingesetzt oder zu Klonierungszwecken (2.8.10) genutzt werden. In dieser Arbeit wurden dazu zwei unterschiedliche Methoden verwendet, die wie folgt beschrieben werden:

2.8.8.1 Direkte Reinigung über eine Silikamembran

Mit dem NucleoSpin[®] Extract II Kit (Machery-Nagel) lassen sich PCR-Produkte sowie einzelsträngige DNA-Fragmente reinigen. Die DNA wird in Gegenwart von chaotropen Salzen an eine Silikamembran gebunden, gewaschen und mit Tris-HCl (10 mM, pH 8) eluiert. Die Durchführung erfolgt nach Angaben des Herstellers.

2.8.8.2 Reinigung über Agarosegel und Silikasuspension oder -membran

Zur Reinigung eines DNA-Fragmentes aus einem DNA-Gemisch wurde dieses über ein Agarosegel (2.8.7) aufgetrennt und die entsprechende Gelbande unter UV-Licht (Transilluminator BIOView UST-20M-8K, biostep) mit einem Skalpell herausgeschnitten. Anschließend wurde das Gelstück geschmolzen und die daraus frei werdende DNA in Anwesenheit von chaotropen Salzen an eine Silikasuspension aus dem QIAEX[®] II Agarose Gel Extraction Kit (Qiagen) oder an eine Silikamembran des GeneJET[™] Gel Extraction Kits (Fermentas) gebunden. Nach mehreren Waschschritten wurde die DNA mit Tris-HCl (10 mM, pH 8) von dem jeweiligen Silikamaterial gelöst. Die genaue Durchführung erfolgte auch hier nach Herstellerangaben.

2.8.9 Klonierung in pGEM[®]-T Easy-Vektor

Das pGEM[®]-T Easy-Vektor System eignet sich zur direkten Ligation von aufgereinigten PCR-Produkten (2.8.8), sofern diese mit einer DNA-Polymerase erzeugt wurde, die A-Überhänge bildet. Während der Ligation hybridisieren die A-Überhänge des PCR-Produktes mit den T-Überhängen des Vektors, sodass wieder ein vermehrungsfähiges, zirkuläres Plasmid entsteht. Die Ligation des PCR-Produktes in den Vektor erfolgt ungerichtet. Die Klonierung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Selektion gewachsener Kolonien erfolgte zuerst mittels Blau-Weiß-Selektion (2.8.12.1), d.h. weiße Kolonien wurden einzeln von der LB-Platte in LB-Flüssigmedium zur Vermehrung überführt und anschließend der Minipräparation (2.8.13.1) unterworfen. Der Ansatz einer folgenden Restriktionsanalyse (2.8.12.2) mit *EcoRI* wurde mittels Agarosegelelektrophorese (2.8.7) aufgetrennt. War die Nukleinsäuresequenz des klonierten PCR-Produktes unbekannt, wurden alle Plasmide sequenziert, die ein unterschiedliches Bandenmuster im Agarosegelbild aufwiesen. Die Sequenzierung (2.8.24) konnte mittels T7-Primer sowohl vorwärts als auch mit dem SP6-Primer in Gegenrichtung durchgeführt werden.

2.8.10 Klonierung in Expressionsvektoren

2.8.10.1 Hydrolyse der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Um eine mittels PCR (2.8.5) erhaltene *full-length*-cDNA in einen Expressionsvektor zu klonieren, wurde sowohl der Vektor als auch die cDNA (Insert) einer Restriktion unterworfen, um die für die Ligation notwendigen kompatiblen Enden zu erzeugen. Die erforderlichen Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen wurden während der PCR mit Hilfe von Expressionsprimern (EP) an die Enden des Inserts angebracht. Es konnten nur diejenigen Erkennungssequenzen gewählt werden, die nicht in der *full-length*-cDNA vorkamen, aber in der MCS des Zielvektors. Damit wurde gewährleistet, dass die *full-length*-cDNA während Hydrolyse intakt blieb und dennoch kompatible Enden zum Vektor geschaffen wurden, wodurch die spätere Ligation ermöglicht werden konnte.

Für den Restriktionsansatz wurden 1-1,5 µg Vektor-DNA und 20 µl des PCR-Ansatzes verwendet. Die Hydrolyse erfolgte nach Angaben des Herstellers der jeweils verwendeten Restriktionsendonukleasen (Fermentas oder NEB).

Für die anschließende Ligation wurden die modifizierten DNA-Fragmente von Puffer- und Nukleotidrückständen befreit (2.8.8).

2.8.10.2 Ligation

Für die Ligation wurde standardmäßig ein molares Verhältnis von 1:10 (Vektor:Insert) gewählt. Um die vorhandenen Konzentrationen zu ermitteln, wurden verschiedene Verdünnungen des linearisierten Vektors und des PCR-Produktes mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (2.8.7) analysiert. Unter Berücksichtigung der Molekularmassen wurden die Intensitäten der Banden verglichen, anhand welcher die benötigten Mengen für die Ligation errechnet wurden.

Der Ligationsansatz wurde nach Herstellerprotokoll der verwendeten Ligase angesetzt und für eine Stunde bei 25°C oder über Nacht bei 15°C inkubiert.

Die Inaktivierung der Ligase erfolgte bei 65°C für 10 Minuten. Der Ansatz wurde anschließend ohne weitere Aufreinigung zur Transformation (2.8.11) eingesetzt.

2.8.11 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen (2.4.3) langsam auf Eis aufgetaut, mit 5 µl Ligationsansatz (2.8.10.2) oder 1 µl Plasmid-DNA (2.8.13) versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 60 Sekunden bei 42°C. Anschließend wurden die Zellen erneut für 2 Minuten auf Eis gestellt. Zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz wurden die transformierten Zellen mit 400 µl SOC-Medium (2.4.2.2) gemischt und 1 Stunde unter Schütteln (230 rpm) bei 37°C

inkubiert. 200 µl dieses Ansatzes wurden auf eine LB-Platte mit dem entsprechenden Selektionsmarker ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Bei Verwendung eines Plasmids und Zellen, die zur Blau-Weiß-Selektion befähigt sind, wurden die LB-Platten zusätzlich mit 100 µl IPTG [100 mM] und 20 µl X-Gal [50 mg/ml] vorbereitet.

2.8.12 Selektion positiver Kolonien

Nach Klonierung und Transformation wurden mit folgenden Methoden die Vektoren selektiert, die das entsprechende Insert enthielten.

2.8.12.1 Blau-Weiß-Selektion

Bei Verwendung des pGEM[®]-T Easy-Vektors mit *E. coli*-TOP10-Zellen ist eine Blau-Weiß-Selektion positiver Kolonien möglich. Nach erfolgreicher Klonierung eines PCR-Produktes in den Vektor ist das *lacZ*-Gen unterbrochen und es findet keine Expression der β -Galactosidase durch IPTG-Induktion statt. Die β -Galactosidase katalysiert die Hydrolyse von X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl, welches durch Luftsauerstoff zum blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert wird. Positive Kolonien, die das PCR-Produkt enthalten, erscheinen so weiß und negative Kolonien blau.

2.8.12.2 Restriktionsanalyse

Ein durch Minipräparation (2.8.13.1) gewonnenes Plasmid konnte mittels Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und anschließend analysiert werden. War die inserierte DNA-Sequenz bekannt, konnten bereits vorab die Größen der entstehenden DNA-Fragmente errechnet werden. Bei unbekanntem Sequenzen wurden diejenigen Kolonien weiter analysiert, die unterschiedliche Bandenmuster im Agarosegel aufwiesen.

Tabelle 20: Restriktionsansatz

Restriktionsansatz	
Plasmid-Lösung	2,0 µl
10X Puffer	0,5 µl
Restriktionsendonuklease	0,1 µl
dH ₂ O	ad 5,0 µl

Der Restriktionsansatz wurde 1 Stunde bei der gemäß Herstellerangabe der jeweiligen Restriktionsendonuklease angegebenen Temperatur inkubiert. Der komplette Ansatz wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (2.8.7) aufgetrennt und analysiert.

2.8.12.3 PCR-Screening

Für das PCR-Screening wurde von jeder zu untersuchenden Bakterienkolonie zunächst eine Minipräparation (2.8.13.1) angefertigt. Die gewonnene Plasmidlösung wurde 1:100 verdünnt und 1 µl dieser Verdünnung wurde als Template in einer Standard-PCR (2.8.5.1) eingesetzt. Als Primer dienten die Primer, die bereits zur Amplifizierung des Inserts verwendet wurden. 3 µl des PCR-Ansatzes wurden über ein Agarosegel (2.8.7) aufgetrennt. Bei erfolgreicher Klonierung des Inserts in den Vektor war im Agarosegel eine deutliche Bande bei entsprechender Größe sichtbar.

2.8.13 Plasmidisolierung

2.8.13.1 Minipräparation

Die Minipräparation (MP) wurde standardmäßig nach der Boiling-Methode (Holmes and Quigley, 1981) durchgeführt. Zunächst wurden 7 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versehen, mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. 4,5 ml des Ansatzes wurden abzentrifugiert (10.000 rpm) und das Pellet in 500 µl STET-Lösung (Tabelle 21) resuspendiert. Zur Zellyse dienten 50 µl einer Lysozymlösung [10 mg/ml], wobei der Ansatz zusätzlich für 90 Sekunden bei 95°C inkubiert wurde. Nach dem Hitzeschock wurde für 10 Minuten bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet, bestehend aus Proteinen, genomischer DNA und Zellresten, wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Der Überstand wurde mit 50 µl Ammoniumacetat [7,5 M] und 500 µl Isopropanol versetzt, um die darin enthaltene Plasmid-DNA zu fällen. Nach 15 minütiger Inkubation bei -20°C wurde 15 Minuten bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Die gefällte Plasmid-DNA wurde circa 10 Minuten getrocknet und anschließend mit 50 µl Tris-HCl (10 mM, pH 8) gelöst, das auf 70°C vorgewärmt wurde.

Die nach dieser Methode gewonnene Plasmid-DNA wurde für Restriktionsanalysen (2.8.12.2) sowie für Transformationen (2.8.11) eingesetzt.

Tabelle 21: Zusammensetzung der STET-Lösung

<i>STET-Lösung</i>	
Tris-HCl (pH 8)	50 mM
EDTA	50 mM
Saccharose	8% (w/v)
Triton X-100	0,5 % (v/v)

2.8.13.2 Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)

Hierbei handelt es sich um eine Reinigungsmethode (Spinprep), bei der die nach Zellyse freigewordene Plasmid-DNA an eine Silikamembran gebunden wird. Dies wird durch Anwesenheit von chaotropen Salzen ermöglicht. Die Durchführung erfolgte nach dem Zentrifugations-Protokoll der Firma Promega, wobei die Elution der Plasmid-DNA abweichend mit Tris-HCl (10 mM, pH 8) erfolgte. Der DNA-Gehalt wurde UV-metrisch bestimmt (2.8.23). Die Aufbewahrung der Rückstellprobe erfolgte bei -80°C.

Vektoren, die zur Sequenzierung eingeschickt wurden, wurden auf diese Weise isoliert und gereinigt.

2.8.13.3 NucleoBond® Xtra Midi Plasmid DNA Purification (Machery-Nagel)

Dieses Reinigungssystem basiert ebenfalls auf der Bindung der Plasmid-DNA an eine Silika-Membran. Allerdings konnten bei Verwendung dieses Kits bis zu 250 µg Plasmid-DNA gewonnen werden, ausgehend von 100 ml LB-Kultur. Die exakte Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Expressionsvektoren (2.2.1) wurden auf diese Weise vermehrt und gereinigt. Der Gehalt wurde ebenfalls UV-metrisch ermittelt (2.8.23) und die Plasmid-DNA bei -80°C gelagert.

2.8.14 Heterologe Expression in *E. coli*-Zellen

Für die heterologe Expression wurde das cDNA-Transkript des zu exprimierenden Enzyms in einen pET-Vektor (2.2.1) kloniert und anschließend in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) (2.4.1) transformiert (2.8.11). Eine Kolonie wurde mit dem entsprechenden Antibiotikum in 7 ml LB-Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 37°C und 230 rpm inkubiert. 1 ml der Kultur wurde am Folgetag abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit 1 ml LB-Medium gewaschen, bevor es in 50-1000 ml LB-Flüssigmedium mit dem jeweiligen Antibiotikum transferiert wurde. Dieser Ansatz wurde erneut bei 37°C unter Schütteln (230 rpm) bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von IPTG [1,25 mM Endkonzentration] und Inkubation über Nacht bei 4-30°C und 230 rpm.

Zur Expressionskontrolle wurde jeweils vor und nach Induktion ein Aliquot der Bakterienkultur von 10 µl abgenommen, das mittels SDS-PAGE (2.9.5) analysiert wurde.

2.8.15 Heterologe Coexpression von Chaperonen in *E. coli*-Zellen

Bei der heterologen Expression in *E. coli*-Zellen treten häufig *inclusion bodies* auf. Diese unvollständig oder fehlerhaft gefalteten Zielproteine sind für weitere biochemische Untersuchungen ungeeignet. Die zusätzliche Expression von Chaperonen, den sogenannten Faltungshelfern, bietet die Möglichkeit Proteine, als lösliches und damit aktives Protein zu erhalten, die sonst von *E. coli*-Zellen als *inclusion bodies* exprimiert werden.

Die Vektoren pRep4-groESL und pRDKJG (2.4.3), die für Chaperone codieren, wurden in *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen transformiert (2.8.11). Erfolgreich transformierte Zellen wiesen eine vektorvermittelte Kanamycinresistenz auf und wurden für eine weitere Transformation erneut kompetent gemacht (2.4.3). In einer zweiten Transformation wurde ein pET-Vektor, der das cDNA-Transkript des zu exprimierenden Proteins trug, in die Zelle eingeschleust. Dabei wurde darauf geachtet, dass der pET-Vektor eine Ampicillin- oder Streptomycinresistenz vermittelt, um die Selektion derjenigen Zellen zu ermöglichen, die beide Vektoren tragen.

Die weitere Durchführung der Coexpression erfolgte wie die der heterologen Expression in *E. coli*-Zellen (2.8.14).

2.8.16 Solubilisierung und Renaturierung von *inclusion bodies*

Die Solubilisierung und Renaturierung von *inclusion bodies* bietet die Möglichkeit fehlerhaft gefaltete Proteine in die richtige Konformation zu überführen. Die Proteinexpression wurde wie unter Kapitel 2.8.14 beschrieben durchgeführt. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Anleitung des „Protein Refolding Kit“ der Firma Novagen. Für die Dialyse wurde eine Slide-A-Lyzer® G2 Dialyse-Kassette (Thermo Scientific) eingesetzt, deren Membran eine Ausschlußgröße von 10 kDa aufwies. Die Dialyse erfolgte nach folgendem Schema:

Dialysepuffer + DTT	3 Stunden
Dialysepuffer + DTT	3 Stunden
Dialysepuffer + DTT	12 Stunden
Dialysepuffer	3 Stunden
Dialysepuffer	3 Stunden
Dialysepuffer + Glutathion (reduzierend und oxidierend)	18 Stunden

Die Menge des Dialysepuffers wurde so berechnet, dass sie 50 Volumenteile der zu dialysierenden Proteinlösung betrug. Alle Dialyseschritte erfolgten bei 4°C.

Nach Beendigung der Dialyse wurde die Proteinlösung aus der Kammer der Dialyse-Kassette entnommen, Vivaspin 6-Konzentratoren (Vivaspin) eingengt und in Assaypuffer (Tabelle 29) umgepuffert (2.9.2). Die Durchführung des Enzymassays erfolgte wie unter Kapitel 2.9.10 beschrieben.

2.8.17 Zellfreie heterologe Expression

Die zellfreie heterologe Expression ist eine moderne Methode der Proteinsynthese (Baranov et al., 1989). Die Durchführung beruht darauf, dass zur Proteinbiosynthese nicht zwingend die Integrität einer lebenden Zelle erforderlich ist. Neben dem Transkriptions- und Translationsapparat einer lysierten Zelle ist ein rekombinantes T7-Polymerasegen vorhanden, das die Expression eines cDNA-Transkriptes unter Kontrolle des T7-Promotors ermöglicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das S30 T7 High-Yield Protein Expression System (Promega) angewandt, das nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

2.8.18 Transformation kompetenter *K. lactis*-Zellen

Nach der Transformation kompetenter *K. lactis*-Zellen wird die inserierte DNA in das Wirtszellgenom eingebaut. Da dies nur mit linearer DNA möglich ist, wurde aus dem pKLAK1-Vektor, der das Zielgen enthielt, eine sogenannte Expressionskassette generiert. Die Herstellung der Expressionskassette geschah durch Hydrolyse mit einer Restriktionsendonuklease (*SacII* oder *BstXI*). Das entstandene lineare DNA-Fragment bestand aus dem Zielgen und dem Acetamidase-Selektionsmarker-Gen, die von Teilfragmenten des P_{LAC4} -Promotors umgeben waren (Abbildung 9). In dieser Arbeit wurde die Transformation des pKLAC1-Vektors durchgeführt, der das cDNA-Transkript der SAO aus *C. tremulae* enthielt und mit *BstXI* linearisiert wurde. Für die Reaktion wurden 2 µg des Vektorkonstruktes eingesetzt und für 2 Stunden mit *BstXI* nach Herstellerangaben (NEB) hydrolysiert. Nach Reinigung des Ansatzes (2.8.8.1) wurde die Konzentration der DNA UV-metrisch (2.8.23) bestimmt, da für die Transformation eine Konzentration von 1 µg gefordert wurde.

Material und Methoden

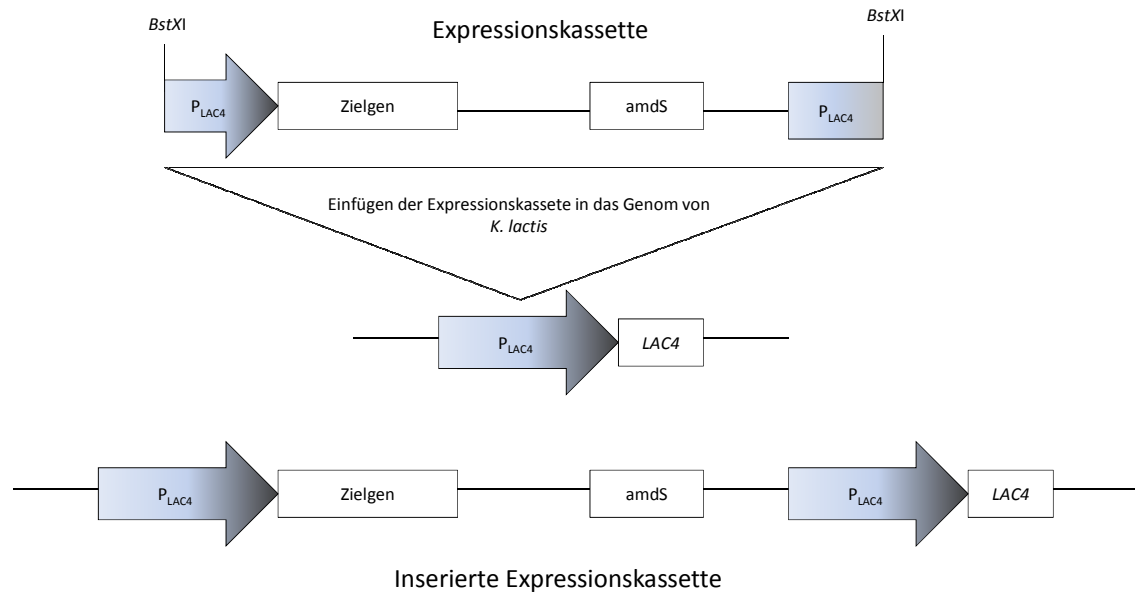


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Einföhrung der Expressionskassette in das Genom von *K. lactis*. Modifizierte Abbildung nach Anleitung des *K. lactis* Protein Expression Kits (NEB).

Die Transformation erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode, wobei 100 μ l frisch hergestellte kompetente *K. lactis*-Zellen (2.5.4) mit 1 μ g der Expressionskassette und 100 μ g denaturierter Heringsperma-DNA (Invitrogen) gemischt wurden und mit 700 μ l Transformationspuffer (Tabelle 22) versetzt. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach Zugabe von 88 μ l DMSO (Sigma) folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 7 Minuten. Anschließend wurden die Zellen für 10 Sekunden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml 1X TE (Tabelle 11) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 Sekunden wurden die Zellen in 100 μ l 1X TE resuspendiert und auf Selektionsmedium (2.5.3) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 30°C für ca. 3 Tage.

Tabelle 22: Zusammensetzung des Transformationspuffers für *K. lactis*-Zellen

Transformationspuffer	
10X LiAc Puffer	10 ml
10X TE Puffer	10 ml
PEG-3350	40 g
dH ₂ O	ad 100 ml

Zur Herstellung des Transformationspuffers wurde die Lösung autoklaviert, wobei das PEG-3350 erst vollständig in Lösung ging. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

2.8.19 Selektion positiver *K. lactis*-Zellen

Kolonien, die nach Transformation (2.8.17) auf dem Selektionsmedium gewachsen sind, wurden zusätzlich mit Hilfe einer Standard-PCR (2.8.5.1) auf Integration der Expressionskassette in das Genom getestet. Das *K. lactis*-System wurde so konzipiert, dass sich die Expressionskassette einfach oder mehrfach in das Genom einlagern kann. Durch Kombination unterschiedlicher Integrationsprimer (IP) lässt sich in zwei PCR-Ansätzen feststellen, wie oft die Kassette inseriert wurde.

Für die Durchführung wurde eine Kolonie in 2 ml YPGlu Medium (Tabelle 7) überführt und 16 Stunden bei 30°C unter Schütteln (230 rpm) inkubiert. 50 µl dieser Kultur wurden bei maximaler Umdrehung abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl Sorbitol [1 M] resuspendiert. Nach Zugabe von 12 µl Lyticase [20 mg/ml] wurde der Ansatz 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend kräftig gemischt. 3 µl der Lösung wurden als Template für die PCRs eingesetzt, die mit der *Taq* DNA-Polymerase (2.8.5.1) durchgeführt wurden. Entstand ein PCR-Produkt von 1,9 kb unter Verwendung von IP1 und IP2, wurde die Expressionskassette einfach integriert. Ein PCR-Produkt von 2,3 kb unter Verwendung von IP2 und IP3 deutete auf mehrfache Integration hin.

Tabelle 23: Integrationsprimer 1, 2 und 3 für den Test auf einfache und mehrfache Integration der Expressionskassette in das *K. lactis*-Genom.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
IP1	5'-TACCGACGTATATCAAGCCCA-3'	50°C
IP2	5'-ATCATCCTTGTCAGCGAAAGC-3'	
IP3	5'-CAGTGATTACATGCATATTGT-3'	

2.8.20 Heterologe Expression in *K. lactis*-Zellen

Die heterologe Expression erfolgte ausschließlich mit Zellen, die die Expressionskassette mehrfach in ihr Genom integriert hatten. Die Kolonien wurden getrennt in 2 ml YPGlu-Medium (Tabelle 7) über Nacht zur Zellvermehrung bei 30°C inkubiert. Das YPGlu-Medium wurde durch Zentrifugation abgetrennt und die Zellen in 2 ml Induktionsmedium YPGal (Tabelle 7) resuspendiert. Die Induktion verlief über 36 Stunden bei 30°C und 230 rpm. *K. lactis*-Zellen sind in der Lage das rekombinant exprimierte Protein in das Medium zu sezernieren. Daher wurden die Zellen 15 Minuten bei maximaler Umdrehung abzentrifugiert und verworfen. 500 µl des Mediums wurden zur Proteinkonzentration mit TCA gefällt (2.9.4). Die gefällten Proteine wurden in 15 µl Tris-HCl (10 mM, pH 8) aufgenommen, über die SDS-PAGE (2.9.5) getrennt und analysiert.

2.8.21 Transformation kompetenter INVSC1-Zellen

Zur Transformation wurden 100 µl frisch hergestellte kompetente INVSc1-Zellen (2.5.4) mit 1 µg Plasmid-DNA (2.8.13.2) und 100 µg denaturierter Heringsperma-DNA (Invitrogen) gemischt und analog zur Transformation kompetenter *K. lactis*-Zellen nach der Lithiumacetat-Methode (2.8.18) weiterbehandelt.

2.8.22 Heterologe Expression in *S. cerevisiae*

Zur Expression transformierter INVSc1 Zellen (2.8.21) wurde eine Kolonie in 15 ml Selektionsmedium überführt und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Am Folgetag wurde die optische Dichte der Vorkultur bei 600 nm bestimmt (Ultrospec 2100 pro, Amersham Bioscience). Ausgehend von der gemessenen OD₆₀₀ (y OD/ml) wurden soviel Milliliter der Vorkultur in 50 ml Induktionsmedium überführt, dass dieses eine OD₆₀₀ von 0,4 aufwies. Die benötigte Milliliterzahl (x ml) ließ sich nach folgender Formel errechnen:

$$x \text{ ml} = \frac{(0,4 \text{ OD/ml}) \times (50 \text{ ml})}{y \text{ OD/ml}}$$

Das Induktionsmedium wurde anschließend für 10 Stunden bei 30°C unter Schütteln (230 rpm) inkubiert.

2.8.23 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung erfolgte durch Absorptionsmessung mit Hilfe eines UV-Spektrometers (Ultrospec 2100 pro, Amersham Bioscience). Die zu vermessende Lösung wurde 1:100 mit Wasser verdünnt und bei 230 nm, 260 nm und 280 nm in einer Quarzküvette (Hellma) vermessen. Bei proteinfreien Lösungen entspricht eine OD₂₆₀ von 1,0 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml und einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors lässt sich die Konzentration der Nukleinsäure errechnen. Proteinverunreinigungen lassen sich am Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ erkennen. Dieser Wert sollte 1,8 ± 0,2 betragen. Liegt der Wert unterhalb des angegebenen Bereiches, ist die Probe stark mit Proteinen verunreinigt und für weitere Analysen wie z.B. die Sequenzierung (2.8.24) ungeeignet. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₃₀ gibt ein Maß über die Verunreinigung mit phenolischen Substanzen an. Optimale Werte liegen hier bei 1,0 ± 0,2.

2.8.24 Sequenzierung

Plasmidsequenzierungen wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon in Ebersberg durchgeführt. Nach erfolgter Plasmidisolierung (2.8.13.2) wurde von der in Tris-HCl (10 mM, pH 8) gelösten Plasmid-DNA 1,5 µg in einem Mindestvolumen von 20 µl eingeschickt. Nach erfolgreicher Sequenzierung standen die Ergebnisse online im FASTA-Format zur Verfügung.

Sequenzierproben konnten ebenfalls am Institut für Klinische Molekularbiologie (IKMB) der Universität Kiel abgegeben werden. Dazu wurden 200-300 ng gereinigtes Plasmid (2.8.13.2) mit 0,5 µl des Sequenzierprimers [10 mM] in einem Gesamtvolumen von 5 µl gemischt. Die Ergebnisse wurden im FASTA-Format per E-Mail übermittelt.

2.8.25 Sequenzanalyse

Die nach Sequenzierung (2.8.24) erhaltenen Daten wurden mit folgenden Softwareprogrammen analysiert:

BeetleBase

BeetleBase ist eine Datenbank, die DNA Sequenzen von *Tribolium castaneum* enthält. Mit Hilfe des BLAST-Algorithmusses lassen sich eigene Sequenzen mit gespeicherten Sequenzen der Datenbank vergleichen.

<http://beetlebase.org>

BLAST

Das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) hilft Nuklein- und Aminosäuresequenzen mit denen verschiedener Datenbanken zu vergleichen.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

Chromas

Sequenziererergebnisse können mit Hilfe dieses Programmes als Chromatogramm dargestellt werden. Sie dienen zur visuellen Überprüfung der Ergebnisse.

<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>

ClustalX

ClustalX ist ein Computerprogramm zur Erstellung multipler Sequenzalignments mit grafischer Benutzeroberfläche. Als weitere Option steht die graphische Darstellung von Sequenzähnlichkeiten zur Verfügung.

<http://www.clustal.org>

ExPASy

Das Expert Protein Analysis System (ExPASy) des Swiss Institute of Bioinformatics wurde genutzt, um Vorhersagen der physikalischen und chemischen Eigenschaften eines Proteins aufgrund seiner Aminosäuresequenz zu erhalten.

<http://www.expasy.ch>

GCG

Softwarepaket zur Analyse und Bearbeitung von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen. Dieses Programm wurde darüberhinaus zum Erstellen von Alignments genutzt.

<https://gcg.gwdg.de>

Genedoc

Mit diesem Programm ist es möglich Alignments von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen graphisch darzustellen. Homologe Bereiche können dabei auf verschiedene Weise markiert werden.

<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>

PSORT II Prediction

Dieses Tool trifft aufgrund der vorgegebenen Aminosäuresequenz eine Aussage über die Proteinlokalisierung in der Zelle. Zusätzlich werden weitere physikalische und chemische Eigenschaften vorhergesagt.

<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>

SignalP 3.0

Der SignalP 3.0 Server ist in der Lage anhand einer eingegebenen Aminosäuresequenz mögliche Signalpeptide zu detektieren.

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>

Tair Restriction Mapper

Nach Eingabe einer DNA-Sequenz im FASTA-Format gibt dieses Programm an, welche Restriktionsenzyme an welcher Stelle die DNA hydrolysieren und welche Enzyme die eingegebene DNA-Sequenz nicht verdauen.

<http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/RestrictionMapper.pl>

TMHMM

Programm zur Vorhersage von Transmembranhelices von Proteinen nach dem Hidden Markov Model (Krogh et al., 2001).

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

TreeView

Diese Software ermöglicht eine strukturelle Darstellung phylogenetisch ähnlicher Sequenzen.

<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>

2.9 Biochemische Methoden

2.9.1 Affinitätsreinigung über Metallchelatchromatographie

Rekombinant exprimierte Proteine, die am C- oder N-Terminus mit einem *His-Tag* fusioniert wurden, können mit Hilfe der Immobilisierten Metall-Ionen Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt werden. Das Prinzip beruht darauf, dass ein zentrales Metallion über 4 der 6 Bindestellen mit einem Liganden verknüpft ist, welcher an eine Gelmatrix fixiert wurde. An die 2 freien Bindestellen des Metallions kann der *His-Tag* des Zielproteins binden.

Verwendet wurde zum einen die Nickel-Nitrilo-Tri-Essigsäure (Ni-NTA, Qiagen), mit zweiwertigem Nickel (Ni^{2+}) als Metallion und NTA als Ligand. Zum anderen fand die TALON[®]-Gelmatrix (Clontech) Anwendung, deren zentrales Metallion aus Cobalt (Co^{2+}) und der Ligand aus carboxymethyliertem Aspartat besteht. Unter Verwendung beider Systeme lässt sich das komplex gebundene Zielprotein durch kompetitive Verdrängung mit Imidazol aus der Bindung lösen.

Die Durchführung erfolgte nach Angabe des Herstellers mit folgenden Modifikationen: Wurde das gereinigte Enzym im Anschluss auf Aktivität geprüft, erfolgten alle Schritte bei 4°C. Wurde lediglich eine Expressions- und Affinitätsreinigungskontrolle durchgeführt, konnten alle Arbeitsschritte bei Raumtemperatur vollzogen werden.

Für die Gewinnung des histidinmarkierten Zielproteins wurde nach Expression (2.8.14) die gesamte Kultur bei 4500 rpm für 30 Minuten abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde zunächst

gewogen, dann mit Lysispuffer (3 ml/100 ml Ausgangskultur) aufgenommen und mit 0,01 g Lysozym pro 1 g Zellpellet versetzt. Zur Zellyse wurde die Mischung 15 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend 6 Minuten per Ultraschall (Branson Sonifier II W-250, Standard-Mikrotip-Spitze, Pulseinrichtung 50%) unter Eiskühlung aufgeschlossen. Die entstandenen Zelltrümmer wurden bei 16.000 rpm 20 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand, der die löslichen Proteine enthielt, wurde zur Proteinreinigung eingesetzt.

2.9.1.1 Nickel-Affinitätschromatographie

Für die Nickel-Affinitätschromatographie wurden 50-500 µl Ni-NTA mit Lysispuffer äquilibriert, indem die Matrix dreimal in 1,5 ml Lysispuffer suspendiert und anschließend wieder abzentrifugiert wurde. Nach Zugabe des äquilibrierten Ni-NTA zur Proteinlösung (2.9.1) wurde diese Mischung 30 Minuten über Kopf rotierend bei 4°C inkubiert, damit die histidinmarkierten Proteine an die Ni-NTA-Matrix binden konnten.

Die Suspension wurde dann in eine leere 1 ml Spritzenhülse überführt, die am Boden mit einer Fritte präpariert wurde. So konnte der Protein-Ni-NTA-Komplex in der Spritze gehalten und gleichzeitig von der Lösung, die ungebundene Proteine als Verunreinigung enthielt, abgetrennt werden.

Nach viermaligem Waschen des Komplexes mit jeweils 1,5 ml Waschpuffer wurde das histidinmarkierte Protein mit 2,5 ml Elutionspuffer von der Ni-NTA-Matrix verdrängt. Um den Erfolg der Durchführung zu kontrollieren, wurde während der Aufreinigung nach jedem Schritt ein Aliquot von 10 µl abgenommen und der SDS-Page (2.9.5) unterzogen.

Tabelle 24: Zusammensetzung des Lysis-, Wasch- und Elutionspuffers

<i>Lysispuffer</i>		<i>Waschpuffer</i>		<i>Elutionspuffer</i>	
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	50 mM	NaCl	1,5 M	Imidazol	250 mM
NaCl	300 mM	Imidazol	40 mM		
β-Mercaptoethanol	5 mM				
Imidazol	20 mM				

Die Chemiekalien des Lysispuffers wurden in Wasser gelöst und mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Die Substanzen des Wasch- und Elutionspuffers wurden dagegen in Lysispuffer gelöst und mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt.

Material und Methoden

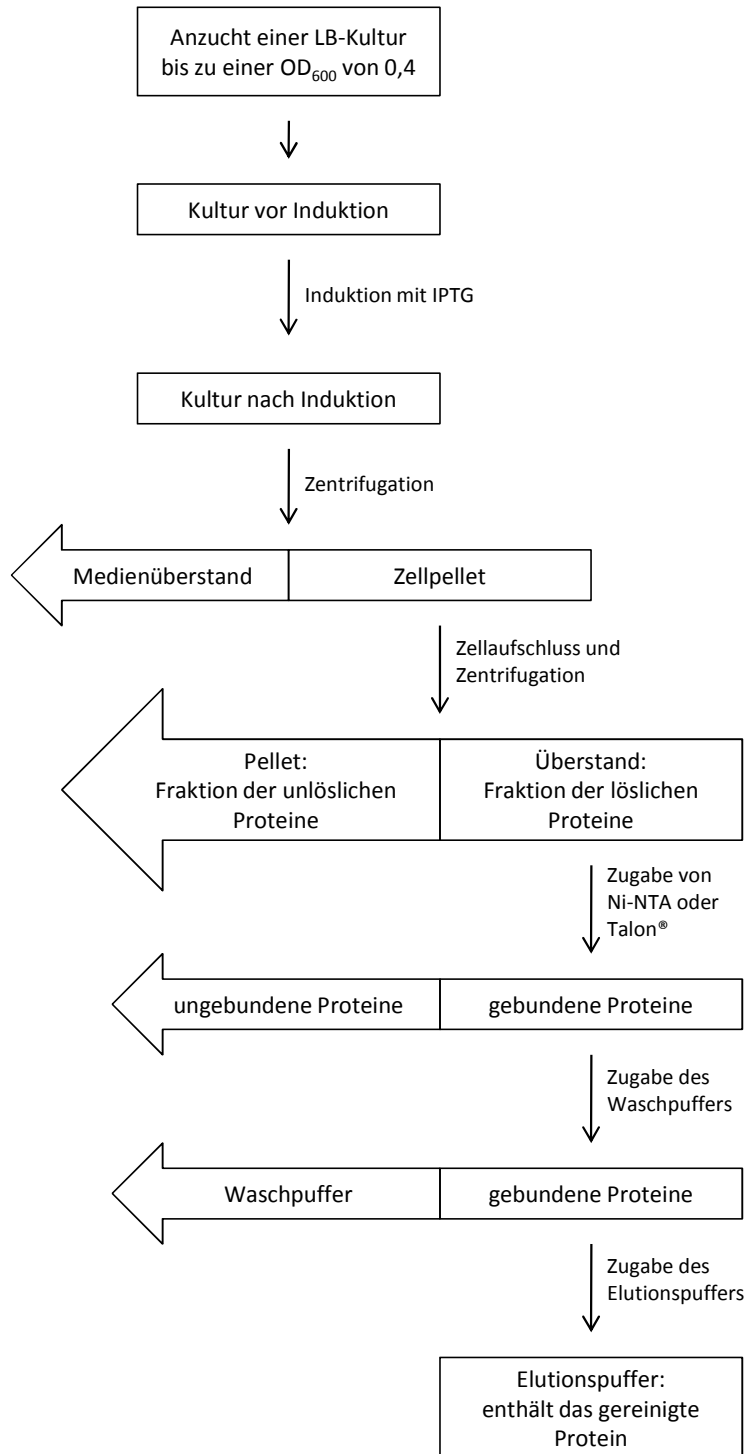


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Immobilisierten Metall-Ionen Affinitätschromatographie. Fraktionen, die mit Blockpfeilen umrandet sind wurden verworfen. Fraktionen, die mit Rechtecken markiert sind, wurden weiterverwendet.

2.9.1.2 Cobalt-Affinitätsreinigung

Die Cobalt-Affinitätsreinigung mit TALON® erfolgte analog der Nickel-Affinitätsreinigung, jedoch mit unterschiedlicher Pufferzusammensetzung (Tabelle 25).

Tabelle 25: Zusammensetzung der für die Cobalt-Affinitätsreinigung benötigten Puffersysteme

<i>Lysispuffer</i>		<i>Waschpuffer</i>		<i>Elutionspuffer</i>	
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM	NaCl	300 mM
NaH ₂ PO ₄	50 mM	NaH ₂ PO ₄	50 mM	NaH ₂ PO ₄	50 mM
		Imidazol	5 mM	Imidazol	150 mM

Nach Lösen der Bestandteile in Wasser wurden alle Puffer auf pH 7,0 eingestellt.

2.9.2 Umpuffern und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

In einigen Fällen war es nötig das Enzym einer vorhandenen Enzymlösung in ein anderes Puffersystem zu überführen. Dazu wurde eine PD10-Säule der Firma GE-Healthcare mit 35 ml des neuen Puffers äquilibriert. Nach Auftragen von 2,5 ml der vorhandenen Enzymlösung konnte das Enzym mit 3,5 ml des gewünschten Puffers von der Säule eluiert werden.

Zur Regeneration wurde das Säulenmaterial mit 2 ml NaOH [0,2 M] gespült und anschließend mit so viel NaCl [0,5 M] gewaschen, bis die Elutionsflüssigkeit einen neutralen pH-Wert aufwies. Zur Lagerung bei 4°C wurde die Säule mit 0,05%iger Natriumazid-Lösung überschichtet.

Zum Aufkonzentrieren von Enzymlösungen dienten Vivaspin 6-Konzentratoren der Firma Vivaspin. Die Konzentratoren wurden mit maximal 6 ml der Enzymlösung gefüllt und bei 4.500 x g 15 Minuten zentrifugiert. Durch dieses Verfahren konnte das Volumen auf ca. 200 µl eingengt werden.

2.9.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde photometrisch nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Der eingesetzte Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 bildet mit Proteinen einen Komplex, wobei eine Farbänderung von Rot nach Blau entsteht. Die dabei auftretende Absorptionsänderung von 470 nm nach 595 nm ist proportional zur Proteinkonzentration.

Zur Herstellung des Bradford-Reagenzes wurden 100 mg Serva Blau G in 50 ml Ethanol (absolut) gelöst und mit 100 ml 85%iger (v/v) Phosphorsäure versetzt. Die Lösung wurde mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt, filtriert und bei 4°C gelagert.

Jeweils 20 µl einer Probe wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz gemischt und im UV/VIS-Spektrometer (Ultrospec 2100 pro, GE Healthcare) vermessen. Die resultierenden Absorptionen wurden anhand einer Kalibriergeraden ausgewertet, die mit 0,1 bis 1,0 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) als Referenzprotein erstellt wurde.

2.9.4 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Lösliche Proteine können aus wässrigen Medien mittels Trichloressigsäure (TCA) gefällt werden. Dazu wurde eine 0,1%ige Desoxycholat-Lösung hergestellt, die 0,02% Natriumazid als Konservierungsmittel enthielt und zu 1/10 Volumenteile der Proteinlösung beigefügt wurde. Anschließend wurden 1/10 Volumenteile einer 55%igen TCA-Lösung zugesetzt, kräftig geschüttelt und 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Die inkubierte Probe wurde bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert und die im Pellet enthaltenen Proteine mit Tris-Puffer (10 mM, pH 8) wieder aufgenommen. Proteine, die auf diese Weise aufkonzentriert wurden, waren nicht mehr aktiv, konnten jedoch für die SDS-PAGE eingesetzt werden.

2.9.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Methode der SDS-Gelelektrophorese ermöglicht eine Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Größe. Es lassen sich auch Aussagen über die Reinheit und Quantität vorhandener Proteinlösungen treffen. Daher ist die SDS-PAGE eine unentbehrliche Methode zur Untersuchung der verschiedenen Proteinfractionen bei der Proteinaufreinigung.

Die zu analysierenden Proben wurden mit dem gleichen Volumen an Probenpuffer gemischt und 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe einer Hamilton-Spritze in die Taschen des Sammelgels eingebracht. Neben den Proben wurde ein Proteinmarker der Firma Fermentas aufgetragen (PageRuler™ Unstained Protein Ladder oder Unstained Protein Molecular Weight Marker).

Zur Analytik der in dieser Arbeit exprimierten Proteine haben sich 10%ige Trenngele als optimal erwiesen.

Zur Trennung wurde das Mini-Protean III System der Firma Biorad mit dem Multidrive XL (Pharmacia) als Spannungsgeber verwendet. Durchgeführt wurde die Elektrophorese in 1X SDS-Puffer bei konstanter Spannung (200 V) und abnehmender Stromstärke (Startwert 75 mA). Anschließend wurden die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt (2.9.7) oder die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet (2.9.6).

Tabelle 26: Bestandteile des 2X Probenpuffers sowie des 10X SDS-Elektrodenpuffers

2X Probenpuffer		10X SDS-Elektrodenpuffer	
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1 ml	Tris-Base	30 g
DTT-Lösung [1 mM]	1 ml	Glycin	144 g
10 % (w/v) SDS-Lösung	2 ml	SDS	10 g
Bromphenolblau	0,01 g	dH ₂ O	ad 1000 ml
Glycerin	1,02 ml		
dH ₂ O	ad 9,00 ml		

Tabelle 27: Pipettierschema des Sammel- und Trenngels für die SDS-GAGE

Zusammensetzung	Sammelgel 5%	Trenngel 10%
dH ₂ O	2,770 ml	2,728 ml
30% Acrylamid	0,666 ml	3,334 ml
Tris-HCl [0,5 M] pH 6,8	0,500 ml	-
Tris-HCl [1,5 M] pH 8,8	-	3,750 ml
SDS-Lsg. 10%	0,040 ml	0,100 ml
TEMED	5 µl	8 µl
APS	25 µl	80 µl

2.9.6 Blotten von SDS-Gelen

Der Proteintransfer von SDS-Gelen (2.9.5) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Roth) erfolgte nach der Semi-Dry-Methode. Dazu wurden unmittelbar vor Verwendung die PVDF-Membran und zwölf Lagen Whatman-Papier auf die Größe des SDS-Gels zurechtgeschnitten und eine Minute in Methanol getränkt und anschließend mit 1X Blotpuffer gespült.

Die Graphitplatten der Blotkammer (Multiphor II Nova Blot Elektrophorese, Pharmacia) wurden ebenfalls mit 1X Puffer benetzt und von der Anode zur Kathode in folgender Reihenfolge luftblasenfrei bestückt: 2 Lagen Whatman-Papier, PVDF-Membran, SDS-Gel, 2 Lagen Whatman-Papier. Das Blotten erfolgte bei 120 mA (Spannungsgeber: Multidrive XL, Pharmacia) für eine Stunde. Die Detektion der Proteine wurde mit der Färbelösung PageBlue™ Protein Staining Solution (2.9.7) durchgeführt.

Tabelle 28: Herstellung 10X und 1X Blotpuffers

10X Blotpuffer		1X Blotpuffer	
Tris-Base	58,0 g	10X Blotpuffer	100 ml
Glycin	29,0 g	Methanol	200 ml
SDS	3,70 g	dH ₂ O	ad 1000 ml
dH ₂ O	ad 1000 ml		

2.9.7 Proteinfärbung

Zur Detektion der Proteinbanden in einem SDS-Gel beziehungsweise auf einer PVDF-Membran wurde die PageBlue™ Protein Staining Solution (Fermentas) eingesetzt. Die Lösung enthält Coomassie Brilliant Blau G-250, das sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert und Proteine unspezifisch ab einer Konzentration von 5 ng pro Gelbande anfärbt. SDS-Gele wurden zuerst 30 min in Wasser gewaschen und anschließend 30-60 Minuten in der Färbelösung auf dem Orbitalschüttler (Polymax 1040, Heidolph) geschwenkt. PVDF-Membranen wurden direkt in die Färbelösung gelegt und ebenfalls 30-60 Minuten unter Schütteln inkubiert. Abschließend wurden die SDS-Gele und PVDF-Membranen kurz mit Wasser abgespült und analysiert.

2.9.8 N-terminale Sequenzierung von Proteinen

Die N-terminale Sequenzierung von Proteinen aus dem Wehrsekret verschiedener Blattkäferlarven wurde freundlicherweise von Frau Getzlaff am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) durchgeführt. Die Proben wurden einem chemischen Abbau nach Edman unterzogen und sequenziert (Edman, 1949).

Die Wehrsekrete wurden dafür mit einer Kapillare gesammelt und zur Trennung der Proteine der SDS-PAGE unterzogen (2.9.5). Die getrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran geblottet (2.9.6) und zur Detektion angefärbt (2.9.7). Die zu sequenzierende Bande wurde mit einem Skalpell aus der Membran herausgelöst, getrocknet und ans HZI geschickt.

2.9.9 ESI-MS/MS Sequenzierung

Die Elektronenspray-Ionisation (ESI) mit anschließender Massenspektroskopie (MS) von Proteinen wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Nimtz am HZI durchgeführt. Auf diese Weise wurden unbekannte Proteine aus den Wehrsekreten unterschiedlicher Blattkäferlarvenarten fragmentiert und einzelne Peptide sequenziert. Die Peptidsequenzen konnten mit Sequenzen verschiedener Datenbanken (2.8.25) abgeglichen werden. Anhand der Homologien zu bekannten Sequenzen können gegebenenfalls die Peptide klassifiziert werden.

Zur Probenvorbereitung wurde das Wehrsekret mit einer Kapillare aus den Drüsen gesaugt und direkt mit dem SDS-Probenpuffer (Tabelle 26) gemischt. Die darin enthaltenden Proteine wurden anschließend per SDS-PAGE getrennt (2.9.5). Die zu untersuchende Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Probe wurde bei Raumtemperatur getrocknet und zur Weiterbehandlung ans HZI gesendet.

2.9.10 Enzymassay zur Aktivitätsbestimmung der SAO

Nach erfolgreicher Expression (2.8.14) und Reinigung (2.9.1) der SAO wurde diese über eine PD-10 Säule in Assay-Puffer (Kaliumphosphatpuffer 50mM, pH 6) umgepuffert und auf ihre Aktivität hin getestet. Das aktive Enzym katalysiert die Oxidation von Salicylalkohol zu Salicylaldehyd. Da es sich sowohl beim Substrat als auch beim Produkt um flüchtige Substanzen handelt, wurde die Quantifizierung des entstandenen Salicylaldehyds per Gaschromatographie (GC) durchgeführt.

Tabelle 29: Zusammensetzung des Assay-Puffers und der Substrat-Stammlösung

Assay-Puffer, pH 6,0		Substrat-Stammlösung	
K ₂ HPO ₄ [50 mM]	90 ml	Salicylalkohol	0,6207 g
KH ₂ PO ₄ [50 mM]	600 ml	Assay-Puffer	ad 10 ml

Vor Durchführung des Enzymassays wurde die Substrat-Stammlösung hergestellt, die 500 mM Salicylalkohol enthielt. Die Herstellung erfolgte unmittelbar vor der Verwendung, da nach längerer Aufbewahrung der Luftsauerstoff die Oxidation vom Salicylalkohol zum Aldehyd bewirkte. Um das Vorhandensein von Salicylaldehyd in der Stammlösung gänzlich auszuschließen, wurde diese ebenfalls per GC vermessen und analysiert. War diese frei von Salicylaldehyd konnten folgende Enzymassay-Ansätze angefertigt werden:

10-250 µl Substrat-Stammlösung (entspricht 10-250 mM Salicylalkohol-Endkonzentration)
ad 400 µl Assay-Puffer

Durch Zugabe von 100 µl Enzymlösung wurde die Reaktion gestartet. Das Enzymassay wurde in einem 2 ml GC-Vial (Neolab) mit geschlossenem Deckel angesetzt, der ein Septum enthielt. Auf die Dichtigkeit des Reaktionsgefäßes wurde streng geachtet, damit das flüchtige Produkt Salicylaldehyd nicht entweichen konnte.

Nach 2-30 minütiger Inkubation bei 25°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 250 µl Ethylacetat mit Hilfe einer Hamilton-Spritze durch das Septum gestoppt. Gleichzeitig diente die Ethylacetat-Lösung zur Extraktion der in organischen Lösungsmitteln löslichen Substanzen Salicylalkohol und Salicylaldehyd. Das Ethylacetat enthielt 0,2 mM Phenol als internen Standard, um die spätere quantitative Analyse des Salicylaldehyds zu gewährleisten.

Zur besseren Extraktion wurde der Ansatz 15 Sekunden auf einem Schüttler durchmischt und zur Phasentrennung 5 Minuten bei 5000 Upm (EBA 3S, Hettich) zentrifugiert. Die obere organische Phase wurde per Hamilton-Spritze durch das Septum abgenommen und auf Grund seines geringen Volumens in ein konisches GC-Vial (Neolab) überführt. 1 µl der organischen Phase wurde zur

gaschromatographischen Analyse eingesetzt, die mit dem Gerät GC-2010 (Shimadzu) durchgeführt wurde. Die Trennung der zu analysierenden Substanzen erfolgte über eine BP-1 Säule mit 30 m Länge, einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Schichtdicke von 0,25 µm. Die Injektortemperatur wurde auf 250°C eingestellt. Auf diese Weise konnte die Probe schlagartig verdampfen und mit dem Trägergas Helium (Flussrate: 40 cm/s) auf die Säule gebracht werden. Um eine ausreichende Trennung der Substanzen zu erreichen, wurde die Säule anfangs 3 Minuten konstant auf 70°C gehalten. Anschließend wurde die Säule linear um 6°C pro Minute bis zum Erreichen von 200°C hochgeheizt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors (FID).

2.9.11 Produktidentifizierung mittels GC-MS

Die Gaschromatographie mit Massenspektroskopie-Kopplung (GC-MS) des Produktes vom Enzymassay zur Aktivitätsbestimmung der SAO (2.9.10) durfte freundlicherweise am Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde der CAU Kiel bei Frau Dr. Schwarz durchgeführt werden. Entsteht während des Assay Salicylaldehyd aus Salicylalkohol, können beide Stoffe über die GC (Agilent 19091N-216) getrennt und anhand der gekoppelten MS (Agilent MSD 5975) identifiziert werden. Dazu wurden nach Beendigung der Reaktion 200 µl eines wässrigen Enzymansatzes in ein Headspace-Vial überführt und für 5 Minuten auf 70°C erhitzt. Die Gaschromatographie erfolgte mit 1 ml der entstanden Gasphase, die auf eine HP-INNOWax Säule (60 m x 0,32 mm x 0,5 µm, Agilent) mit einem Splitverhältnis von 5,3:1 aufgetragen wurde. Unter Verwendung von Helium als Trägergas (Flussrate: 30 cm/s) erfolgte die Trennung der Substanzen bei linearem Temperaturgradient von 15 °C/min bis zum Erreichen von 240°C. Die Endtemperatur wurde abschließend 4 Minuten gehalten. Die Elektronenstoßionisation wurde bei 70 Elektronenvolt (eV) erzeugt.

2.9.12 Glucoseoxidase-Assay

Die Durchführung des Glucoseoxidase-Assays erfolgte nach leicht modifizierter Angabe von Cavener und MacIntyre (Cavener and MacIntyre, 1983). Nach erfolgreicher Expression (2.8.14) und Reinigung (2.9.1) der SAO wurde diese über eine PD-10 Säule in 0,1 M Tris-Puffer pH 7,0 umgepuffert (2.9.2). 100 µl der gereinigten und umgepufferten Enzymlösung wurden mit 400 µl Dichlorindophenol-(DCIP)-Reagenz versetzt und die Absorptionsänderung bei 600 nm (Ultrospec 2100 pro, Amersham Bioscience) über einen Zeitraum von 10 Minuten gemessen. Katalysiert die SAO die Oxidation der vorhandenen Glucose zu Gluconsäure, werden die freigesetzten Elektronen auf den blauen Farbstoff

2,6-Dichlorindophenol übertragen. Durch Reduktion des Farbstoffs entsteht ein Farbumschlag von blau nach farblos, welcher bei 600 nm detektiertbar ist.

Tabelle 30: Bestandteile des DCIP-Reagenzes

<i>DCIP-Reagenz</i>	
Tris-HCl	100 mM
β -D-Glucose	76 mM
2,6-Dichlorindophenol	48 μ M

Nach Lösen der Bestandteile in Wasser wurde der pH-Wert auf pH 7,0 eingestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung und Charakterisierung der Salicylalkohol-Oxidase (SAO) aus *C. tremulae*

Larven von *C. tremulae* sind in der Lage Salicin, das sie über ihre Wirtspflanze aufnehmen, in Salicylaldehyd umzuwandeln (Pasteels et al., 1983). Dazu wird Salicin über spezifische Transporter in das Wehrreservoir transportiert, wo es von einer β -Glucosidase in Salicylalkohol umgewandelt wird (Discher et al., 2009; Pasteels et al., 1990). Die Reaktion vom Salicylalkohol zu Salicylaldehyd wird von einer Oxidase katalysiert, die wegen ihrer Substratspezifität Salicylalkohol-Oxidase (SAO) bezeichnet wird (Brückmann, 2002b). Im Folgenden wird die SAO aus *C. tremulae* als CtSAO bezeichnet.

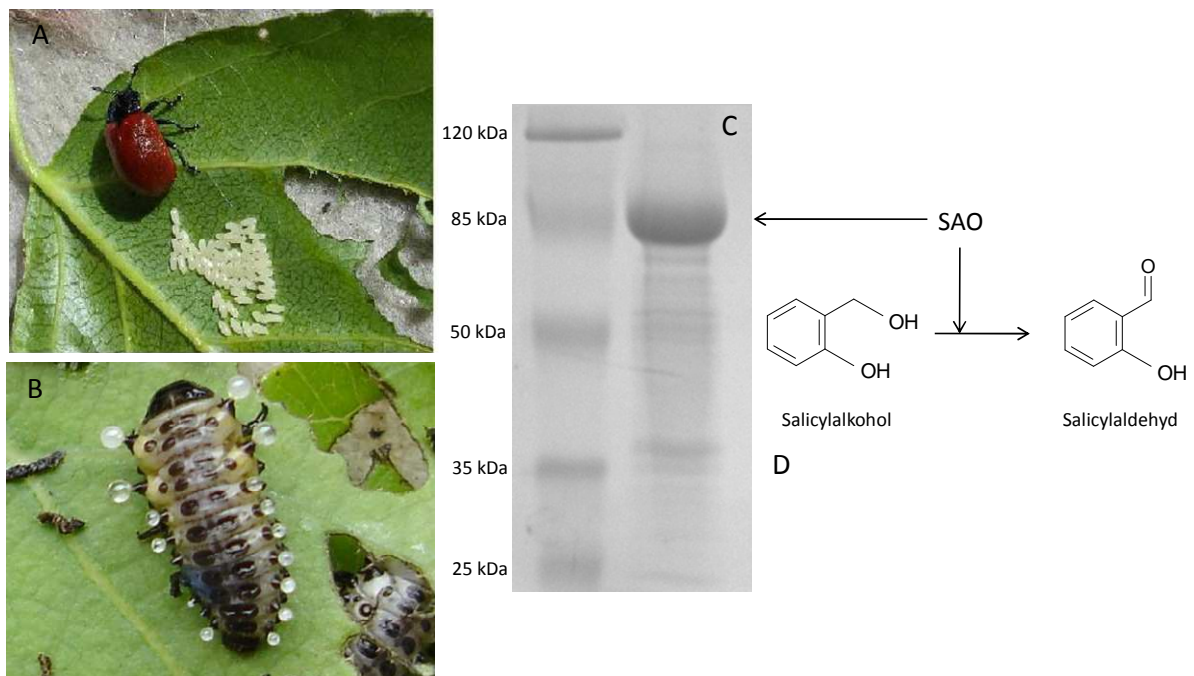


Abbildung 11: A: Adultes Tier und Eier von *C. tremulae* (Mohagheghi, 2007). B: Larve von *C. tremulae* mit evertiertem Wehrsekret (Mohagheghi, 2007). C: SDS-PAGE-Gel des Wehrsekretes von *C. tremulae*. Linke Spur: Prestainiertes Protein Molecular Weight Marker (Fermentas). Rechte Spur: Wehrsekret. Die ca. 85 kDa große Bande entspricht der SAO, die die Reaktion von Salicylalkohol zu Salicylaldehyd katalysiert (D).

Aufgrund der höheren Spezifität der SAO gegenüber der β -Glucosidase (Pasteels et al., 1990) wurde die SAO für genetische und biochemische Analysen ausgewählt, um die Evolution der an der Wehrsekretsynthese beteiligten Enzyme tiefergehend zu untersuchen.

3.1.1 Identifizierung und Klonierung des cDNA-Transkriptes der CtSAO

Hoda Mohagheghi identifizierte im Rahmen ihrer Doktorarbeit (Mohagheghi, 2007) bereits ein putatives cDNA-Transkript, das für die SAO aus *C. tremulae* codiert. Die Amplifizierung der Sequenz gelang mittels Durchführung einer Standard-PCR mit degenerierten Primern. Als Grundlage der degenerierten Primer dienten kurze Peptidsequenzen, die durch ESI-MS/MS (2.9.9) erhalten wurden.

Tabelle 31: Auflistung der nach ESI-MS/MS sequenzierten Peptide (Mohagheghi, 2007). In Klammern gelistete Aminosäuren konnten nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Unterstrichene Aminosäuren fanden keine Übereinstimmung mit der rekombinant exprimierten CtSAO.

Peptide	Bemerkung
LYDEFTGDISRFL(I/L)N	N-Terminus der CtSAO
ASQEAGLPYVDND <u>GQ</u> (I/L)GVS ^Y VQTTTK	92,9%ige Übereinstimmung mit CtSAO
QLG(I/L) <u>TV</u> QSDLPV	91,7%ige Übereinstimmung mit CtSAO
GF(I/L)TSSNTVEALS <u>YLK</u>	93,8%ige Übereinstimmung mit CtSAO
LSGDLSSLLNLSSR	Peptid wurde in CtSAO nicht wiedergefunden

Das Amplifikat weist einen offenen Leserahmen (OLR) von 1875 bp auf. Da es sich bei der CtSAO um ein extrazelluläres Enzym handelt, das im Wehrreservoir arbeitet, war davon auszugehen, dass das Protein ein Signalpeptid zur Translokation enthält. Durch N-terminale Sequenzierung (2.9.8) und computergestützte Analysen (2.8.25) konnte ein Signalpeptid von 21 Aminosäuren vorhergesagt werden. Da Signalpeptide nach der Membranpassage vom Protein abgespalten werden, wurde die Wahl der Expressionsprimer so getroffen, dass das künstlich amplifizierte cDNA-Transkript den Bereich nicht mehr beinhaltet, der für das Signalpeptid codiert. In diesem Fall handelt es sich um 63 bp, wodurch das in *E. coli*-Zellen transformierte cDNA-Transkript der CtSAO 1812 bp aufwies und die rekombinante CtSAO 604 Aminosäuren.

Vier der fünf sequenzierten Peptide fanden eine hohe Übereinstimmung mit der identifizierten CtSAO (Tabelle 31). Diese Tatsache, kombiniert mit dem Vorhandensein eines Signalpeptids, wies auf die hohe Wahrscheinlichkeit hin, dass das vorliegende cDNA-Transkript für die SAO der Wehrsekretsynthese aus *C. tremulae* codiert. Für einen funktionellen Nachweis sollte die SAO rekombinant exprimiert und anschließend biochemisch charakterisiert werden. Mohagheghi gelang es aus zeitlichen Gründen nicht die SAO in löslicher Form zu exprimieren. Dies wurde durch Änderungen der Expressionsbedingungen im Rahmen dieser Arbeit nachgeholt.

Die Sequenz, die bereits von Mohagheghi in den TOPO XL-Vektor kloniert wurde, war so modifiziert, dass eine Umklonierung in den Expressionsvektor pET-22b(+) möglich war. Das cDNA-Transkript der CtSAO enthält die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *SallI*. Der Vektor pET-22b(+) wurde für die Ligation mit *NdeI* und *XhoI* linearisiert. *SallI* und *XhoI* erzeugen bei der

Hydrolyse kompatible Enden, was die Ligation von Vektor und cDNA-Transkript zu einem zirkulären Plasmid ermöglicht. Unter Nutzung des pET-22b(+)-Vektors entsteht bei der Expression ein Fusionsprotein, das einen C-terminalen *His-Tag* trägt, welcher die spätere Reinigung des Proteins ermöglicht.

Die Ligation erfolgte bei 4°C für 16 Stunden (2.8.10.2) mit anschließender Transformation in kompetente *E. coli*-TOP10-Zellen (2.8.11). Aus den entstandenen Bakterienkolonien wurde das Plasmid isoliert (2.8.13.1) und anhand einer Restriktionsanalyse (2.8.12.2) mit *NdeI* und *XhoI* auf korrekte Integration der cDNA in den Vektor überprüft. Diese Restriktionsendonukleasen konnten für die Restriktionsanalyse verwendet werden, da der Vektor pET-22b(+) die Erkennungssequenz von *NdeI* trägt und das cDNA-Transkript der CtSAO eine *XhoI*-Erkennungssequenz enthält. Die zusätzliche Kontrollsequenzierung der Plasmide, die anhand der Restriktionsanalyse als positiv identifiziert wurden, bestätigte den Erfolg der Klonierung des cDNA-Transkriptes der CtSAO in den Vektor pET-22b(+). Das entstandene Konstrukt konnte für die Expression verwendet werden und wird im Folgenden pCtSAO1 genannt.

3.1.2. Expression der SAO aus *C. tremulae* in *E. coli*-Zellen

Das in Kapitel 3.1.1 hergestellte Plasmid pCtSAO1 wurde für die Expression in kompetente *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen transformiert (2.8.18). Die Expression (2.8.14) erfolgte für 16 Stunden bei 37°C in 50 ml LB-Medium (2.4.2.1). Nach Zellaufschluss und Reinigung der CtSAO mit Ni-NTA (2.9.1) wurde von jeder Fraktion ein Aliquot über ein SDS-Gel (2.9.5) getrennt und analysiert.

Die Auswertung des SDS-Gels ergab, dass die SAO exprimiert wurde. Die Größe der überexprimierten SAO betrug etwa 67 kDa, was der Vorhersage von PeptideMass (2.8.25) entsprach. Der Größenunterschied zur ca. 85 kDa großen nativen CtSAO ist damit zu erklären, dass diese *in vivo* von einer eukaryontischen Zelle gebildet wird, d.h. das Protein erhält möglicherweise posttranslationale Modifikationen in Form von Zuckerketten, die das Molekulargewicht beeinflussen (3.1.7). Deutlich zu erkennen war, dass die SAO als unlösliches Protein in Form von *inclusion bodies* exprimiert wurde. Die Fraktion der nach Zellaufschluss mit Ultraschall löslichen Proteine zeigte keine Bande bei 67 kDa, wohingegen die Fraktion der unlöslichen Bestandteile eine intensive Bande bei 67 kDa zeigte. So war eine Reinigung der SAO nicht möglich.

Das Phänomen der *inclusion bodies* ist hinreichend bekannt und tritt häufig bei der Fremdgenexpression in *E. coli*-Zellen auf (Rudolph and Lilie, 1996). Als *inclusion bodies* werden unlösliche Proteinagglomerate bezeichnet, die missgefaltet und damit auch nicht funktionsfähig sind. Ein möglicher Grund für die Bildung solcher Agglomerate ist zum einen die unnatürlich hohe Konzentration des Fremdproteins in der *E. coli*-Zelle. Zum anderen handelt es sich bei der SAO um ein

Protein, das *in vivo* von einer eukaryontischen Zelle gebildet wird, d.h. das Protein erhält möglicherweise posttranslationale Modifikationen in Form von Zuckerketten. Denkbar ist, dass diese Modifikationen für die korrekte Faltung des Proteins essentiell sind.

Auch die durch den *His-tag* künstlich erzeugten Aminosäuren könnten die Faltung des Proteins negativ beeinflussen. Ein Lösungsansatz besteht darin den Expressionsvektor auszutauschen, um auf diese Weise ein Fusionsprotein zu erzeugen, das den *His-Tag* am *N*-Terminus trägt. Diese Strategie wird im folgenden Kapitel beschrieben.

3.1.3. Umklonierung der SAO aus *C. tremulae* mit anschließender Expression in *E. coli*-Zellen

In unserer Arbeitsgruppe konnte Elisabeth Kaltenecker erfolgreich das Problem der Bildung von *inclusion bodies* beheben, indem sie den Expressionsvektor änderte (Kaltenecker, 2009): pET-22b(+)-Vektorkonstrukte erzeugten bei Expression in *E. coli*-Zellen unlösliche Proteine mit C-terminalem *His-Tag*, wohingegen pET-28a(+)-Konstrukte lösliche und aktive Proteine mit N-terminalem *His-Tag* bildeten.

Für die Klonierung des cDNA-Transkriptes der CtSAO im pET-28a(+)-Vektor mussten zunächst Expressionsprimer (EP) entworfen werden. EP1 konnte aus der Arbeit von Mohagheghi (2007) übernommen werden, der dort als P09 beziffert wurde. EP2 (Tabelle 32) wurde mit einer *Sall*-Erkennungssequenz ausgestattet, die die spätere Klonierung in den Vektor pET-28a(+) ermöglichte. Da in diesem Fall CtSAO am *N*-Terminus mit einem *His-Tag* fusioniert werden sollte, enthielt EP2 zusätzlich ein Stoppkodon. In einer Standard-PCR (2.8.5.1) unter Verwendung der Platinum® *Pfx* DNA-Polymerase wurde ein Amplifikat erzeugt, das nach Hydrolyse mit dem linearisierten pET-28a(+)-Vektor ligiert werden konnte. Als Template dienten 0,5 µl einer 1:100 verdünnten Spinprep des pCtSAO1 Konstrukts (3.1.1). Die *Annealing*-Temperatur lag bei 56,8°C.

Tabelle 32: Expressionsprimer 1 und 2 für die Klonierung der SAO aus *C. tremulae* in den pET-28a(+)-Vektor. Die fettgedruckten Bereiche verdeutlichen die *NdeI*-Erkennungssequenz von EP1 und die *Sall*-Erkennungssequenz von EP2. Das Stoppkodon ist unterstrichen.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
EP1	5'-ATATACATATGCTTTACGATGAATTTACAGGTCACATATCG-3'	56,8°C
EP2	5'-ATATAGTCGACCTATATTCCATAATCATTCTTAATGATGTCT-3'	

Das 1820 bp große Amplifikat wurde gereinigt (2.8.8.1) und mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *Sall* hydrolysiert. Parallel wurde der pET-28a(+)-Vektor ebenfalls mit *NdeI* und *Sall* hydrolysiert,

um die für die Ligation erforderlichen kompatiblen Enden zu erzeugen. Nach erneuter Aufreinigung der beiden Fragmente über ein Agarosegel (2.8.8.2) wurde die Ligation für 1 Stunde bei 25°C durchgeführt (2.8.10.2). Nach Transformation in kompetente *E. coli*-TOP10-Zellen (2.8.11) wurden keine Bakterienkolonien erhalten. Auch nach Wiederholung der Ligation mit unterschiedlichen Verhältnissen des Inserts zum Vektor konnten keine Kolonien erzeugt werden.

Da vermutlich die Erkennungssequenz einer der beiden Restriktionsendonukleasen nicht erkannt wurde, wurde eine Spinprep (2.8.13.2) des pET-28a(+)-Vektors angefertigt und sequenziert. Die erhaltene Sequenz ergab, dass der Vektor intakt war und eine eventuelle Verwechslung mit einem anderen Vektor ausgeschlossen werden konnte.

Zur Überprüfung des PCR-Produktes wurde dieses unverändert in den pGEM®-T Easy Vektor (2.8.9) kloniert und ebenfalls nach Anfertigung einer Spinprep sequenziert. Anhand der Sequenz wurde festgestellt, dass EP1 fehlerhaft synthetisiert wurde. Die ersten fünf Nukleinsäuren 5'-ATATA-3' waren nicht vorhanden. Liegt die Erkennungssequenz einer Restriktionsendonuklease am äußeren Ende eines cDNA-Strangs, kann die Hydrolyse an dieser Stelle nicht gewährleistet werden. Aus diesem Grund konnten keine kompatiblen Enden für die Ligation geschaffen werden.

Da die Erkennungssequenz von *Nde*I unversehrt war, konnte die Sequenz mit *Nde*I und *Sal*I aus dem pGEM®-T Easy Vektorkonstrukt hydrolysiert und in den pET-28a(+)-Vektor ligiert werden. Die Kontrollsequenzierung belegte, dass das cDNA-Transkript der CtSAO erfolgreich ohne Teilsequenz der MCS des pGEM®-T Easy Vektors in pET-28a(+) kloniert wurde. Das Konstrukt wird im Folgenden pCtSAO2 genannt.

Nach Transformation des pCtSAO2-Konstrukts in kompetente *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen (2.8.11) wurde dieses analog des pCtSAO1-Konstrukts exprimiert (3.1.2). Die Expression wurde getrennt bei 30, 25, 20 und 15°C durchgeführt. Die SDS-PAGE-Analyse (2.9.5) zeigte auch hier, dass die CtSAO bei keiner der angegebenen Temperaturen in löslicher Form exprimiert werden konnte.

Dies deutet darauf hin, dass die Wahl des Expressionsvektors in diesem Fall keinen Einfluss auf die Löslichkeit der CtSAO besitzt.

3.1.4 Coexpression der SAO aus *C. tremulae* mit Chaperonen

Um die rekombinante SAO aus *C. tremulae* in löslicher Form zu exprimieren, wurden Chaperone coexprimiert (2.8.15). Chaperone sind ubiquitär vorkommende Proteine, die ein Schutz- und Reparatursystem in der Zelle bilden (Mogk et al., 2001). Es wird vermutet, dass die Chaperone, die in dieser Arbeit verwendet wurden, eine sogenannte Faltungskammer bilden, in die Proteine bis zu einer Größe von 60 kDa aufgenommen werden können (Roseman et al., 1996). Dort werden hydrophobe Bereiche des missgefalteten Proteins erkannt und in die richtige Konformation gebracht.

Auf diese Weise können lösliche und damit aktive Proteine entstehen. Obwohl die zu exprimierende CtSAO eine Größe von 67 kDa aufweist, wurde dieser Versuchsansatz durchgeführt. Verwendet wurden die chaperonkodierenden Plasmide pRDKJG und pRep4-groESL, die der Zelle eine Kanamycinresistenz vermitteln (Caspers et al., 1994). Aus diesem Grund kam für die Coexpression dieser Plasmide nur das pCtSAO1-Konstrukt in Frage, da es ein β -Lactamase-Gen besitzt und so den transformierten Zellen ermöglicht auf ampicillinhaltigem Medium zu wachsen. Unter Verwendung von LB-Medium (2.4.2.1), das Ampicillin und Kanamycin enthielt, waren nach Transformation nur jene Zellen in der Lage zu wachsen, die beide Plasmide aufgenommen hatten. pCtSAO2 eignete sich nicht zur Coexpression, da dieser Vektor wie die der Chaperone eine Kanamycinresistenz vermittelt und damit eine eindeutige Selektion nicht möglich war.

Nach Transformation des pCtSAO1-Konstrukts in kompetente *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen, die bereits eines der beiden chaperonkodierenden Plasmide enthielten, wurde die Expression zunächst in 50 ml LB-Medium bei 15°C für 16 Stunden durchgeführt (2.8.15). Nach Zellaufschluss und Enzymreinigung (2.9.1) war im SDS-Gel (2.9.5) deutlich zu erkennen, dass die CtSAO in Verbindung mit pRep4-groESL in löslicher Form exprimiert wurde. Die Fraktion der löslichen Proteine zeigte eine intensive Bande bei 67 kDa (Abbildung 12). In der gleichen Fraktion wurde eine ausgeprägte Bande bei ca. 60 kDa detektiert, die dem Chaperon GroEL zugeordnet werden konnte. Das zweite Chaperon GroES der Größe 12 kDa konnte nicht detektiert werden, da es aufgrund seiner geringen Größe und der für die ausreichende Trennung benötigten langen Laufzeit das SDS-Gel verlassen hatte. Die Elutionsfraktion ließ erkennen, dass die CtSAO mit Hilfe von Ni-NTA (2.9.1) gereinigt werden konnte, allerdings befanden sich dort auch Proteine, die vermutlich unspezifisch an das Säulenmaterial gebunden hatten. Das Chaperon GroEL stellte die Hauptverunreinigung dar. Zur Beseitigung der Verunreinigungen wurde die Affinitätsreinigung (2.9.1) dahingehend verändert, dass dem Waschpuffer 50 mM anstatt 40 mM Imidazol zugesetzt wurde. Dies sollte bewirken, dass mehr unspezifisch gebundene Proteine von der Ni-NTA-Agarose gespült werden. Die SDS-PAGE Analyse der Enzymreinigung zeigte, dass durch die Erhöhung der Imidazolkonzentration im Waschpuffer nicht mehr unspezifisch angelagerte Proteine ausgespült werden konnten. Alternativ wurde die Affinitätsreinigung mit Talon® durchgeführt (2.9.1.2). Die Elutionsfraktion wies ebenfalls Proteine auf, die unspezifisch an das Säulenmaterial gebunden haben. Daneben zeigte sich, dass sich die CtSAO trotz *His-Tags* nur zu einem geringen Teil an das Talon® anlagerte, da die Fraktion der ungebundenen Proteine eine intensive Bande bei 67 kDa zeigte (Daten sind nicht abgebildet).

Da keine 100%ige Reinigung der CtSAO erfolgte, wurde im Folgenden die Reinigung mit Ni-NTA so vollzogen, wie sie in Kapitel 2.9.1.1 beschrieben ist. Bei der Aktivitätsmessung war daher durch

Ergebnisse

Anfertigen einer Negativkontrolle auszuschließen, dass die Enzymaktivität von einem Protein ausgeht, das als Verunreinigung vorlag (3.1.5).

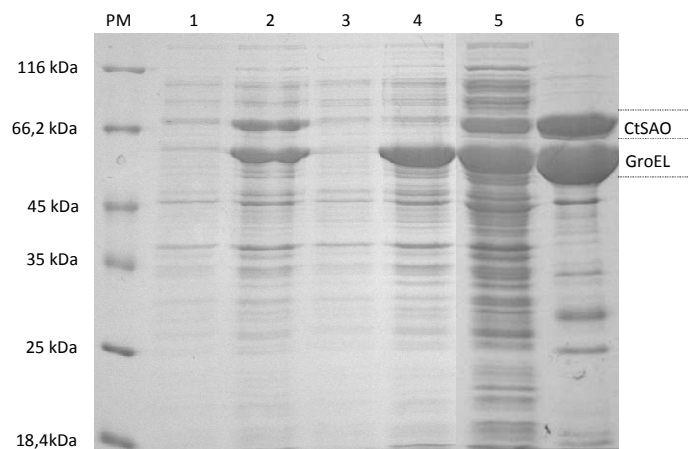


Abbildung 12: SDS-PAGE-Bild der Coexpression der CtSAO mit pREP4-groESL und anschließender Reinigung. PM: Proteinmarker (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas). 1: pCtSAO1 vor der Expression. 2: pCtSAO1 nach Expression, deutlich zu erkennen ist, dass CtSAO und GroEL überexprimiert wurden. 3: unmodifizierter pET-22b(+)-Vektor nach Expression, es wurde kein Protein überexprimiert. 4: pREP4-groESL nach Expression, deutliche Überexpression von GroEL detektierbar. 5: Fraktion der löslichen Proteine nach Zellaufschluss. 6: Elutionsfraktion der Ni-NTA-Agarose-Affinitätsreinigung. (10%iges SDS-Gel angefärbt mit Coomassieblau, 2.9.7).

Um auszuschließen, dass die 67 kDa große Bande, die der CtSAO zugeordnet wurde, nicht von einem der beiden verwendeten Vektoren codiert wird, wurde die Expression unter gleichen Bedingungen mit den unmodifizierten Vektoren wiederholt. Dafür wurde jeweils der pET-22b(+)-Vektor, der keine klonierte cDNA enthielt, und der pRep4-groESL-Vektor getrennt in *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen transformiert (2.8.11) und zur Expression gebracht. Auf ein SDS-Gel wurde jeweils ein Aliquot der beiden Zellkulturen nach erfolgter Expression aufgetragen. Die Auswertung des SDS-Gels ergab, dass weder der pET-22b(+)-Vektor noch pRep4-groESL für ein 67 kDa großes Protein codieren (Abbildung 12). Damit konnte davon ausgegangen werden, dass das überexprimierte Protein der CtSAO aus *C. tremulae* entsprach. Um dies zu bestätigen, musste ein funktioneller Nachweis in Form eines Enzymassay durchgeführt werden. Dieser Versuch wird in Kapitel 3.1.5 beschrieben.

Die SDS-Gel Analyse der Coexpression mit pRDKJG zeigte, dass sich in der Fraktion der löslichen Proteine eine deutliche Bande bei 67 kDa befand. pRDKJG codiert für die Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE. DnaK hat eine Größe von 69 kDa. Aufgrund der Überexpression von DnaK und der etwa gleich großen CtSAO könnte es im SDS-Gel zur Überlagerung der beiden Proteinbanden gekommen sein. So konnte nicht sicher davon ausgegangen werden, dass die CtSAO in löslicher Form exprimiert wurde. Da sich jedoch die Coexpression mit pRep4-groESL bereits als erfolgreich erwies, wurde die

Versuchsdurchführung der Coexpression mit pRDKJG eingestellt. Die Ergebnisse der Identifizierung und Expression des cDNA-Transkriptes der CtSAO werden in Kapitel 4.1 diskutiert.

3.1.5 Aktivitätsmessung der SAO aus *C. tremulae*

Wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben gelang es die CtSAO mit Hilfe der Coexpression von pRep4-groESL in löslicher Form zu exprimieren. Zur Sicherstellung, dass es sich bei dem löslich exprimierten 67 kDa großen Protein (3.1.4) um die SAO aus *C. tremulae* handelt, wurde ein spezifisches Enzymassay (2.9.10) durchgeführt.

Dazu wurde die Coexpression in einem 1000 ml LB-Kulturansatz wiederholt. Nach Affinitätsreinigung mit Ni-NTA wurden die Proteine der Elutionsfraktion in Assaypuffer umgepuffert (2.9.2) und ohne weitere Aufkonzentration für die Konzentrationsbestimmung (2.9.3) und das Enzymassay (2.9.10) eingesetzt. Die Zusammensetzung des Assaypuffers sowie dessen pH-Wert und die Inkubationstemperatur wurden aus der Arbeit von Brückmann (2002a) übernommen, der diese Parameter als optimal für die Enzymaktivität der nativen SAO aus *C. populi* bestimmt hatte. Auf Grund der nahen Verwandtschaft zu *C. tremulae* wurde davon ausgegangen, dass die Bedingungen übertragbar sind.

Durch Einsatz unterschiedlicher Substratkonzentrationen sowie unterschiedlicher Inkubationszeiten konnte für CtSAO eine Kinetik erstellt werden, die in Tabelle 33 zusammengefasst ist.

Tabelle 33: Aktivität der CtSAO bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen

Substratkonzentration [mM]	Aktivität der CtSAO [nkat/mg Gesamtprotein]
10	22,9
30	52,0
75	87,7
150	88,4
250	56,2

Da die Elutionsfraktion neben der CtSAO auch Fremdproteine enthielt, kann die Aktivität der CtSAO nur pro Miligramm Gesamtprotein der Elutionsfraktion angegeben werden. Demnach müssten die tatsächlichen Werte der spezifischen Aktivität der CtSAO höher sein, konnten aber an dieser Stelle nicht ermittelt werden, da die Reinigung der CtSAO bis zur Homogenität nicht gelang.

Anhand der erhaltenen Werte für die Aktivität der CtSAO konnte der K_M -Wert durch doppelreziproke Diagramme nach Lineweaver-Burk (1934) berechnet werden. Da die Darstellung nach Lineweaver-

Burk niedrige Werte überbewertet, wurde der K_M -Wert ebenfalls durch einfachreziproke Darstellung nach Hanes (1932) errechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 34 dargestellt.

Tabelle 34: K_M -Werte nach Lineweaver-Burk und Hanes

	<i>Lineweaver-Burk</i>	<i>Hanes</i>
K_M	46,4 mM	32,7 mM

Die erhaltenen Werte verdeutlichen, dass bei einer Substratkonzentration von 46,4 mM (Lineweaver-Burk), bzw. bei 32,7 mM (Hanes) die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit der CtSAO erreicht ist. Bereits ab einer Substratkonzentration von 75 mM ist die Umsatzgeschwindigkeit konstant. Bei hohen Substratkonzentrationen von 250 mM tritt eine Substrathemmung ein, wobei Substrat und Produkt vermutlich um die Anlagerung an das aktive Zentrum konkurrieren.

Das Produkt konnte durch Vergleich mit einer Referenzsubstanz im GC-Spektrum eindeutig als Salicylaldehyd identifiziert werden. Dennoch wurde zur zweifelsfreien Identifizierung des Produkt-Peaks ein Enzymassay-Ansatz nach Beendigung der Reaktion der GC-MS-Analyse (2.9.11) unterworfen. Die MS-Analyse des Peaks ergab eine 97%ige Übereinstimmung mit den Daten, die für Salicylaldehyd in der Datenbank gespeichert sind (Abbildung 13). Eine 100%ige Übereinstimmung ist nicht zu erreichen, da die Werte der Datenbank mit unterschiedlichen GC-Säulen und Temperaturprogrammen erhalten wurden. So konnte durch die Anwendung der GC-MS eindeutig belegt werden, dass es sich bei dem gebildeten Produkt um Salicylaldehyd handelt.

Ergebnisse

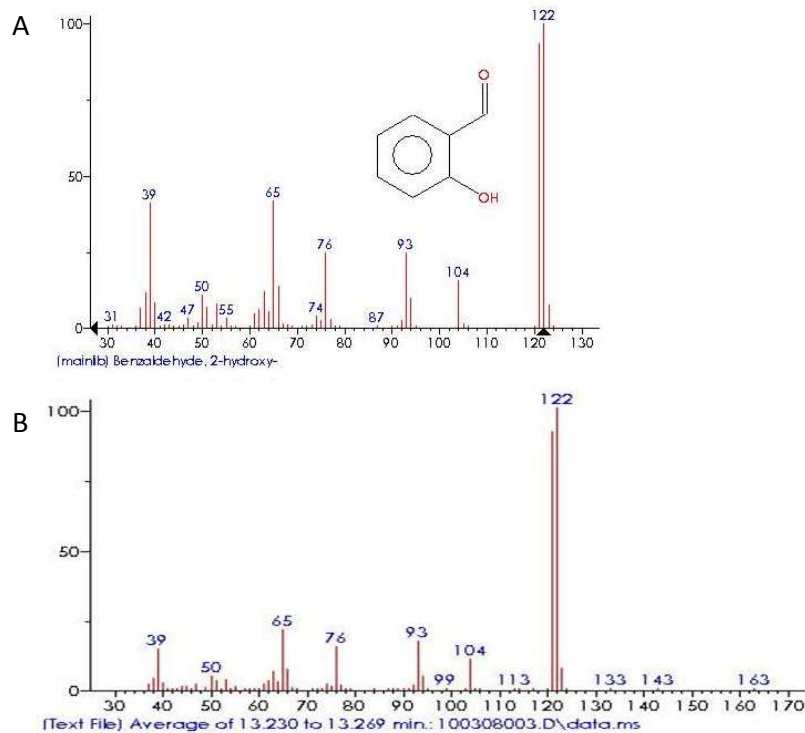


Abbildung 13: GC-MS-Spektren. A: Referenzspektrum des Salicylaldehyds. **B:** Spektrum des Produkt-Peaks, der nach Durchführung des Enzymassays detektiert wurde. Die beiden Spektren weisen eine Übereinstimmung von 97% auf, wodurch bestätigt wird, dass im durchgeführten Enzymassay Salicylaldehyd entstanden ist.

Um sicherzustellen, dass die Oxidaseaktivität enzymatisch bedingt ist und nicht von Pufferbestandteilen ausgeht, wurden zur Denaturierung der Proteine 100 µl der Elutionsfraktion für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach Durchführung des Enzymassays konnte anhand der GC-Auswertung kein Salicylaldehyd-Peak detektiert werden.

Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist, weist die Bande der Elutionsfraktion neben der CtSAO Proteinverunreinigungen auf, deren Hauptbestandteil GroEL ist. Um auszuschließen, dass von dem Chaperon oder einem anderen Protein, das als Verunreinigung vorlag, eine Oxidaseaktivität ausgeht, wurde eine Negativkontrolle angefertigt. Dafür wurden der unmodifizierte pET-22b(+)-Vektor und das Plasmid pRep4-groESL gemeinsam in kompetente *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen transformiert und anschließend unter gleichen Bedingungen wie bei der Coexpression von pCtSAO1 exprimiert. Die Durchführung der Reinigung und des Enzymassays erfolgte ebenfalls analog zu der der Coexpression. Die gaschromatographische Auswertung des Enzymassays ergab, dass kein Salicylaldehyd gebildet wurde, d.h. keine Oxidaseaktivität von den als Verunreinigung vorliegenden Proteinen ausgeht.

Die Durchführung dieser beiden Negativkontrollen beweist, dass die Bildung des Salicylaldehyds aus Salicylalkohol allein auf der Enzymaktivität der CtSAO beruht.

3.1.6 Bestimmung der Substratspezifität der CtSAO

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es die CtSAO rekombinant in löslicher Form zu exprimieren (3.1.4). Die Ergebnisse des Enzymassays (3.1.5) erbrachten den funktionellen Nachweis, dass es sich bei dem exprimierten cDNA-Transkript um das der gesuchten CtSAO aus *C. tremulae* handelt. Damit kann, wie Mohagheghi (2007) bereits vermutete, bestätigt werden, dass die CtSAO zur Familie der GMCs gehört (4.1.2). Da GMCs in der Lage sind eine Vielzahl an Substraten zu erkennen und umzusetzen (Cavener, 1992), war es interessant die Substratspezifität der CtSAO zu identifizieren. Dafür wurde eine Bandbreite an strukturverwandten Benzylalkoholderivaten als Substrat eingesetzt, die schon in der Arbeit von Brückmann (2002a) zur biochemischen Charakterisierung der nativen SAO aus *C. populi* Anwendung fanden. Die Reaktionen wurden wie ein Enzymassay (2.9.10) angesetzt und 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Die in einer Vergleichsreaktion mit Salicylalkohol entstandene Menge an Salicylaldehyd wurde dabei als 100%iger Umsatz definiert, anhand welchem die entstandenen Aldehydmengen der weiteren Substrate prozentual eingeordnet werden konnten. Die Quantifizierung erfolgte per GC-Analyse. Die ermittelten Werte für die Substratspezifität sind in Tabelle 35 zusammengefasst.

Tabelle 35: Angabe der relativen Oxidase-Aktivität der CtSAO mit verschiedenen Substraten in Prozent [%]. Nicht detektierbare Aldehyde sind mit n.d. (nicht detektierbar) gekennzeichnet.

Substrat	Relative Aktivität der CtSAO [%]
2-Hydroxybenzylalkohol (Salicylalkohol)	100
3-Hydroxybenzylalkohol	16,2
4-Hydroxybenzylalkohol	2,7
Benzylalkohol	23,2
2-Methylbenzylalkohol	21,9
3-Methylbenzylalkohol	n.d.
4-Methylbenzylalkohol	n.d.
2-Methoxybenzylalkohol	2,3
3-Methoxybenzylalkohol	1,0
4-Methoxybenzylalkohol	n.d.
2-Phenylethylalkohol	1,2

Die Werte der relativen Aktivität der CtSAO machen deutlich, dass das Enzym eindeutig Salicylalkohol als Substrat bevorzugt. Daneben findet eine schwache Umsetzung von Benzylalkohol und *ortho*-substituierter Derivate statt. *Meta*- und *para*-substituierte Derivate werden dagegen kaum als Substrat akzeptiert.

Ein Vergleich der Substratspezifität der CtSAO mit denen der nativen SAO aus *C. populi* und der rekombinanten SAO aus *C. populi* (CpSAO) wird in Kapitel 4.1 vorgenommen.

Neben den verschiedenen Benzylalkoholderivaten wurde ebenfalls Glucose als Substrat getestet. Das Enzym Glucose-Oxidase katalysiert die Oxidation von Glucose zu Gluconolacton, was spontan zu Gluconsäure umgewandelt wird. Da die Glucose-Oxidase wie CtSAO zur Familie der GMCs gehört (Cavener, 1992), war es ebenfalls interessant die oxidative Eigenschaft der CtSAO hinsichtlich der Glucose zu testen. Die Durchführung des optischen Glucoseoxidase-Assays (2.9.12) zeigte keinerlei Aktivität der CtSAO in Bezug auf die Oxidation von Glucose zu Gluconsäure.

3.1.7 Untersuchungen der posttranslationalen Modifikationen der CtSAO

Untersuchungen von Brückmann zeigten, dass das Molekulargewicht der nativen SAO aus *C. populi* 80 kDa beträgt (2002b), wohingegen das Molekulargewicht der rekombinanten CtSAO bei ca. 67 kDa liegt. Der Größenunterschied ist höchstwahrscheinlich mit der posttranslationalen Modifikation eukaryontischer Zellen in Form von Zuckerketten zu erklären, denn die heterologe Expression der CtSAO erfolgte in prokaryontischen Zellen. Durch softwaregestützte Analysen, die von Dr. Manfred Nitz vorgenommen wurde, konnten 7 putative *N*-Glycosylierungsstellen an der sich wiederholenden Aminosäureerkennungssequenz NX(S/T) identifiziert werden, wobei X für jede Aminosäure außer Prolin steht. Anhand des Edman-Abbaus konnte eine Glycosylierung an der ersten Erkennungssequenz ausgeschlossen werden. Zusätzliche ESI-MS/MS-Analysen (2.9.9) weisen einzig auf eine *N*-Glycosylierung des Aminosäuremusters YNATLVR in Form von 6-9 Mannoseresten hin, die mit 2 *N*-Acetylglucosaminresten verknüpft sind (Man₆₋₉GlcAc₂). Daher scheint nur eine der 7 putativen *N*-Glycosylierungsstellen tatsächlich glycosyliert zu sein.

Für weitere Untersuchungen der posttranslationalen Modifikationen wurde die CtSAO in dem eukaryontischen *K. lactis*-System heterolog exprimiert. Des Weiteren war es interessant festzustellen, ob sich die rekombinanten Proteine mit und ohne posttranslationale Modifikationen hinsichtlich ihrer Enzymaktivität unterscheiden.

3.1.7.1 Heterologe Expression der CtSAO in *K. lactis*-Zellen

Für weitergehende Untersuchungen der posttranslationalen Modifikation wurde die CtSAO heterolog in den Hefezellen von *K. lactis* exprimiert (2.8.20), weil sich dieses System bereits mehrfach zur Fremdgenexpression bewährte (Swinkels et al., 1993). Da es sich bei *K. lactis* um ein eukaryontisches Expressionssystem handelt, das in der Lage ist die hier zu untersuchenden posttranslationalen Modifikationen am Zielprotein durchzuführen, sollte es für die Expressionsversuche der CtSAO mit posttranslationalen Modifikationen getestet werden. Die zur Transformation benötigte Expressionskassette wurde durch Klonierung des cDNA-Transkriptes der CtSAO in den Vektor pKLAC1

(2.3) erzeugt. Dazu wurde der Vektor mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *BglII* linearisiert. Das cDNA-Transkript der CtSAO wurde in einer Standard-PCR (2.8.5.1) erzeugt, die mit der Platinum® *Pfx* DNA-Polymerase, den Primern EP7 und EP8 (Tabelle 36) und als Template 1 µl einer 1:100 Verdünnung einer Spinprep des Konstrukts pCtSAO1 (3.1.1) durchgeführt wurde. Der *forward*-Expressionsprimer (EP7) wurde dabei so konzipiert, dass nach Hydrolyse mit der Restriktionsendonuklease *BsaI* ein zu *XhoI* kompatibler Überhang entstand, der die Ligation in den Vektor ermöglichte. Der *reverse*-Expressionsprimer (EP8) enthielt eine *BglII*-Erkennungssequenz sowie ein Stoppkodon zur Beendigung der Transkription. Da der pKLAC1-Vektor keine für einen *His-Tag* codierende Sequenz beinhaltet, wurde diese in den EP8 integriert. Auf diese Weise entsteht bei Expression ein Fusionsprotein mit C-terminalem *His-Tag*.

Tabelle 36: Expressionsprimer zur Klonierung des cDNA-Transkript der CtSAO in den pKLAC1-Vektor. Der **fettgedruckte Bereich** in EP7 stellt die Erkennungssequenz von *BsaI* dar, die gepunktet unterstrichenen Nucleinsäuren bilden nach Hydrolyse mit *BsaI* den zu *XhoI* kompatiblen Überhang. Der **fettgedruckte Bereich** in EP8 markiert die *BglII*-Erkennungssequenz. Das Stoppkodon ist einfach unterstrichen, die für den *His-Tag* codierende Sequenz ist doppelt unterstrichen.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
EP7	5'-TATATAG GGTCTC CTCGAGAAAAGACTTTACGATGAATTTACAGGTGA CATATCGAG-3'	63,0°C
EP8	5'-ATATA AGATCT <u>CTAATGGTGATGGTGATGGTGT</u> TATTCCATAATCATT CTTAATGATGTCTGA-3'	

Das ca. 1800 bp große Amplifikat wurde gereinigt (2.8.8.1) und mit den Restriktionsendonukleasen *BsaI* und *BglII* hydrolysiert. Die Klonierung des cDNA-Transkriptes in den Vektor pKLAC1 erfolgte wie unter Kapitel 2.8.10 beschrieben und der Erfolg wurde mittels Restriktionsanalyse (2.8.12.2) und Sequenzierung (2.8.24) bestätigt. Nach Herstellung der Expressionskassette und anschließender Transformation (2.8.18) in kompetente *K. lactis*-Zellen wurde auf Integrität der Expressionskassette im *K. lactis*-Genom getestet (2.8.19), indem eine Standard-PCR mit dem Primerpaar IP2 und IP3 (Tabelle 23, Kapitel 2.8.19) durchgeführt wurde. Die Auswertung zeigte eindeutig, dass ein 2,3 kb großes Fragment amplifiziert werden konnte, was bestätigte, dass die Expressionskassette mehrfach in das Genom von *K. lactis* integriert werden konnte. Kolonien, die diese Mehrfachintegration aufwiesen, wurden zur Expression (2.8.20) gebracht. Da das Zielprotein von *K. lactis*-Zellen in das Expressionsmedium abgegeben wird, war ein Zellaufschluss nicht erforderlich. Die an das Medium abgegebenen Proteine wurden mit TCA gefällt (2.9.4) und über die SDS-PAGE (2.9.5) aufgetrennt, welche belegt, dass bei 3 von 6 Kolonien ein ca. 80 kDa großes Protein überexprimiert wurde (Abbildung 14). Die ca. 80 kDa große Bande von Kolonie 4 wurde aus dem Gel getrennt, getrocknet und zur ESI-MS/MS-Analyse (2.9.9) eingesetzt.

Ergebnisse

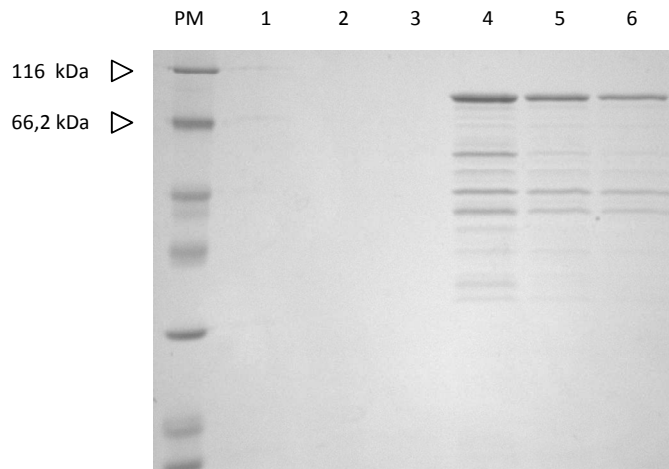


Abbildung 14: Expression der CtSAO in *K. lactis*. PM: Proteinmarker (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas). Spur 1-6: Expression unterschiedlicher Kolonien, wobei nur die Kolonien 4, 5 und 6 eine deutliche Überexpression eines ca. 80 kDa großen Proteins zeigten. (10%iges SDS-Gel mit Coomassieblau gefärbt, 2.9.7).

Überraschenderweise wurde das Protein nicht als CtSAO identifiziert, sondern als ein Protein mit 39%iger Identität zum S-Layerprotein aus *Bacillus cereus*. Da es sich um ein bakterielles Protein zu handeln schien, wurde die Transformation mit neu hergestellten kompetenten Zellen wiederholt. Zudem wurden alle Medien zur Expression frisch angesetzt, um eine potentielle bakterielle Verunreinigung auszuschließen. Die erneute Sequenzierung ergab, dass wiederum das gleiche rekombinante Protein entstand.

Eine bakterielle Verunreinigung wurde ausgeschlossen, da in diesem Fall keine Überexpression eines einzelnen Proteins zu erwarten ist. Alle Kolonien wurden mit dem gleichen Induktionsmedium behandelt. Liegt eine bakterielle Verunreinigung vor, müsste diese bei allen 6 Kolonien im SDS-Gel (Abbildung 14) sichtbar sein. Es konnten jedoch nur bei 3 von 6 Kolonien Proteinbanden detektiert werden. Zudem entspricht die Aminosäuresequenz des rekombinanten Proteins nur zu 39% der des S-Layerproteins, daher wurde auf eine fehlerhafte Integration der Expressionskassette in das Genom von *K. lactis* geschlossen. Wieso trotzdem ein rekombinantes Protein der erwarteten Größe mit intaktem Leserahmen entstand, konnte auch von Herstellerseite (NEB) aus nicht erörtert werden und bleibt an dieser Stelle ungeklärt.

Die vermutlich fehlerhafte Integration fand in zwei unabhängigen Transformationsereignissen statt und war damit reproduzierbar. Deshalb wurde von weiteren Transformationsversuchen abgesehen. So gelang es nicht die CtSAO heterolog in *K. lactis*-Zellen zu exprimieren.

3.2 Identifizierung und Charakterisierung der Salicylalkohol-Oxidase aus *C. populi*

Wie die Larven von *C. tremulae* sind auch die Larven der nah verwandten Art *C. populi* in der Lage Salicin aus der Wirtspflanze zu sequestrieren und in Salicylaldehyd umzuwandeln. In einer früheren Arbeit wurde bereits die native SAO aus *C. populi* biochemisch teilcharakterisiert (Brückmann, 2002a), die im Folgenden als CpSAO bezeichnet wird. Aufbauend auf die Daten von Brückmann (2002a) schien es besonders interessant die genetische Information der CpSAO zu identifizieren, um diese mit der der SAO aus *C. tremulae* vergleichen zu können.



Abbildung 15: Bilder von *C. populi*. A: Adulte Tiere. B: Eigelege, deren Färbung zwischen beige und braun variiert. (A und B wurden mit einer Canon PowerShot SX 200 IS aufgenommen). C: Larve im 3. Larvenstadium (Mohagheghi, 2007).

Der Verwandtschaftsgrad von *C. tremulae* und *C. populi* lässt sich allein durch ihre Optik belegen. Der einzige Unterschied bei adulten Tieren ist ein schwarzer Punkt an den Enden der Flügeldecken von *C. populi*, der bei *C. tremulae* nicht zu finden ist. Die Larven lassen sich optisch nicht voneinander unterscheiden. Eine eindeutige Differenzierung der Arten ist über die Farbe der Eier möglich. Während die Eier von *C. tremulae* weiß sind (Abbildung 11 A), zeigen die Eier von *C. populi* eine Beige- bis Braunfärbung (Abbildung 15 B). Ein Vergleich der beiden über ein SDS-Gel aufgetrennten Wehrsekrete verdeutlicht ebenfalls die Ähnlichkeit der Proteinzusammensetzung (Abbildung 16). Bei beiden Arten dominiert die SAO-Proteinbande bei ca. 85 kDa. Aufgrund der Vergleichbarkeit wurde bei der Identifizierung und Charakterisierung der CpSAO so vorgegangen wie bei der Identifizierung und heterologen Expression der CtSAO.

Ergebnisse

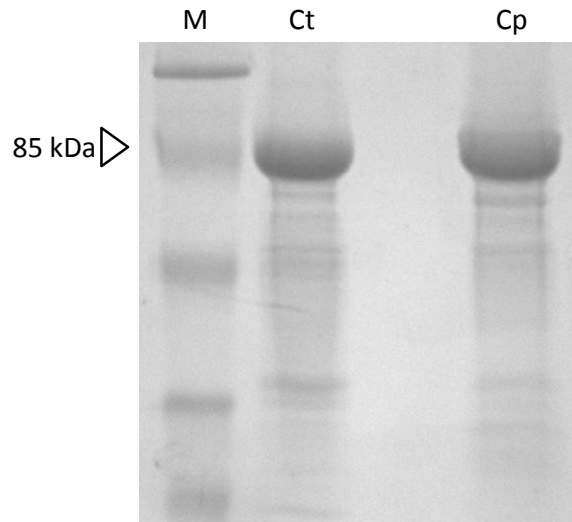


Abbildung 16: SDS-Gelbild der Wehrsekrete von *C. tremulae* und *C. populi*. M: Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas). Ct: Wehrsekret von *C. tremulae*. Cp: Wehrsekret von *C. populi*. Die Proteinauftrennung der beiden Wehrsekrete verdeutlicht die Ähnlichkeit der Proteinzusammensetzung beider Organismen. Die Hauptbande stellt jeweils die SAO mit ca. 85 kDa dar. Die schwache Bande unter der SAO konnte von Mohagheghi (2007) als Katalase identifiziert werden. (10%iges SDS-Gel angefärbt mit Coomassieblau, 2.9.7).

3.2.1 Identifizierung des cDNA-Transkriptes der SAO aus *C. populi*

Eine Teilsequenz des putativen cDNA-Transkriptes der SAO aus *C. populi* wurde bereits von Mohagheghi (2007) amplifiziert. Die Vervollständigung der Sequenz mit Hilfe der 5'-RACE wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Zusätzlich wurde die Sequenz exprimiert, um einen funktionellen Nachweis zu erbringen.

Zur Durchführung der 5'-RACE (2.8.4) wurde zunächst aus 4 Larven von *C. populi* die Gesamt-RNA isoliert (2.8.2). Die cDNA-Einzelstrangsynthese erfolgte nach Anlagerung des GSP1 (Tabelle 37) mit Hilfe der SuperskriptTM III Reverse Transkriptase bei 55°C.

Nach Poly-C-tailing und Reinigung des cDNA-Einzelstranges (2.8.4) wurden 2,0 µl des Tailing-Ansatzes als Template einer Standard-PCR (2.8.5.1) mit der Taq-DNA-Polymerase unter Verwendung der Primer GSP2 und AAP (Tabelle 37 und Tabelle 14) eingesetzt. Die verwendete Annealing-Temperatur lag bei 51,1°C.

Tabelle 37: Genspezifische Primer zur Durchführung der 5'-RACE des cDNA-Transkriptes von CpSAO.

Primer	Sequenz
GSP1	5'-GCTTCTTGAGACGCTTTCCA-3'
GSP2	5'-AGTTTAGATCTATAAGACGCATCACTAA-3'
GSP3	5'-GCCCATCGCTATTGTGATATCCATTAT-3'

Zur Erhöhung der Spezifität wurde der PCR-Ansatz nach Beendigung der PCR 1:100 verdünnt, wobei 2,5 µl dieser Verdünnung als Template in einer weiteren Standard-PCR verwendet wurden. Als Primer wurden GSP3 und AUAP (Tabelle 37 und Tabelle 14) eingesetzt, die *Annealing*-Temperatur lag bei 56,2°C.

Die Auswertung der PCR (2.8.7) zeigte, dass ein ca. 650 bp großes Amplifikat erhalten wurde. Dieses wurde gereinigt (2.8.8.2) und zu Sequenzierungszwecken in den pGEM®-T Easy-Vektor kloniert (2.8.9). Die Analyse mit der GCG-Software (2.8.25) ergab einen Sequenz-Überlapp mit der vorhandenen Sequenz von Mohagheghi (2007). Die resultierende *full-length*-Sequenz weist einen offenen Leserahmen (OLR) von 1872 bp auf. Da es sich bei der SAO um ein extrazelluläres Protein handelt, sollte am *N*-Terminus der 624 bp langen Aminosäuresequenz ein Signalpeptid zur Translokation vorhanden sein. Die Analyse mit SignalP3.0 (2.8.25) der vom cDNA-Transkript kodierten Aminosäuresequenz ergab, dass ein Signalpeptid von 21 Aminosäuren vorhanden ist (Abbildung 20, Kapitel 3.4.1). Das Ergebnis stimmt exakt mit den Analysen von Brückmann (2002a) überein, der bereits durch *N*-terminale Sequenzierung den *N*-Terminus der nativen SAO von *C. populi* ermittelt hat.

Des Weiteren wurden die von Mohagheghi (2007) durch ESI-MS/MS-Analyse ermittelten Peptide der nativen CpSAO mit der putativen Aminosäuresequenz verglichen (Tabelle 38). Drei der vier Peptide sind zu 100% identisch zur putativen Aminosäuresequenz der CpSAO. Eine Peptidsequenz stimmt zu 81,8% mit der putativen Aminosäuresequenz der CpSAO überein.

Tabelle 38: Auflistung der nach ESI-MS/MS erhaltenen Peptidsequenzen. In Klammern gesetzte Aminosäuren konnten nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Unterstrichene Aminosäuren stimmen nicht mit der rekombinant exprimierten CpSAO überein.

Peptide	Bemerkung
LDNELSGDISSILINLSS(R)ET	<i>N</i> -Terminus der CpSAO, 95,2%ige Übereinstimmung mit CpSAO
Q(I/L)GVSYVQTTTK	100%ige Übereinstimmung mit CpSAO
TAYGVEYLDNK	81,8%ige Übereinstimmung mit CpSAO
QLGLTVQSDLPVGK	100%ige Übereinstimmung mit CpSAO
GFLTSSNTVEALSULK	100%ige Übereinstimmung mit CpSAO

Aufgrund des vorhandenen Signalpeptids sowie der Identität von Peptiden mit der Aminosäuresequenz ist mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass es sich bei der amplifizierten Sequenz um das cDNA-Transkript der SAO aus *C. populi* handelt. Zur Überprüfung wurde die Sequenz in Expressionsvektoren kloniert und exprimiert. Die rekombinant erzeugte SAO wurde hinsichtlich ihrer Aktivität und Substratspezifität getestet (3.2.5 und 3.2.6). Erste Sequenzanalysen bestätigten, dass die CpSAO wie die CtSAO zur Familie der GMCs gehört, was in Kapitel 4.1.2 ausführlich diskutiert wird.

Die Auswertung der 5'RACE-Sequenzen erbrachte ein zweites putatives cDNA-Transkript der SAO, das nahezu identisch zum ersten cDNA-Transkript ist. Nach der 159. Nukleinsäure besitzt diese Sequenz ein zusätzliches Basentriplet, das für die Aminosäure Valin codiert. Demzufolge hat die Sequenz einen OLR von 1875 bp und das entsprechende Protein 625 Aminosäuren. Da ein Fehler der verwendeten *Taq*-DNA-Polymerase oder bei der Sequenzierung nicht ausgeschlossen werden konnte, war bei Sequenzanalyse der amplifizierten *full-length*-cDNA darauf zu achten, welches cDNA-Transkript tatsächlich erzeugt wurde. Zur besseren Unterscheidung der beiden Sequenzen wird die kurze Sequenz im Folgenden als cDNA-Transkript der CpSAO1 bezeichnet und dementsprechend die längere Sequenz als cDNA-Transkript der CpSAO2. Insofern keine spezifische Angabe über das cDNA-Transkript nötig ist, wird die SAO aus *C. populi* im Allgemeinen CpSAO genannt.

3.2.2 Klonierung der cDNA-Transkripte der CpSAO

Für die biochemische Analyse der rekombinanten SAO aus *C. populi* war es zunächst erforderlich die identifizierten cDNA-Transkripte der CpSAO1 und CpSAO2 (3.2.1) in einen geeigneten Expressionsvektor (2.3) zu klonieren, welcher anschließend in *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen exprimiert werden konnte.

Da sich die Wahl des Expressionsvektors auf die Löslichkeit des Proteins auswirken kann (Kaltenegger, 2009), wurden verschiedene Klonierungsstrategien verfolgt:

1. Klonierung in den Vektor pET-22b(+) mit pelB-Leader und C-terminalem *His-Tag*
2. Klonierung in den Vektor pET-22b(+) ohne pelB-Leader und C-terminalem *His-Tag*
3. Klonierung in den Vektor pET-28a(+) und N-terminalem *His-Tag*

Unter Verwendung des pET-22b(+)-Vektors mit pelB-Leader wird das Zielprotein mit dem sogenannten „pelB-Leader“ fusioniert, was bewirkt, dass das Zielprotein in den periplasmatischen Raum der *E. coli*-Zelle geschleust wird. Zhou *et al.* (2004) gelang es durch Fusionierung des pelB-Leaders aus dem pET-22b(+)-Vektor mit dem *odorant-binding*-Protein LUSH aus *Drosophila melanogaster* lösliches Protein zu exprimieren, wohingegen die Expression des pET-22b(+)-Vektor-Konstrukts ohne pelB-Leader in der Bildung *inclusion bodies* resultierte.

Für die Klonierung der cDNA-Transkripte der CpSAO im pET-22b(+)-Vektor mit pelB-Leader wurde eine Standard-PCR (2.8.5.1) unter Verwendung der Platinum® *Pfx* Polymerase mit EP3 und EP4 (Tabelle 39) durchgeführt.

Tabelle 39: Expressionsprimer für die Klonierung der cDNA-Transkripte der CpSAO im pET-22b(+)-Vektor mit pelB-Leader. Fettgedruckte Bereiche markieren die *BsaI*-Erkennungssequenz. Der einfach unterstrichene Bereich in EP3 stellt den zu *NcoI* kompatiblen Überhang dar, der doppelt unterstrichene Bereich in EP4 den zu *XhoI* kompatiblen Überhang.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
EP3	5'TATATAGGTCTCC <u>ATG</u> CTTGATAATGAGTTGCCGGAGATATATCG AGC-3'	51,0°C
EP4	5'TATATAGGTCTC <u>CTCG</u> AGCATTCCATAATCTTTTTAATGATGTCTGA TGCTCTCTC-3'	

EP3 und EP4 enthalten beide eine Erkennungssequenz der *BsaI*-Restriktionsendonuklease. Unter Verwendung dieses Enzyms lassen sich kompatible Enden zu jeder beliebigen Restriktionsendonuklease schaffen, die nach Hydrolyse klebrige Enden mit einem Überhang von 4 bp erzeugen, wie z.B. bei *XhoI* und *NcoI* (Tabelle 39). Da beide Erkennungssequenzen zur Linearisierung des Vektors in den cDNA-Transkripten der CpSAO1 und CpSAO2 vorkommen, wurde die Alternative mit *BsaI* gewählt, die nach Hydrolyse die kompatiblen Enden für die Ligation mit dem Vektor erzeugt. Als Template wurde 1 µl cDNA (2.8.3) aus *C. populi* verwendet. Das resultierende ca. 1800 bp große Fragment wurde aufgereinigt (2.8.8.2) und mit *BsaI* hydrolysiert (2.8.10.1). Für die Ligation wurde der pET-22b(+)-Vektor mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *XhoI* hydrolysiert, wodurch die Sequenz für den pelB-Leader erhalten bleibt. Nach Ligation (2.8.10.2) und Transformation (2.8.11) wurden einzelne Kolonien mittels MP (2.8.13.1) und anschließender Restriktionskontrolle mit *NcoI* (2.8.12.2) auf Vorhandensein des Plasmids mit korrekter Integration des Inserts analysiert. Die zusätzliche Sequenzierung (2.8.24) ergab, dass es sich bei der amplifizierten Sequenz um das cDNA-Transkript der CpSAO2 handelt, die erfolgreich in den pET-22b(+)-Vektor mit pelB-Leader kloniert werden konnte. Im Folgenden wird dieses Konstrukt pCpSAO2 genannt.

Da diese Versuchsdurchführung die Amplifizierung des cDNA-Transkriptes der CpSAO2 erbrachte, wurde der gleiche Versuchsansatz unter Verwendung der AccuTaq™ LA DNA-Polymerase wiederholt, um möglicherweise das cDNA-Transkript der CpSAO1 zu amplifizieren. Die Durchführung erfolgte auf identische Weise wie die oben aufgeführte Klonierung des cDNA-Transkriptes der CpSAO2 in pET-22b(+) mit pelB-Leader. Die Sequenzierung ergab, dass mit Hilfe der AccuTaq™ LA DNA-Polymerase das cDNA-Transkript der CpSAO1 amplifiziert und erfolgreich in pET-22b(+) mit pelB-Leader kloniert werden konnte. Das Konstrukt wird im Folgenden pCpSAO1 genannt.

Die wiederholte Amplifizierung der unterschiedlichen Sequenzen in verschiedenen PCR-Reaktionen wies darauf hin, dass beide Sequenzen existieren und ein Fehler der verwendeten Polymerasen bzw. der Sequenzierung ausgeschlossen werden kann.

Ergebnisse

Da die cDNA-Transkripte der CpSAO erfolgreich in den pET-22b(+)-Vektor mit pelB-Leader kloniert wurden, konnten die Konstrukte pCpSAO2 und pCpSAO1 als Template für PCRs weiterer Klonierungsstrategien verwendet werden. Die Klonierung der cDNA-Transkripte in den pET-22b(+)-Vektor ohne pelB-Leader und in den pET-28a(+)-Vektor wurde auf gleiche Weise durchgeführt wie die Klonierung in den pET-22b(+)-Vektor mit pelB-Leader. Die Durchführung der Standard-PCRs erfolgte jedoch mit unterschiedlichen Expressionsprimern und unter Verwendung verschiedener Polymerasen. Die verwendeten Polymerasen, die Sequenzen der Expressionsprimer sowie die benötigten Restriktionsendonukleasen sind für alle entstandenen Konstrukte in Tabelle 40 und Tabelle 41 zusammengefasst.

Tabelle 40: Auflistung aller durch Klonierung entstandenen Konstrukte. ✂: Symbol für die verwendeten Restriktionsendonukleasen. pET-22b(+)*: Verwendung des pET-22b(+)-Vektors mit pelB-Leader. Die Position des *His-Tags* ist mit *C* (C-terminal) und *N* (N-terminal) gekennzeichnet.

Konstrukt	Insert-cDNA	Polymerase	Primer/✂	Annealing-Temperatur	Vektor/✂	His-Tag
pCpSAO1	CpSAO1	AccuTaq™ LA DNA	EP3 <i>Bsal</i> EP4 <i>Bsal</i>	51,0°C	pET-22b(+)* <i>NcoI/XhoI</i>	<i>C</i>
pCpSAO2	CpSAO2	Platinum® <i>Pfx</i>	EP3 <i>Bsal</i> EP4 <i>Bsal</i>	51,0°C	pET-22b(+)* <i>NcoI/XhoI</i>	<i>C</i>
pCpSAO3	CpSAO2	AccuTaq™ LA DNA	EP5 <i>VspI</i> EP4 <i>Bsal</i>	52,1°C	pET-22b(+) <i>NdeI/XhoI</i>	<i>C</i>
pCpSAO4	CpSAO1	<i>Pfu</i> DNA	EP5 <i>VspI</i> EP4 <i>Bsal</i>	52,1°C	pET-22b(+) <i>NdeI/XhoI</i>	<i>C</i>
pCpSAO5	CpSAO2	AccuTaq™ LA DNA	EP5 <i>VspI</i> EP6 <i>Sall</i>	51,0°C	pET-28a(+) <i>NdeI/Sall</i>	<i>N</i>

Tabelle 41: Expressionsprimer für die Klonierung der cDNA-Transkripte der CpSAO. Der fettgedruckte Bereich markiert in EP5 die *VspI*-Erkennungssequenz und in EP6 die *Sall*-Erkennungssequenz. Das zu *NdeI* kompatible Ende ist in EP5 einfach unterstrichen. Das Stoppkodon in EP6 ist doppelt unterstrichen dargestellt.

Primer	Sequenz
EP5	5'-TATATA AATTAAT GCTTGATAATGAGTTGTCGGAGATATATCGAGC-3'
EP6	5'-TATATAG TCGACT <u>CACATTCCATAATCTTTTTAATGATGTCTGATGCTCTCTCTC</u> -3'

Alle entstandenen Plasmide wurden kontrollsequenziert (2.8.24). Die Auswertung ergab, dass alle Konstrukte erfolgreich kloniert wurden und der Expression in *E. coli*-Zellen unterworfen werden konnten.

3.2.3 Expression der CpSAO in *E. coli*-Zellen

Alle in Kapitel 3.2.2 entstandenen Konstrukte wurden in kompetente *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen transformiert (2.8.11) und anschließend 16 Stunden bei 15°C exprimiert (2.8.14). Die Überprüfung des Expressionserfolges der Konstrukte pCpSAO3, pCpSAO4 und pCpSAO5 mit Hilfe der SDS-PAGE (2.9.5) verdeutlichte, dass in allen Fällen ein ca. 67 kDa großes Protein exprimiert wurde. Wie bei der Expression der CtSAO (3.1.2) resultierte die Expression der CpSAO in Form von unlöslichen *inclusion bodies*. Die Auswertung der SDS-PAGE-Gele der Expression von Konstrukt pCpSAO2 und pCpSAO1 jeweils mit pelB-Leader zeigte, dass kein Protein überexprimiert wurde. Eine ähnliche Beobachtung machten Cho *et al.* (2000) bei der Expression einer thermophilen Lipase aus *Bacillus thermo-leovorans*. Die Expressionsrate war unter Verwendung des pelB-Leaders aus dem pET-22b(+)-Vektor deutlich geringer als ohne pelB-Leader.

Der Einsatz von Chaperonen als Faltungshelfer zeigte bei der Expression der CtSAO großen Erfolg. Daher wurde diese Methode auch bei der Expression von CpSAO angewandt und wird im folgenden Kapitel beschrieben.

3.2.4 Coexpression der CpSAO mit Chaperonen in *E. coli*-Zellen

Aufgrund des erfolgreichen Einsatzes der Coexpression der CtSAO mit Chaperonen (3.1.4) wurde die Expression der CpSAO ebenfalls in Gegenwart von Chaperonen durchgeführt. Dazu wurden die Konstrukte pCpSAO3 und pCpSAO4 in kompetente *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen transformiert (2.8.11), die bereits den Vektor pRep4-groESL (2.3) trugen. Die Konstrukte pCpSAO2 und pCpSAO1 wurden aus dieser Versuchsreihe ausgeschlossen, da sie bei Expression in *E. coli*-Zellen keine Expression der CpSAO hervorriefen (3.2.3). Das Konstrukt pCpSAO5 kam ebenfalls nicht für die Coexpression in Frage, da es wie das für die Chaperone codierende Plasmid eine Kanamycinresistenz vermittelt und damit Kolonien, die beide Plasmide tragen, nicht zweifelsfrei über die Antibiotikaselektion identifiziert werden können.

Die SDS-PAGE-Analyse (2.9.5) nach 16 stündiger Expression bei 15°C und anschließender Reinigung mit Ni-NTA (2.9.1.1) belegte, dass ein 67 kDa Protein in löslicher Form exprimiert werden konnte. Wie auch bei der Expression der CtSAO (3.1.4) war in der Fraktion der löslichen Proteine neben der putativen CpSAO eine deutliche Bande des Chaperons GroEL zu erkennen. Da Modifikationen des Reinigungsprozesses der CtSAO (3.1.4) keine Verbesserung hinsichtlich der Reinheit des Proteins brachten, wurden keinerlei Änderungen des Reinigungsprotokolls der CpSAO vorgenommen.

In Kapitel 3.1.4 wurde bereits beschrieben, dass von dem unmodifizierten pET-22b(+)-Vektor und von pRep4-groESL keine Expression eines 67 kDa großen Proteins ausgeht. So konnte auch bei der Coexpression der CpSAO davon ausgegangen werden, dass das entstandene 67 kDa große Protein

auf Translation des cDNA-Transkriptes der CpSAO1 bzw. CpSAO2 beruhte. Für einen eindeutigen Beweis dieser Hypothese musste das entstandene Enzym biochemisch charakterisiert werden. Dazu wurde, wie bereits zuvor für die CtSAO, ein Aktivitätstest mit anschließender Bestimmung des K_M -Wertes und der Substratspezifität durchgeführt.

Die Ergebnisse der Identifizierung und Expression des cDNA-Transkriptes der CpSAO werden in Kapitel 4.1 diskutiert.

3.2.5 Aktivitätsmessung der CpSAO

Dass es sich bei dem in Kapitel 3.2.4 exprimierten 67 kDa großen Protein um die gesuchte CpSAO handelt, konnte nur anhand der Durchführung eines spezifischen Enzymassays (2.9.10) belegt werden. Dazu erfolgte zunächst die Coexpression der cDNA-Transkripte der CpSAO1 und CpSAO2 mit pRep4-groESL in 1000 ml LB-Kultur bei 15°C für 16 Stunden (2.8.15). Die nach Affinitätsreinigung (2.9.1) gewonnenen Proteine der Elutionsfraktion wurden in Assaypuffer umgepuffert (2.9.2) und ohne weitere Aufkonzentration für die Konzentrationsmessung (2.9.3) und das Enzymassay (2.9.10) eingesetzt. Während für CpSAO1 keine Aktivität nachgewiesen werden konnte, zeigte sich CpSAO2 aktiv. Der Einsatz unterschiedlicher Substratkonzentrationen sowie unterschiedliche Inkubationszeiten führte zu einer Kinetik der CpSAO2, deren Werte in Tabelle 42 zusammengefasst sind. Auch hier konnte für die Aktivität der CpSAO2 analog der CtSAO (3.1.5) nur die Aktivität pro Miligramm Gesamtprotein angegeben werden.

Tabelle 42: Aktivität der CpSAO2 bei unterschiedlicher Substratkonzentration

<i>Substratkonzentration [mM]</i>	<i>Aktivität [nkat/mg Gesamtprotein]</i>
10	17,0
30	32,0
75	56,8
150	55,0
250	30,9

Anhand der ermittelten Werte für die spezifische Aktivität der CpSAO2 konnte der K_M -Wert nach Lineweaver-Burk (Lineweaver and Burk, 1934) und Hanes (Hanes, 1932) wie in Kapitel 3.1.5 ermittelt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 43 dargestellt.

Tabelle 43: K_M -Werte der CpSAO2 und nach Lineweaver-Burk und Hanes

	<i>Lineweaver-Burk</i>	<i>Hanes</i>
K_M	29,8 mM	27,0 mM

Die für die Enzymkinetik der CpSAO2 charakteristischen Werte entsprechen in ihrer Größenordnung denen der CtSAO (3.1.5). Bei CpSAO2 wird bei einer Substratkonzentration von 29,8 mM (Lineweaver-Burk), bzw. bei 27,0 mM (Hanes) die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht. Auch hier ist die Umsatzgeschwindigkeit ab einer Substratkonzentration von 75 mM konstant und bei hohen Substratkonzentrationen von 250 mM ist eine deutliche Substrathemmung erkennbar. Auffällig ist, dass für CpSAO1, die nur eine Aminosäure weniger aufweist als CpSAO2, keine Aktivität nachgewiesen werden konnte. Diese Tatsache wird in Kapitel 4.1.5 diskutiert.

3.2.6 Bestimmung der Substratspezifität der CpSAO

Für die weitere Charakterisierung der CpSAO sowie deren Vergleich mit der SAO aus *C. tremulae* wurde für die CpSAO ebenfalls die Substratspezifität getestet. Die Durchführung erfolgte analog zur Bestimmung der Substratspezifität der CtSAO (3.1.6). Die erhaltenen Werte für die relative Aktivität der CpSAO sind in Tabelle 44 zusammengefasst.

Tabelle 44: Relative Aktivität der CpSAO verschiedener Substrate in Prozent [%]. Substrate bei denen keine Umsetzung stattfand sind mit n.d. (nicht detektierbar) gekennzeichnet.

<i>Substrat</i>	<i>Relative Aktivität der CpSAO [%]</i>
2-Hydroxybenzylalkohol (Salicylalkohol)	100
3-Hydroxybenzylalkohol	13,1
4-Hydroxybenzylalkohol	0,9
Benzylalkohol	12,2
2-Methylbenzylalkohol	19,1
3-Methylbenzylalkohol	n.d.
4-Methylbenzylalkohol	0,4
2-Methoxybenzylalkohol	3,2
3-Methoxybenzylalkohol	2,5
4-Methoxybenzylalkohol	n.d.
2-Phenylethylalkohol	3,8

Die Werte der relativen Aktivität der CpSAO zeigen, dass das Enzym wie die CtSAO eindeutig Salicylalkohol als Substrat bevorzugt. Auch hier findet eine schwache Umsetzung von Benzylalkohol und *ortho*-substituierter Derivate statt. *Meta*- und *para*-substituierte Derivate werden ebenfalls kaum als Substrat akzeptiert.

Die Durchführung des optischen GOD-Tests (2.9.12) zeigte, dass die CpSAO wie die CtSAO nicht in der Lage ist Glucose in Gluconolacton zu oxidieren.

Ein Vergleich der Substratspezifitäten der CtSAO, CpSAO2, der nativen CpSAO sowie anderer Oxidasen wird in Kapitel 4.1 vorgenommen.

3.3 Identifizierung einer weiteren GMC-Sequenz aus *C. populi*

Wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben wird gehören die CtSAO und CpSAO zur Familie der Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktasen (GMCs). Aus den Daten durchgeführter Genomprojekte ist bekannt, dass jeweils mehrere GMC-Sequenzen in den dort untersuchten Insektengenomen vorkommen (Iida et al., 2007). Daher lag es nahe nach weiteren GMC-Sequenzen in den *Chrysomela*-Arten zu suchen. Da *C. populi* auf dem Campusgelände der CAU Kiel beheimatet ist, boten sich die Larven dieser Art für weitere Analysen an. Zunächst wurde die Gesamt-RNA isoliert (2.8.2) und mit Hilfe des Oligo(dT)₁₇-Primers und der Reversen Transkriptase Superskript™ III in cDNA umgeschrieben (2.8.3). 1 µl der erhaltenen cDNA wurde als Template einer Standard-PCR (2.8.5.1) eingesetzt, die mit der AccuTaq™ LA DNA-Polymerase (Tabelle 17) durchgeführt wurde. Der für die PCR benötigte *forward*-Primer wurde aus der Arbeit von Mohagheghi (2007) übernommen, der dort als P13 beziffert wurde (Tabelle 45). Es handelt sich um einen degenerierten Primer, der anhand homologer Bereiche eines Alignments aus GMC-Sequenzen unterschiedlicher Organismen entworfen wurde. Die verwendeten GMC-Sequenzen stammten aus den Insekten *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera* und der Hefe *Candida elegans*. Als *reverse*-Primer wurde Oligo(dT)₁₇ (Tabelle 13) verwendet.

Tabelle 45: *forward*-Primer zur Amplifizierung eines weiteren GMC-homologen cDNA-Transkriptes.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
P13	5'-AA(CT) TAC ATG (AC)T(GCT) TAC (AG)II (AC)G(AGC) GG-3'	51,2°C

Die Auswertung zeigte, dass 3 Amplifikate erzeugt werden konnten. Die Bandengrößen betragen ca. 2100 bp, 1600 bp und 1500 bp. Da alle Banden nur eine geringe Intensität zeigten, wurden sie einzeln aus dem Agarosegel gereinigt (2.8.8.2) und erneut als Template in einer Standard-PCR eingesetzt, die unter exakt gleichen Bedingungen wie oben aufgezeigt durchgeführt wurde. Die angereicherten Amplifikate wurden erneut gereinigt (2.8.8.2) und wiesen nun eine ausreichend hohe DNA-Konzentration zur Klonierung in pGEM®-T Easy auf (2.8.9). Die Sequenzierung (2.8.24) der Plasmide positiver Kolonien zeigte, dass die Amplifikate mit 2100 bp und 1500 bp keine OLRs aufwiesen und

auch keine Teilbereiche eine Homologie zu bekannten GMC-Sequenzen zeigten. Dies weist darauf hin, dass sich die Primer unspezifisch angelagert haben. Die Sequenzierung des 1600 bp großen Amplifikats brachte jedoch eine Sequenz hervor, die nach BLAST (2.8.25) eine Homologie zu anderen GMC-Sequenzen aufwies und zu 69% identisch war mit dem cDNA-Transkript der CpSAO2. Für weitere Analysen musste die Teilsequenz zunächst mit Hilfe der 5'RACE Technik (2.8.4) vervollständigt werden. Dazu wurde erneut die Gesamt-RNA aus Larven gewonnen. Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe der Superskript™ III Reversen Transkriptase nach Anlagerung des GSP7 (Tabelle 46).

Tabelle 46: Primer zur Vervollständigung der GMC-Sequenz aus *C. populi* mit Hilfe der 5'RACE-Technik.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
GSP7	5'-CCGTTGTAGTCGACGGC-3'	55,0°C
GSP8	5'-GCAGGTTTCAGCTGGTGAG-3'	54,0°C
GSP9	5'-CTCGAGGATTGTCGGCCC-3'	57,0°C

In einer Standard-PCR wurden 2,5 µl der erhaltenen cDNA als Template sowie die Primer GSP8 und AAP (Tabelle 46 und Tabelle 14) eingesetzt. Zur Spezifizierung und Konzentrierung des PCR-Produktes wurden 2,5 µl des PCR-Ansatzes unverdünnt in einer weiteren Standard-PCR eingesetzt, die das Primerpaar GSP9 und AUAP (Tabelle 14 und Tabelle 46) beinhaltet. Beide PCRs wurden mit Hilfe der *Taq*-DNA-Polymerase (2.8.5.1) durchgeführt. Das ca. 900 bp große Fragment wurde gereinigt (2.8.8.2) und in pGEM®-T Easy kloniert (2.8.9). Die Sequenzierung der Plasmide positiver Kolonien führte zu einer Sequenz, die einen 100%igen Überlapp mit dem 5'Ende der bekannten Teilsequenz zeigte. Die resultierende *full-length*-Sequenz besitzt einen OLR von 1869 bp. Die korrespondierende Aminosäuresequenz (CpGMC) zeigt im Vergleich zu den bereits bekannten SAOs kein Signalpeptid, weswegen es sich wahrscheinlich um ein intrazelluläres Enzym handelt. Der phylogenetische Vergleich des cDNA-Transkriptes der CpGMC mit anderen GMC-Sequenzen aus *T. castaneum* und den bekannten cDNA-Transkripten der SAOs zeigt, dass das cDNA-Transkript der CpGMC der Unterfamilie der κGMCs zugeordnet werden konnte (Abbildung 30). Dieses Ergebnis wird in Kapitel 4.1.5 ausführlich diskutiert.

Da bislang wenig über die Funktionen der GMCs beschrieben ist, ist ein erster Ansatzpunkt zur Aufklärung die gewebespezifische Lokalisation des cDNA-Transkriptes der CpGMC mit Hilfe der RT-PCR, die im folgenden Kapitel eingehend beschrieben wird.

3.3.1 Gewebespezifische Lokalisation der cDNA-Transkripte der CpSAO2 und CpGMC mit Hilfe von RT-PCR

Das Verfahren der gewebespezifischen RT-PCR kann Aufschluss über den Ort der Genexpression geben (2.8.5.2). Anhand dieser Methode sollte der Transkriptionsort des Gens der CpGMC identifiziert werden. Als Vergleich und Test auf Funktionalität der Durchführung wurde parallel der Expressionsort des cDNA-Transkriptes der CpSAO2 analysiert. Für die Isolierung der einzelnen Gewebe wurden die Larven wie in Abbildung 17 präpariert, die Wehrapparate, das Fettgewebe und der Darm entnommen sowie das Exoskelett entfernt. Neben der Isolierung der Gesamt-RNA aus den verschiedenen Geweben (2.8.2.1) wurde ebenfalls die Gesamt-RNA aus dem Gesamttier (2.8.2) isoliert.

Jeweils 1 µg der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der RevertAid™ Premium Reverse Transkriptase nach Anlagerung des Oligo(dT)₁₇-Primers (Tabelle 13) in cDNA umgeschrieben (2.8.3), von der je 1,0 µl als Template in einer Standard-PCR eingesetzt wurde, die mit der GoTaq® DNA-Polymerase erfolgte (2.8.5.1). Als Positivkontrollen (PK) wurden Plasmide eingesetzt, die das cDNA-Transkript der CpSAO2 (PK1) beziehungsweise das cDNA-Transkript der CpGMC (PK2) enthielten. Dementsprechend dient PK1 bei Durchführung der RT-PCR des cDNA-Transkriptes der CpGMC als Negativkontrolle und umgekehrt PK2 als Negativkontrolle des cDNA-Transkriptes der CpSAO2. Als zusätzliche Negativkontrolle (NK) wurde jeweils eine PCR angesetzt, die als Template Wasser enthielt. Die benötigten Primer wurden anhand eines Alignments der beiden cDNA-Transkripte erstellt. Dazu wurden Bereiche gewählt, die möglichst große Unterschiede zwischen beiden Sequenzen aufwiesen, um Primer mit hoher Spezifität für die jeweilige Sequenz zu erhalten. Bei positivem Nachweis des CpSAO2-Transkriptes sollte ein 487 bp großes Amplifikat entstehen bzw. ein 468 bp großes Amplifikat bei Nachweis des cDNA-Transkriptes der CpGMC.

Tabelle 47: Primer zur Durchführung gewebespezifischer RT-PCRs des cDNA-Transkriptes der CpSAO2 und CpGMC

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
P-SAO-f	5'-CCCTCGATATCCTAACAATGTAATAG-3'	55,0°C
P-SAO-r	5'-GACGCATCACTAACCGACAAAGG-3'	
P-GMC-f	5'-CTGAGATGCAGCAGTCTTCG-3'	55,0°C
P-GMC-r	5'-GCTGGAAGGGCTCCAGGTG-3'	

Ergebnisse

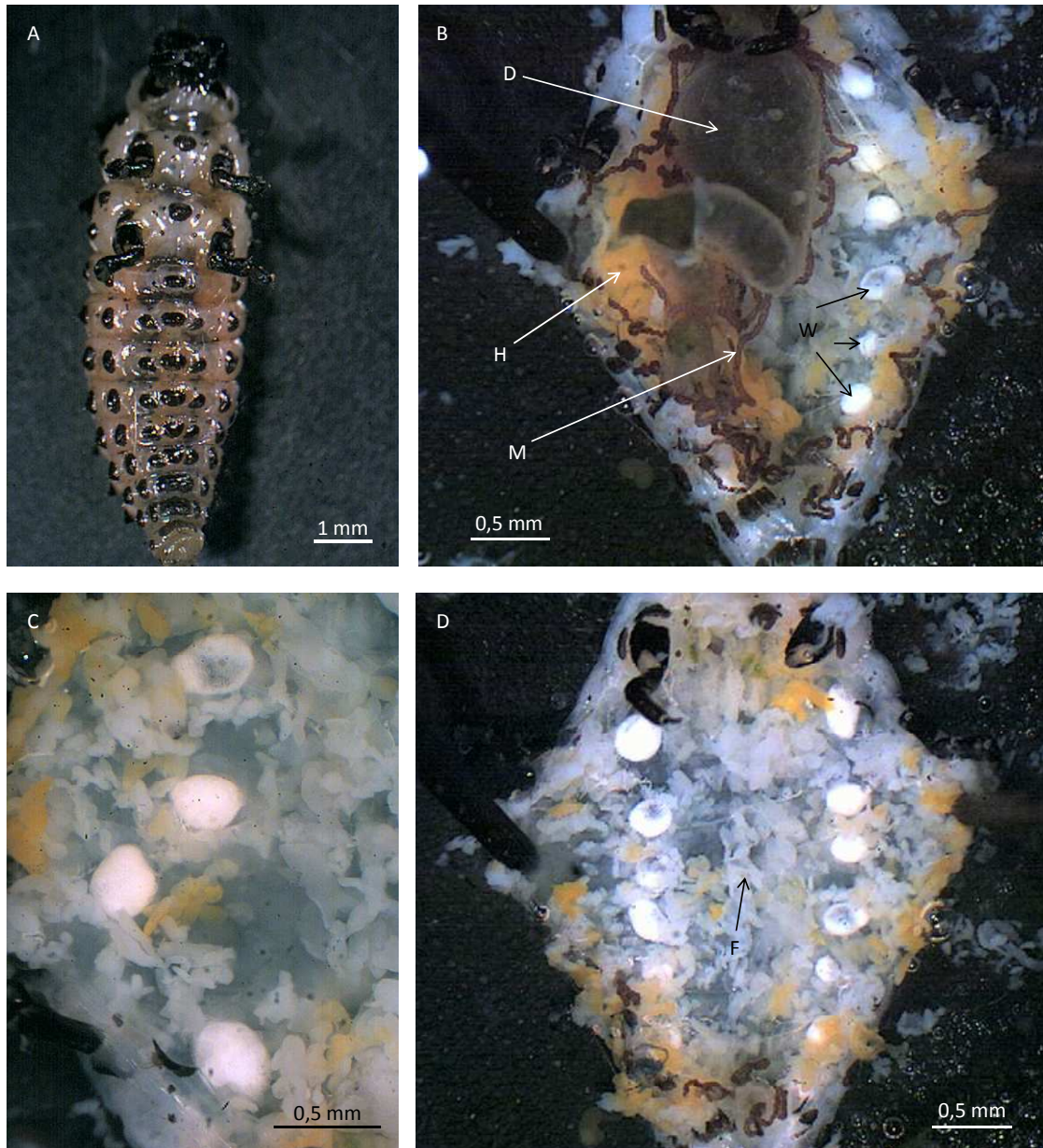


Abbildung 17: Bilder der Präparation einzelner Gewebe aus einer Larve. A: Die Larve wurde auf den Rücken in eine Petrischale gelegt, die mit isotoner Kochsalzlösung gefüllt war. B: Nach Aufschneiden der Larven auf der Bauchseite lassen sich bereits die einzelnen Gewebe deutlich erkennen. D: Darm. W: Wehrapparat. H: Hämolymphe. M: Malpighisches Gefäß. F: Fettgewebe C: Vergrößerung der Wehrapparate. D: Ausschnitt nach Entfernung des Darms.

Die Auswertung der RT-PCRs mittels Agarosegelelektrophorese (2.8.7) ist in Abbildung 18 dargestellt und belegt, dass das cDNA-Transkript der CpSAO2 wie zu erwarten im Wehrapparat (WA) exprimiert wird. Die Bande, die bei Durchführung der RT-PCR mit cDNA aus dem Exoskelett (E) detektiert wurde, lässt sich darauf zurückführen, dass dieses vermutlich nicht rückstandsfrei von den Wehrapparaten heraus präpariert werden konnte. Wie erwartet wird das cDNA-Transkript der

Ergebnisse

CpSAO2 nicht im Fett- und Darmgewebe exprimiert. Überraschend ist jedoch, dass die Bande, die durch Verwendung der cDNA aus dem Gesamttier (G), intensiver ist als die aus dem Wehrapparat. Denkbar ist, dass bei der Präparation der einzelnen Wehrapparate Drüsenzellen zerstört werden und während des Vorgangs bei Raumtemperatur RNasen die RNA degradieren. Bei Isolierung der Gesamt-RNA von ganzen Tieren (2.8.2) wird von Anfang an unter Bedingungen gearbeitet, die die RNase-Aktivität inhibieren. So ist es möglich, dass nach Vorlage von 1 µg Gesamt-RNA aus den Wehrapparaten weniger intakte RNA-Stränge vorliegen als in 1 µg Gesamt-RNA aus den ganzen Larven. Dies würde auch zu weniger Amplifikaten in der RT-PCR führen, wie es in diesem Versuch der Fall ist (Abbildung 18).

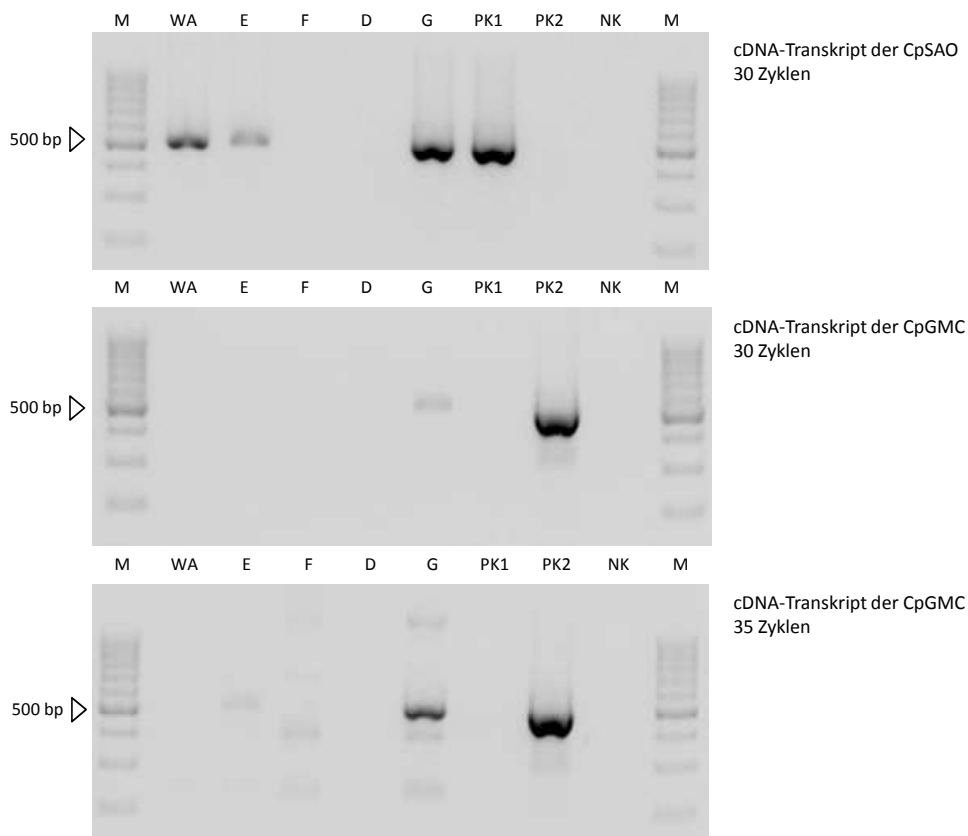


Abbildung 18: Agarosegel-Auftrennung der RT-PCR der cDNA-Transkripte von CpSAO2 und CpGMC. Oben: Auswertung der RT-PCR des cDNA-Transkriptes der CpSAO2 nach 30 Zyklen. **Mitte:** Auswertung der RT-PCR des cDNA-Transkriptes der CpGMC nach 30 Zyklen. **Unten:** Auswertung der RT-PCR des cDNA-Transkriptes der CpGMC nach 35 Zyklen. Aufgetragen wurden Aliquots der PCR-Reaktionen, die cDNA aus dem Wehrapparat (WA), aus dem Exoskelett (E), aus dem Fettgewebe (F), aus dem Darm (D) und dem Gesamttier (G) als Template enthielten. Zusätzlich wurden Positivkontrollen (PK) angefertigt, die aus einem Plasmid bestanden, das die jeweilige cDNA enthielt. PK1: cDNA der CpSAO2. PK2: cDNA der CpGMC. Bei der Negativkontrolle (NK) wurde die cDNA durch Wasser ersetzt. M: 100 bp DNA-Marker (Fermentas).

Für das cDNA-Transkript der CpGMC lässt sich anhand der hier durchgeführten RT-PCR nach 30 Zyklen kein genauer Expressionsort identifizieren. Neben dem zu erwartenden Signal der

Ergebnisse

Positivkontrolle (PK2) ist nur eine weitere schwache Bande im Ansatz mit cDNA des Gesamttiers zu erkennen. Die niedrige Intensität der Bande könnte darauf hinweisen, dass das Transkript der CpGMC allgemein schwach exprimiert ist, nur im hier verwendeten 2. Larvenstadium schwach exprimiert ist oder in hier nicht analysierten Geweben vorkommt. An dieser Stelle wurde die RT-PCR unter gleichen Bedingungen wiederholt, jedoch mit 35 anstatt 30 Zyklen. Die Auswertung der einzelnen RT-PCRs durch die Agarosegelelektrophorese ergab, dass nach erhöhter Zyklenzahl die Bande aus der cDNA des Gesamttiers wie erwartet intensiver ist. Neben dem cDNA-Transkript der CpGMC lassen sich nach 35 Zyklen weitere sehr schwache Banden detektieren, die im Wesentlichen auf unspezifische Anlagerung der Primer zurückzuführen sind. Eine sehr schwache Bande ist im Ansatz mit cDNA aus dem Exoskelett zu erkennen, was darauf hindeutet, dass das Transkript der CpGMC im Exoskelett vorkommen könnte.

Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob das Transkript der CpGMC in den verschiedenen Larvenstadien unterschiedlich stark exprimiert ist, wurde die RT-PCR mit Gesamt-cDNA aus den drei Larvenstadien wiederholt. Dazu wurde 1 µg Gesamt-RNA (2.8.2) aus unterschiedlich alten Larven mit Hilfe des Oligo(dT)₁₇-Primers und der RevertAid™ Premium Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Larven aus dem 1. Larvenstadium waren 4 Tage alt, die des 2. Larvenstadiums 7 Tage und die des 3. Larvenstadiums 10 Tage. Die gewonnene cDNA wurde erneut in Form einer RT-PCR (2.8.5.2) mit dem Primerpaar P-GMC-f und P-GMC-r (Tabelle 47) eingesetzt. Auf Positiv- und Negativkontrollen wurde an dieser Stelle verzichtet, da die Spezifität der Primer bereits in der vorangegangenen Durchführung der RT-PCR (Abbildung 18) bestätigt wurde.

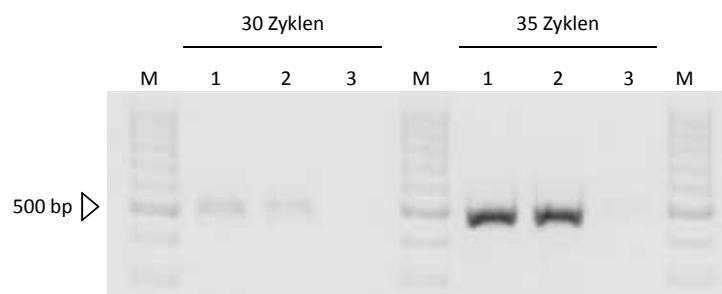


Abbildung 19: Agarosegel-Auftrennung der RT-PCR des cDNA-Transkriptes der CpGMC mit Template-cDNA verschiedener Larvenstadien. RT-PCRs nach 30 und 35 Zyklen mit Gesamt-cDNA der drei verschiedenen Larvenstadien (1, 2 und 3). M: 100 bp DNA-Marker (Fermentas).

Wie die Auswertung durch das Agarosegel-Bild (Abbildung 19) deutlich macht, ist das cDNA-Transkript der CpGMC in den verschiedenen Larvenstadien unterschiedlich stark exprimiert. Die RT-PCR nach 30 Zyklen zeigt, dass das cDNA-Transkript der CpGMC im 1. Larvenstadium am stärksten exprimiert ist. Im 2. Larvenstadium ist noch eine schwache Bande detektierbar, wohingegen das

cDNA-Transkript der CpGMC im 3. Larvenstadium nicht mehr exprimiert zu sein scheint. Da die Bande des cDNA-Transkriptes der CpGMC der ersten RT-PCR im Exoskelett erst nach 35 Zyklen zu erkennen war (Abbildung 18), wurde die zweite RT-PCR auch mit 35 Zyklen durchgeführt. Auch nach erhöhter Zyklenzahl war im 3. Larvenstadium keine Bande detektierbar, was darauf hinweist, dass die Sequenz in diesem Stadium tatsächlich nicht exprimiert zu sein scheint. Demzufolge ist das cDNA-Transkript der CpGMC im 1. Larvenstadium am stärksten exprimiert und die Expression nimmt mit dem Alter der Larve ab. Die Ergebnisse der Identifizierung und gewebespezifischen Lokalisation des cDNA-Transkriptes der CpGMC werden in Kapitel 4.1.5 diskutiert.

3.4 Identifizierung und Charakterisierung der SAO aus *P. vitellinae*

Neben *C. populi* und *C. tremulae* ist auch *P. vitellinae* in der Lage Salicylaldehyd zu produzieren (1.2.2). Nach Angaben von Termonia *et al.* (2001) hat sich im Laufe der Evolution die Fähigkeit pflanzliches Salicin in Salicylaldehyd umzuwandeln in *Chrysomela*-Arten und *P. vitellinae* unabhängig voneinander entwickelt. Daher schien die Identifizierung der SAO aus *P. vitellinae* (PvSAO) und der anschließende Vergleich mit den bereits bekannten SAOs besonders interessant.

3.4.1 Identifizierung des cDNA-Transkriptes der SAO aus *P. vitellinae*

Aus dem Wehrsekret von *P. vitellinae* konnten von Mohagheghi (2007) kurze Peptidsequenzen mittels ESI-MS/MS erhalten werden (Tabelle 48). Allein der Vergleich der kurzen Aminosäuresequenzen mit BLAST (2.8.25) ergibt bei allen Peptiden eine Zugehörigkeit zur Familie der GMCs. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde davon ausgegangen, dass es sich bei den kurzen Sequenzen um Teilstücke der gesuchten SAO handelt. Auf Grundlage eines geeigneten Peptidbereichs wurde ein degenerierter Primer (DP) entworfen, der in einer Standard-PCR zusammen mit dem Oligo(dT)₁₇-Primer den 3'-Bereich des cDNA-Transkriptes der SAO aus *P. vitellinae* amplifizieren sollte.

Tabelle 48: Peptidsequenzen aus dem Wehrsekret von *P. vitellinae*. Der Aminosäurebereich in **fettgedruckten** Buchstaben diente als Vorlage des degenerierten Primers DP1. Aminosäuren in Klammern konnten nicht zweifelsfrei identifiziert werden.

Peptide

LPVESDLPVGTTK

(EL)LDTTTTYQR

PESLAVTDD**GYHNEDG**PLSVSDV

YAYQVFLLLLHPK

Die Gesamt-RNA wurde aus Larven isoliert (2.8.2) und mit RevertAid™ Premium Reverse Transkriptase (Fermentas) in cDNA umgeschrieben (2.8.3). 1,0 µl der amplifizierten cDNA diente als

Template einer Standard-PCR, die mit der GoTaq® DNA-Polymerase (Tabelle 16) in 35 Zyklen durchgeführt wurde. Als Primer dienten dabei DP1 und Oligo(dT)₁₇ (Tabelle 49 und Tabelle 13).

Tabelle 49: Primer zur Amplifizierung des cDNA-Transkriptes der SAO aus *P. vitellinae*

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
DP1	5'-GA(GA)GG(GCTA)TA(TC)CA(TC)AA(TC)GA(GA)GA(TC)GG-3'	54,0°C

Das resultierende ca. 1300 bp großes Amplifikat wurde gereinigt (2.8.8.2), in pGEM®-T Easy kloniert (2.8.9) und anschließend sequenziert (2.8.24). Die Auswertung der Sequenzierung (2.8.25) ergab, dass es sich um eine 1333 bp große Teilsequenz einer GMC handelt, in der auch die 4 Peptidsequenzen aus Tabelle 48 wiedergefunden wurden. Die Zugehörigkeit der Teilsequenz zur Familie der GMCs sowie die Übereinstimmung der Peptide mit der korrespondierenden Aminosäuresequenz animierten zur Vervollständigung der Sequenz im 5'-Bereich.

Zur Durchführung der 5'RACE (2.8.4) wurde die Gesamt-RNA aus Larven mit Superscript™ III Reverse Transkriptase (Invitrogen) umgeschrieben. Als Primer zur Gewinnung der spezifischen cDNA wurde GSP4 eingesetzt (Tabelle 50).

Tabelle 50: Primer zur Durchführung der 5'RACE zur Vervollständigung des cDNA-Transkriptes der SAO aus *P. vitellinae*

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
GSP4	5'-GGATTTTAGTGGCTCTGCAAC-3'	55,0°C
GSP5	5'-GGTCTCAGATATGATTTCTCAGC-3'	54,0°C
GSP6	5'-GTTCTTCGACCGTTGTTTGTGACAG-3'	57,0°C

2,0 µl der gewonnenen cDNA wurde als Template einer Standard-PCR eingesetzt, die mit der AccuTaq™ LA DNA Polymerase (Tabelle 17), GSP5 und AAP (Tabelle 50 und Tabelle 14) durchgeführt wurde. Zur Spezifizierung des Amplifikats wurden 2,0 µl des unverdünnten PCR-Produktes in einer weiteren Standard-PCR eingesetzt, die ebenfalls mit der AccuTaq™ LA DNA-Polymerase durchgeführt wurde. Als Primer der zweiten PCR kamen GSP6 und AUAP (Tabelle 50 und Tabelle 14) zum Einsatz.

Nach Klonierung des ca. 900 bp großen Amplifikats in den pGEM®-T Easy-Vektor zeigte die Auswertung der Sequenzdaten, dass das 5'-Ende der bereits vorhandenen Teilsequenz vervollständigt werden konnte. Die Gesamtsequenz hat einen OLR von 1878 bp, der für die PvSAO mit 626 Aminosäuren kodiert. Da es sich bei der PvSAO um ein extrazelluläres Enzym handeln muss, das im Wehrreservoir aktiv ist, wurde die Sequenz daraufhin mit Hilfe von PSORT II und SignalP3.0

(2.8.25) überprüft. Die Auswertung ergab, dass ein Signalpeptid von 21 Aminosäuren vorhanden ist (Abbildung 20).

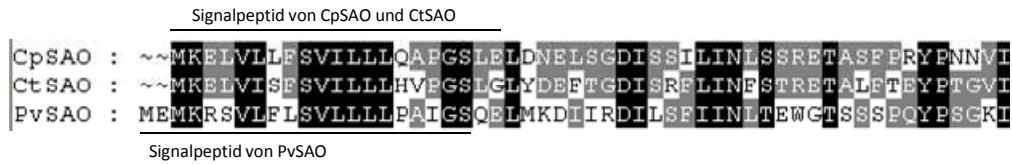


Abbildung 20: Ausschnitt eines Alignments der N-Termini der CpSAO, CtSAO und PvSAO. Die obere Linie markiert die 21 Aminosäuren der Signalpeptide von CpSAO und CtSAO. Die untere Linie kennzeichnet die 21 Aminosäuren des Signalpeptids von PvSAO.

Das Signalpeptid der PvSAO besitzt die gleiche Anzahl an Aminosäuren wie die Signalpeptide von CtSAO und CpSAO; dennoch macht das Alignment (Abbildung 20) deutlich, dass das Signalpeptid von PvSAO 2 Aminosäuren vorher (gen N-Terminus) endet, wodurch das eigentliche aktive Enzym 2 Aminosäuren am N-Terminus mehr aufweist als die der CtSAO und CpSAO. Ein Sequenzvergleich auf Nukleinsäure- und Aminosäurebasis ist in Tabelle 51 zusammengestellt.

Tabelle 51: Identitätsvergleich der Aminosäuren (AS) von CtSAO, CpSAO und PvSAO sowie der Identitätsvergleich der Nukleinsäuren (NS) von CtSAO, CpSAO und PvSAO.

AS	CtSAO	CpSAO	NS	CtSAO	CpSAO
CpSAO	91,9%	-	CpSAO	90,5%	-
PvSAO	81,9%	80,0%	PvSAO	76,0%	74,7%

Die Daten der Sequenzähnlichkeiten weisen darauf hin, dass es sich bei dem amplifizierten cDNA-Transkript mit hoher Wahrscheinlichkeit um die cDNA der SAO aus *P. vitellinae* handelt. Dennoch kann nur ein funktioneller Nachweis eines auf Grundlage des cDNA-Transkriptes der PvSAO erzeugten rekombinanten Proteins diese Hypothese bestätigen. Die Durchführung dieser Versuche wird in den folgenden Kapiteln beschrieben. Die Identifizierung des cDNA-Transkriptes der PvSAO wird in Kapitel 4.3 weitergehend diskutiert.

3.4.2 Klonierung des cDNA-Transkriptes der PvSAO in Expressionsvektoren

Nach Klonierung der cDNA-Transkripte der CtSAO und CpSAO in den pET22b(+)-Vektor und anschließender Coexpression mit pRep4-groESL in *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen konnten CtSAO und CpSAO in löslicher Form exprimiert und biochemisch charakterisiert werden. Aufgrund dieser Tatsache erschien es sinnvoll diese Versuche in gleicher Form mit dem cDNA-Transkript der PvSAO

durchzuführen. Die Auswertung der Nukleinsäuresequenz ergab jedoch, dass die Klonierung in den Vektor pET-22b(+) nur bedingt möglich war. Die Sequenz besitzt die Erkennungssequenzen der *NdeI*-Restriktionsendonukleasen sowie die Erkennungssequenzen aller zu *NdeI* kompatiblen Restriktionsendonukleasen. Da die Verwendung der *NdeI*-Restriktionsendonuklease bei dem pET-22b(+)-Vektor die einzige Möglichkeit darstellt den *pelB*-Leader auszuschließen, wurde nach einer alternativen Klonierungsstrategie gesucht, da sich die Anwesenheit des *pelB*-Leader bei der Expression der CtSAO als nachteilig erwiesen hat (3.1.3). Der pET-22b(+)*modMCS*-Vektor unterscheidet sich vom pET-22b(+)-Vektor lediglich in einigen Sequenzabschnitten der MCS. Er besitzt keinen *pelB*-Leader und anstelle der *NdeI*-Erkennungssequenz eine *NcoI*-Erkennungssequenz. So entsteht nach Klonierung der PvSAO ein komplementäres Konstrukt zu denen der cDNA-Transkripte der CtSAO und CpSAO.

Für die Klonierung wurde der pET-22b(+)*modMCS*-Vektor mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *XhoI* linearisiert (2.8.10.1). Das cDNA-Transkript der PvSAO wurde in einer Standard-PCR (2.8.5.1) mit Hilfe des High Fidelity PCR Enzyme Mix vervielfältigt. Der dazu eingesetzte *forward*-Expressionsprimer (EP9) enthielt neben dem Startkodon die Erkennungssequenz der Restriktionsendonukleasen *BsmBI*, die nach Hydrolyse einen zu *NcoI*-kompatiblen Überhang erzeugt. Der *reverse*-Expressionsprimer (EP10) wurde mit einer *XhoI*-Erkennungssequenz ausgestattet (Tabelle 52).

Tabelle 52: Expressionsprimer zur Klonierung des cDNA-Transkriptes der PvSAO in pET-22b(+)*modMCS*. Der fettgedruckte Bereich stellt in EP9 die *BsmBI*-Erkennungssequenz dar, in EP10 die *XhoI*-Erkennungssequenz. Das Startkodon in EP9 ist unterstrichen.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
EP9	5'-TATATAC CGTCTCCCATG <u>CAAGA</u> ACTGATGAAGGATATCATAAGAG-3'	62,0°C
EP10	5'-TATATA CTCGAG GGATTCAATCCAATCATTTTTGATTATATCTGAAGC-3'	

Das erhaltene Amplifikat wurde gereinigt (2.8.8.1) und in den bereits linearisierten Vektor pET-22b(+)*modMCS* kloniert (2.8.10). Die Sequenzierung der entstandenen Plasmide belegte zweifelsfrei, dass es gelungen war das cDNA-Transkript der PvSAO in den Vektor pET-22b(+)*modMCS* zu klonieren. Das Konstrukt wird im Folgenden pPvSAO1 genannt. Die Versuche zur Expression von pPvSAO1 werden in den nachstehenden Kapiteln erläutert.

3.4.3 Coexpression der PvSAO mit Chaperonen in *E. coli*-Zellen

Für die Coexpression der PvSAO wurde das Chaperon pRep4-groESL (2.3) gewählt, da es bei der Coexpression der CtSAO (3.1.4) und CpSAO (3.2.4) zum löslichen Zielprotein führte. Dazu wurde das

Konstrukt pPvSAO1 (3.4.2) in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (2.8.11), die bereits das Plasmid pRep4-groESL enthielten. Die Coexpression (2.8.15) wurde in 50 ml LB-Kultur bei 15°C für 16 Stunden durchgeführt. Der Reinigungsverlauf der PvSAO (2.9.1.1) wurde über die SDS-PAGE (2.9.5) kontrolliert. Die Auswertung des SDS-Gels verdeutlichte, dass ein ca. 67 kDa großes Protein exprimiert werden konnte, jedoch in Form von unlöslichen *inclusion bodies* (Abbildung 21).

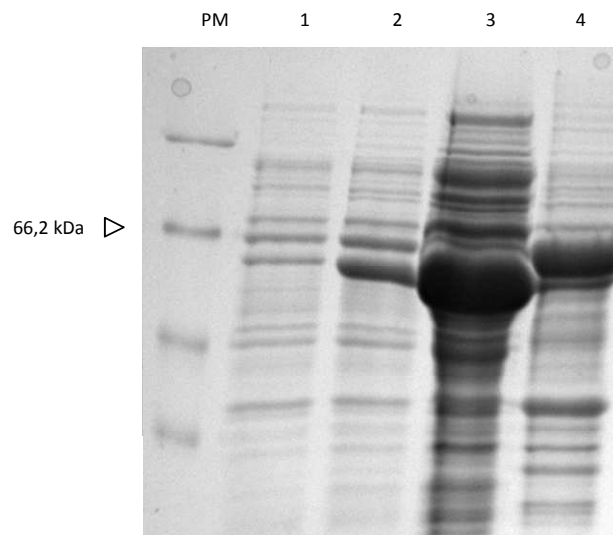


Abbildung 21: Coexpression der PvSAO mit pRep4-groESL. PM: Proteinmarker (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas). Spur 1: Zellkultur vor der Induktion. Spur 2: Zellkultur nach der Induktion. Spur 3: Fraktion der löslichen Proteine. Spur 4: Fraktion der unlöslichen Proteine. Anhand Spur 2 lässt sich deutlich die Überexpression der PvSAO und des Chaperons GroEL erkennen. Während das Chaperon GroESL in der Fraktion der löslichen Proteine (Spur 3) wiederzufinden ist, wurde PvSAO in Form von *inclusion bodies* exprimiert, die in der Fraktion der unlöslichen Proteine (Spur 4) sind.

So gelang es nicht die PvSAO auf gleiche Weise löslich zu exprimieren wie die CtSAO und CpSAO. Da in vorangegangenen Versuchen (3.1.3 und 3.2.3) festgestellt wurde, dass die Wahl des Expressionsplasmids oder durch die Änderung des *His-Tags* vom C-Terminus zum N-Terminus keinen positiven Einfluss auf die Löslichkeit anderer rekombinanter SAOs erreicht werden konnte, wurde an dieser Stelle von Umklonierungen abgesehen.

3.4.4 Sequenzmodifizierung des cDNA-Transkriptes der PvSAO mit anschließender Klonierung in pET-22b(+)-modMCS und Expression in *E. coli*-Zellen

Wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben ist, weist die PvSAO ein Signalpeptid von 21 Aminosäuren auf. Die Vorhersage beruht auf zwei voneinander unabhängigen Softwareprogrammen, die identische Angaben hinsichtlich des Signalpeptids machten. Dennoch unterscheidet sich die PvSAO von den

sonst ihr sehr ähnlichen CtSAO und CpSAO am *N*-Terminus um 2 Aminosäuren (Abbildung 20). Um eine mögliche computergestützte Falschaussage über den *N*-Terminus der Sequenz auszuschließen, wurde das cDNA-Transkript molekularbiologisch dahingehend modifiziert, dass die Sequenz am 5' Ende 6 Nukleinsäuren weniger aufweist. Die dazugehörige Aminosäuresequenz (PvSAO-mod) besitzt somit im Vergleich zu PvSAO 2 Aminosäuren weniger am *N*-Terminus. Um zu überprüfen, ob diese Veränderung Einfluss auf die Löslichkeit des heterolog exprimierten Proteins hat, wurde das cDNA-Transkript der PvSAO-mod ebenfalls wie folgt kloniert und exprimiert.

Dazu erfolgte die Amplifizierung des cDNA-Transkriptes der PvSAO-mod in einer Standard-PCR unter Verwendung des High Fidelity PCR Enzyme Mix (2.8.5.1). Der *forward*-Primer (EP11) wurde so entworfen, dass er ein Startkodon und eine *BsmBI*-Erkennungssequenz enthält (Tabelle 53). Nach Hydrolyse mit *BsmBI* entsteht ein zu *NcoI* kompatibler Überhang. Da der *C*-Terminus unverändert bleibt, konnte der *reverse*-Primer (EP10, Tabelle 52) aus der vorangegangenen Klonierungsstrategie übernommen werden (3.4.2).

Tabelle 53: Primer zur Amplifizierung des cDNA-Transkriptes der PvSAO-mod. Der **fettgedruckte Bereich** in EP11 stellt die *BsmBI*-Erkennungssequenz dar. Das Startkodon ist unterstrichen.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
EP11	5'-TATATAC CGTCTCCCATG CTGATGAAGGATATCATAAGAGATATAC-3'	62,0°C

Das ca. 1800 bp große Fragment wurde gereinigt (2.8.8.1) und mit den Restriktionsendonukleasen *BsmBI* und *XhoI* hydrolysiert, um dann in den mit *NcoI/XhoI*-linearisierten Vektor pET-22b(+)*modMCS* kloniert zu werden. Die Sequenzierung eines Plasmids ergab, dass das cDNA-Transkript der PvSAO-mod erfolgreich in pET-22b(+)*modMCS* inseriert werden konnte. Das Konstrukt wird im Folgenden pPvSAO2 genannt.

Für die anschließende Expression (2.8.15) wurde pPvSAO2 in kompetente *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen transformiert, die bereits das Plasmid pREP4-*groESL* enthielten. Die Coexpression fand analog zur Coexpression von pPvSAO1 statt (3.4.3). Ein Aliquot vor und nach Expression sowie von der Fraktion der löslichen Proteine und dem unlöslichen Rückstand wurde mittels SDS-PAGE (2.9.5) analysiert. Die Auswertung des Gel-Bildes zeigte, dass die PvSAO-mod überexprimiert wurde, allerdings wie die PvSAO komplett in Form von *inclusion bodies* im unlöslichen Rückstand zu finden ist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Verlängerung des Signalpeptids bzw. die Kürzung der Sequenz PvSAO um 2 Aminosäuren am *N*-Terminus keinen Einfluss auf die Löslichkeit des rekombinant exprimierten Proteins hat. Da es keine weiteren Hinweise darauf gab, dass eine Abweichung der Länge vom vorhergesagten Signalpeptid die Löslichkeit des rekombinanten Proteins verbessern würde, wurden

alle weiteren Versuche die PvSAO in löslicher Form zu exprimieren nur mit dem Konstrukt pPvSAO1 durchgeführt, dessen Insertsequenz am 5'-Ende gemäß der Vorhersage von PSORT II und SignalP3.0 (2.8.25) dem Enzym ohne Signalsequenz entspricht.

3.4.5 Renaturierung der PvSAO aus *inclusion bodies*

Im Vergleich zu CtSAO und CpSAO gelang es nicht die PvSAO mit Hilfe der Coexpression von Chaperonen in löslicher Form zu exprimieren (3.4.3). Daher wurde an dieser Stelle versucht die bei der Expression der PvSAO erhaltenen *inclusion bodies* zu renaturieren (2.8.16). Diese Vorgehensweise wurde bereits erfolgreich bei der Expression der Senecionin-*N*-Oxygenase aus *Tyria jacobaeae* angewandt (Naumann et al., 2002). Das Konstrukt pPvSAO1 (3.4.2) wurde dazu in kompetente *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen transformiert (2.8.11) und über Nacht bei 15°C zur Expression gebracht (2.8.14). Die Zellen wurden per Zentrifugation geerntet und wie unter Kapitel 2.9.1 beschrieben aufgeschlossen. Die *inclusion bodies*, die nach erneuter Zentrifugation das Pellet bildeten, wurden unter denaturierenden Bedingungen solubilisiert. Der in dieser Arbeit verwendete Solubilisierungspuffer bestand aus CAPS unter Verwendung von *N*-Laurylsarcosin als Detergenz. Zur Unterstützung der Ausbildung von Disulfidbrücken wurde dem Puffer ebenfalls DTT beigegeben. Zur Renaturierung der im Solubilisierungspuffer befindlichen PvSAO wurde die Lösung in eine Dialysekassette überführt und wie unter Kapitel 2.8.16 beschrieben in den jeweiligen Dialysepuffer getaucht. Nach erfolgter Dialyse wurde die Proteinlösung eingeeengt und in Assaypuffer umgepuffert. Die Durchführung des Enzymassays erfolgte wie in Kapitel 2.9.10 erläutert. Die gaschromatographische Auswertung zeigte, dass Salicylalkohol in diesem Enzymassay nicht zu Salicylaldehyd umgesetzt wurde, da kein Salicylaldehyd-Peak detektiert werden konnte.

Da die Larven von *P. vitellinae* ebenfalls in der Lage sind die autogene Wehrsekretsynthese zu verfolgen, wurde für die hier rekombinant erzeugte PvSAO auch 8-Hydroxygeraniol als Substrat verwendet. 8-Hydroxygeraniol wurde im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert (2.2.1). Der Syntheserfolg wurde mittels GC-MS-Analyse bestätigt, die von Dr. Till Beuerle am Institut für Pharmazeutische Biologie der TU-Braunschweig durchgeführt wurde. Da keine Quantifizierung erfolgte, wurden standardmässig 100 µl des Syntheseprodukts zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt, die unter Kapitel 2.9.10 beschrieben ist. Bei Aktivität der PvSAO mit 8-Hydroxygeraniol als Substrat wurde 8-Oxogeraniol als Produkt erwartet (Lorenz et al., 1993). Da dem Assayansatz keine Cyclase und Isomerase beigegeben wurde, war die weitere Reaktion zu Chrysolidial ausgeschlossen, wie sie in den Larven bei der autogenen Wehrsekretsynthese vorkommt. Die Auswertung des Chromatogramms zeigte, dass neben dem Substrat-Peak und dem Phenol-Peak, der als interner Standard diente, kein weiterer Peak identifizierbar war. Da weder Salicylalkohol noch 8-

Hydroxygeraniol von der renaturierten PvSAO umgesetzt wurde, war an dieser Stelle davon auszugehen, dass es nicht gelang die PvSAO durch Denaturierung und anschließender Renaturierung in die lösliche, aktive Form zu überführen. Die erfolgreiche Renaturierung hängt von einer Vielzahl an variablen Faktoren ab. In dieser Arbeit wurde *N*-Laurylsarcosin als Detergenz verwendet, welches möglicherweise denaturierend auf das Zielprotein PvSAO wirkt und damit dessen Aktivitätsverlust bewirkt. Um diese Vermutung zu überprüfen, müsste die Renaturierung wiederholt werden, wobei *N*-Laurylsarcosin mit Hilfe eines Anionenaustauschers aus der Lösung entfernt wird. Eine weitere Alternative wäre das Denaturierungsmittel gegen Harnstoff, Guanidinhydrochlorid oder Cetyltrimethylammoniumchlorid auszutauschen. Des Weiteren können der pH-Wert des Dialysepuffers und die Dialysezeiten in den einzelnen Puffersystemen variiert werden.

3.4.6 Zellfreie Expression der PvSAO

Alternativ zur Coexpression der PvSAO mit Chaperonen wurde versucht das Konstrukt pPvSAO1 (3.4.2) zellfrei zu exprimieren (2.8.17). Ein Vorteil der zellfreien Expression gegenüber der herkömmlichen Expression in intakten *E. coli*-Zellen ist, dass zeitraubende Schritte wie die Transformation, Kulturanzucht und Aufreinigung des rekombinanten Proteins entfallen. Ein weiterer Vorteil ist die Expressionsgeschwindigkeit des zellfreien Systems. Während hier die Proteinexpression innerhalb 1 Stunde stattfindet, werden bei der herkömmlichen Expression meist 16 Stunden benötigt. Nach Herstellerangaben ist es möglich bis zu 500 µg Protein pro 1 µl Ansatz zu gewinnen.

Die für die zellfreie Expression erforderliche Plasmid-DNA-Menge von 500 ng/µg wurde mit Hilfe der Midi-Präparation (2.8.13.3) gewonnen. Bei der Vektorwahl war darauf zu achten, dass dieser einen T7-Promotor besitzt, unter dessen Kontrolle die inserierte Zielsequenz steht. Der Vektor pET-22b(+)-modMCS erfüllt diese Bedingung, wodurch sich das Konstrukt pPvSAO1 zur zellfreien Expression mit dem S30 T7 High-Yield Expression System (Promega) eignete. Des Weiteren wurde von Firmenseite aus bereits eine Reihe von pET-Vektoren mit diesem System positiv getestet (S30 T7 High-Yield Expression System, Technical Manual, Promega).

5 µg von pPvSAO1 wurden nach Herstellerangaben über 1 Stunde zur Expression eingesetzt. Vor und nach der Inkubation wurde jeweils eine Probemenge von 5 µl entnommen, die der SDS-PAGE (2.9.5) unterzogen wurde. Die Auswertung ergab, dass keine eindeutige Überexpression eines 67 kDa großen Proteins stattfand (Abbildung 22).

Ergebnisse

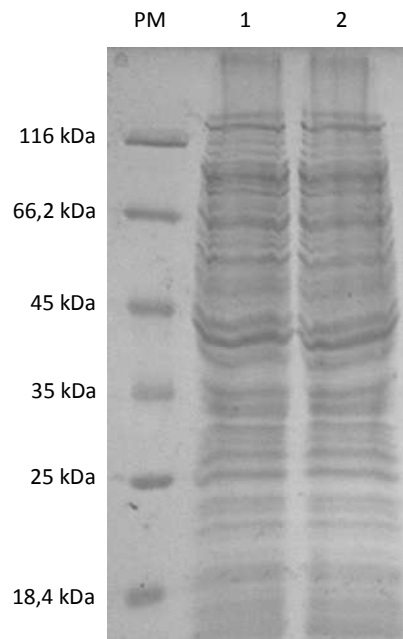


Abbildung 22: Zellfreie Expression der PvSAO. PM: Proteinmarker (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas). Spur 1: Ansatz vor Proteinexpression. Spur 2: Ansatz nach Proteinexpression. Die Auswertung der zellfreien Expression mittels SDS-PAGE zeigt, dass kein Protein überexprimiert wurde.

Da möglicherweise nur geringe Mengen der PvSAO exprimiert wurden, die mittels SDS-PAGE durch Überlagerung mit *E. coli*-Proteinen aus dem Expressionssystem nicht eindeutig zu erkennen waren, wurde mit dem Zellextrakt nach Expression ein Enzymassay durchgeführt. Dazu wurden 100 µl des zellfreien Expressionsansatzes wie unter Kapitel 2.9.10 beschrieben eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten, um eine möglichst hohe Menge des Produktes Salicylaldehyd zu erhalten. Die Auswertung des Chromatogramms der gaschromatografischen Analyse zeigte, dass kein Peak bei der zu erwartenden Retentionszeit von Salicylaldehyd entstand. So wurde ausgeschlossen, dass bei der zellfreien Expression die PvSAO rekombinant in nachweisbarer Menge erzeugt werden konnte.

3.5 Ansätze zur Identifizierung einer GMC-homologen Sequenz aus *P. cochleariae* und *G. viridula*

Die Larven von *P. cochleariae* und *G. viridula* sind typische Vertreter der Arten, die zur autogenen Wehrsekretsynthese befähigt sind (1.2.1). Sie können die geruchsgebende Komponente ihres Wehrsekrets aus körpereigenen Stoffwechselprodukten generieren und sind dabei nicht wie z.B. die Pappelblattkäfer-Larven von ihrer Wirtspflanze abhängig. Dennoch ist die Bildung des Wehrsekrets der autogenen und der wirtspflanzenabhängigen Strategie, abgesehen von den Substraten,

enzymatisch ähnlich. Zunächst wird eine Vorläufersubstanz in das Wehrreservoir geschleust. In diesem extrazellulären Raum findet jeweils die enzymatische Umwandlung der Vorläufersubstanz in die eigentlich aktive Komponente des Wehrsekretes statt. Interessanterweise benutzen beide Synthesewege die gleichen Enzymgruppen, beim ersten Schritt eine Glucosidase und beim zweiten eine Oxidase (Abbildung 7, Kapitel 1.4). Auf der Basis anderer Arbeiten (Brückmann, 2002a; Mohagheghi, 2007) konnte in dieser Arbeit bereits die Salicylalkohol-Oxidase (SAO) aus den Pappelblattkäfer-Larven *C. tremulae* und *C. populi* identifiziert und biochemisch charakterisiert werden. Die daraus gewonnene Erkenntnis, dass die SAO zur Enzymfamilie der GMCs gehört, die ein breites Substratspektrum aufweist, bekräftigt die Vermutung von Laurent (2003), dass die wirtspflanzenabhängige Wehrsekretsynthese aus der der Iridoiden Monoterpe durch Substratanpassung hervorgegangen sein könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte die an der Wehrsekretsynthese beteiligte Oxidase eines Vertreters der Iridoiden Monoterpe identifiziert und für den funktionellen Nachweis ebenfalls biochemisch charakterisiert werden. Anhand einer Phylogenie, der Oxidase-Sequenzen unterschiedlicher Synthesewege zugrunde liegen, sollte bewiesen werden, dass sich die wirtspflanzenabhängige Wehrsekretsynthese aus der der Iridoiden Monoterpe entwickelt hat.

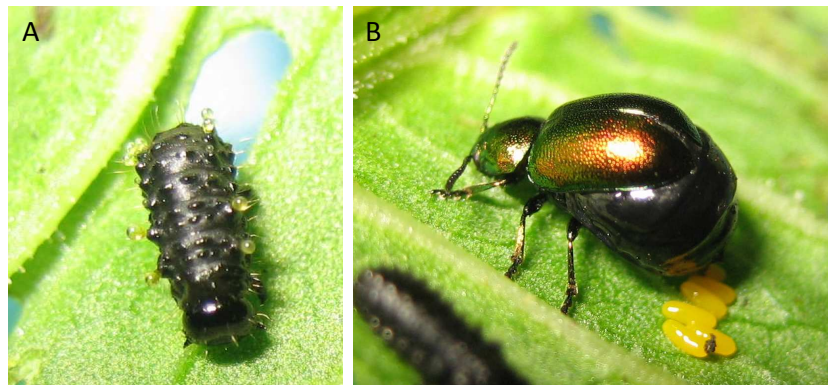


Abbildung 23: Larve und adultes Tier von *G. viridula* aufgenommen mit einer Canon PowerShot SX 200 IS. **A:** Larve mit teilweise evertiertem Wehrsekret. **B:** Weibchen bei der Eiablage.

Die Vorgehensweise zur Identifizierung der putativen GMCs aus den Larven von *P. cochleariae* und *G. viridula* erfolgte zunächst analog der der Pappelblattkäfer-Larven (3.1 und 3.2). Dazu wurde das Wehrsekret der Larven gesammelt und über die SDS-PAGE (2.9.5) getrennt. Das Sammeln des Wehrsekretes gelang nicht mit einer Kapillare, da die Wehrsekrettröpfchen kleiner sind als der Durchmesser einer handelsüblichen Kapillare. So wurde das Wehrsekret mit einem kleinen Stück Filterpapier aufgesaugt und anschließend mit 15 µl Puffer (Tabelle 24 ohne β -Mercaptoethanol und Imidazol) ausgespült. 10 µl des Puffers wurden für die SDS-PAGE eingesetzt.

Ergebnisse

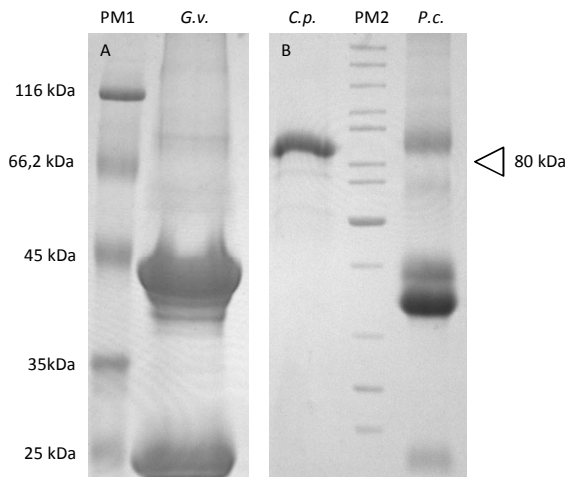


Abbildung 24: SDS-PAGE-Bild der Wehrsekrete von *G. viridula*, *C. populi* und *P. cochleariae*. A: Trennung der Proteine des Wehrsekrets von *G. viridula* (*G.v.*). PM1: Proteinmarker (Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas). B: Trennung der Proteine der Wehrsekrete von *C. populi* (*C.p.*) und *P. cochleariae* (*P.c.*). PM2: Proteinmarker (Page Ruler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas).

Wie Abbildung 24 zeigt, beinhaltet das Wehrsekret der Larven von *P. cochleariae* ein ca. 85 kDa großes Protein, das in etwa der Größe der SAO aus *C. populi* entspricht. Im Vergleich zu *C. populi* stellt dieses Protein allerdings nicht die Hauptbande dar. Ein ca. 45 kDa großes Protein stellt die intensivste Bande dar. Überraschenderweise war im Wehrsekret der Larven von *G. viridula* keine eindeutige Proteinbande zu erkennen, die der Größe der SAO aus *C. populi* entspricht. Neben zwei sehr intensiv gefärbten Proteinbanden (45 und 25 kDa) waren noch zwei kleinere Banden unterhalb der 45 kDa Bande zu erkennen.

Alle Proteinbanden aus dem Wehrsekret von *P. cochleariae* und *G. viridula* wurden ausgeschnitten und zur MS/MS-Sequenzierung ans HZI geschickt (2.9.9). Aus dem Wehrsekret von *P. cochleariae* konnte eine Fülle an Peptiden sequenziert werden, die bei Mohagheghi (2007) noch nicht vorlagen. Von *G. viridula* lagen bisher noch keine Peptidsequenzen vor. Wie im Folgenden beschrieben, wiesen zwei aller identifizierten Peptide aus *P. cochleariae* und kein Peptid aus *G. viridula* eine Homologie zu bekannten GMCs auf.

Mohagheghi (2007) konnte für keines der sequenzierten Peptide durch Eingabe in BLAST (2.8.25) eine eindeutige Homologie zu einer GMC oder einer anderen Oxidase feststellen. Eine im Rahmen dieser Arbeit erneute Untersuchung der Peptide von Mohagheghi (2007) zeigte jedoch, dass ein Peptid eine schwache Identität zu einer GMC-Sequenz aus *Synechococcus sp.* aufweist, die erst 2006 der Datenbank zugefügt wurde. Daher wurde auch auf Grundlage dieses Peptids ein degenerierter Primer entwickelt, der zusammen mit dem Oligo(dT)₁₇-Primer in einer Standard-PCR eingesetzt wurde. Die Template-cDNA wurde aus Gesamt-RNA (2.8.2) mit Superskript™ III Reverse

Ergebnisse

Transkriptase umgeschrieben (2.8.3). Die Durchführung der Standard-PCR erfolgte mit der AccuTaq™ LA DNA-Polymerase, der Taq-DNA-Polymerase und der GoTaq® DNA-Polymerase bei *Annealing*-Temperaturen zwischen 47,0 und 52,0°C und unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen. Keine der durchgeführten Standard-PCRs führte zu einem Amplifikat. Vermutlich war die Degeneriertheit des Primers so hoch, dass es lediglich zu unspezifischen Anlagerungen des Primers und damit zu keinen eindeutigen Amplifikaten in der Standard-PCR kam.

Eins der im Rahmen dieser Arbeit neu identifizierten Peptide aus *P. cochleariae* wies nach BLAST eine schwache Ähnlichkeit zu GMC-Sequenzen auf. Aus diesem Grund wurde ein degenerierter Primer entworfen, dem dieses Peptid zu Grunde lag. Der Primer wurde in Kombination mit dem Oligo(dT)₁₇-Primer in einer Standard-PCR (2.8.5.1) eingesetzt.

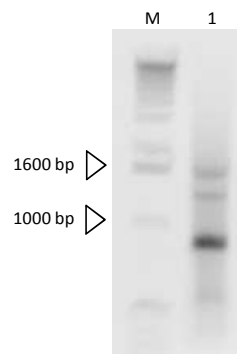


Abbildung 25: Agarosegel-Auftrennung der Standard-PCR. M: 1 kb DNA-Marker (Invitrogen). 1: Die Durchführung der Standard-PCR führte zu drei Amplifikaten, die ca. 1600 bp, 1400 bp und 900 bp groß waren.

Die Auswertung der Standard-PCR mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (2.8.7) ergab, dass drei Fragmente amplifiziert wurden (Abbildung 25). Die drei Amplifikate der ungefähren Größe von 1600 bp, 1400 bp und 900 bp wurden aus dem Agarosegel isoliert, aufgereinigt (2.8.8.2) und in pGEM®-T Easy kloniert (2.8.9). Die nach Transformation (2.8.11) erhaltenen weißen Kolonien wurden zur Plasmidisolierung der MP (2.8.13.1) unterzogen. Plasmide, die ein unterschiedliches Bandenmuster im Agarosegel nach Hydrolyse mit *EcoRI* zeigten, wurden zum Sequenzieren geschickt. Die Sequenzierung ergab, dass keine der drei amplifizierten Fragmente eine Homologie zur GMC-Familie oder einer anderen Oxidase aufwies. Vermutlich ist auch die Degeneriertheit dieses Primers zu hoch, so dass es wieder zu unspezifischen Anlagerungen kam.

Da mit Ausnahme der beiden Peptide aus *P. cochleariae* die meisten durch ESI-MS/MS-Sequenzierung erhaltenen Peptide keine Homologie zu GMC-Sequenzen zeigten, bzw. die Standard-PCR mit degeneriertem Primer auf Grundlage der Peptide mit einer schwachen Homologie zu

unterschiedlichen GMC-Sequenzen keinen Erfolg brachte, musste an dieser Stelle über alternative Vorgehensweisen zur Identifizierung einer GMC-Sequenz nachgedacht werden. Vorab sei angemerkt, dass keine der beiden unten angeführten Strategien zu einem Ergebnis führten, dennoch werden die Versuche der Vollständigkeit halber kurz aufgeführt.

1. Einsatz des degenerierten Primers, der zur Identifizierung des cDNA-Transkripts der PvSAO diente (DP1, Tabelle 49).
2. Erstellung eines Alignments verschiedener ι GMC-Sequenzen (4.1.2) mit Entwurf eines degenerierten Primers auf einen hoch konservierten Bereich (DP4, Tabelle 54).

Tabelle 54: Primer zur Identifizierung einer GMC aus Larven von *P. cochleariae* und *G. viridula*

Primer	Sequenz
DP4	5'-GCIATGGG(ATCG)AA(AT)CCIGG(ATCG)TGG -3'

Die Durchführung der Standard-PCRs der beiden alternativen Strategien zur Identifizierung einer GMC aus *P. cochleariae* und *G. viridula* ist in verkürzter Form in Tabelle 55 zusammengefasst. Konnte ein Amplifikat in der Standard-PCR erzielt werden, wurde dieses in pGEM[®]-T Easy kloniert (2.8.9) und anschließend in *E. coli*-TOP10-Zellen transformiert (2.8.11). Die Sequenzierung der isolierten Plasmide (2.8.13.1) ergab, dass es nicht gelang durch die beiden alternativen Strategien ein Amplifikat zu erhalten, das eine Homologie zu einer GMC-Sequenz oder einer anderen Oxidase aufweist. Die Diskussion dieser Ergebnisse wird in Kapitel 4.4 vorgenommen.

Tabelle 55: Zusammenfassung der durchgeführten PCRs mit DP1/DP4 und Oligo(dT)₁₇ zur Identifizierung einer GMC von *P. cochleariae* und *G. viridula*. Aufgeführt sind die verwendeten Primerpaare, der Organismus aus dem die Template-cDNA gewonnen wurde sowie die in der Standard-PCR verwendete Polymerase und *Annealing*-Temperatur.

Primerpaar	Template cDNA	Polymerase	Annealing-Temperatur [°C]
DP1/Oligo(dT) ₁₇	<i>P. cochleariae</i>	GoTaq [®]	54,0
		KAPAHiFi [™]	55,6
DP1/Oligo(dT) ₁₇	<i>G. viridula</i>	KAPAHiFi [™]	54,0
DP4/Oligo(dT) ₁₇	<i>P. cochleariae</i>	GoTaq [®]	55,0-65,0
		GoTaq [®]	55,0-65,0

3.6 Vervollständigung der genetischen Information weiterer Enzyme, die an der Biosynthese des Wehrsekretes von *C. populi* beteiligt sind

Wie eingangs beschrieben sind an der Biosynthese der aktiven Komponente Salicylaldehyd aus dem Wehrsekret von *C. populi* mehrere Enzyme beteiligt (1.2.2). Neben der CpSAO (3.2) bedarf es einer β -Glucosidase (CpGLU), die die pflanzliche Vorläufersubstanz Salicin in Salicylalkohol umwandelt. Ein weiteres Enzym, das nicht direkt an der Biosynthese des Salicylaldehyds beteiligt, aber dennoch essentiell ist, ist die Katalase (CpKAT). Die Katalase entgiftet das bei der Umwandlung von Salicylalkohol in Salicylaldehyd entstehende Wasserstoffperoxid. Diese Reaktion ist daher so wichtig, weil Wasserstoffperoxid als Zellgift fungiert (Buttke and Sandstrom, 1994).

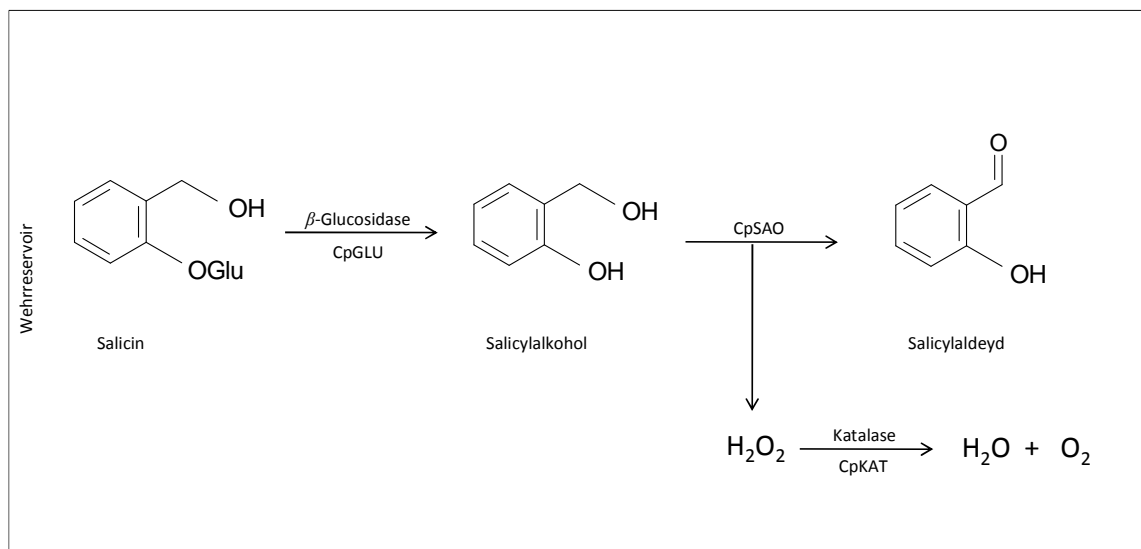


Abbildung 26: Schematische Darstellung aller enzymatischen Reaktionen im Wehrreservoir von *C. populi*.

Da bereits wertvolle Vorversuche zur Identifizierung der genetischen Information der β -Glucosidase und Katalase in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, erschien es sinnvoll die vorläufigen Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit weiter auszubauen. Die Ergebnisse der Vorversuche sind mit den Daten der weiterführenden Versuche in den folgenden Kapiteln zusammengefasst.

3.6.1 Versuche zur Identifizierung des cDNA-Transkriptes der β -Glucosidase aus dem Wehrapparat

3.6.1.1 Identifizierung eines β -Glucosidase-homologen cDNA-Transkriptes

Aus den Arbeiten von Brückmann (2002a) und Mohagheghi (2007) ist bekannt, dass keines der durch ESI-MS/MS-Sequenzierung erhaltenen Peptide eine Homologie zu einer β -Glucosidase aufweist. Brückmann konnte eine geringe β -Glucosidase-Aktivität im frischen Wehrsekret von *C. populi* nachweisen. Auch Mohagheghi gelang es eine β -Glucosidase-Aktivität nachzuweisen, nachdem das Wehrsekret von *C. tremulae* über ein natives PAGE-Gel getrennt wurde. Das Fehlen von β -Glucosidase-homologen Peptidsequenzen nach ESI-MS/MS-Sequenzierung und die geringe β -Glucosidase-Aktivität des isolierten Wehrsekrets ließen vermuten, dass es sich bei der gesuchten β -Glucosidase aus dem Wehrrservoir um ein membrangebundenes oder membranassoziertes Enzym handelt. Anhand eines hoch konservierten Bereichs eines Alignments unterschiedlicher β -Glucosidasen wurden degenerierte Primer entworfen, die zu einer Teilsequenz einer β -Glucosidase aus *C. tremulae* führte (Mohagheghi, 2007). Die Vervollständigung der Sequenz mit Hilfe der 5'-RACE gelang nicht, so dass auf genomischer DNA-Ebene mit Hilfe der Inversen PCR weitergearbeitet wurde. Dies führte nach computergestützter Zusammenführung der Teilsequenzen zu einem cDNA-Transkript, das einen OLR von 1680 bp besitzt. Die Durchführung einer Standard-PCR mit *full-length*-Primern zur Bestätigung der Sequenz stand noch aus.

Da zum Zeitpunkt der Aufnahme dieser Versuche keine Larven von *C. tremulae* zur Verfügung standen, wurden die Untersuchungen mit Larven von *C. populi* durchgeführt. Dies erforderte jedoch die Wiederholung der Standard-PCR mit dem degenerierten Primer, der bereits bei Mohagheghi (2007) zur Teilsequenz der β -Glucosidase bei *C. tremulae* führte. Da es sich um einen degenerierten Primer handelt und *C. populi* und *C. tremulae* um nahe Verwandte sind, wurde davon ausgegangen, dass sich der Primer auch bei *C. populi* bewährt.

Zur Templategewinnung wurde die Gesamt-RNA aus Larven von *C. populi* isoliert (2.8.2) und anschließend in cDNA mit Hilfe der SuperskriptTM III Reverse Transkriptase und dem Oligo(dT)₁₇-Primer umgeschrieben (2.8.3). 1 μ l der cDNA wurde als Template in einer Standard-PCR eingesetzt, die mit dem Primerpaar DP5/Oligo(dT)₁₇ (Tabelle 56 und Tabelle 13) und der AccuTaqTM LA DNA-Polymerase (2.8.5.1) durchgeführt wurde.

Tabelle 56: Primer zur Identifizierung einer Teilsequenz der β -Glucosidase aus *C. populi*. DP5 wurde aus der Arbeit von Mohagheghi (2007) übernommen, der dort als P22 geführt wurde.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
DP5	5'-GG(ACGT)ACIAA(CT)TA(CT)GA(AG)CA(AG)(CT)T-3'	53,1°C

Das ca. 1100 bp große Amplifikat wurde gereinigt (2.8.8.2), anschließend in pGEM®-T Easy kloniert (2.8.9) und in *E. coli*-TOP10-Zellen transformiert (2.8.11). Nach Sequenzierung der isolierten Plasmide wurde eine Sequenz mit einem OLR von 1062 bp erhalten, der eine eindeutige Homologie zu β -Glucosidasen aufweist. Daraufhin wurden genspezifische Primer (Tabelle 57) zur Vervollständigung der Sequenz im 5'-Bereich entworfen (2.8.4).

Tabelle 57: Primer zur Vervollständigung der Teilsequenz einer β -Glucosidase aus *C. populi*.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
GSP7	5'-GCTCAATCCAGTCCCCAC-3'	55,0°C
GSP8	5'-CCCTACTACACCGTTTTGGC-3'	52,0°C
GSP9	5'-GGAACTCATCGTCGTACATCCTC-3'	57,0°C

Zur Vorbereitung der 5'-RACE wurde erneut die Gesamt-RNA aus Larven von *C. populi* isoliert. Mit Hilfe der Superskript™ III Reverse Transkriptase und dem GSP7 wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben. Die anschließende Standard-PCR erfolgte mit den Primern GSP8 und AAP (Tabelle 57 und Tabelle 14) sowie der *Taq*-DNA-Polymerase (2.8.5.1). Zur Spezifizierung wurde eine weitere Standard-PCR durchgeführt, die 2,5 μ l einer 1:10 Verdünnung des vorangegangenen Standard-PCR-Ansatzes als Template enthielt. Als Primer wurden GSP9 und AUAP (Tabelle 57 und Tabelle 14) verwendet, die Polymerase blieb unverändert. Das dadurch entstandene ca. 700 bp großes Amplifikat wurde gereinigt (2.8.8.2) und in den pGEM®-T Easy-Vektor kloniert (2.8.9). Nach Sequenzierung der entstandenen Plasmide konnte mit der GCG-Software (2.8.25) eine *full-length*-Sequenz zusammengesetzt werden, die einen OLR von 1500 bp aufweist. Die korrespondierende Aminosäuresequenz, die im Folgenden CpGLU genannt wird, besitzt dementsprechend 500 Aminosäuren. Nach Abgleich der Aminosäuresequenz mit SignalP3.0 (2.8.25) konnte ein Signalpeptid von 22 Aminosäuren vorhergesagt werden. Dies war ein erster Hinweis darauf, dass es sich um ein extrazelluläres Enzym handelt, wie es postuliert wird (1.4). Dennoch reicht das alleinige Vorhandensein eines Signalpeptids nicht aus, um sicher davon ausgehen zu können, dass es sich um die gesuchte β -Glucosidase aus der Wehrsekretsynthese handelt. Vom Seidenspinner *Bombyx mori* ist beispielsweise eine β -Glucosidase mit Signalpeptid aus dem Darm bekannt (Byeon et al., 2005). Zudem ist aus den Daten des *T. castaneum*-Genoms bekannt, dass dieses 2 unterschiedliche Gene enthält, die für Glucosidasen kodieren (Richards et al., 2008). Vor diesem Hintergrund war es besonders wichtig weitere Analysen anzuschließen, um zu testen, ob es sich bei der identifizierten Sequenz um das gesuchte cDNA-Transkript aus dem Biosyntheseweg des Salicylaldehyds handelt. Ein Ansatz dazu wird im nachstehenden Kapitel erläutert, der sogar zur Identifizierung einer weiteren β -Glucosidase geführt hat.

3.6.1.2 Identifizierung einer weiteren β -Glucosidase aus dem cDNA-Pool des Wehrapparates

Wie in Kapitel 3.6.1.1 bereits beschrieben ist, konnte nicht allein auf die Tatsache des Vorhandenseins eines Signalpeptids davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem cDNA-Transkript der CpGLU um die genetische Information der β -Glucosidase aus dem Wehrapparat handelt. Um gezielt jene β -Glucosidase zu identifizieren, die an der Wehrsekretsynthese beteiligt ist, wurden systematisch die Wehrapparate aus den Larven seziiert (Abbildung 17, Kapitel 3.3.1). Zur Anreicherung der cDNA aus den Wehrapparaten wurde deren Gesamt-RNA isoliert (2.8.2.1), die mit Superskript™ III Reverse Transkriptase und Oligo(dT)₁₇ in cDNA umgeschrieben wurde (2.8.3). Die anschließende Standard-PCR erfolgte mit dem bereits bekannten Primerpaar DP5 und Oligo(dT)₁₇ (Tabelle 56 und Tabelle 13) und der AccuTaq™ LA DNA-Polymerase (Tabelle 17). Die Auswertung der Standard-PCR ergab, dass ein ca. 1300 bp großes Amplifikat erhalten wurde, welches in pGEM®-T Easy kloniert wurde (2.8.9). Die Sequenzierung der erhaltenen Plasmide führte interessanterweise zu zwei Sequenzen, die ebenfalls nach BLAST (2.8.25) eine Homologie zu Glucosidasen aufweisen. Während die eine Sequenz einen OLR von 1071 bp aufweist, besitzt die andere Sequenz einen OLR von 1203 bp. Bis auf die Differenz von 132 bp sind die beiden Sequenzen zu 99% identisch. Zur besseren Unterscheidung wird die kürzere Sequenz im Folgenden cDNA-Transkript der CpGLUWA1 genannt, die längere Sequenz dementsprechend cDNA-Transkript der CpGLUWA2. Wenn es keiner weiteren Spezifizierung des Enzyms bedarf, wird allgemein die β -Glucosidase aus dem Wehrapparat als CpGLUWA bezeichnet. Da die zusätzlichen Nukleinsäuren der längeren Sequenz im Mittelteil liegen, war an dieser Stelle davon auszugehen, dass es sich entweder um einen Fehler der verwendeten Polymerase handelt, oder um ein nicht codierendes Intron, das auf der Amplifizierung genomischer DNA beruht, welche vermutlich als Verunreinigung vorgelegen haben könnte. Gegen die Vermutung spricht, dass es sich bei den 132 bp um ein Intron handelt, da die Sequenz nicht der GT-AG-Regel folgte (Burge et al., 1998). Diese besagt, dass die meisten Introns mit den Aminosäuren Guanin und Thymin beginnen und mit den Aminosäuren Adenin und Guanin enden. Die hier identifizierte Sequenz beginnt zwar mit Guanin-Thymin, endet allerdings mit den Nukleinsäuren Cytosin-Adenin. Ein erstelltes Alignment von CpGLUWA1 und CpGLUWA2 mit Glucosidasen aus *T. castaneum* deutete ebenfalls darauf hin, dass die 132 bp zur codierenden Sequenz gehören. Um eindeutig auszuschließen, dass es sich bei den 132 bp um ein nichtcodierendes Intron handelt, wurde zunächst eine 5'-RACE durchgeführt und anschließend die *full-length*-Sequenz mit einer *proofreading*-DNA-Polymerase amplifiziert.

Zur Durchführung der 5'-RACE (2.8.4) der vorliegenden cDNA-Transkripte von CpGLUWA1 und CpGLUWA2 genügten drei Primer (Tabelle 58), deren Sequenzabschnitte stromaufwärts der zusätzlichen 132 bp des cDNA-Transkriptes der CpGLUWA2 gewählt wurden.

Tabelle 58: Primer zur Durchführung der 5'-RACE der cDNA-Transkripte der CpGLUWA1 und CpGLUWA2

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
GSP10	5'-CGCTTGACATGCGATAGAC -3'	50,0°C
GSP11	5'-GCTGCATGTGCCTTCATCATC-3'	52,0°C
GSP12	5'-GATACATTTATACTCATCCCTGCCACTG-3'	57,0°C

Da die Versuchsdurchführung im Herbst stattfand, waren zu diesem Zeitpunkt keine Larven von *C. populi* zur Gesamt-RNA-Isolierung verfügbar. So konnte auch keine spezifische cDNA mit GSP10 umgeschrieben werden. Da sich das Umschreiben von eingefrorener RNA nicht bewährte (Mohagheghi, 2007), wurde auf die cDNA der Wehrapparate zurückgegriffen, die mit Oligo(dT)₁₇ umgeschrieben wurde. Nachteil dieser Methode ist, dass als Template einer Standard-PCR der komplette cDNA-Pool eines Gewebes eingesetzt wird, was sich negativ auf die Spezifität des PCR-Produktes auswirken kann. Nach Anfügen des Poly-C-Schwanzes (2.8.4) wurde die erste Standard-PCR (2.8.5.1) mit dem Primerpaar GSP11 und AAP (Tabelle 58 und Tabelle 14) unter Verwendung der *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt. Die Spezifizierung und Anreicherung des PCR-Produktes gelang durch eine weitere Standard-PCR, die mit dem Primerpaar GSP12 und AUAP (Tabelle 58 und Tabelle 14) und der *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt wurde. Die Auswertung der zweiten Standard-PCR verdeutlichte, dass ein ca. 700 bp großes Amplifikat erhalten wurde, welches in pGEM®-T Easy kloniert wurde (2.8.9). Die resultierende Sequenz besitzt einen eindeutigen Bereich, der mit dem cDNA-Transkript der CpGLUWA1 und CpGLUWA2 übereinstimmte. Des Weiteren konnte ein ATG-Basentriplet identifiziert werden, das im Alignment mit anderen Glucosidasen aus *T. castaneum* auf Höhe derer Startcodons liegt. Dies spricht dafür, dass die Durchführung der 5'-RACE erfolgreich war. Das resultierende cDNA-Transkript der CpGLUWA1 weist nun eine Gesamtlänge von 1479 bp auf, das korrespondierende Protein 493 Aminosäuren. Das cDNA-Transkript der CpGLUWA2 weist dagegen 1611 bp auf und das entsprechende Protein 537 Aminosäuren.

Da es sich bei der gesuchten β -Glucosidase um ein extrazelluläres Protein handelt, wurden die beiden Aminosäuresequenzen auf das Vorhandensein eines Signalpeptids untersucht. Nach Angabe von SignalP3.0 (2.8.25) weisen die beiden Sequenzen CpGLUWA1 und CpGLUWA2 ein Signalpeptid von 16 Aminosäuren auf. Diese Aussage bestärkt die Vermutung, dass es sich bei einer dieser beiden Sequenzen um die β -Glucosidase aus dem Biosyntheseweg des Salicylaldehyds handeln könnte.

Da keine Peptide durch ESI-MS/MS-Sequenzierung gefunden wurden, die eine Homologie zu einer Glucosidase aufweisen, vermutete Mohagheghi (2007), dass es sich bei der β -Glucosidase aus dem Stoffwechselweg des Salicylaldehyds um ein membrangebundenes Protein handeln könnte. Die softwaregestützte Untersuchung über den TMHMM-Server (2.8.25) von CpGLUWA1 und CpGLUWA2 gab jedoch keine Hinweise darauf, dass es sich bei einer der beiden Sequenzen um ein Transmembranprotein handeln könnte, da keine Transmembrandomänen detektierbar waren. Dennoch könnte das Enzym hydrophobe Bereiche besitzen, die bewirken, dass sich das Enzym an die Oberfläche einer Membran anlagert. So liegt die Wahrscheinlichkeit näher, dass es sich bei der gesuchten Glucosidase um ein sogenanntes peripheres Membranprotein handelt und nicht um ein Transmembranprotein. Diese Aussage wird in Kapitel 4.2 weitergehend diskutiert.

3.6.1.3 **Full-length-Amplifizierung der β -Glucosidase aus dem Wehrapparat mit anschließender Klonierung und Expression in *E. coli*-Zellen**

In Kapitel 3.6.1.2 konnten zwei nahezu identische Sequenzen identifiziert werden. Das cDNA-Transkript der CpGLUWA2 unterscheidet sich von dem cDNA-Transkript der CpGLUWA1 durch 132 zusätzliche Nukleotide nach den ersten 555 Nukleotiden beider Sequenzen. Um festzustellen, welches dieser beiden Transkripte tatsächlich vorliegt und für die anschließende Expression in Frage kommt, wurden Primer entworfen, die die *full-length*-Sequenz in einer Standard-PCR mit Hilfe einer *proofreading*-Polymerase amplifizieren. Die Primer wurden gleichzeitig so gestaltet, dass eine Klonierung des Amplifikats in den Expressionsvektor pET-22b(+) möglich war. Da das Signalpeptid *in vivo* beim Durchtritt durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums abgespalten wird und nicht Bestandteil des eigentlich aktiven Enzyms ist, wurde die Sequenz des *forward*-Primers (EP12) so gewählt, dass die Nukleinsäuren, die für das vorhergesagte Signalpeptid kodieren, ausgespart wurden. An Stelle dessen wurde ein künstliches Startkodon eingefügt.

Tabelle 59: Expressionsprimer zur Amplifizierung der *full-length*-Sequenz der β -Glucosidase aus dem Wehrapparat. Der **fettgedruckte** Bereich in EP12 kennzeichnet die Erkennungssequenz von *VspI*, das künstliche Startkodon ist unterstrichen. Die *XhoI*-Erkennungssequenz in EP13 ist **fettgedruckt**.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
EP12	5'-TATATA ATTAAT <u>ATGC</u> CATAACGGCACATTTCCCCCAATTTC-3'	72,0°C
EP13	5'-TATATA CTCGAGT GCTCTGATTTTCTAGATGCAGGTG-3'	

Die Durchführung der Standard-PCR erfolgte mit EP12 und EP13 (Tabelle 59) sowie der iProof™ High-Fidelity DNA-Polymerase (2.8.5.1). Als Template wurden 0,5 μ l der cDNA aus dem Wehrapparat eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde gereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen *VspI* und *XhoI*

hydrolysiert (2.8.10.1). Die Ligation (2.8.10.2) des hydrolysierten Amplifikats mit dem linearisierten Vektor pET-22b(+) (*NdeI/XhoI*) erfolgte über Nacht bei 4°C mit anschließender Transformation des Ansatzes in *E. coli*-TOP10-Zellen (2.8.11). Aus Kolonien, die auf ampicillinhaltigem Medium wuchsen, wurden die Plasmide isoliert (2.8.13.1) und eine Restriktionsanalyse (2.8.12.2) durchgeführt. Die Sequenzierung eines als positiv identifizierten Plasmids belegte, dass die Klonierung der amplifizierten Sequenz in den pET-22b(+)-Vektor gelungen war. Das Konstrukt wird im Folgenden pCpGLU1 genannt. Die Sequenzierung von pCpGLU1 zeigt, dass es sich bei der amplifizierten Sequenz, wie in Kapitel 3.6.1.2 vermutet, um das cDNA-Transkript der CpGLUWA2 handelt. Ein Alignment des cDNA-Transkriptes der CpGLUWA2 mit anderen Glucosidasen aus *T. castaneum* zeigte, dass die Sequenz bis auf wenige Nucleinsäuren etwa die gleiche Länge besitzt wie die Glucosidasen aus *T. castaneum*. So wurde an dieser Stelle davon ausgegangen, dass es sich bei dem cDNA-Transkript der CpGLUWA2 um die gesuchte Sequenz der β -Glucosidase aus dem Syntheseweg des Salicylaldehyds von *C. populi* handeln könnte.

Da das cDNA-Transkript im Expressionsvektor vorlag (pCpGLU1), wurde dieses in kompetente *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen (2.4.1) transformiert und zur Expression gebracht (2.8.14). Die Expression erfolgte zunächst in 50 ml LB-Medium bei 15°C. Die anschließende Reinigung (2.9.1.1) und Auswertung anhand der SDS-PAGE (2.9.5) zeigte, dass die CpGLUWA2 schwach exprimiert wurde und nicht in löslicher Form vorlag. Das Problem der *inclusion bodies* trat im Rahmen dieser Arbeit wiederholt auf und konnte bei der Expression der cDNA-Transkripte der CtSAO und CpSAO erfolgreich durch Änderung der Expressionsbedingungen behoben werden. Ebenso ist aus der Literatur bekannt, dass β -Glucosidasen aus *Agrobacterium tumefaciens* und *Cellvibrio glivus* erfolgreich durch Coexpression der Chaperone GroEL und GroES in löslicher Form erhalten wurden (Machida et al., 1998). Daher wurde dieser Versuchansatz sowie eine Reihe weiterer Expressionsbedingungen an pCpGLU1 getestet, die alle nicht zur Expression eines löslichen Proteins führten. Die Modifikationen der Expressionsbedingungen sind kurz in Tabelle 60 zusammengefasst.

Tabelle 60: Modifikation der Expressionsbedingungen für das cDNA-Transkript der CpGLUWA2

	Änderung der Temperatur	Zugabe von 0,8 M Sorbitol und 2,5 mM Bestain-HCl zum Expressionsmedium (Oganesyan et al., 2007)
Expression von pCpGLU1	4-30°C	Ja
Coexpression von pCpGLU1 mit pREP4-groESL und pRDKJG	15 und 30°C	Ja

Da keine der in Tabelle 60 aufgeführten Änderungen der Expressionsbedingungen erfolgreich waren, wurde das cDNA-Transkript der CpGLUWA2 in weitere Expressionsvektoren kloniert. Die entstandenen Konstrukte sind in Tabelle 61 aufgelistet, die weiteren Primer, die zur Amplifikation der Sequenz benötigt wurden, sind in Tabelle 62 aufgeführt.

Tabelle 61: Auflistung weiterer Konstrukte, die das cDNA-Transkript der CpGLUWA2 enthalten. ✂: Symbol für die verwendeten Restriktionsendonukleasen. pCpGLU4 stammt aus der Bachelorarbeit von Pietschke (2009).

Konstrukt	Polymerase	Primer/✂	Vektor/✂
pCpGLU2	iProof™ High-Fidelity DNA	EP14 <i>Vspl</i> EP15 <i>Sall</i>	pET-28a(+) <i>NdeI/Sall</i>
pCpGLU3	iProof™ High-Fidelity DNA	EP12 <i>Vspl</i> EP13 <i>XhoI</i>	pTYB1 <i>NdeI/XhoI</i>
pCpGLU4	Platinum® <i>Pfx</i> DNA	EP14 <i>Vspl</i> EP15 <i>Sall</i>	pET-28a(+) <i>modAmp</i> <i>NdeI/Sall</i>

Tabelle 62: Expressionsprimer zur Amplifizierung des cDNA-Transkriptes der CpGLUWA2. Der **fettgedruckte** Bereich in EP14 markiert die *Vspl*-Erkennungssequenz. In EP15 ist die *Sall*-Erkennungssequenz **fettgedruckt**, das Stoppkodon unterstrichen.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
EP14	5'-TATATA ATTAAT CATAACGGCACATTTCCCCCAATTC-3'	69,0°C
EP15	5'-TATATAG TCGACTT ATGCTCTGATTTTCTAGATGCAGG-3'	

Die Expression aller in Tabelle 61 aufgeführten Konstrukte wurde ohne sowie mit der Coexpression von pRDKJG (2.8.15) durchgeführt. Jedoch konnte mit keinem der Konstrukte und keiner der angewendeten Methoden das Problem der *inclusion bodies* behoben werden.

Da die Expression des cDNA-Transkriptes der CpGLUWA2 in *E. coli*-Zellen nicht möglich zu sein scheint, wurde an dieser Stelle über den Wechsel des Expressionssystems entschieden. Eine weitere Alternative zur Fremdgenexpression sind Hefezellen, bei denen mehrere Expressionssysteme zur Verfügung standen. Da die Expression des cDNA-Transkriptes der CtSAO in *K. lactis*-Zellen nicht erfolgreich war (3.1.7.1), wurde für das cDNA-Transkript der CpGLUWA2 die Expression in *S. cerevisiae*-Zellen getestet. Die Versuchsdurchführung wird im nächsten Kapitel erläutert.

3.6.1.4 Expression der CpGLUWA2 in *S. cerevisiae*-Zellen

Die Expression des cDNA-Transkriptes der CpGLUWA2 in *E. coli*-Zellen war selbst unter verschiedensten Bedingungen nicht erfolgreich. Aus der Literatur ist bekannt, dass es bereits gelang

eine β -Glucosidase aus *Aspergillus niger* in *S. cerevisiae* (INVSc1) unter Verwendung des pYES2-Vektors in löslicher Form zu exprimieren (Dan et al., 2000). Aus diesem Grund wurde das Expressionssystem, bestehend aus dem Hefestamms INVSc1 und dem Vektor pYES2, für weitere Expressionsversuche gewählt.

Tabelle 63: Expressionsprimer zur Klonierung des cDNA-Transkriptes der CpGLUWA2 in den pYES2-Vektor. In EP16 ist die *Bam*HI-Erkennungssequenz **fettgedruckt**, die *yeast-consensus-sequenz* einfach unterstrichen und das Startkodon doppelt unterstrichen. Der **fettgedruckte** Bereich in EP17 markiert die *Xho*I-Erkennungssequenz, die einfach unterstrichenen Nukleinsäuren stellen das Stoppkodon dar und die doppelt unterstrichenen Nukleinsäuren codieren für den *His*-Tag.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
EP16	5'-TATATAGGATCC AA CACAAT <u>GT</u> TCTCATAACGGCACATTTCCCCC-3'	68,0°C
EP17	5'-TATACTCGAGT <u>TTAGTGGTGGTGGTGGTGGT</u> GTGCTCTGATTTTCTAG-3'	

Die Amplifizierung der Sequenz erfolgte in einer Standard-PCR (2.8.5.1) mit dem Primerpaar EP16/EP17 (Tabelle 63) und der Platinum® *Pfx* DNA-Polymerase. Das Amplifikat wurde gereinigt (2.8.8.1) und zur Erzeugung der für die Klonierung in den pYES2-Vektor kompatiblen Enden wurden sowohl das Amplifikat als auch der Vektor mit den Endonukleasen *Bam*HI und *Xho*I hydrolysiert (2.8.10.1). Die Ligation wurde über Nacht bei 4°C (2.8.10.2) durchgeführt. Da der pYES2-Vektor auch für die Vermehrung in *E. coli*-Zellen befähigt ist, wurde der Ligationsansatz zur Selektion in kompetente *E. coli*-TOP10-Zellen transformiert (2.8.11). Die Sequenzierung eines isolierten Plasmids zeigte eindeutig, dass es gelungen war das cDNA-Transkript der CpGLUWA in den pYES2-Vektor zu klonieren. Das Konstrukt wird im Folgenden pCpGLU5 genannt.

Für die Transformation in kompetente INVSc1-Zellen (2.5.4) wurde von pCpGLU5 eine Spinprep (2.8.13.2) angefertigt, damit das Plasmid die erforderliche Konzentration und Reinheit aufwies. Die Transformation erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode wie unter Kapitel 2.8.21 beschrieben. Nach 48 stündiger Inkubation des Transformationsansatzes auf Selektionsmedium (2.5.3) wurden 5 Kolonien erhalten, die zur Vermehrung in 15 ml SC-Minimalmedium mit Raffinose (Tabelle 9) überführt und über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert wurden. Nach Herstellerangaben (Invitrogen) sollte die Übernachtskultur eine OD₆₀₀ von mindesten 1,3 aufweisen, um genügend Zellen für die anschließende Expression zu haben. Die 5 Übernachtskulturen zeigten keinerlei Trübung und nach 72 stündiger Inkubation eine maximale OD₆₀₀ von 0,2. Auch der Austausch der Raffinose gegen Glucose im SC-Minimalmedium erbrachte nicht die benötigte optische Dichte der Vorkultur. Ob die Transformation nicht gelang oder die Expressionsbedingung nicht optimal gewählt wurden, konnte nicht geklärt werden. Da die heterologe Expression weder in *E. coli*-Zellen noch in *S. cerevisiae*-Zellen

gelang, wurde eine Methode zur Identifizierung des Expressionsortes des cDNA-Transkriptes von CpGLUWA2 gewählt, die im folgenden Kapitel dargestellt ist.

3.6.1.5 Gewebespezifische Lokalisation der cDNA-Transkripte der CpGLUWA2 und CpGLU

Da die Expression der CpGLUWA2 nicht in löslicher Form gelang und kein funktioneller Nachweis des Proteins erbracht werden konnte, wurde eine gewebespezifische RT-PCR angefertigt, die den Expressionsort des cDNA-Transkriptes der CpGLUWA2 im Wehrapparat nachweisen sollte. Als Vergleich wurde auch das cDNA-Transkript der CpGLU untersucht. Da die Identifizierung dieses Transkriptes mit der cDNA aus dem Gesamttier erfolgte, liegen keine Hinweise vor, in welchem Gewebe das cDNA-Transkript der CpGLU exprimiert ist. Auch darüber sollte durch die RT-PCR Aufschluss erlangt werden.

Die Isolierung der Gesamt-RNA, das Umschreiben in cDNA und die Durchführung der RT-PCR erfolgte wie bereits unter Kapitel 3.3.1 beschrieben. Zur Amplifizierung einer Teilsequenz aus dem cDNA-Transkript der CpGLUWA2 wurde das Primerpaar P-GLUWA-f und P-GLUWA-r (Tabelle 64) verwendet, das ein 591 bp großes Fragment ergibt. Unter Verwendung der Primer P-GLU-f und P-GLU-r (Tabelle 64) wird ein 525 bp großes Fragment des cDNA-Transkriptes der CpGLU amplifiziert. Für die Wahl der Primer wurde ein Alignment der beiden cDNA-Transkripte angefertigt und Bereiche ausgewählt, die keine Homologien aufwiesen. So konnten unspezifische Anlagerungen der Primer an das jeweils andere Transkript vermieden werden.

Tabelle 64: Primer zur Durchführung der RT-PCR der cDNA-Transkripte von CpGLUWA2 und CpGLU

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
P-GLUWA-f	5'-CTCCTGGCATCGAGAGCA -3'	55,0°C
P-GLUWA-r	5'-TCAGATGAGCCAATTTCCGTTATC-3'	
P-GLU-f	5'-GATGGGTTTGGCAAGCTCTCCA -3'	55,0°C
P-GLU-r	5'-CTGGTAACCCCGGTATCTGC-3'	

Neben der cDNA der unterschiedlichen Gewebe wurden als Positivkontrollen (PK) Plasmide verwendet, die das jeweilige cDNA-Transkript der zu untersuchenden β -Glucosidase enthielten. PK1 enthielt das cDNA-Transkript der CpGLUWA2 und PK2 das der CpGLU. PK1 diente daher gleichzeitig als Negativkontrolle für die Durchführung der RT-PCR des cDNA-Transkriptes von CpGLU und umgekehrt PK2 als Negativkontrolle CpGLUWA2. Zusätzlich wurde dadurch die Spezifität der Primer bewiesen. Daneben wurde eine Negativkontrolle (NK) durchgeführt, die keine cDNA als Template enthielt.

Ergebnisse

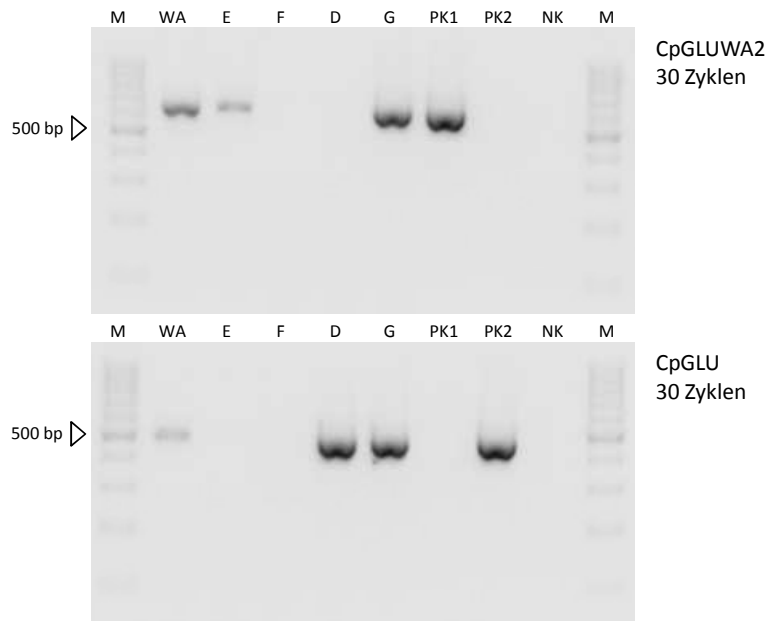


Abbildung 27: Agarosegel-Bild der RT-PCR der cDNA-Transkripte der CpGLUWA2 und CpGLU. Oben: Auswertung der RT-PCR des cDNA-Transkriptes der CpGLUWA2 nach 30 Zyklen. Unten: Auswertung der RT-PCR des cDNA-Transkriptes der CpGLU nach 30 Zyklen. Aufgetragen wurden Aliquots der PCR-Reaktionen, die cDNA aus dem Wehrapparat (WA), aus dem Exoskelett (E), aus dem Fettgewebe (F), aus dem Darm (D) und dem Gesamttier (G) enthielten. Zusätzlich wurden Positivkontrollen (PK) angefertigt, die aus einem Plasmid bestanden, das die jeweilige cDNA enthielt. PK1: cDNA-Transkript der CpGLUWA2. PK2: cDNA-Transkript der CpGLU. Bei der Negativkontrolle wurde die cDNA durch Wasser ersetzt. M: 100 bp DNA-Marker (Fermentas).

Die Auswertung der RT-PCRs mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (2.8.7) verdeutlicht folgende Ergebnisse für den Expressionsort des cDNA-Transkriptes der CpGLUWA2 (Abbildung 27): Neben der erwarteten Bande der PK1 und im Gesamttier ist eine deutliche Bande unter Verwendung der cDNA aus dem Wehrapparat als Template zu erkennen. Daneben ist eine schwache Bande unter Verwendung der cDNA aus dem Exoskelett detektierbar. Dieses Phänomen trat schon bei der RT-PCR des cDNA-Transkriptes der CpSAO2 (3.3.1) auf und ist an dieser Stelle nicht verwunderlich, da die verwendete cDNA beider Durchführungen aus einer Charge stammt. Daher handelt es sich auch hier wahrscheinlich um eine Verunreinigung der cDNA aus dem Exoskelett mit cDNA aus dem Wehrapparat. Wie erwartet ist keine Bande bei PK2 und NK zu finden, was zeigt, dass die gewählten Primerbereiche spezifisch sind. Auch nach Einsatz von cDNA aus dem Fett- und Darmgewebe als Template ist im Agarosegel keine Bande detektierbar. Damit ist sicher davon auszugehen, dass das cDNA-Transkript der CpGLUWA2 spezifisch im Wehrapparat von *C. populi* exprimiert ist und wahrscheinlich die Umwandlung von Salicin zu Salicylalkohol katalysiert.

Anhand Abbildung 27 können folgende Aussagen über den Expressionsort des cDNA-Transkriptes von CpGLU getroffen werden: Neben den erwarteten Amplifikaten basierend auf der PK2 und der cDNA des Gesamttiers ist eine intensive Bande nach Vorlage der cDNA aus dem Darm erkennbar.

Erstaunlich ist, dass auch eine schwache Bande bei Verwendung der cDNA aus dem Wehrapparat als Template ein Signal im Agarosegel detektierbar ist. Dies deutet darauf hin, dass die cDNA aus dem Wehrapparat mit Spuren der cDNA aus dem Darm verunreinigt ist. Dass das cDNA-Transkript von CpGLU ebenfalls im Wehrapparat exprimiert ist, ist unwahrscheinlich, da wie in Kapitel 3.6.1.2 beschrieben, durch Sequenzanalyse keinerlei Hinweise auf das Vorhandensein eines weiteren β -Glucosidase-cDNA-Transkriptes im Wehrapparat gefunden wurden. Nach Vorlage der cDNA aus dem Exoskelett und dem Fettgewebe sowie in den beiden Negativkontrollen (PK1 und NK) ist keine Bande im Agarosegel detektierbar. Dies lässt darauf schließen, dass das cDNA-Transkript der CpGLU ausschließlich im Darm exprimiert ist.

3.6.2 Versuche zur Identifizierung des cDNA-Transkriptes der Katalase aus dem Wehrapparat

Zur Identifizierung der genetischen Information der im Wehrreservoir befindlichen Katalase (CpKAT) wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits richtungsweisende Ergebnisse erzielt (Brückmann, 2002a; Mohagheghi, 2007). Während es Brückmann gelang eine Katalaseaktivität aus dem frischen Wehrsekret von *C. populi* nachzuweisen, konnte Mohagheghi durch ESI-MS/MS-Sequenzierung des Wehrsekretes von *C. tremulae* 6 Peptidsequenzen identifizieren, die Identität zu bereits bekannten Katalasen anderer Organismen aufweisen, deren Sequenzen auf BLAST hinterlegt sind. Auf Grundlage dieser Peptidsequenzen wurden degenerierte Primer entworfen, mit deren Hilfe Mohagheghi (2007) eine Teilsequenz identifizieren konnte.

Tabelle 65: Peptide aus dem Wehrsekret von *C. tremulae* mit Homologie zur Katalase (Mohagheghi, 2007).

Peptide aus dem Wehrsekret von <i>C. tremulae</i>	Übereinstimmung mit CpKAT
DYLNAL EEGK	90%
LGTNYEQLPVN	100%
QSFNPFDLTK	100%
DPQQAELLAGQDPDYAVR	94,4%
YPSWTFYLQTMTP EQAK	96,4%
LGNLTD DNTLLVYK	80%

Die Vervollständigung dieser Sequenz gelang nicht. Mohagheghi führte die Versuche mit *C. tremulae* durch. Da die Tiere zum Zeitpunkt der im Folgenden beschriebenen Versuche nicht zur Verfügung standen, wurde auf *C. populi* ausgewichen. Dazu wurde die Standard-PCR mit dem von Mohagheghi entworfenen degenerierten Primer (P05) wiederholt und die cDNA von *C. populi* als Template eingesetzt. Zur Gewinnung der cDNA wurde zunächst die Gesamt-RNA (2.8.2) isoliert, die mit SuperskriptTM III Reverse Transkriptase und Oligo(dT)₁₇ umgeschrieben wurde (2.8.3). 1 μ l der cDNA

wurde als Template in einer Standard-PCR verwendet, die mit der AccuTaq™ LA DNA-Polymerase (2.8.5.1) durchgeführt wurde. Als *forward*-Primer wurde DP6 (Tabelle 66) eingesetzt, der in der Arbeit von Mohagheghi als P05 bezeichnet wurde. Als *reverse*-Primer kam Oligo(dT)₁₇ zum Einsatz (Tabelle 13).

Tabelle 66: Primer zur Identifizierung eines zur Katalase homologen cDNA-Transkriptes. DP6 wurde aus der Arbeit von Mohagheghi (2007) übernommen, der dort P05 bezeichnet wurde.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
DP6	5'-CA(GA)GA(TC)CC(GATC)GA(TC)TA(TC)GC(GATC)GT -3'	54,5°C

Es wurde ein ca. 800 bp großes Fragment amplifiziert, welches gereinigt (2.8.8.2) und in pGEM®-T Easy kloniert (2.8.9) wurde. Die anschließende Sequenzierung erbrachte ein cDNA-Sequenz mit einem OLR von 756 bp. Ein Vergleich der zum cDNA-Transkript korrespondierenden Aminosäuresequenz mit den Peptidsequenzen zeigte, dass sich bereits die ersten 5 der 6 Peptide aus Tabelle 65 in der Sequenz wiederfinden lassen. Da Katalasen ubiquitär vorkommen (Loew, 1900) und untereinander ein hohes Maß an Identität aufweisen, spricht die alleinige Übereinstimmung der Peptidsequenzen mit der Aminosäuresequenz nicht zwingend dafür, dass das gefundene cDNA-Transkript das aus dem Wehrapparat ist. Nach Abgleich der Katalasesequenzen aus *T. castaneum* mit SignalP3.0 konnte für keine der Katalasen ein Signalpeptid vorhergesagt werden. Das spricht dafür, dass alle bereits bekannten Katalasen intrazellulär aktiv sind. Daher wäre das Vorhandensein eines Signalpeptids bei der hier gesuchten CpKAT ein starker Hinweis darauf, dass es sich um die extrazellulär arbeitende Katalase aus dem Wehrrservoir handelt. Zur Vervollständigung der Sequenz wurden genspezifische Primer entworfen, die in Tabelle 67 aufgeführt sind.

Tabelle 67: Primer zur Vervollständigung des zur Katalase homologen cDNA-Transkriptes mit Hilfe der 5'-RACE.

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
GSP13	5'-CGTAATTTGTCCCAATCGG -3'	55,0°C
GSP14	5'-GAGCATCCTGATATGCAAAAAGTC-3'	52,0°C
GSP15	5'-CTGCAACATCCTATCTGGCGAG-3'	57,0°C

Zunächst wurde erneut die Gesamt-RNA isoliert und mit Transcriptor High Fidelity Reverse Transkriptase und GSP13 in cDNA umgeschrieben. Nachdem die erhaltene cDNA im 5'-Bereich mit einem Poly-C-Schwanz versehen wurde, wurden 2 µl der cDNA als Template einer Standard-PCR eingesetzt, die mit der AccuTaq™ LA DNA-Polymerase und dem Primerpaar GSP14/AAP (Tabelle 67 und Tabelle 14) durchgeführt wurde. Nach Beendigung der PCR wurde von dem Ansatz eine 1:10

Verdünnung angefertigt, wovon 1 µl als Template einer weiteren Standard-PCR verwendet wurde. Diese wurde ebenfalls mit der AccuTaq™ LA DNA-Polymerase durchgeführt, allerdings mit dem Primerpaar GSP15 und AUAP (Tabelle 67 und Tabelle 14). Die Auswertung der zweiten PCR mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese führte zu einem ca. 1100 bp großen Amplifikat, das in pGEM®-T Easy (2.8.9) kloniert wurde. Die Sequenzierung ergab, dass das amplifizierte Fragment einen identischen Überlapp mit der Teilsequenz zeigte. So wurde eine *full-length*-Sequenz erhalten, die einen OLR von 1518 bp besitzt. Durch die Verlängerung der Sequenz konnte auch das sechste Peptid in der korrespondierenden Aminosäuresequenz wiedergefunden werden. Da die gesuchte Katalase wie die Oxidase und β -Glucosidase ein extrazellulär aktives Enzym ist, muss das cDNA-Transkript der Katalase ein Signalpeptid zur Translokalisierung aufweisen. Die softwaregestützte Analyse der Sequenz konnte für das cDNA-Transkript kein Signalpeptid vorhersagen. Dies weist darauf hin, dass es sich bei der Sequenz nicht um das gesuchte cDNA-Transkript handelt oder dass das 5'-Ende des cDNA-Transkriptes noch nicht komplett identifiziert wurde. Um sicherzustellen, dass die Sequenz als *full-length*-Sequenz vorliegt, wurden drei weitere Primer (Tabelle 68) konzipiert, die stromaufwärts der Primer GSP13-GSP15 liegen. Die Durchführung und Auswertung der 5'-RACE erfolgte unter gleichen Bedingungen wie die der ersten.

Tabelle 68: Primer zur Durchführung einer zweiten 5'-RACE zur Ermittlung des 5'-Endes des cDNA-Transkriptes der CpKAT

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur [°C]
GSP16	5'-CGGGAGAGCTCTTGAGTC -3'	55,0°C
GSP17	5'-GGTGATCTGTTGAAGGGATCGG-3'	52,0°C
GSP18	5'-CCATATTTTCCAACAGTTAGGCTACTG-3'	57,0°C

Die erhaltene Sequenz bestätigte das bereits zuvor identifizierte 5'-Ende. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurde vermutet, dass es sich bei dem vorliegenden cDNA-Transkript nicht um die gesuchte Sequenz der Katalase aus dem Wehrapparat handelt.

Da die Suche nach der β -Glucosidase durch gezielte Vorlage der cDNA aus dem Wehrapparat erfolgreich war, sollte dieser Versuchsansatz auch zur Identifizierung der Katalase angewendet werden. Dazu wurde die gleiche cDNA-Charge verwendet, die wie in Kapitel 3.6.1.2 beschrieben aus der Gesamt-RNA des Wehrapparats gewonnen wurde. Die cDNA wurde als Template verschiedener Standard-PCRs eingesetzt, die mit dem Primerpaar DP6/Oligo(dT)₁₇ (Tabelle 66) durchgeführt wurden. Erstaunlicherweise wurde kein Amplifikat selbst unter Verwendung verschiedener Polymerasen erhalten. Da sich sowohl die Primerkonzipierung als auch die cDNA-Vorlage bereits bewährt haben, bleiben die Gründe für das Fehlschlagen der PCR ungeklärt.

Eine gewebespezifische RT-PCR kam an dieser Stelle nicht in Frage, da die Homologie der Katalasen untereinander zu hoch ist, um unspezifische Anlagerungen der Primer zu vermeiden. Eine andere Möglichkeit bestand darin auf genomischer Ebene weiterzusuchen. Dieser Versuchsansatz ist im folgenden Kapitel erläutert.

3.6.2.3 Ansatz zur Identifizierung der genetischen Information der Katalase auf Ebene der genomischen DNA

Mit Hilfe der Inversen PCR (2.8.6) lassen sich auf genomischer Ebene unbekannte Sequenzabschnitte identifizieren, die einen bekannten DNA-Bereich flankieren. Diese Methode wurde gewählt, um ein potentiell 5'-Ende einer Katalase zu finden, dessen Aminosäuresequenz ein Signalpeptid aufweist. Aus Insekten ist bislang keine Katalase bekannt, die ein Signalpeptid aufweist. So könnte das Auffinden eines Signalpeptids ein Hinweis sein, dass es sich um die entsprechende Katalase aus dem Wehrapparat handelt. Dieser Bereich könnte wiederum als Grundlage eines Primers dienen, der in einer Standard-PCR gezielt das cDNA-Transkript der gesuchten Katalase amplifiziert.

Die Gewinnung der genomischen DNA aus *C. populi* erfolgte wie unter Kapitel 2.8.1 beschrieben. Zur Fragmentierung der genomischen DNA wurde die Restriktionsendonuklease *MspI* verwendet. Die Wahl der Restriktionsendonuklease wurde so getroffen, dass ihre Erkennungssequenz in einem DNA-Abschnitt liegt, der für ein Peptid codiert, das mittels ESI-MS/MS-Sequenzierung identifiziert wurde. Da die zur Durchführung der Inversen PCR verwendeten Primer an die Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease angrenzen, ist die Wahrscheinlichkeit höher die genomische DNA der gesuchten Katalase in der PCR amplifizieren zu können.

Nach Hydrolyse der genomischen DNA wurden die resultierenden Fragmente zur Herstellung zirkulärer Fragmente mit sich selbst ligiert und anschließend durch Fällung aufkonzentriert (2.8.6). 2,0 µl des konzentrierten Ligationsprodukts wurden als Template der Inversen PCR eingesetzt, die mit der AccuTaq™ LA DNA-Polymerase durchgeführt wurde. Die verwendeten Primer sowie die *Annealing*-Temperatur sind in Tabelle 69 aufgeführt.

Tabelle 69: Primer zur Durchführung der Inversen PCR

Primer	Sequenz	<i>Annealing</i> -Temperatur [°C]
P1-f	5'-GAAAGCACAAAGCTTCAATCCCTTGA-3'	57,0°C
P1-r	5'-GCGTCATAGTCTGTATATAAAATGTCCAAG-3'	

Die Auswertung der Inversen PCR mittels Agarosegelelektrophorese (2.8.7) ergab, dass kein Amplifikat erhalten wurde.

Eine mögliche Fehlerquelle ist die Wahl der verwendeten Restriktionsendonuklease. *Ml*I benötigt eine bestimmte Abfolge von 6 Nukleinsäuren als Erkennungssequenz und ist daher ein 6-Basen-*Cutter*, dessen Erkennungssequenz statistisch gesehen selten vorkommt. Vermutlich sind neben der Erkennungssequenz des bekannten DNA-Abschnitts nur wenige weitere Erkennungssequenzen auf der genomischen DNA enthalten. Infolgedessen könnte es zu sehr großen zirkulären Fragmenten gekommen sein, die in der PCR schwer zu amplifizieren sind. Aus diesem Grund wurde der Versuch wiederholt, jedoch mit einer Mischung aus 2 Restriktionsendonukleasen. Die zweite Restriktionsendonuklease wurde so gewählt, dass sie im bekannten DNA-Abschnitt nicht vorkommt, um die Sequenz intakt zu halten. Es wurde ein 4-Basen-*Cutter* gewählt, der statistisch gesehen häufiger vorkommt, um genügend kleine DNA-Fragmente zu erzeugen. Ein weiteres Kriterium war, dass die zweite Restriktionsendonuklease wie *Ml*I glatte Enden nach Hydrolyse erzeugt, damit die spätere Ligation gewährleistet werden kann. Nach diesen Ausschlusskriterien kamen die Restriktionsendonukleasen *Dra*I, *Sma*I und *Bst*1107I in Frage. Diese wurden jeweils getrennt mit *Ml*I in der Hydrolysereaktion eingesetzt. Die anschließende Ligation und Fällung der zirkulären DNA erfolgte wie oben beschrieben. Die Durchführung der Inversen PCR erfolgte ebenfalls mit der AccuTaq™ LA DNA-Polymerase und dem Primerpaar P1-f/P1-r (Tabelle 69). Die Auswertung der Inversen PCR zeigte erneut, dass kein Amplifikat erhalten wurde. Der Fehler der Inversen PCR lag daher vermutlich nicht an der Größe der hydrolysierten Fragmente.

Um auszuschließen, dass die Primer fehlerhaft synthetisiert wurden, wurden 2 Standard-PCRs (2.8.5.1) mit den Primern P1-f und P1-r durchgeführt. Dabei wurde P1-f mit Oligo(dT)₁₇ gepaart, sodass bei Vorlage von cDNA aus dem Gesamttier ein 720 bp großes Fragment amplifiziert werden sollte. P1-r wurde in Verbindung mit AAP eingesetzt. Unter Verwendung von Poly-C-verknüpfter cDNA aus der 5'-RACE des Gesamttiers sollte in einer Standard-PCR ein 950 bp großes Amplifikat erzeugt werden. Beide PCRs erfolgten unter Verwendung der GoTaq® DNA-Polymerase (2.8.5.1) bei einer *Annealing*-Temperatur von 54°C. Die Auswertung der PCRs mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese zeigte, dass bei beiden Reaktionen kein Amplifikat erhalten wurde. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Primer entweder fehlerhaft synthetisiert wurden oder die gewählten Primerbereiche für die Anlagerung ungeeignet sind. In jedem Fall müssten neue Primerbereiche gewählt werden, auf die ein neues Primerpaar konzipiert werden kann.

4. Diskussion

Die Larven der Pappelblattkäfer *C. tremulae* und *C. populi* sind ein faszinierendes Beispiel für die Wechselwirkung zwischen Pflanzen und Insekten. Ihre Futterpflanzen beinhalten das Glucosid Salicin. Während Salicin auf andere Tiere fraßhemmend wirkt, machen sich die Larven der Pappelblattkäfer diesen Stoff zu eigen und setzen ihn nach Umwandlung in Salicylaldehyd selber gegen ihre Fraßfeinde ein (1.2.2).

Der Hauptteil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung und Charakterisierung der drei Enzyme aus dem Wehrreservoir der Pappelblattkäferlarven, die an der Bildung des Wehrsekrets beteiligt sind. Von besonderem Interesse war dabei jedoch die Charakterisierung der Oxidase, da diese neben den ubiquitär vorkommenden Enzymen der β -Glucosidase und Katalase als einziges spezifisches Enzym der Wehrsekretsynthese gilt (3.1). Nur durch die Analyse dieses an der Wehrsekretsynthese beteiligten spezifischen Enzyms und der anschließende Vergleich mit anderen aus dem Wehrreservoir stammenden Oxidasen verschiedener Arten können Rückschlüsse auf die evolutive Entwicklung der Wehrsekretsynthese gezogen werden.

4.1 Identifizierung und Charakterisierung der SAO aus *C. tremulae* und *C. populi*

Während das cDNA-Transkript der CtSAO bereits von Mohagheghi vollständig identifiziert wurde, lag das cDNA-Transkript der CpSAO nur als Teilsequenz vor (Mohagheghi, 2007). Die Vervollständigung der Sequenz gelang im Rahmen dieser Arbeit durch Anwendung der 5'RACE-Technik (3.2.1). Nach Analyse der Aminosäuresequenzen beider Transkripte mit SignalP3.0 konnte jeweils ein Signalpeptid von 21 Aminosäuren vorhergesagt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Analysen von Brückmann (2002a) überein, der durch Mikrosequenzierung der nativen SAO aus *C. populi* den N-Terminus bestimmen konnte. Das Vorhandensein eines Signalpeptids war der erste Hinweis darauf, dass es sich bei den identifizierten cDNA-Transkripten um die gesuchten Sequenzen handelt, da die SAOs extrazellulär aktive Enzyme sind, die zur Translokation ein Signalpeptid benötigen. Die cDNA-Transkripte der CtSAO und CpSAO weisen eine Identität von 90,5% auf, die korrespondierenden Aminosäuresequenzen eine Identität von 91,9%. Zur heterologen Expression wurden beide cDNA-Transkripte in den pET-22b(+)-Vektor kloniert und in *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen zur Expression gebracht. Die Expression beider Enzyme resultierte unter verschiedensten Bedingungen in *inclusion bodies* (3.1.2). Die Bildung unlöslicher *inclusion bodies* wurde bereits bei der Expression einer Oxidase, der menschlichen Lysyl-Oxidase, unter Verwendung eines pET-Vektors mit *E. coli*-BL21(DE3)-Zellen beobachtet (Kim et al., 2003). Da es sich bei den hier untersuchten SAOs sowie der

menschlichen Lysyl-Oxidase um Proteine handelt, die *in vivo* in eukaryontischen Zellen exprimiert werden, ist die Bildung von *inclusion bodies* der rekombinanten Proteine vermutlich damit zu erklären, dass es sich bei dem verwendeten Expressionssystem um einen prokaryontischen Organismus handelt. Daher wirkt die Temperatur von 37°C, die üblicherweise zur heterologen Expression in *E. coli*-Zellen verwendet wird, häufig auf ursprünglich eukaryontische Proteine denaturierend. Von Schein und Noteborn (1988) wurde berichtet, dass bei der Expression von humanen Interferonen eine Senkung der Temperatur auf 30°C einen Anstieg der Löslichkeit der exprimierenden Proteinen bewirken kann. Aus diesem Grund wurde bei der Expression der CtSAO die Temperatur schrittweise bis auf 15°C reduziert (3.1.2). Dennoch konnte nicht erreicht werden, dass die CtSAO bei niedrigeren Temperaturen in löslicher Form exprimiert wurde. Ein weiterer Unterschied liegt darin, dass heterolog exprimierte Proteine in *E. coli*-Zellen aufgrund des reduzierenden Milieus des Cytoplasmas keine Disulfidbrücken bilden können, die eventuell für Proteine aus eukaryontischen Organismen für die richtige Faltung essentiell sind (Wilkinson and Harrison, 1991).

Erst die Zuhilfenahme der Chaperone GroEL und GroES als Faltungshelfer führte zur Expression löslicher SAOs (3.1.4 und 3.2.4). Wie bereits in Kapitel 3.1.4 erwähnt werden nach Roseman *et al.* (1996) vermutlich nur Proteine mit einer maximalen Größe von 60 kDa in die Faltungskammer von GroEL aufgenommen und in die korrekte Konformation gebracht. Im Widerspruch dazu belegten Dubaquié *et al.* (1998), dass *in vivo* GroEL und GroES auch einen Einfluss auf die Löslichkeit größerer Proteine (60 – 90 kDa) haben. Das Chaperon GroEL besteht aus zwei übereinanderliegenden Ringen, die aus je sieben identischen Untereinheiten zusammengesetzt sind (Bukau and Horwich, 1998). In die Hohlräume der beiden Ringe können missgefaltete Proteine aufgenommen werden. Nach Einlagerung verschließt GroES, das ebenfalls aus sieben Untereinheiten besteht, den Hohlraum und dient so als Deckel. Durch Verschluss der Kammer ist das missgefaltete Protein nicht mehr in der Lage mit anderen Proteinen zu agglomerieren, wodurch die Möglichkeit gegeben ist die richtige Faltung einzunehmen. Auslöser der Reaktion ist die Anlagerung von GroES an GroEL, wodurch der Ring eine Konformationsänderung erfährt. Dadurch vergrößert sich das Volumen der Faltungskammer, die Bindung zwischen Kammer und missgefaltetem Protein wird aufgehoben und gleichzeitig das Protein entfaltet (Shtilerman *et al.*, 1999). Das zuvor missgefaltete Protein kann sich erneut falten. Einige Proteine durchlaufen mehrere Zyklen von Bindung und Freisetzung, bis die korrekte Konformation erhalten wird. Aufgrund dieses Mechanismus gelang es die beiden Proteine CtSAO und CpSAO in löslicher Form zu erhalten (3.1.4 und 3.2.4).

4.1.1 Biochemische Charakterisierung der CtSAO und CpSAO

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Substratspezifität der rekombinanten CtSAO (3.1.6) und der rekombinanten CpSAO (3.2.6) ermittelt. So kann an dieser Stelle ein biochemischer Vergleich der beiden Enzyme untereinander sowie mit der nativen SAO aus *C. populi* (Brückmann, 2002b) vorgenommen werden (Tabelle 70).

Die Substratspezifitäten der rekombinanten Enzyme CtSAO und CpSAO zeigen keine essentiellen Unterschiede. Auffällig ist jedoch, dass Benzylalkohol von der rekombinanten CpSAO prozentual weniger umgesetzt wird als von den beiden anderen Enzymen. Die geringe Fähigkeit der SAO die Reaktion von Benzylalkohol zu Benzaldehyd zu katalysieren, könnte für das Vorkommen von Spuren an Benzaldehyd im Wehrsekret von *C. populi* verantwortlich sein (Brückmann, 2002a). Ebenso konnte für *Chrysomela*-Arten, die auf der Sal-Weide (*Salix caprea*) leben, Spuren von Benzaldehyd im Wehrsekret nachgewiesen werden (Termonia and Pasteels, 1999). Mittels GC-MS-Analyse des Wehrsekrets von *C. vigintipunctata costella* wurde festgestellt, dass dort Benzaldehyd und Salicylaldehyd in einem Verhältnis von 1:10 vorliegen (Matsuda and Sugawara, 1980). Inwiefern sich die Aktivität der nativen SAOs unterschiedlicher *Chrysomela*-Arten gegenüber Benzylalkohol unterscheidet und ob der Gehalt an Benzaldehyd im Wehrsekret von der Konzentration an Benzylalkohol in der Futterpflanze abhängt, bleibt zu untersuchen. Während das Benzaldehyd in den *Chrysomela*-Arten neben dem Salicylaldehyd eine untergeordnete Rolle hinsichtlich der Abwehrfunktion zu spielen scheint, ist Benzaldehyd neben Blausäure der Hauptbestandteil im Wehrsekret von Käferlarven der Gattung *Paropsis* (Moore, 1966). Das parallele Vorkommen von Blausäure und Benzaldehyd im Wehrsekret lässt darauf schließen, dass es durch den Zerfall von Amygdalin entsteht, welches wiederum aus der Aminosäure Phenylalanin gebildet wird (Towers et al., 1972). Da Phenylalanin zu den essentiellen Aminosäuren gehört, die mit der Nahrung aufgenommen werden müssen (House, 1962), kann man auch hier von einer wirtspflanzenabhängigen Wehrsekretsynthese sprechen.

Ein weiterer signifikanter Unterschied besteht in der Akzeptanz von 2-Phenylethylalkohol. Die rekombinanten Enzyme setzen wesentlich weniger 2-Phenylethylalkohol zu 2-Phenylethanal um, als die native SAO aus *C. populi*. Allgemein zeichnet sich die Tendenz ab, dass alle SAOs eine höhere Affinität zu *ortho*-substituierten Derivaten aufweisen als zu *meta*- und *para*-substituierten Derivaten. Die Ergebnisse zeigen im Wesentlichen, dass ausgewählte biochemische Eigenschaften der beiden rekombinanten Enzyme CtSAO und CpSAO mit denen der nativen SAO aus *C. populi* übereinstimmen und dass die SAO eine deutlich höhere Affinität zu Salicylaldehyd aufweist als zu anderen Substraten (Tabelle 70).

Tabelle 70: Vergleich der Substratspezifitäten der rekombinanten CtSAO und CpSAO mit der nativen SAO aus *C. populi*. Substrate, die nicht umgesetzt wurden, sind mit n.d. (nicht detektierbar) aufgeführt.

Substrat	Relative Aktivität [%]		
	CpSAO		CtSAO
	nativ	rekombinant	rekombinant
2-Hydroxybenzylalkohol (Salicylalkohol)	100	100	100
3-Hydroxybenzylalkohol	<10	13,1	16,2
4-Hydroxybenzylalkohol	n.d.	0,9	2,7
Benzylalkohol	23	12,2	23,2
2-Methylbenzylalkohol	21	19,1	21,9
3-Methylbenzylalkohol	n.d.	n.d.	n.d.
4-Methylbenzylalkohol	n.d.	0,4	n.d.
2-Methoxybenzylalkohol	14	3,2	2,3
3-Methoxybenzylalkohol	<10	2,5	1,0
4-Methoxybenzylalkohol	n.d.	n.d.	n.d.
2-Phenylethylalkohol	21	3,8	1,2

Aufgrund der Ergebnisse der Substratspezifität wurden die K_M -Werte mit Salicylalkohol als Substrat bestimmt (3.1.5 und 3.2.5). Die identifizierten K_M -Werte nach Lineweaver-Burk von 46,4 mM für CtSAO und 29,8 mM für CpSAO sind vergleichsweise hoch (Tabelle 71), korrespondieren jedoch mit der vorliegenden Substratkonzentration von 30 mM im Wehrreservoir (Brückmann, 2002a). Der Vergleich der rekombinanten SAOs mit der nativen SAO aus *C. populi* (Brückmann, 2002b) zeigt, dass der K_M -Wert der nativen SAO deutlich höher liegt als der der rekombinanten SAOs. Dies könnte darauf beruhen, dass bei Brückmann (2002a) die Analysen mit einer Enzymlösung eines Ammoniumpräzipitats durchgeführt wurden, was eventuell zu einem Aktivitätsverlust der nativen SAO führte.

Tabelle 71: Vergleich der K_M -Werte nach Lineweaver-Burk der SAOs mit anderer Oxidasen

Oxidase	Substrat	K_M-Wert	Quelle
Native SAO aus <i>C. populi</i>	Salicylalkohol	132 mM	Brückmann, 2002b
Rekombinante SAO aus <i>C. populi</i> (CpSAO)	Salicylalkohol	29,8 mM	Kapitel 3.2.5
Rekombinante SAO aus <i>C. tremulae</i> (CtSAO)	Salicylalkohol	46,4 mM	Kapitel 3.1.5
Glucose-Oxidase aus <i>Aspergillus niger</i>	D-Glucose	2,56 mM	Zia et al., 2007
Xanthin-Oxidase aus der Leber von Ratten, Mäusen, Kaninchen und Meerschweinchen	Benzaldehyd	5,32-18,8 μ M	Kadam and Iyer, 2008
Cholin-Oxidase aus <i>Arthrobacter globiformis</i>	Cholin	0,6 mM	Fan et al., 2004
Monoamin-Oxidase aus Schweine-, Rinder- und Rattenleber	primäre Amine	200-300 μ M	Tipton, 1973

Der K_M -Wert stellt ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat dar. Je niedriger der K_M -Wert ist, desto höher ist die Affinität des Enzyms zum Substrat. Aufgrund der sehr hohen K_M -Werte der SAO liegt die Vermutung nahe, dass Salicylalkohol nicht das geeignete Substrat für die SAOs ist, was jedoch durch die Analyse der Substratspezifitäten (Tabelle 70) ausgeschlossen werden konnte. Bei Betrachtung der physiologischen Bedingungen der SAOs in der Wehrdrüse wird deutlich, dass das Substrat Salicylalkohol durch kontinuierliche Futteraufnahme auf einem hohen Level von ca. 30 mM gehalten wird (Brückmann, 2002a). Zudem wird das Produkt Salicylalkohol konstant aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt. Salicylaldehyd besitzt eine geringe Löslichkeit in Wasser und bildet im Wehrreservoir eine eigene organische Phase. Dadurch wird es aus dem wässrigen Reaktionsgemisch entfernt und wirkt dem Massenwirkungsgesetz entgegen. Aufgrund der hohen Substratkonzentration und der steten Entfernung des Produktes aus dem Reaktionsgleichgewicht ist eine hohe Affinität der SAOs zu Salicylalkohol nicht zwingend erforderlich.

Durch die Abtrennung des Salicylaldehyds in eine eigene organische Phase kann eine hohe Konzentration der Wehrsubstanz von 950 mM erzielt werden (Brückmann, 2002a). So stellt das Wehrreservoir einen effizienten Reaktor zur Bildung der Wehrsubstanz dar. Die hohe Konzentration in der organischen Phase verhilft den Larven zu einer effektiven Abwehr, denn das Salicylaldehyd kann auf diese Weise schnell in die Gasphase übergehen und potentielle Angreifer abwehren. Würden die Larven ein rein wässriges Wehrsekret ausstülpen, das nur geringe Mengen an Salicylaldehyd enthält, wäre dieser Effekt nicht gewährleistet.

Darüber hinaus wurde versucht die CtSAO im eukaryontischen *K. lactis*-Expressionssystem zu exprimieren (3.1.7.1), um die posttranslationalen Modifikationen in Form von Zuckerketten zu erhalten. Damit sollte erreicht werden, dass die Struktur des rekombinant exprimierten Proteins dem nativen näher kommt, und es sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Zuckerketten auf das Protein haben. Da die heterologe Expression in *K. lactis* erfolglos blieb, kann an dieser Stelle keine konkrete Aussage darüber getroffen werden. Da jedoch der K_M -Wert der rekombinanten CtSAO, die keine Zuckerketten enthält, mit dem der nativen SAO aus *C. populi* keinen signifikanten Unterschied aufweist, ist davon auszugehen, dass die Zuckerketten keinen relevanten Einfluss auf die Aktivität des Proteins haben. Möglicherweise bieten die Zuckerketten eine Art „Schutzschirm“ für das Protein, damit es bei Kontakt mit der organischen Phase des Wehrsekrets nicht denaturiert.

Anhand der heterologen Expression der cDNA-Transkripte von CtSAO und CpSAO2 mit anschließender biochemischer Charakterisierung der Enzyme konnte im Rahmen dieser Arbeit zweifelsfrei belegt werden, dass es sich bei den identifizierten cDNA-Transkripten um die gesuchte genetische Information der Salicylalkohol-Oxidase aus *C. tremulae* und *C. populi* handelt. Diese Ergebnisse erlaubten weitere Analysen der cDNA-Sequenzen.

4.1.2 Ursprung und Entwicklung der CtSAO und CpSAO

Nach Eingabe der Aminosäuresequenzen der CtSAO und CpSAO in BLAST wird vorhergesagt, dass die beiden Enzyme in die Enzymfamilie der Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktasen (GMC) einzuordnen sind, was durch homologe Bereiche von Alignments verschiedener GMC-Sequenzen mit den hier untersuchten bestätigt werden konnte. Diese Tatsache vermutete bereits Mohagheghi (2007), da auch der Vergleich mit BLAST der mittels ESI-MS/MS identifizierten Peptidsequenzen aus dem Wehrsekret von *C. tremulae* einen Hinweis auf die GMCs gab. Die Familie der GMCs wurde erstmals von Cavener beschrieben (Cavener, 1992). Cavener entdeckte, dass eine Glucose-Dehydrogenase aus *Drosophila melanogaster*, eine Methanol-Oxidase aus den Hefen *Hansenula polymorpha* und *Pichia pastoris*, eine Glucose-Oxidase aus *Aspergillus niger* sowie eine Cholin-Dehydrogenase aus *E. coli*-Zellen eine hohe Homologie zueinander aufweisen. Entsprechend den Substraten dieser Enzyme wurden sie zur Familie der Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktasen zusammengefasst, bei der es sich ausschließlich um Flavoproteine handelt. Charakteristisch für diese Enzyme ist eine Sequenz von 30 Aminosäuren am *N*-Terminus, die die ADP-Bindestelle darstellt. Neben der hoch konservierten ADP-Bindestelle zeigen die übrigen Aminosäuresequenzbereiche der Enzyme, die strukturell unterschiedliche Substrate erkennen, erstaunlicherweise ebenfalls eine Homologie auf. Paarweise Identitäten variieren zwischen 23 und 32%. Die Familie der GMCs spiegelt nach Cavener die Flexibilität der Evolution wider. Er vermutet, dass alle Enzyme, die zur Familie der

GMCs gehören, den gleichen Ursprung haben. Das ursprüngliche Enzym konnte wahrscheinlich eine Vielzahl an Substraten erkennen, die jedoch eine geringe Umsatzrate erfahren haben. Im Laufe der Evolution wurde dieses Enzym vermutlich durch Mutationen gezielt an unterschiedliche Substrate angepasst, die nun selektiv mit hoher Rate umgesetzt werden können (Cavener, 1992). In den wenigsten Fällen führt eine Genduplikation mit anschließender Mutation zu einem funktionsfähigen Protein mit angepasster Aufgabe. Für die CtSAO und CpSAO2 wird dies vermutet, ein weitaus besser untersuchtes Enzym hinsichtlich der Entstehung ist dahingegen die pflanzliche Homospermidin-Synthase (HSS). Die HSS wurde als erstes spezifisches Enzym der PA-Biosynthese von Böttcher (1993) identifiziert und katalysiert die Bildung von Homospermidin aus Spermidin und Putrescin. Sie weist eine hohe Identität zur Desoxyhypusin-Synthase (DHS) auf, die keinen Bezug zur PA-Biosynthese hat (Ober and Hartmann, 1999b). Die DHS ist ein Enzym des Primärstoffwechsels, das zwei unterschiedliche Reaktionen katalysieren kann. Ihre Hauptaufgabe ist die Aminobutylierung des eukaryontischen Initiationsfaktors 5A (eIF5A). Daneben vermag sie mit annähernd gleicher Spezifität wie die HSS Homospermidin aus Spermidin und Putrescin zu bilden (Ober et al., 2003; Ober and Hartmann, 1999a). Die hohe Sequenz-Identität der DHS und HSS sowie deren nahezu identischen kinetischen Eigenschaften deuten darauf hin, dass die HSS aus einer Genduplikation einer DHS entstanden ist. Infolge von Mutationen verlor die HSS die Eigenschaft eIF5A als Substrat zu binden und wurde dadurch dem Primärstoffwechsel entzogen. Die Bildung von Homospermidin wurde so zur Hauptaufgabe der HSS und damit Bestandteil der Biosynthese von Fraßschutz-Verbindungen, die dem Selektionsdruck von Herbivoren unterliegen (Ober and Hartmann, 2000). Interessanterweise konnte belegt werden, dass die HSS im Laufe der Evolution mindestens viermal unabhängig voneinander innerhalb der Angiospermen aus der DHS hervorgegangen ist (Nurhayati et al., 2009; Reimann et al., 2004).

Der Prozess der Genduplikation gehört neben der Genomduplikation zu den wichtigsten Mechanismen, die das Genom im Laufe der Evolution umwandeln. Auf diese Weise können Genome wachsen und ihre Funktion erweitern. Durch die Genmutation können neue Aufgaben übernommen werden, wie das Beispiel der Evolution der HSS eindrucksvoll belegt (Ober and Kaltenecker, 2009).

Neben der Ähnlichkeit der Primärstrukturen der GMC-Sequenzen konnte ebenfalls eine Ähnlichkeit von 3D-Kristallen der Enzyme ermittelt werden. Die 3D-Strukturen einer Cholesterol-Oxidase (Vrielink et al., 1991) und einer Glucose-Oxidase (Hecht et al., 1993), die beide zur Familie der GMCs gehören, weisen strukturelle Ähnlichkeiten zur 3D-Struktur des Flavoenzyms *p*-Hydroxybenzoat-Hydroxylase (PHBH) auf, die erstmals von Wierenga *et al.* (1979) beschrieben wurde. Die 3D-Struktur der PHBH zeigt 2 Hauptdomänen, wovon eine die FAD-Bindestelle darstellt. Der im Gegensatz zur

FAD-Bindestelle variable C-Terminus bildet das katalytische Zentrum, an das jeweils die unterschiedlichen Substrate binden (Kiess et al., 1998).

Seit Entdeckung der GMC-Familie konnte eine Fülle an Sequenzen anhand der Homologie dieser Familie zugeordnet werden. Dies veranlasste Zamocky und Mitarbeiter die Sequenzen durch phylogenetische Untersuchungen in Gruppen einzuteilen (Zamocky et al., 2004). Es resultierten 11 Gruppen, deren Substrate eine große Bandbreite aufweisen. Das Vorkommen der GMCs reicht von Bakterien, Pflanzen und Pilzen bis hin zum Menschen. Die verblüffende Ähnlichkeit der Sequenzen verschiedener Organismen regte zu weiteren Untersuchungen an.

In Anlehnung an die Studie von Zamocky *et al.* analysierten Iida und Mitarbeiter Sequenzdaten von Insekten, deren Genome bereits vollständig sequenziert sind (Iida et al., 2007). Die gezielte Suche nach GMC-ähnlichen Sequenzen bei *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera* und *T. castaneum* zeigte, dass die Mehrheit aller GMC-Sequenzen eines Organismus in einem hoch konservierten Gencluster liegen. Dieses Gencluster befindet sich wiederum in einem Intron des *flotillin-2* (*Flo-2*)-Gens, wobei die GMC-Gene, bis auf Ausnahmen, die entgegengesetzte Transkriptionsrichtung zum *Flo-2*-Gen einnehmen. *Flo-2* codiert für das „lipid raft“ Flotillin-2, das eine cholesterinreiche Mikrodomäne in Zellmembranen bildet, welches u.a. an der Signaltransduktion beteiligt ist (Bickel et al., 1997; Lang et al., 1998). Ein Vergleich der Gencluster untereinander zeigt, dass die Unterfamilien interessanterweise häufig die gleiche Position in jedem Gencluster einnehmen (Abbildung 28). Beispielsweise sind von den 23 GMC-Sequenzen aus *T. castaneum* 12 Sequenzen in dem Gencluster lokalisiert, während 11 Sequenzen ausserhalb dieses Clusters zu finden sind.

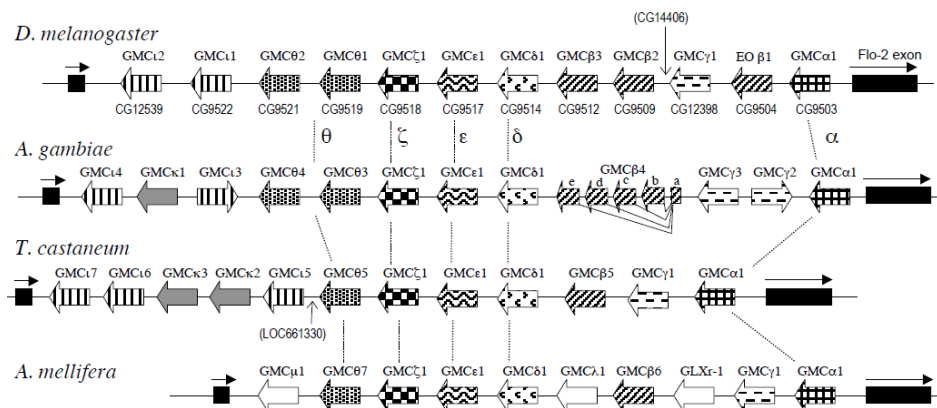


Abbildung 28: Vergleich der GMC-Gencluster von *D. melanogaster*, *A. gambiae*, *T. castaneum* und *A. mellifera* (Iida et al., 2007). Die kodierende Region des *Flo-2*-Gens ist durch einen schwarzen Kasten dargestellt, wobei der darüberliegende Pfeil die Transkriptionsrichtung angibt. Die Transkriptionsrichtung der GMC-Gene ist durch Blockpfeile gekennzeichnet. Die einzelnen GMC-Unterfamilien sind durch unterschiedliche Musterung der Blockpfeile gekennzeichnet. Die im Gencluster hoch konservierten Unterfamilien GMCα, GMCδ, GMCε, GMCζ und GMCθ sind durch eine gestrichelte Linie verbunden. Die Positionen von Genen, die nicht zur Familie der GMCs gehören, aber dennoch in diesem Cluster lokalisiert sind, sind mit vertikalen Pfeilen bei *D. melanogaster* und *T. castaneum* angedeutet.

Mit der Erkenntnis des Vorhandenseins der GMC-Unterfamilien wurde im Rahmen dieser Arbeit eine *neighbor-joining* Phylogenie erstellt (Abbildung 29), für deren Berechnung alle 23 GMC-Sequenzen aus *T. castaneum* sowie die cDNA-Transkripte der CtSAO und CpSAO und das cDNA-Transkript der GMCs aus *C. tremulae* verwendet wurden. Wie aus Abbildung 29 ersichtlich ist, werden die CtSAO und CpSAO der Unterfamilie der iota-GMCs (ι GMCs) zugeordnet, die innerhalb des Genclusters lokalisiert sind (Abbildung 28). Mit der Annahme, dass dieses Gencluster auch bei den hier untersuchten *Chrysomela*-Arten vorhanden ist, ist es wahrscheinlich, dass die CtSAO und CpSAO durch Genduplikation aus einer ι GMC-Sequenz dieses Clusters hervorgegangen sind.

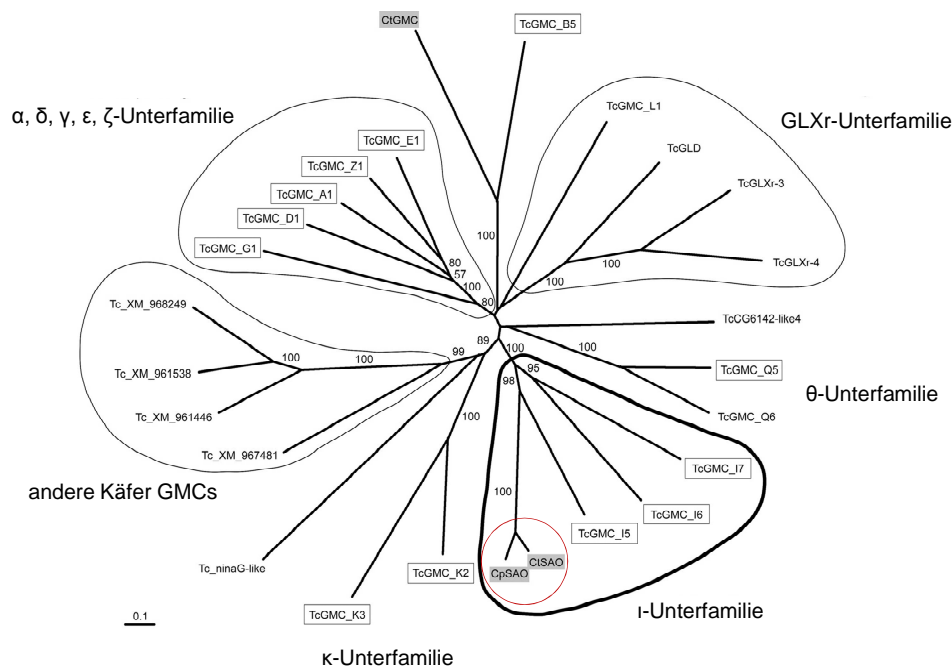


Abbildung 29: Neighbor-joining Phylogenie der GMC-Sequenzen aus *T. castaneum* mit den cDNA-Transkripten der CtSAO und CpSAO. Die Phylogenie verdeutlicht die Gruppierung der einzelnen GMCs in ihre Unterfamilien, die jeweils mit griechischen Buchstaben nach Iida *et al.* (2007) benannt sind. Die cDNA-Transkripte der CtSAO und CpSAO, die mit einem grauen Kasten gekennzeichnet und durch einen roten Kreis hervorgehoben sind, lassen sich anhand der Phylogenie eindeutig der Unterfamilie der ι GMCs zuordnen. Die dritte Sequenz CtGMC, die durch einen grauen Kasten markiert ist, ist das cDNA-Transkript einer GMC-Sequenz aus *C. tremulae*, die von Mohagheghi (2007) identifiziert wurde. Diese Sequenz kann vermutlich bei den β GMCs eingeordnet werden (4.1.5).

4.1.3 Funktionen weiterer GMC-Sequenzen unterschiedlicher Organismen

Anhand der Genomanalyse unterschiedlicher Insekten konnte gezeigt werden, dass in *D. melanogaster* und *A. gambiae* 15 GMC-Sequenzen, in *A. mellifera* 18 sowie in *T. castaneum* 23 GMC-Sequenzen zu finden sind (Iida *et al.*, 2007). Trotz der Fülle der Sequenzen konnten bislang nur vier Sequenzen funktionell charakterisiert werden.

Eine bereits identifizierte GMC-Sequenz ist eine Glucosedehydrogenase aus *D. melanogaster*, die nach der Paarung für die Speicherung der Spermien in den Weibchen essentiell ist (Iida and Cavener, 2004). Nach der Spermienübertragung werden ca. 20-25% der Spermien im Rezeptakulum und in der Spermathek für 2-3 Wochen gespeichert und kontinuierlich verbraucht (Lefevre and Jonsson, 1962). Dabei dient die Spermathek zur Langzeitlagerung. Sie ist mit Drüsenzellen ausgekleidet, die ein Sekret zu den Spermien sezernieren, das unter anderem eine Glucosedehydrogenase enthält (Schiff et al., 1992). Zudem konnte gezeigt werden, dass auch die Männchen eine Glucosedehydrogenase mit der Samenflüssigkeit in den Samenausführungsgang sezernieren, welche ebenfalls Einfluss auf die Samenspeicherung ausübt (Neubaum and Wolfner, 1999). Welche katalytische Funktion die Glucosedehydrogenase aus den Fortpflanzungsorganen von *D. melanogaster* besitzt, bleibt unbekannt. Dennoch konnte gezeigt werden, dass weibliche Mutanten, denen die Fähigkeit zur Bildung der Glucosedehydrogenase entzogen wurde, wesentlich weniger Spermien in der Spermathek speichern und schlechter auf diese zurückgreifen konnten als der Wildtyp (Iida and Cavener, 2004). Interessant ist, dass die Expression der Glucosedehydrogenase durch Ecdyson reguliert wird (Murtha and Cavener, 1989), welches wiederum durch eine bereits identifizierte GMC, die Ecdysonoxidase, gebildet wird (4.1.5.1).

Eine weitere charakterisierte GMC ist die Glucoseoxidase aus der Hypopharyxdrüse der Honigbiene *A. mellifera* (Ohashi et al., 1999), ein Enzym, das zur Umwandlung von Nektar in Honig benötigt wird. Des Weiteren konnten Sarfare et al. (2005) zeigen, dass das Gen *ninaG* aus *D. melanogaster* für eine Oxidoreduktase aus der GMC-Familie kodiert, das an der Bildung von 3-Hydroxyretinal, einem Sehpigment der Photorezeptoren, beteiligt ist. Welche Rolle genau die *ninaG*-Oxidoreduktase in diesem Prozess spielt, ist jedoch noch nicht geklärt (Ahmad et al., 2006). Mit der Identifizierung und Charakterisierung der SAO aus *C. tremulae* und *C. populi* konnten zwei weitere Vertreter der GMC-Familie beschrieben werden (4.1.2), womit ein weiteres Mal die Vielfältigkeit der katalytischen Aktivität von GMCs gezeigt werden konnte.

4.1.4 Identifizierung einer weiteren SAO aus *C. populi*

Die Sequenzanalyse der 5'-RACE-Amplifikate der CpSAO (3.2.1) führte neben der CpSAO2 zu einer zweiten Sequenz, die CpSAO1 genannt wurde. CpSAO1 unterscheidet sich von CpSAO2 in nur einer Aminosäure. CpSAO2 besitzt nach der 53. Aminosäure die zusätzliche Aminosäure Valin. Dementsprechend weist das cDNA-Transkript der CpSAO2 ein Basentriplet mehr auf als das der CpSAO1. Ein Fehler der verwendeten Polymerase zur Amplifizierung des Transkriptes sowie eine fehlerhafte Sequenzierung konnten eindeutig ausgeschlossen werden. Denn das Vorhandensein beider Transkripte konnte sowohl bei der Identifizierung des 5'-Endes, als auch bei der Amplifizierung

der *full-length*-Sequenzen und damit in unterschiedlichen PCR-Reaktionen belegt werden (3.2.2). Die Klonierung und Expression beider Sequenzen erfolgte auf identische Weise mit dem pET-22b(+)-Vektor in *E. coli*-Zellen. Durch Coexpression der Chaperone GroEL und GroES konnten CpSAO1 und CpSAO2 in löslicher Form erhalten werden (3.2.4). Während sich CpSAO2 eindeutig aktiv zeigte, konnte für CpSAO1 keine Aktivität nachgewiesen werden (3.2.5). Der geringe Sequenzunterschied sowie das Ausbleiben der Aktivität deuten darauf hin, dass es sich beim cDNA-Transkript der CpSAO1 um ein Pseudogen handeln könnte. Der Begriff Pseudogen wurde erstmals von Jacq *et al.* (1977) geprägt und beschreibt Gene, die nicht mehr für ein funktionelles Protein kodieren. Anhand der Entstehung können Pseudogene in zwei Gruppen unterteilt werden:

- Duplizierte Pseudogene: Sie entstehen bei der Verdopplung des Erbgutes, bei der es vorkommen kann, dass von einem Gen eine Kopie zuviel erstellt wird, die an einer anderen Stelle im Genom eingebaut wird. Es handelt sich um ein Gen mit Exons und Introns, das im Laufe der Zeit durch Mutationen funktionslos wurde.
- Prozessierte Pseudogene: Sie werden durch reverse Transkription einer RNA in DNA gebildet, die sich in das Genom einlagert. Diese Pseudogene enthalten keine Introns (Vanin, 1985).

Nach Ohno (1970) übernimmt das Duplikat nach Genduplikation eine neue Funktion (Neofunktionalität) oder verliert seine Funktionalität (Pseudogen), wie es vermutlich bei der CpSAO1 der Fall ist. Darüber hinaus vermutete Ohno, dass die Bildung von Pseudogenen häufiger vorkommt als die Neofunktionalität und dass duplizierte Gene im Laufe der Evolution oftmals wieder verloren gehen (Ohno, 1970). Nach neueren Erkenntnissen reicht diese Theorie alleine nicht aus, denn die Anzahl an duplizierten Genen, die im Laufe der Evolution entstanden sind, ist höher, als es die Theorie von Ohno vorhersagt, und oft bleiben diese auch erhalten (Force *et al.*, 1999). Daher erweiterten Hughes (1994) und Force (1999) das klassische Modell um das Duplikations-Degenerations-Komplementations-Modell, welches besagt, dass die Bewahrung des duplizierten Gens dadurch bestärkt wird, dass nun Ursprung und Tochtergen zusammen an einer Funktion beteiligt sind, die das Ursprungsgen vor Genduplikation alleine bewältigte. Dieser Vorgang wird auch als Subfunktionalität bezeichnet. Voraussetzung für diesen Vorgang ist jedoch, dass es sich bei dem Ursprungsgen um ein bifunktionales Gen handelt (Ober, 2010).

Auf welche Weise das putative Pseudogen gebildet wurde, dem das cDNA-Transkript der CtSAO1 zugrunde lag, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Dazu bedarf es der Untersuchung der genomischen DNA. Es ist wahrscheinlich, dass die Transkription vom Gen in mRNA stattfindet, da diese aus den Larven isoliert und in cDNA umgeschrieben wurde, jedoch ist eine Kontamination mit

genomischer DNA nicht komplett auszuschließen. Diese *in vitro* umgeschriebenen cDNA dienten als Template einer Standard-PCR, in der das cDNA-Transkript der CpSAO1 amplifiziert werden konnte (3.2.1). Ob *in vivo* die Translation des Enzyms CpSAO1 stattfindet, bleibt zu diesem Zeitpunkt ebenso unklar wie die Frage, ob *in vivo* die CpSAO1 tatsächlich funktionslos ist.

4.1.5 Identifizierung einer weiteren GMC-homologen Sequenz aus *C. populi*

Iida *et al.* (2007) haben durch Untersuchungen von Sequenzen, die aus der Genomanalyse verschiedener Insekten hervorgegangen sind, gezeigt, dass ein Gencluster existiert, das mehrere Unterfamilien der GMC-Sequenzen beherbergt (Abbildung 28). Da die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten cDNA-Transkripte der CtSAO und CpSAO2 in die Unterfamilie der ι GMCs eingeordnet werden konnten, liegt die Vermutung nahe, dass ein solches Gencluster auch in den *Chrysomela*-Arten existiert. Um weitere Hinweise auf das Vorhandensein mehrerer GMC-Sequenzen zu erhalten, wurde die Gesamt-RNA aus den Larven isoliert und in cDNA umgeschrieben (3.3). Der cDNA-Pool wurde als Template für Standard-PCRs eingesetzt, die mit einem degeneriertem Primer durchgeführt wurde. Als Vorlage dieses degenerierten Primers diente ein hoch konservierter Bereich eines Alignments von GMC-Sequenzen aus Insekten und Hefen (Mohagheghi, 2007). Die Sequenzanalyse der erhaltenen Amplifikate führte zu einer weiteren GMC-homologen Sequenz aus *C. populi*, die zu 69% identisch ist mit dem cDNA-Transkript der CpSAO2. Phylogenetische Untersuchungen zeigten, dass diese Sequenz der κ GMC-Unterfamilie nach Iida *et al.* (2007) zugeordnet werden kann (Abbildung 30). Bereits Mohagheghi (2007) konnte mit diesem Primer eine weitere GMC-Sequenz aus *C. tremulae* identifizieren, die nach eigener phylogenetischer Analyse vermutlich der β GMC-Unterfamilie nach Iida *et al.* (2007) angehört (Abbildung 29). Welche Funktionen die β GMC und κ GMCs aus *T. castaneum* besitzen, ist nicht bekannt, da die Sequenzen durch die Genomanalyse identifiziert wurden. Bislang liegen keine Erkenntnisse darüber vor, ob die Sequenzen transkribiert und translatiert werden und welche Funktionen die putativen Proteine übernehmen. Auch wenn das Vorhandensein einer weiteren GMC-Sequenz aus einer Unterfamilie des Genclusters aus *T. castaneum* die Hypothese bekräftigt, dass dieses Gencluster auch in den *Chrysomela*-Arten vorhanden ist, ist für die eindeutige Identifizierung eines GMC-Clusters die Genomsequenzierung unabdingbar.

4.1.5.1 Gewebespezifische Lokalisation GMC-homologer Sequenzen

Über die Funktion der identifizierten CpGMC lag nach Datenbankvergleich (3.3) keine Erkenntnis vor. Um weitere Information über die CpGMC zu erhalten, wurde der Expressionsort mittels gewebespezifischer RT-PCRs analysiert (3.3.1). Parallel wurde der Expressionsort des cDNA-

Transkriptes der CpSAO2 verifiziert. Wie zu erwarten konnte belegt werden, dass der Expressionsort des cDNA-Transkriptes der CpSAO2 der Wehrapparat ist (Abbildung 18). Ein Amplifikat der RT-PCR nach Vorlage von cDNA aus dem Exoskelett lässt darauf schließen, dass das Exoskelett nicht rückstandsfrei von den Wehrapparaten getrennt werden konnte. Anhand der durchgeführten RT-PCRs konnte gezeigt werden, dass das cDNA-Transkript der CpGMC im Exoskelett exprimiert wird (Abbildung 18), wobei die Stärke der Expression vom 1. bis zum 3. Larvenstadium kontinuierlich abnimmt (Abbildung 19).

Das Vorkommen des cDNA-Transkriptes der CpGMC im Exoskelett der Larven sowie die stete Abnahme mit dem Larvenalter legen die Vermutung einer Beteiligung der CpGMC am Ecdysteroid-Stoffwechsel nahe. Ecdysteroiden, die auch als Häutungshormone bezeichnet werden, werden in den Prothoraxdrüsen der Larven gebildet (Chino et al., 1974). Ecdyson, eines dieser Steroide, gelangt in die Epidermiszellen der Larven, wo es zu 20-Hydroxyecdysone hydroxyliert wird. 20-Hydroxyecdysone gilt als aktivstes Häutungshormon (Rees, 1995). Die Larvenentwicklung hängt von dem Mengenverhältnis zwischen 20-Hydroxyecdysone und dem Juvenilhormon ab. Sind beide Hormone zu gleichen Teilen in den Epidermiszellen vorhanden, werden diese zur Synthese eines neuen Exoskeletts angeregt. Die Anwesenheit von 20-Hydroxyecdysone stimuliert die Bildung des Hormons Bursicon, das wiederum die Aushärtung des neuen Exoskeletts bewirkt (Dewey et al., 2004; Fraenkel and Hsiao, 1962). Mit zunehmendem Alter der Larve sinkt die Konzentration des Juvenilhormons, wobei der Überschuss an 20-Hydroxyecdysone den Übergang der Larve zur Puppe bewirkt (Bollenbacher et al., 1981). Die Inaktivierungsreaktion von 20-Hydroxyecdysone wird durch eine Oxidase katalysiert, die Ecdyson-Oxidase, welche ebenfalls zur Familie der GMCs gehört (Takeuchi et al., 2001). Die hier identifizierte CpGMC weist eine Identität von 33% zur Ecdyson-Oxidase aus *D. melanogaster* (EC 1.1.3.16) auf. Das geringe Maß an Identität lässt darauf schließen, dass es sich bei CpGMC nicht um eine Ecdyson-Oxidase handelt. Dennoch sind die Stoffwechselwege der vielen Ecdysteroiden noch nicht bis ins letzte Detail geklärt. Da an der Metabolisierung von Steroiden eine Reihe von Redoxreaktionen beteiligt ist, ist es durchaus denkbar, dass die CpGMC eine Rolle in diesem Prozess spielt.

4.2 Identifizierung der β -Glucosidase und Katalase aus dem Wehrapparat von *C. populi*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben der Identifizierung und Charakterisierung der CpSAO auch Versuche zur Identifizierung der weiteren Enzyme durchgeführt, die an der Wehrsekretsynthese beteiligt sind. Dazu gehören eine β -Glucosidase und eine Katalase (1.4). Aus dem Genomprojekt von *T. castaneum* (Richards et al., 2008) ist bekannt, dass das Genom dieses Käfers zwei unterschiedliche

Gene enthält, die für α -Glucosidasen codieren und drei für Katalasen. Da es sich sowohl bei den Glucosidasen als auch bei der Katalase um ubiquitär vorkommende Enzyme handelt, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass es auch im Genom von *C. populi* mehrere unterschiedliche Gene gibt, die für Glucosidasen und Katalasen codieren. Daher bestand die Schwierigkeit bei der Identifizierung der gesuchten genetischen Information darin, eindeutig diejenige zu identifizieren, die für die β -Glucosidase und Katalase aus dem Wehrapparat codiert.

Aus dem Wehrsekret von *C. populi* konnten mittels ESI-MS/MS-Analyse keine Peptide erhalten werden, die eine Homologie zu β -Glucosidasen aufwiesen (Mohagheghi, 2007), was so interpretiert wurde, dass es sich bei der gesuchten β -Glucosidase um ein membrangebundenes oder membranassoziertes Enzym handelt. Auf Grundlage eines Alignments mehrerer Glucosidasen verschiedener Organismen wurden degenerierte Primer entworfen, mit deren Hilfe in einer Standard-PCR und 5'-RACE zwei unterschiedliche cDNA-Transkripte mit Homologie zu β -Glucosidasen identifiziert wurden (3.6.1.1 und 3.6.1.2). Anhand gewebespezifischer RT-PCRs (3.6.1.5) konnte gezeigt werden, dass CpGLU im Darm und CpGLUWA2 im Wehrapparat exprimiert ist. Daher ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass es sich bei dem cDNA-Transkript der CpGLUWA2 um das der gesuchten β -Glucosidase handelt, die die Glucoseabspaltung vom Salicin im Wehrapparat katalysiert. Alle Versuche die β -Glucosidase in löslicher Form rekombinant zu exprimieren, um einen funktionellen Nachweis zu erhalten, schlugen fehl (3.6.1.3 und 3.6.1.4). Die softwaregestützten Untersuchungen der CpGLUWA2-Sequenz zeigten, dass keine Transmembrandomänen identifiziert werden konnten, wodurch die Vermutung ausgeschlossen werden kann, dass es sich um ein integrales Membranprotein handelt. Bei Membranproteinen wird zwischen integralen und peripheren Membranproteinen unterschieden. Während integrale Proteine die Zellmembran durchziehen, sind periphere Proteine über hydrophobe Aminosäurereste an eine Seite der Lipiddoppelschicht angelagert (Tan et al., 2008). Proteine können aber auch über einen sogenannten Membrananker mit der Zellmembran verbunden sein. Dabei konnten bislang drei mögliche Gruppen von hydrophoben Membranankern identifiziert werden, die kovalent an das Protein gebunden sind:

- Palmitoylgruppe, die über eine Thioesterbindung mit einem Cysteinrest verbunden ist (Jennings, 1989)
- Farnesylgruppe, die mit einem Cysteinrest am C-Terminus verbunden ist (Jennings, 1989)
- Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker, ein Glykolipid, das mit dem C-Terminus verbunden ist (Udenfriend and Kodukula, 1995)

Eine Möglichkeit hydrophobe Bereiche an der Oberfläche von Proteinen zu identifizieren bietet die Absorptionsdifferenzspektroskopie mit dem Farbstoff Bromphenolblau (Bertsch et al., 2003). Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum von höheren zu niedrigeren Wellenlängen, je mehr hydrophobe Bereiche das zu untersuchende Protein aufweist. Da die weitere Untersuchung der β -Glucosidase nicht im Mittelpunkt dieser Arbeit stand, wurden keine tiefergehenden Analysen hinsichtlich der Membranassoziation durchgeführt. Denkbar ist, dass eventuell vorhandene hydrophobe Bereiche der Aminosäuresequenz die Bildung von *inclusion bodies* während der heterologen Expression in *E. coli*-Zellen begünstigten (Bowden et al., 1991). Wird das Vorhandensein eines Membranankers in Betracht gezogen, wäre dies eine weitere mögliche Erklärung für die Bildung von *inclusion bodies* in *E. coli*-Zellen, da das prokaryontische Expressionssystem nicht über die Fähigkeit der posttranslationalen Modifikation verfügt und das Fehlen des Membranankers zur Missfaltung des rekombinanten Enzyms beitragen kann (Grisshammer and Buchanan, 2006).

Im Gegensatz zur β -Glucosidase konnten für die Identifizierung der Katalase bereits Peptidsequenzen aus der Wehrsekretanalyse erhalten werden (3.6.2). Auf Grundlage dieser Peptide wurde ein degenerierter Primer entworfen, der zur Amplifikation einer Teilsequenz mit Homologie zu Katalasen führte. Versuche zur Vervollständigung der Sequenz im 5'-Bereich führten zu einer Sequenz für die nach SignalP3.0 und Psort II kein Signalpeptid vorhergesagt wurde (3.6.2). Auffällig ist, dass die 5 Peptide der Teilsequenz zu 90-100% mit der identifizierten CpKAT übereinstimmen, das sechste Peptid, das im 5'-Bereich lokalisiert ist, jedoch nur eine 80%ige Übereinstimmung findet. Unklar bleibt, ob die gesamte Sequenz die einer intrazellulär aktiven Katalase ist oder ob nur der 5'-Bereich durch unspezifische Anlagerung der Primer einer anderen Katalase zugeordnet werden kann. Letzteres könnte durch eine Standard-PCR mit *full-length*-Primern überprüft werden, wobei die Schwierigkeit darin besteht Primer zu entwerfen, die sich nicht unspezifisch an andere Katalasen anlagern. Der Versuch die genetische Information der Katalase auf genomischer Ebene zu identifizieren schlug vermutlich aufgrund der mangelnden Primerqualität fehl (3.6.2.3). Daher scheint es am vielversprechendsten neue Primer für die Inverse PCR zu entwerfen und diese Strategie zur Identifizierung der Katalase aus dem Wehrapparat weiter zu verfolgen.

Während die Katalase aus dem Wehrsekret der *Chrysomela*-Arten vermutlich nur in einer Nebenreaktion das schädliche Wasserstoffperoxid entgiftet, setzt der Bombardierkäfer (Brachininae) eine Katalase gezielt zur Herstellung seines Wehrsekrets ein. Er besitzt am hinteren Ende des Abdomen einen paarig angeordneten Explosionsapparat bestehend aus einer Sammelblase und einer Explosionskammer. In der Sammelblase wird ein Gemisch aus Wasserstoffperoxid und Hydrochinon gespeichert, das im Verteidigungsfall über Muskelkontraktion in die Explosionskammer gepresst wird. Diese ist wiederum von Drüsenzellen ausgekleidet, über die die Enzyme Katalase und

Peroxidase zum Reaktionsgemisch sezerniert werden (Schildknecht and Holoubek, 1961). Dabei wird Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser sowie Hydrochinon zu 1,4-Benzochinon enzymatisch umgewandelt. Während dieser Reaktion entsteht soviel Wärme, dass der Siedepunkt des Reaktionsgemisches überschritten wird und ca. ein Fünftel in die Gasphase übergeht. Durch die Druckerhöhung des entstandenen Gases wird das Gemisch explosionsartig nach außen gedrückt (Aneshansley et al., 1969). Dean *et al.* (1990) fanden heraus, dass diese Reaktion mehrfach hintereinander stattfindet, sodass das Gemisch pulsartig nach außen schießt. Dank des beweglichen Abdomens kann das Wehrsekret in alle Richtungen gezielt auf den Angreifer gesprüht werden (Eisner, 1958). Während der Abwehrmechanismus des Bombardierkäfers gut untersucht ist, gab dessen Entstehung Anlass zur Diskussion. Befürworter der Evolutionstheorie vermuten, dass der Wehrapparat der Bombardierkäfer schrittweise im Laufe der Evolution durch Mutationen im Erbgut entstanden ist (Weber, 1981). Die Synthese der Ausgangsstoffe des Wehrsekrets musste nicht neu angelegt werden, da Chinone Bestandteile des Chitinpanzers sind und Wasserstoffperoxid als Abfallprodukt vieler Stoffwechselwege ist (Eisner et al., 1977). Gegner der Evolutionstheorie sehen im Bombardierkäfer einen Beweis dafür, dass sich solch komplexe Funktionen nicht aus genetischen „Zufällen“ entwickelt haben können (Gish, 1978). Gish (1978) gab zu bedenken, dass bei einer schrittweisen Entstehung des Wehrmechanismus die Bombardierkäfer keine Chance zum Überleben gehabt hätten. Er nahm fälschlicherweise an, dass eine Mischung aus Hydrochinon und Wasserstoffperoxid spontan explodiert, sodass der Käfer ohne das Vorhandensein eines voll funktionsfähigen Wehrapparates durch die Explosionsreaktion zerstört würde. Im Umkehrschluss stellte sich Gish (1978) die Frage, warum im Laufe der Evolution ein solch komplexer Wehrapparat angelegt wurde, wenn die Reaktivität der Chemikalien nicht bekannt ist? Dennoch sprechen gezielte Untersuchungen dafür, dass die Abwehrfähigkeit des Bombardierkäfers Schritt für Schritt im Laufe der Evolution über Adaptierung und Spezialisierung vorhandener Gewebe und Ausgangsstoffe entstanden ist (Weber, 1981).

4.3 Identifizierung der SAO aus *P. vitellinae*

Wie die Larven der Pappelblattkäfer sind auch die Larven von *P. vitellinae*, der Weidenblattkäfer, in der Lage Salicylaldehyd aus dem pflanzlichen Salicin zu bilden (Pasteels et al., 1983). Untersuchungen von Veith *et al.* (1997) haben gezeigt, dass die Larven von *P. vitellinae* darüber hinaus in der Lage sind künstlich in das Wehrrservoir eingebrachtes 8-Hydroxygeraniol zu oxidieren. Interessant ist, dass nach Erstellung einer Phylogenie (Termonia et al., 2001) *P. vitellinae* bei den Vertretern der autogenen Wehrsekret-Synthese wiederzufinden ist und nicht wie zu erwarten bei den Salicylaldehyd-produzenten (1.3). Die Eigenschaft der Bildung von Salicylaldehyd aus Salicin hat sich

vermutlich zweimal in der Evolution unabhängig voneinander entwickelt. Zum einen in der Gattung *Chrysomela* und zum anderen in der Gattung *Phratora*, wobei *P. vitellinae* in dieser Gattung der einzige Vertreter mit dieser Eigenschaft ist. Larven von *P. vitellinae* sind also in der Lage das Iridoide Monoterpen 8-Hydroxygeraniol zu verstoffwechseln und Larven aus der Gattung *Chrysomela* besitzen diese Fähigkeit nicht (Soetens et al., 1993). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Ähnlichkeit der Oxidase aus *P. vitellinae* zu der putativen Oxidase der Vertreter der Iridoiden Monoterpe höher ist als die der Oxidase aus der Gattung *Chrysomela*. Da sich die Identifizierung der Oxidase aus einem Vertreter des Synthesewegs der Iridoiden Monoterpe als schwierig erwies (3.5), wurde von der Identifizierung der Oxidase aus *P. vitellinae* ein Brückenschlag von der Oxidase aus *Chrysomela* zur Oxidase aus dem Stoffwechselweg der Iridoiden Monoterpe erhofft. Zudem war es interessant die Substratspezifitäten der unterschiedlichen Oxidasen der Salicylaldehydproduzenten zu vergleichen.

Die Identifizierung der PvSAO gelang über Peptide (3.4), die mittels ESI-MS/MS aus dem Wehrsekret von *P. vitellinae* von Mohagheghi erhalten wurden (unveröffentlichte Ergebnisse). Eines dieser Peptide diente als Vorlage zur Erstellung des degenerierten Primers, der zusammen mit Oligo(dT)₁₇ in einer Standard-PCR ein Amplifikat mit Homologie zu GMC-Sequenzen erbrachte (3.4.1). Die Vervollständigung der Sequenz gelang mit Hilfe der 5'RACE. Viele Sequenzmerkmale deuten mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf hin, dass es sich bei der identifizierten Sequenz um das gesuchte cDNA-Transkript der PvSAO handelt:

- Alle kurzen Peptidsequenzen (Tabelle 48, Kapitel 3.4.1) aus dem Wehrsekret lassen sich in der korrespondierenden Aminosäuresequenz wiederfinden.
- Für die Aminosäuresequenz konnte nach SignalP3.0 ein Signalpeptid vorhergesagt werden, das auf ein extrazelluläres Enzym hinweist.
- Die Aminosäuresequenz ist zu 81,9% identisch mit der CtSAO und zu 80,0% identisch zu CpSAO.
- Ein Vergleich ähnlicher Sequenzen zeigt, dass die PvSAO wie die CtSAO und CpSAO zur Unterfamilie der tGMCs gehört (Abbildung 30).

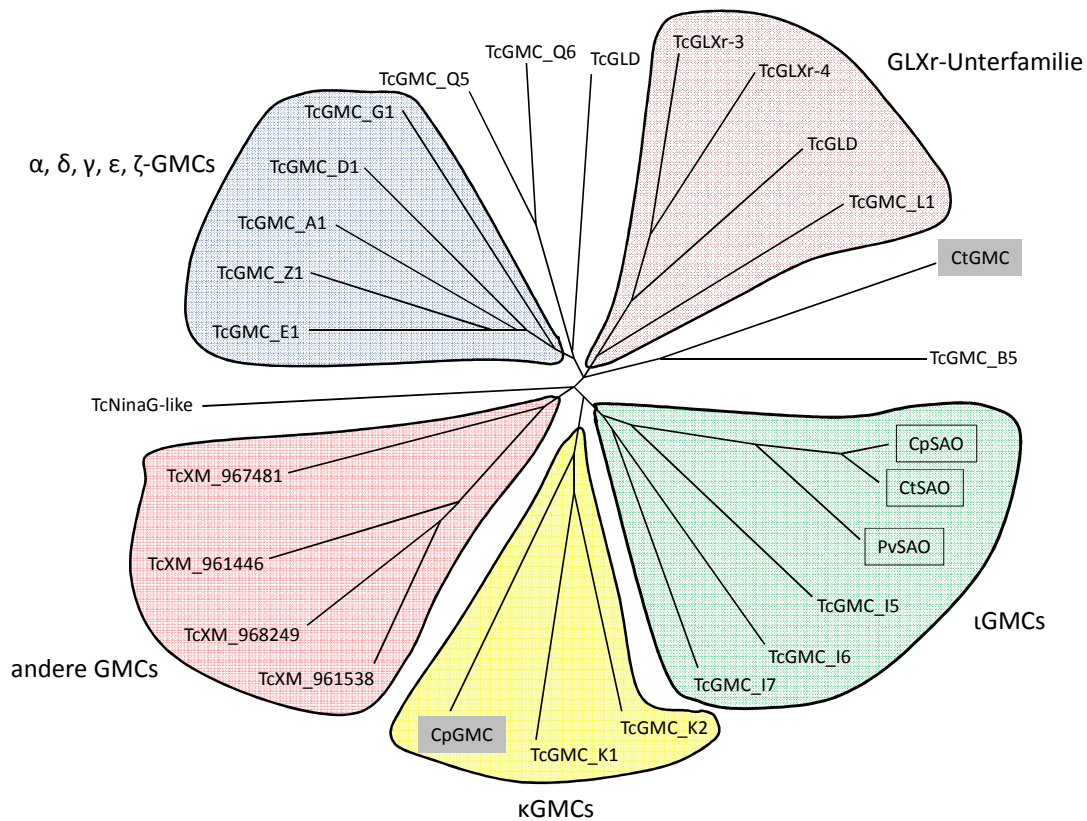


Abbildung 30: Darstellung der Sequenzähnlichkeiten der GMC-Sequenzen aus *T. castaneum*, *C. tremulae*, *C. populi* und *P. vitellinae*. Die Darstellung verdeutlicht die Gruppierung der einzelnen GMCs in ihre Unterfamilien, die jeweils mit dem griechischen Buchstaben nach Iida *et al.* (2007) benannt sind. Die cDNA-Transkripte der CtSAO, CpSAO und PvSAO, die mit einem Kasten umrandet sind, lassen sich anhand der Darstellung eindeutig der Unterfamilie der lGMCs einordnen. Das cDNA-Transkript der CpGMC (3.3) gehört dagegen zur Unterfamilie der κGMCs (4.1.5).

Trotz der hohen Identität des cDNA-Transkriptes der PvSAO mit denen der CtSAO und CpSAO führte die Expression auf analoge Weise nicht zu löslichem Protein (3.4.3). Auch die Verwendung verschiedener Expressionssysteme (3.4.6) sowie der Versuch der Renaturierung der PvSAO (3.4.5) führten nicht zu löslichem oder aktivem Enzym.

4.4 Synthese Iridoider Monoterpene als Abwehrstoffe

Wie eingangs beschrieben (1.3) legen Untersuchungen nahe, dass die Bildung Iridoider Monoterpene die ursprünglichste Form der Larvenverteidigung ist (Termonia *et al.*, 2001). Der Wechsel der Futterpflanze und die damit verbundene Aufnahme neuer pflanzlicher Sekundärstoffe haben bei den Chrysomeliden zur Bildung weiterer Abwehrstoffe geführt. Voraussetzungen zur Erlangung dieser Fähigkeit waren zum einen die Substratanpassung der Transportproteine, die die Ausgangsstoffe in das Wehrreservoir bringen, zum anderen die Substratanpassung der im Wehrreservoir vorliegenden Proteine, die die Ausgangsstoffe in die eigentlich aktive Komponente des Wehrsekrets umwandeln.

Die Eigenschaften der Transportproteine werden eingehend am Max-Planck-Institut für Biochemische Ökologie in Jena untersucht. Dort konnte gezeigt werden, dass bereits *P. cochleariae* und *G. viridula*, die die Iridoiden Monoterpene autogen produzieren, hochspezifische Transportproteine für Glycoside im Darm sowie an den Wehrdrüsen besitzen (Feld et al., 2001). Eine weiterführende Studie belegte, dass Larven von *Plagiodera versicolora* und *Phratora laticollis* in ihrer natürlichen Umgebung Iridoide Monoterpene sowohl autogen synthetisieren als auch aus ihrer Futterpflanze generieren können (Kunert et al., 2008), die das 8-Hydroxygeraniol-8-O- β -D-glucosid enthält. Das Vorhandensein dieses dualen Systems in der sogenannten ursprünglichen Form und der Vergleich mit dem Transportsystem aus Salicylaldehydproduzenten (*C. populi* und *P. vitellinae*) lassen vermuten, dass diese ihre Transportproteine für die Pflanzenglycoside nicht neu gebildet haben (Kuhn et al., 2004). Vielmehr ist es wahrscheinlicher, dass die Transportproteine, die ursprünglich zur Aufnahme des 8-Hydroxygeraniol-8-O- β -D-glucosid dienten, nach dem Wirtspflanzenwechsel in ihrer Spezifität angepasst wurden.

Das Phänomen der Enzymrekrutierung wird ebenfalls bei der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Oxidase vermutet, welche als Schlüsselenzym der Wehrsubstanzbildung dient (Pasteels et al., 1990; Veith et al., 2004). Für die Salicylalkohol-Oxidase aus *C. tremulae* (3.1) und *C. populi* (3.2) konnte eine Zugehörigkeit zur Enzymfamilie der GMCs belegt werden. Sequenzanalysen der Oxidase aus *P. vitellinae* (3.4) weisen ebenfalls auf eine Zugehörigkeit zur Familie der GMCs hin. Enzyme, die in die Gruppe der GMCs eingeordnet werden können, weisen ein extrem breites Substratspektrum auf (Cavener, 1992; Zamocky et al., 2004). Die Flexibilität der GMCs lässt vermuten, dass die Oxidase der wirtspflanzenabhängigen Strategie durch Anpassung an das neue Substrat ohne weitere Genduplikation entstanden ist. Wäre im Laufe der Evolution eine Genduplikation eingetreten, müssten die Larven der wirtspflanzenabhängigen Strategie in der Lage sein beide Synthesewege parallel zu verfolgen. Dies ist jedoch bei keiner Art der Blattkäferlarven bekannt, daher ist es auch denkbar, dass eine Genduplikation stattgefunden hat und dass eine Kopie im Laufe der Zeit durch weitere Mutationen ihre Funktion verloren hat.

Zur Identifizierung der Oxidase aus dem Wehrreservoir von *P. cochleariae* und *G. viridula* wurden verschiedene Ansätze durchgeführt (3.5). Während die kurzen Peptidsequenzen aus den Wehrsekreten der Vertreter der wirtspflanzenabhängigen Strategie bereits eine deutliche Ähnlichkeit zu anderen GMC-Sequenzen aufwiesen, konnte für kein Peptid aus *G. viridula* und für nur zwei der erhaltenen Peptide aus dem Wehrsekret von *P. cochleariae* eine schwache Homologie zu GMC-Sequenzen festgestellt werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der gesuchten Oxidase aus den Vertretern der gemischten Wehrstrategie um ein membranassoziertes oder -gebundenes Enzym handelt. Dagegen sprechen Untersuchungen, die belegen, dass das isolierte

Wehrsekret von *Phaedon armoracie* eine eindeutige Oxidaseaktivität aufweist (Veith et al., 1996). Das gleiche Phänomen konnte bei der gesuchten β -Glucosidase aus dem Wehrsekret von *C. populi* beobachtet werden. Da kein sequenziertes Peptid aus dem Wehrsekret eine Ähnlichkeit zu einer bekannten β -Glucosidase aufwies, vermutete Mohagheghi (2007), dass es sich ebenfalls um ein membranassoziertes oder -gebundenes Enzym handelt. Dennoch konnte Brückmann (2002a) mit isoliertem Wehrsekret eine Glucosidaseaktivität nachweisen und Untersuchungen an der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Sequenz (3.6.1.2) deuten nicht auf ein membrangebundenes Enzym hin. Während die Versuche mit Deuterium-markiertem 8-Hydroxygeraniol als Substrat die Oxidaseeigenschaft des Wehrsekretes des nahen Verwandten von *P. cochleariae* belegen (Veith et al., 1996), bleibt der genetische Ursprung dieser Oxidase weiterhin unentdeckt. Im Gegensatz dazu konnte bereits die Oxidase, die die Oxidation von 8-Hydroxygeraniol in den Pflanzen *Rauwolfia serpentina* (Apocynaceae) und *Nepeta racemosa* (Lamiaceae) katalysiert, molekularbiologisch beschrieben werden (Hallahan et al., 1995; Ikeda et al., 1991). In beiden Organismen handelt es sich um eine zinkhaltige NADP⁺-abhängige Oxidoreduktase. Eine Parallele zu der gesuchten Oxidase aus dem wirtspflanzenunabhängigen Syntheseweg des Wehrsekrets der Käferlarven scheint es nicht zu geben. Veith et al. (1996) zeigten, dass selbst nach Zugabe von EDTA zum Wehrsekret die Oxidaseeigenschaft unverändert bleibt. EDTA dient als Komplexbildner von zweiwertigen Ionen und entzieht dem Enzym das Zink, wodurch die katalytische Eigenschaft verloren geht. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass es sich bei der gesuchten Oxidase um ein sauerstoffabhängiges Enzym handelt (Veith et al., 1996). Möglicherweise ist dies ein weiterer Ansatzpunkt zur Identifizierung der Oxidase aus dem Syntheseweg der Iridoiden Monoterpene.

4.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte belegt werden, dass der genetische Ursprung der SAO aus *C. populi* und *tremulae* in der ι GMC-Unterfamilie zu finden ist. Wie Iida und Mitarbeiter (2007) zeigten, befindet sich z.B. in *T. castaneum* ein GMC-Cluster, in dem 12 GMC-Gene direkt hintereinander liegen. Unter anderem befinden sich auch ι GMC-Gene innerhalb dieses Clusters. Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch das Genom der *Chrysomela*-Arten ein solches Gencluster beherbergt. Dies ließe sich mit der Sequenzierung der genomischen DNA bestätigen. Damit könnte auch gezeigt werden, ob die hier identifizierte κ GMC aus *C. populi* und die GMC aus *C. tremulae* (Mohagheghi, 2007) innerhalb oder außerhalb dieses Genclusters lokalisiert sind. Des Weiteren wäre es interessant über heterologe Expressionsversuche und anschließende Enzymassays mit unterschiedlichen Substraten die Funktion dieser GMC-Sequenzen zu analysieren. Die Sequenzierung der genomischen DNA könnte ebenfalls Aufschluss über die Art des putativen Pseudogens CpSAO1 geben. CpSAO1

zeigte gegenüber Salicylalkohol keine Aktivität, dennoch könnten weitere Expressionsversuche angeschlossen werden, um zu testen, ob das Enzym für andere Substrate zugänglich ist.

Aus *P. vitellinae* konnte ein cDNA-Transkript identifiziert werden, das mutmaßlich für die SAO aus dem Wehrsekret kodiert. Sequenzanalysen zeigten, dass die PvSAO wie die CtSAO und CpSAO zur Familie der tGMCs gehört. Um zu belegen, dass es sich tatsächlich um die gesuchte SAO aus dem Syntheseweg des Salicylaldehyds handelt, muss ein Funktionsnachweis des Enzyms erbracht werden. Alle Expressionsansätze in dieser Arbeit führten zur Bildung von *inclusion bodies*. Ein möglicher Ansatz zur Erhaltung löslichen Proteins besteht darin, die *inclusion bodies* zu solubilisieren und renaturieren. Versuche dazu wurden durchgeführt, dennoch steht eine Vielzahl weiterer Puffersysteme sowie Denaturierungsmittel zur Verfügung. Alternativ könnte auf andere eukaryontische Expressionssysteme wie Hefe- und Insektenzellen umgestellt werden. Abweichend von den Expressionsversuchen könnten Gewebeschnitte eingebetteter Larven angefertigt werden, die das Gewebe der Wehrapparate enthalten. Anschließend könnte die PvSAO durch Antikörpermarkierung im Gewebe lokalisiert werden.

Um den möglichen evolutiven Zusammenhang der Oxidasen aus dem wirtspflanzenabhängigen Syntheseweg mit der der autogenen Wehrsekretsynthese zu belegen, wurden nach der Oxidase aus dem Wehrsekret von *P. cochleariae* und *G. viridula* gesucht. Anders als bei den salicylaldehydproduzierenden Larven konnten aus dem Wehrsekret der Larven von *P. cochleariae* nur zwei Peptide mit schwacher Homologie zu GMCs identifiziert werden. Aus *G. viridula* wurde kein Peptid mit Homologie zu anderen GMCs gefunden. Zudem konnte kein Amplifikat in Standard-PCRs erhalten werden, die mit degenerierten Primern durchgeführt wurden, die auf Grundlage der Peptide oder homologer Bereiche von Alignments verschiedener GMC-Sequenzen basierten. Um Aufschluss zu bekommen über das Vorhandensein putativer GMC-Sequenzen aus dem Wehrapparat von Larven, die die autogene Wehrsekretsynthese betreiben, könnten gezielt die Zellen des Wehrapparates mit Hilfe der Lasercapture Microdissection isoliert werden. Von diesen Zellen könnte eine cDNA-Datenbank erstellt werden, die dann gezielt nach Oxidasen untersucht werden kann.

Des Weiteren wurde nach der genetischen Information der β -Glucosidase und Katalase aus dem Wehrsekret von *C. populi* gesucht. Mit der Identifizierung von CpGLUWA2 konnte eine putative Sequenz für die β -Glucosidase gefunden werden. Wie bei PvSAO gelang es nicht einen funktionellen Nachweis zu erbringen, daher stehen auch hier die oben erläuterten Methoden zur Verfügung, um eindeutig zu belegen, dass CpGLUWA2 aus dem Wehrapparat stammt.

Für die Katalase konnte kein *full-length*-cDNA-Transkript identifiziert werden. Vermutlich führte die 5'-Race durch unspezifische Anlagerung der Primer zu einem 5'-Ende einer intrazellulären Katalase, da die Sequenz kein Signalpeptid aufwies. Daher könnte der Versuchsansatz der Inversen-PCR mit neu gestalteten Primern weiterverfolgt werden.

5. Zusammenfassung

5.1 Deutsche Zusammenfassung

Die Larven der Blattkäfer *C. populi* und *C. tremulae* sind in der Lage den eigentlich fraßhemmenden Sekundärstoff Salicin ihrer Futterpflanze unbeschadet aufzunehmen und diesen im Extrazellularraum des Wehrapparates enzymatisch in Salicylaldehyd umzuwandeln. Das Salicylaldehyd können die Larven wiederum effektiv gegen ihre eigenen Fraßfeinde einsetzen. Zur Erlangung dieser Fähigkeit wurden vermutlich die β -Glucosidase und die Oxidase aus der ursprünglichen autogenen Wehrsekretsynthese verwandter Blattkäferlarven rekrutiert. Um Aufschluss über die Evolution der an der Wehrsekretsynthese beteiligten Enzyme zu erhalten, wurde bereits in früheren Arbeiten eine *full-length*-Sequenz der SAO aus *C. tremulae* sowie eine Teilsequenz der SAO aus *C. populi* identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Vervollständigung der Teilsequenz mittels 5'-RACE. Beide cDNA-Sequenzen wurden heterolog in *E. coli*-Zellen mit dem Chaperon pREP4-groELS coexprimiert. Anhand eines Enzymassays, dessen Produkt mittels GC und GC-MS quantifiziert und qualifiziert wurde, konnte eindeutig belegt werden, dass es sich bei den identifizierten cDNA-Transkripten um die gesuchten SAOs aus den Wehrapparaten handelt. Die Zugehörigkeit der Sequenzen zur Familie der GMCs konnte durch Eingabe in BLAST und anhand homologer Bereiche in Alignments mit verschiedenen GMC-Sequenzen gezeigt werden. Die Familie der GMCs gliedert sich nochmals in mehrere Unterfamilien. Ein Sequenzvergleich der SAOs mit GMC-Sequenzen aus *T. castaneum* zeigte, dass die SAOs der Unterfamilie der ι GMCs zugeordnet werden können. Dadurch wurde erstmalig die Funktion zweier ι GMCs-Sequenzen beschrieben. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass der gemeinsame genetische Ursprung der SAOs und der Oxidasen aus dem autogenen Syntheseweg in der Unterfamilie der ι GMCs zu finden ist.

Zur Untersuchung weiterer Oxidasen wurden u.a. die Larven von *P. vitellinae* herangezogen. Die Identifizierung des cDNA-Transkriptes der PvSAO erfolgte auf gleiche Weise wie die der Pappelblattkäferlarven. In einem Sequenzvergleich konnte gezeigt werden, dass die PvSAO wie die CpSAO und CtSAO zur Familie der ι GMCs gehört.

Neben der Identifizierung der Oxidase unterschiedlicher Wehrsekretsynthesen aus verschiedenen Käferlarven wurden zusätzlich Versuche zur Identifizierung der genetischen Information der β -Glucosidase und Katalase aus *C. populi* durchgeführt, die ebenfalls an der Wehrsekretsynthese beteiligt sind. Während für die Katalase eine Teilsequenz identifiziert werden konnte, wurden für die β -Glucosidase zwei unterschiedliche *full-length*-Sequenzen identifiziert. Die Durchführung gewebespezifischer RT-PCRs belegte, dass das cDNA-Transkript der CpGLUWA2 im Wehrapparat

exprimiert ist. So ist mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass die CpGLUWA2 die im Wehrsekret ablaufende Reaktion von Salicin zu Salicylalkohol katalysiert.

5.2 Abstract

Larvae of *C. populi* and *C. tremulae* use a specific defence strategy to displace their predators. Upon attack they release defensive chemical from specialized glands. Larvae need to take up salicin as an herbal precursor from leaves of their host plant (poplar trees) to produce the defensive secretion. To achieve the ability to transform salicin into salicylaldehyde larvae have most likely recruited the salicyl alcohol oxidase (SAO) from an oxidase involved in the autogenous biosynthesis of iridoid monoterpenes that is found in related Chrysomelid leaf beetle species. This work focuses on the identification and characterization of specific SAOs from the defensive secretions of *C. populi* and *tremulae* in order to understand the evolution of the enzymes that have been evolved during adaptation of larvae to new host-plants. A full-length cDNA encoding for CtSAO was already identified by Mohagheghi (2007) as well as part of the cDNA encoding CpSAO that was accomplished by 5'-RACE during this work. Both cDNA-sequences were cloned and heterologously coexpressed in *E. coli*-cells with the chaperon pREP4-groESL. Enzyme activity and quantification of the produced salicylaldehyde was measured by gas chromatography. Biochemical analyses showed that both enzymes have basically the same characteristics as the native CpSAO that was characterized in the past. Sequence comparison revealed that the SAOs belong to the family of glucose-methanol-choline oxidoreductase-like sequences (GMCs) with mostly unknown function. Comparing the SAOs with GMC-like sequences from *T. castaneum*, SAOs were found to be part of the ι GMCs-subfamily. This suggests that the SAOs and the oxidase from the autogenous biosynthesis share a common ancestor belonging to the ι GMCs-subfamily.

For further studies of the evolutionary origin of the specific oxidase larvae of *P. vitellinae* were examined. The cDNA encoding for the PvSAO was identified the same way as the cDNA from *C. populi* and *tremulae*. Sequence comparison with CpSAO, CtSAO and GMC-like sequences from *T. castaneum* showed that that PvSAO is also a member of the ι GMC-subfamily.

Beside the identification of different oxidases from various defensive strategies this work also concentrated on identifying the β -glucosidase und catalase from larvae of *C. populi*. Part of the catalase-like sequence was found that could be related to the synthesis of the defensive secretion. Unlike that two different sequences were found showing homology to β -glucosidase. Since both sequences feature a signal peptide tissue specific RT-PCR was performed to analyze the expression site of both sequences. This experiment revealed that the cDNA-sequence of CpGLUWA2 is

expressed in the defensive glands. So it is most likely that CpGLUWA2 catalysis the hydrolysis of the plant-derived salicin.

6. Literaturverzeichnis

- Ahmad S.T., Joyce M.V., Boggess B. und O'Tousa J.E.** (2006) The role of drosophila ninaG oxidoreductase in visual pigment chromophore biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **281**(14):9205-9209.
- Aneshansley D., Eisner T., Widom J.M. und Widom B.** (1969) Biochemistry at 100 degrees celsius - Explosive secretory discharge of bombardier beetles (*Brachinus*). *Science* **165**(3888):61-63.
- Baranov V.I., Morozov I.Y., Ortlepp S.A. und Spirin A.S.** (1989) Gene-expression in a cell-free system on the preparative scale. *Gene* **84**(2):463-466.
- Bertani G.** (1951) Studies on lysogenesis .1. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia-coli*. *Journal of Bacteriology* **62**(3):293-300.
- Bertsch M., Mayburd A.L. und Kassner R.J.** (2003) The identification of hydrophobic sites on the surface of proteins using absorption difference spectroscopy of bromophenol blue. *Analytical Biochemistry* **313**(2):187-195.
- Bickel P.E., Scherer P.E., Schnitzer J.E., Oh P., Lisanti M.P. und Lodish H.F.** (1997) Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry* **272**(21):13793-13802.
- Blum M.S., Brand J.M., Wallace J.B. und Fales H.M.** (1972) Chemical characterization of defensive secretion of a chrysomelid larva. *Life Sciences Pt-2 Biochemistry General and Molecular Biology* **11**(10):525-531.
- Bollenbacher W.E., Smith S.L., Goodman W. und Gilbert L.I.** (1981) Ecdysteroid titer during larval-pupal-adult development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *General and Comparative Endocrinology* **44**(3):302-306.
- Bottcher F., Adolph R.D. und Hartmann T.** (1993) Homospermidine synthase, the 1st pathway-specific enzyme in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* **32**(3):679-689.
- Bowden G.A., Paredes A.M. und Georgiou G.** (1991) Structure and morphology of protein inclusion-bodies in *Escherichia-coli*. *Bio-Technology* **9**(8):725-730.
- Bradford M.M.** (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**(1-2):248-254.
- Brückmann M.** (2002a) Aufnahme und Metabolisierung von Pyrrolizidin-Alkaloiden durch Ithomiiden sowie Untersuchungen zur enzymatischen Bildung von Salicylaldehyd im Wehrsekret von Chrysomeliden. *Dissertation, Pharmazeutische Biologie, Technische Universität Braunschweig.*
- Brückmann M., Termonia A., Pasteels J.M., Hartmann T.** (2002b) Characterization of an extracellular salicyl alcohol oxidase from larval defensive secretion of *Chrysomela populi* and *Phratora vitellinae* (Chrysomelina). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**(11):1517-1523.

- Bukau B. und Horwich A.L.** (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**(3):351-366.
- Burge C.B., Padgett R.A. und Sharp P.A.** (1998) Evolutionary fates and origins of U12-type introns. *Molecular Cell* **2**(6):773-785.
- Burse A., Frick S., Discher S., Tolzin-Banasch K., Kirsch R., Strauss A., Kunert M. und Boland W.** (2009) Always being well prepared for defense: The production of deterrents by juvenile Chrysomelina beetles (Chrysomelidae). *Phytochemistry* **70**(15-16):1899-1909.
- Buttke T.M. und Sandstrom P.A.** (1994) Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today* **15**(1):7-10.
- Byeon G.M., Lee K.S., Gui Z.Z., Kim I., Kang P.D., Lee S.M., Sohn H.D. und Jin B.R.** (2005) A digestive [beta]-glucosidase from the silkworm, *Bombyx mori*: cDNA cloning, expression and enzymatic characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **141**(4):418-427.
- Campbell N.A. und Reece J.B.** (2003) *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Caspers P., Stieger M. und Burn P.** (1994) Overproduction of bacterial chaperones improves the solubility of recombinant protein-tyrosine kinases in *Escherichia-coli*. *Cellular and Molecular Biology* **40**(5):635-644.
- Cavener D.R.** (1992) GMC oxidoreductases - A newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. *Journal of Molecular Biology* **223**(3):811-814.
- Cavener D.R. und Macintyre R.J.** (1983) Biphasic expression and function of glucose-dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **80**(20):6286-6288.
- Chen T., Mei N. und Fu P.P.** (2010) Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Applied Toxicology* **30**(3):183-196.
- Chino H., Sakurai S., Ohtaki T., Ikekawa N., Miyazaki H., Ishibash.M. und Abuki H.** (1974) Biosynthesis of alpha-ecdysone by prothoracic glands *in-vitro*. *Science* **183**(4124):529-530.
- Cho A.R., Yoo S.K. und Kim E.J.** (2000) Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *Fems Microbiology Letters* **186**(2):235-238.
- Claus C.** (1662) Über die Seitendrüsen der Larven von *Chrysomela populi*. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie* **XI**:309-314.
- Cohen S.N., Chang A.C.Y. und Hsu L.** (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria - genetic transformation of *Escherichia coli* by r-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**(8):2110-2114.
- Daloz D. und Pasteels J.M.** (1994) Isolation of 8-hydroxygeraniol-8-O-beta-D-glucoside, a probable intermediate in biosynthesis of iridoid monoterpenes, from defensive secretions of *Plagioderma versicolora* and *Gastrophysa viridula* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Journal of Chemical Ecology* **20**(8):2089-2097.

- Dan S., Marton I., Dekel M., Bravdo B.A., He S.M., Withers S.G. und Shoseyov O.** (2000) Cloning, expression, characterization, and nucleophile identification of family 3, *Aspergillus niger* beta-glucosidase. *Journal of Biological Chemistry* **275**(7):4973-4980.
- Dean J., Aneshansley D.J., Edgerton H.E. und Eisner T.** (1990) Defensive spray of the bombardier beetle - a biological pulse jet. *Science* **248**(4960):1219-1221.
- Deroe C. und Pasteels J.M.** (1982) Distribution of adult defense glands in chrysomelids (Coleoptera, Chrysomelidae) and its significance in the evolution of defense-mechanisms within the family. *Journal of Chemical Ecology* **8**(1):67-82.
- Dewey E.M., McNabb S.L., Ewer J., Kuo G.R., Takanishi C.L., Truman J.W. und Honegger H.W.** (2004) Identification of the gene encoding bursicon, an insect neuropeptide responsible for cuticle sclerotization and wing spreading. *Current Biology* **14**(13):1208-1213.
- Discher S., Burse A., Tolzin-Banasch K., Heinemann S.H., Pasteels J.M. und Boland W.** (2009) A versatile transport network for sequestering and excreting plant glycosides in leaf beetles provides an evolutionary flexible defense strategy. *Chembiochem* **10**(13):2223-2229.
- Dubaquie Y., Looser R., Funfschilling U., Jenö P. und Rospert S.** (1998) Identification of *in vivo* substrates of the yeast mitochondrial chaperonins reveals overlapping but non-identical requirement for hsp60 and hsp10. *Embo Journal* **17**(20):5868-5876.
- Edman P.** (1949) A method for the determination of the amino acid sequence in peptides. *Archives of Biochemistry* **22**(3):475-476.
- Eisner T.** (1958) The protective role of the spray mechanism of the bombardier beetle, *Brachynus ballistarius* Lec. *Journal of Insect Physiology* **2**(3):215-216.
- Eisner T., Jones T.H., Aneshansley D.J., Tschinkel W.R., Silberglied R.E. und Meinwald J.** (1977) Defense-mechanisms of arthropods .57. chemistry of defensive secretions of bombardier beetles (Brachinini, Metriini, Ozaenini, Paussini). *Journal of Insect Physiology* **23**(11-1):1383-1386.
- Fan F., Ghanem M. und Gadda G.** (2004) Cloning, sequence analysis, and purification of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*: a bacterial enzyme involved in osmotic stress tolerance. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **421**(1):149-158.
- Farrell B.D.** (1998) "Inordinate fondness" explained: Why are there so many beetles? *Science* **281**(5376):555-559.
- Feld B.K., Pasteels J.M. und Boland W.** (2001) *Phaedon cochleariae* and *Gastrophysa viridula* (Coleoptera : Chrysomelidae) produce defensive iridoid monoterpenes de novo and are able to sequester glycosidically bound terpenoid precursors. *Chemoecology* **11**(4):191-198.
- Force A., Lynch M., Pickett F.B., Amores A., Yan Y.L. und Postlethwait J.** (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **151**(4):1531-1545.
- Fraenkel G. und Hsiao C.** (1962) Hormonal and nervous control of tanning in fly. *Science* **138**(3536):27-29.

- Frei H., Luthy J., Brauchli J., Zweifel U., Wurgler F.E. und Schlatter C.** (1992) Structure-activity-relationships of the genotoxic potencies of 16 pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila-melanogaster*. *Chemico-Biological Interactions* **83**(1):1-22.
- Frohman M.A., Dush M.K. und Martin G.R.** (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts - Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**(23):8998-9002.
- Gish D.T.** (1978) *Dinosaurs: Those Terrible Lizards*. Master Books.
- Grisshammer R. und Buchanan S.K.** (2006) *Structural Biology of Membrane Proteins*. Royal Society of Chemistry.
- Gross J., Muller C., Vilcinskas A. und Hilker M.** (1998) Antimicrobial activity of exocrine glandular secretions, hemolymph, and larval regurgitate of the mustard leaf beetle *Phaedon cochleariae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **72**(3):296-303.
- Gross J., Podsiadlowski L. und Hilker M.** (2002) Antimicrobial activity of exocrine glandular secretion of *Chrysomela* larvae. *Journal of Chemical Ecology* **28**(2):317-331.
- Gross M.H.** (1994,1995) Chemoecological studies of the exocrine glandular larval secretions of two chrysomelid species (Coleoptera): *Phaedon cochleariae* and *Chrysomela lapponica*. *Chemecologie* **5/6**:185-189.
- Hallahan D.L., West J.M., Wallsgrove R.M., Smiley D.W.M., Dawson G.W., Pickett J.A. und Hamilton J.G.C.** (1995) Purification and characterization of an acyclic monoterpene primary alcohol-NADP(+) oxidoreductase from catmint (*Nepeta-racemosa*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **318**(1):105-112.
- Hanes C.S.** (1932) Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochem J* **26**(5):1406-1421.
- Hartmann T., Theuring C., Schmidt J., Rahier M. und Pasteels J.M.** (1999) Biochemical strategy of sequestration of pyrrolizidine alkaloids by adults and larvae of chrysomelid leaf beetles. *Journal of Insect Physiology* **45**(12):1085-1095.
- Hilker M. und Schulz S.** (1994) Composition of larval secretion of *Chrysomela lapponica* (Coleoptera, Chrysomelidae) and its dependence on host-plant. *Journal of Chemical Ecology* **20**(5):1075-1093.
- Hinton H.E.** (1915) On a little-known protective device of some Chrysomelid pupae (Coleoptera). *Proceedings of the Royal Entomological Society of London* **26**:67-73.
- Hollande A.C.** (1905) Sur la fonction d'excrétion chez les insectes salicioles et en particulier sur l'existence dérivés salicylés. *Annales de l'Université de Grenoble* **21**:459-517.
- Holmes D.S. und Quigley M.** (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry* **114**(1):193-197.
- House H.L.** (1962) Insect Nutrition. *Annual Review of Biochemistry* **31**:653-672.

- Hughes A.L.** (1994) The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **256**(1346):119-124.
- Iida K. und Cavener D.R.** (2004) Glucose dehydrogenase is required for normal sperm storage and utilization in female *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology* **207**(4):675-681.
- Iida K., Cox-Foster D.L., Yang X.L., Ko W.Y. und Cavener D.R.** (2007) Expansion and evolution of insect GMC oxidoreductases. *BMC Evolutionary Biology* **7**(75): .10.1186/1471-2148-7-75
- Ikedo H., Esaki N., Nakai S., Hashimoto K., Uesato S., Soda K. und Fujita T.** (1991) Acyclic monoterpene primary alcohol - NADP+ oxidoreductase of *Rauwolfia-serpentina* cells - The key enzyme in biosynthesis of monoterpene alcohols. *Journal of Biochemistry* **109**(2):341-347.
- Jacq C., Miller J.R. und Brownlee G.G.** (1977) Pseudogene structure in 5S-DNA of *Xenopus laevis*. *Cell* **12**(1):109-120.
- Jennings M.L.** (1989) Topography of membrane-proteins. *Annual Review of Biochemistry* **58**:999-1027.
- Kadam R.S. und Iyer K.R.** (2008) Isolation of liver aldehyde oxidase containing fractions from different animals and determination of kinetic parameters for benzaldehyde. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **70**(1):85-U81.
- Kaltenegger E.** (2009) Evolution der Homospermidin-Synthase in den Convolvulaceae und Apocynaceae. *Dissertation*, Botanisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Kiess M., Hecht H.J. und Kalisz H.M.** (1998) Glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense* - Primary structure and comparison with other glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductases. *European Journal of Biochemistry* **252**(1):90-99.
- Kim M.S., Kim S.S., Jung S.T., Park J.Y., Yoo H.W., Ko J., Csiszar K., Choi S.Y. und Kim Y.** (2003) Expression and purification of enzymatically active forms of the human lysyl oxidase-like protein 4. *Journal of Biological Chemistry* **278**(52):52071-52074.
- Kitagawa I., Tsujii S., Nishikawa F. und Shibuya H.** (1983) Chemical transformation of terpenoids .5. acidic conversions of 10-hydroxygeraniol and 10-hydroxynerol derivatives leading to cyclic monoterpene derivatives. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **31**(8):2639-2651.
- Krogh A., Larsson B., von Heijne G. und Sonnhammer E.L.L.** (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* **305**(3):567-580.
- Kuhn J., Pettersson E.M., Feld B.K., Burse A., Termonia A., Pasteels J.M. und Boland W.** (2004) Selective transport systems mediate sequestration of plant glucosides in leaf beetles: A molecular basis for adaptation and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(38):13808-13813.

- Kuhn J., Pettersson E.M., Feld B.K., Nie L.H., Tolzin-Banasch K., M'Rabet S.M., Pasteels J. und Boland W.** (2007) Sequestration of plant-derived phenolglucosides by larvae of the leaf beetle *Chrysomela lapponica*: Thioglucosides as mechanistic probes. *Journal of Chemical Ecology* **33**(1):5-24.
- Kunert M., Soe A., Bartram S., Discher S., Tolzin-Banasch K., Nie L., David A., Pasteels J. und Boland W.** (2008) De novo biosynthesis versus sequestration: A network of transport systems supports in iridoid producing leaf beetle larvae both modes of defense. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **38**(10):895-904.
- Labandeira C.C. und Sepkoski J.J.** (1993) Insect diversity in the fossil record. *Science* **261**(5119):310-315.
- Lang D.M., Lommel S., Jung M., Ankerhold R., Petrusch B., Laessing U., Wiechers M.F., Plattner H. und Stuermer C.A.O.** (1998) Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. *Journal of Neurobiology* **37**(4):502-523.
- Laurent P., Braekman J.C., Daloz D. und Pasteels J.** (2003) Biosynthesis of defensive compounds from beetles and ants. *European Journal of Organic Chemistry*(15):2733-2743.
- Lefevre G. und Jonsson U.B.** (1962) Sperm transfer, storage, displacement, and utilization in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **42**(12): 1719–1736.
- Lindigkeit R., Biller A., Buch M., Schiebel H.M., Boppre M. und Hartmann T.** (1997) The two faces of pyrrolizidine alkaloids: The role of the tertiary amine and its N-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. *European Journal of Biochemistry* **245**(3):626-636.
- Lineweaver H. und Burk D.** (1934) The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society* **56**:658-666.
- Loew O.** (1900) A new enzyme of general occurrence in organisms. *Science* **11**(279):701-702.
- Lorenz M., Boland W. und Dettner K.** (1993) Biosynthesis of iridodials in the defense glands of beetle larvae (Chrysomelinae). *Angewandte Chemie-International Edition in English* **32**(6):912-914.
- Machida S., Yu Y., Singh S.P., Kim J.D., Hayashi K. und Kawata Y.** (1998) Overproduction of beta-glucosidase in active form by an *Escherichia coli* system coexpressing the chaperonin GroEL/ES. *Fems Microbiology Letters* **159**(1):41-46.
- Matsuda K. und Sugawara F.** (1980) Defensive secretion of chrysomelid larvae "*Chrysomela vigintipunctata-costella* (Marseul), *C. populi* L. and *Gastrolina depressa* Baly (Coleoptera, Chrysomelidae). *Applied Entomology and Zoology* **15**(3):316-320.
- Meinwald J., Jones T.H., Eisner T. und Hicks K.** (1977) New methylcyclopentanoid terpenes from the larval defensive secretion of a chrysomelid beetle (*Plagioderma versicolora*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**:2189-2193.
- Mogk A., Mayer M.P. und Deuerling E.** (2001) Mechanismen der Proteinfaltung. Molekulare Chaperone und ihr biotechnologisches Potential. *Biologie in unserer Zeit* **31**(3):182-192.

- Mohagheghi H.** (2007) Chemische Abwehr bei Larven von *Chrysomela tremulae* (Chrysomelidae). *Dissertation*, Pharmazeutische Biologie, Technische Universität Braunschweig.
- Moore B.P.** (1966) Hydrogen cyanide in the defensive secretions of larval Paropsini (Coleoptera: Chrysomelidae). *Australian Journal of Entomology* **6**(1):36-38.
- Murtha M.T. und Cavener D.R.** (1989) Ecdysteroid regulation of glucose-dehydrogenase and alcohol-dehydrogenase gene-expression in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* **135**(1):66-73.
- Narberhaus I., Papke U., Theuring C., Beuerle T., Hartmann T. und Dobler S.** (2004a) Direct evidence for membrane transport of host-plant-derived pyrrolizidine alkaloid *N*-oxides in two leaf beetle genera. *Journal of Chemical Ecology* **30**(10):2003-2022.
- Narberhaus I., Theuring C., Hartmann T. und Dobler S.** (2003) Uptake and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in Longitarsus flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) adapted and non-adapted to alkaloid-containing host plants. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* **173**(6):483-491.
- Narberhaus I., Theuring C., Hartmann T. und Dobler S.** (2004b) Time course of pyrrolizidine alkaloid sequestration in Longitarsus flea beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). *Chemoecology* **14**(1):17-23.
- Naumann C., Hartmann T. und Ober D.** (2002) Evolutionary recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for the detoxification of host plant-acquired pyrrolizidine alkaloid-def ended arctiid alkaloids in the moth *Tyria jacobaleae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(9):6085-6090.
- Neubaum D.M. und Wolfner M.F.** (1999) Mated *Drosophila melanogaster* females require a seminal fluid protein, Acp36DE, to store sperm efficiently. *Genetics* **153**(2):845-857.
- Nurhayati N., Gonde D. und Ober D.** (2009) Evolution of pyrrolizidine alkaloids in Phalaenopsis orchids and other monocotyledons: Identification of deoxyhypusine synthase, homospermidine synthase and related pseudogenes. *Phytochemistry* **70**(4):508-516.
- Ober D.** (2010) Gene duplications and the time thereafter - examples from plant secondary metabolism. *Plant Biology* **12**(4):570-577.
- Ober D., Harms R., Witte L. und Hartmann T.** (2003) Molecular evolution by change of function - Alkaloid-specific homospermidine synthase retained all properties of deoxyhypusine synthase except binding the eIF5A precursor protein. *Journal of Biological Chemistry* **278**(15):12805-12812.
- Ober D. und Hartmann T.** (1999a) Deoxyhypusine synthase from tobacco - cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of an enzyme with extended substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry* **274**(45):32040-32047.
- Ober D. und Hartmann T.** (1999b) Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(26):14777-14782.

- Ober D. und Hartmann T.** (2000) Phylogenetic origin of a secondary pathway: the case of pyrrolizidine alkaloids. *Plant Molecular Biology* **44**(4):445-450.
- Ober D. und Kaltenecker E.** (2009) Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolution of a pathway in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **70**(15-16):1687-1695.
- Ochman H., Ajioka J.W., Garza D. und Hartl D.L.** (1990) Inverse polymerase chain-reaction. *Bio-Technology* **8**(8):759-760.
- Oganesyan N., Ankoudinova I., Kim S.H. und Kim R.** (2007) Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization. *Protein Expression and Purification* **52**(2):280-285.
- Ohashi K., Natori S. und Kubo T.** (1999) Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *European Journal of Biochemistry* **265**(1):127-133.
- Ohno S.** (1970) *Evolution by gene duplication*. Springer.
- Oldham N.J., Veith M., Boland W. und Dettner K.** (1996) Iridoid monoterpene biosynthesis in insects: Evidence for a de novo pathway occurring in the defensive glands of *Phaedon armoraciae* (Chrysomelidae) leaf beetle larvae. *Naturwissenschaften* **83**(10):470-473.
- Pasteels J.M., Braekman J.C., Daloz D. und Ottinger R.** (1982) Chemical defense in chrysomelid larvae and adults. *Tetrahedron* **38**(13):1891-1897.
- Pasteels J.M., Daloz D. und Rowell-Rahier M.** (1986) Chemical defense in chrysomelid eggs and neonate larvae. *Physiological Entomology* **11**(1):29-37.
- Pasteels J.M., Duffey S. und Rowell-Rahier M.** (1990) Toxins in chrysomelid beetles - possible evolutionary sequence from denovo synthesis to derivation from food-plant chemicals. *Journal of Chemical Ecology* **16**(1):211-222.
- Pasteels J.M., Rowell-Rahier M., Braekman J.C., Daloz D. und Duffey S.** (1989) Evolution of exocrine chemical defense in leaf beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). *Experientia* **45**(3):295-300.
- Pasteels J.M., Rowellrahier M., Braekman J.C. und Dupont A.** (1983) Salicin from host plant as precursor of salicylaldehyde in defensive secretion of chrysomeline larvae. *Physiological Entomology* **8**(3):307-314.
- Perny B.** (2007) Der Ameisen-Sackkäfer *Clytra laeviuscula* - Getarnte Larven im Ameisennest. *Forstschutz Aktuell* **41**:27-29.
- Pietschke C.** (2009) Anpassung eines Vektors zwecks Coexpression einer Glykosidase mit einem Chaperon. *Bachelor-Thesis*, Botanisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Rees H.H.** (1995) Ecdysteroid biosynthesis and inactivation in relation to function. *European Journal of Entomology* **92**(1):9-39.

- Reimann A., Nurhayati N., Backenkohler A. und Ober D.** (2004) Repeated evolution of the pyrrolizidine alkaloid-mediated defense system in separate angiosperm lineages. *Plant Cell* **16**(10):2772-2784.
- Richards S., Gibbs R.A., Weinstock G.M., Brown S.J., Denell R., Beeman R.W., Gibbs R., Bucher G., Friedrich M., Grimmelikhuijzen C.J.P., Klingler M., Lorenzen M.D., Roth S., Schroder R., Tautz D., Zdobnov E.M., Muzny D., Attaway T., Bell S., Buhay C.J., Chandrabose M.N., Chavez D., Clerk-Blankenburg K.P., Cree A., Dao M., Davis C., Chacko J., Dinh H., Dugan-Rocha S., Fowler G., Garner T.T., Garnes J., Gnirke A., Hawes A., Hernandez J., Hines S., Holder M., Hume J., Jhangiani S.N., Joshi V., Khan Z.M., Jackson L., Kovar C., Kowis A., Lee S., Lewis L.R., Margolis J., Morgan M., Nazareth L.V., Nguyen N., Okwuonu G., Parker D., Ruiz S.J., Santibanez J., Savard J., Scherer S.E., Schneider B., Sodergren E., Vattahil S., Villasana D., White C.S., Wright R., Park Y., Lord J., Oppert B., Brown S., Wang L.J., Liu Y., Worley K., Elsik C.G., Reese J.T., Elhaik E., Landan G., Graur D., Arensburger P., Atkinson P., Beidler J., Demuth J.P., Drury D.W., Du Y.Z., Fujiwara H., Maselli V., Osanai M., Robertson H.M., Tu Z., Wang J.J., Wang S.Z., Song H., Zhang L., Werner D., Stanke M., Morgenstern B., Solovyev V., Kosarev P., Brown G., Chen H.C., Ermolaeva O., Hlavina W., Kapustin Y., Kiryutin B., Kitts P., Maglott D., Pruitt K., Sapojnikov V., Souvorov A., Mackey A.J., Waterhouse R.M., Wyder S., Kriventseva E.V., Kadowaki T., Bork P., Aranda M., Bao R.Y., Beermann A., Berns N., Bolognesi R., Bonneton F., Bopp D., Butts T., Chaumot A., Denell R.E., Ferrier D.E.K., Gordon C.M., Jindra M., Lan Q., Lattorff H.M.G., Laudet V., von Levetsov C., Liu Z.Y., Lutz R., Lynch J.A., da Fonseca R.N., Posnien N., Reuter R., Schinko J.B., Schmitt C., Schoppmeier M., Shippy T.D., Simonnet F., Marques-Souza H., Tomoyasu Y., Trauner J., Van der Zee M., Vervoort M., Wittkopp N., Wimmer E.A., Yang X.Y., Jones A.K., Sattelle D.B., Ebert P.R., Nelson D., Scott J.G., Muthukrishnan S., Kramer K.J., Arakane Y., Zhu Q.S., Hogenkamp D., Dixit R., Jiang H.B., Zou Z., Marshall J., Elpidina E., Vinokurov K., Oppert C., Evans J., Lu Z.Q., Zhao P.C., Sumathipala N., Altincicek B., Vilcinskis A., Williams M., Hultmark D., Hetru C., Hauser F., Cazzamali G., Williamson M., Li B., Tanaka Y., Predel R., Neupert S., Schachtner J., Verleyen P., Raible F., Walden K.K.O., Angeli S., Foret S., Schuetz S., Maleszka R., Miller S.C. und Grossmann D.** (2008) The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* **452**(7190):949-955.
- Roseman A.M., Chen S.X., White H., Braig K. und Saibil H.R.** (1996) The chaperonin ATPase cycle: Mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL. *Cell* **87**(2):241-251.
- Rostas M. und Hilker M.** (2002) Feeding damage by larvae of the mustard leaf beetle deters conspecific females from oviposition and feeding. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **103**(3):267-277.
- Rowell-Rahier M. und Pasteels J.M.** (1986) Economics of chemical defense in chrysomelinae. *Journal of Chemical Ecology* **12**(5):1189-1203.
- Rudolph R. und Lilie H.** (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *Faseb Journal* **10**(1):49-56.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. und Erlich H.A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science* **239**(4839):487-491.

- Sarfare S., Ahmad S.T., Joyce M.V., Boggess B. und O'Tousa J.E.** (2005) The *Drosophila* ninaG oxidoreductase acts in visual pigment chromophore production. *Journal of Biological Chemistry* **280**(12):11895-11901.
- Schein C.H. und Noteborn M.H.M.** (1988) Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Bio-Technology* **6**(3):291-294.
- Schiff N.M., Feng Y., Quine J.A., Krasney P.A. und Cavener D.R.** (1992) Evolution of the expression of the GLD gene in the reproductive-tract of *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution* **9**(6):1029-1049.
- Schildknecht H. und Holoubek K.** (1961) Die Bombardierkäfer und ihre Explosionschemie .5. Mitteilung über Insekten-Abwehrstoffe. *Angewandte Chemie-International Edition* **73**(1):1-48.
- Schulz S., Gross J. und Hilker M.** (1997) Origin of the defensive secretion of the leaf beetle *Chrysomela lapponica*. *Tetrahedron* **53**(27):9203-9212.
- Scotto-Lavino E., Du G.W. und Frohman M.A.** (2006) 3' End cDNA amplification using classic RACE. *Nature Protocols* **1**(6):2742-2745.
- Sehmeyer S., Wang L., Langel D., Heckel D.G., Mohagheghi H., Petschenka G. und Ober D.** (2010) Flavin-dependent monooxygenases as a detoxification mechanism in insects: new insights from the Arctiids (Lepidoptera). *Plos One* **5**(5): e10435.
- Shtilerman M., Lorimer G.H. und Englander S.W.** (1999) Chaperonin function: Folding by forced unfolding. *Science* **284**(5415):822-825.
- Soe A.R.B., Bartram S., Gatto N. und Boland W.** (2004) Are iridoids in leaf beetle larvae synthesized de novo or derived from plant precursors? A methodological approach. *Isotopes in Environmental and Health Studies* **40**(3):175-180.
- Soetens P., Pasteels J.M. und Daloz D.** (1993) A simple method for *in-vivo* testing of glandular enzymatic-activity on potential precursors of larval defensive compounds in *Phratora*-species (Coleoptera, Chrysomelinae). *Experientia* **49**(11):1024-1026.
- Swinkels B.W., Vanooyen A.J.J. und Bonekamp F.J.** (1993) The yeast *Kluyveromyces lactis* as an efficient host for heterologous gene-expression. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **64**(2):187-201.
- Takeuchi H., Chen J.H., O'Reilly D.R., Turner P.C. und Rees H.H.** (2001) Regulation of ecdysteroid signaling: Cloning and characterization of ecdysone oxidase - A novel steroid oxidase from the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Journal of Biological Chemistry* **276**(29):26819-26828.
- Tan S., Tan H.T. und Chung M.C.M.** (2008) Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics* **8**(19):3924-3932.

- Termonia A., Hsiao T.H., Pasteels J.M. und Milinkovitch M.C.** (2001) Feeding specialization and host-derived chemical defense in Chrysomeline leaf beetles did not lead to an evolutionary dead end. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(7):3909-3914.
- Termonia A. und Pasteels J.** (1999) Larval chemical defence and evolution of host shifts in Chrysomela leaf beetles. *Chemecologie* **9**(1):13-23.
- Tipton K.F.** (1973) Biochemical aspects of monoamine-oxidase. *British Medical Bulletin* **29**(2):116-119.
- Towers G.H.N., Siegel S.M. und Duffey S.S.** (1972) Defensive secretion - biosynthesis of hydrogen-cyanide and benzaldehyde from phenylalanine by a millipede. *Canadian Journal of Zoology* **50**(7): 1047-1050.
- Udenfriend S. und Kodukula K.** (1995) How glycosylphosphatidylinositolanchored membrane proteins are made. *Annual Review of Biochemistry* **64**:563-591.
- Vanin E.F.** (1985) Processed pseudogenes - characteristics and evolution. *Annual Review of Genetics* **19**:253-272.
- Veith M., Dettner K. und Boland W.** (1996) Stereochemistry of an alcohol oxidase from the defensive secretion of larvae of the leaf beetle *Phaedon armoraciae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Tetrahedron* **52**(19):6601-6612.
- Veith M., Lorenz M., Boland W., Simon H. und Dettner K.** (1994) Biosynthesis of iridoid monoterpenes in insects - defensive secretions from larvae of leaf beetles (Coleoptera, Chrysomelidae). *Tetrahedron* **50**(23):6859-6874.
- Veith M., Oldham N.J., Dettner K., Pasteels J.M. und Boland W.** (1997) Biosynthesis of defensive allomones in leaf beetle larvae: Stereochemistry of salicylalcohol oxidation in *Phratora vitellinae* and comparison of enzyme substrate and stereospecificity with alcohol oxidases from several iridoid producing leaf beetles. *Journal of Chemical Ecology* **23**(2):429-443.
- Weber G.W.** (1981) The bombardier beetle myth exploded. *Creation Evolution Journal* **2**(3):1-5.
- Wierenga R.K., Dejong R.J., Kalk K.H., Hol W.G.J. und Drenth J.** (1979) Crystal-structure of para-hydroxybenzoate hydroxylase. *Journal of Molecular Biology* **131**(1):55-73.
- Wilkinson D.L. und Harrison R.G.** (1991) Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Bio-Technology* **9**(5):443-448.
- Zamocky M., Hallberg M., Ludwig R., Divne C. und Haltrich D.** (2004) Ancestral gene fusion in cellobiose dehydrogenases reflects a specific evolution of GMC oxidoreductases in fungi. *Gene* **338**(1):1-14.
- Zhou J.J., Zhang G.A., Huang W.S., Birkett M.A., Field L.M., Pickett J.A. und Pelosi P.** (2004) Revisiting the odorant-binding protein LUSH of *Drosophila melanogaster*: evidence for odour recognition and discrimination. *Febs Letters* **558**(1-3):23-26.

Zia M.A., Khalilur R., Saeed M.K., Andaleeb F., Rajoka M.I., Sheikh M.A., Khan I.A. und Khan A.I.
(2007) Thermal characterization of purified glucose oxidase from a newly isolated *Aspergillus niger* UAF-1. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **41**(2):132-138.

7. Anhang

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist. Abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer wurden keine anderen Hilfsmittel und Quellen verwendet als angegeben sind. Textstellen, die inhaltlich oder wörtlich aus anderen Quellen entnommen wurden, sind als solche gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder ganz noch in Auszügen an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Desweiteren erkläre ich hiermit, dass die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist und dass ich bisher keine Promotionsversuche unternommen habe.

Der Zulassung von Zuhörerinnen und Zuhörern bei der Disputation wird nicht widersprochen.

Kiel, den 16.08.2011

Carmen Michalski

Veröffentlichung der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Michalski C., Mohagheghi H., Nimtze M., Pasteels J.M., und Ober D. (2008). Salicyl alcohol oxidase of the chemical defense secretion of two chrysomelid leaf beetles - Molecular and functional characterization of two new members of the glucose-methanol-choline oxidoreductase gene family. *Journal of Biological Chemistry* **283**(28):19219-19228.

Tagungsbeiträge

Michalski C., Mohagheghi H., Ober D.: Evolution of Insect Defense Strategy of Leaf Beetles (Chrysomelina) that use Herbal Precursors. International Society of Chemical Ecology, 23rd annual meeting, Jena, 22. - 26. Juli 2007 und Botanikertagung, Hamburg, 3. - 7. September 2007.

Michalski C., Mohagheghi H., Ober D.: Molecular Cloning and Functional Expression of an Extra Cellular Salicyl Alcohol Oxidase of Defensive Secretions of *Chrysomela populi* and *Chrysomela tremulae*. International Society of Chemical Ecology, 24rd annual meeting (25th Anniversary), State College, Pennsylvania, USA, 17. - 22. August 2008

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	21.05.1980
Geburtsort	Zell an der Mosel
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

08/86 – 12/89	Besuch der Grundschule Steinrausch, Saarlouis
01/90 – 07/90	Besuch der Finkenhof-Grundschule, Bonn
08/90 – 05/99	Besuch des Hardtberg-Gymnasiums, Bonn mit Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Studium

10/00 – 10/05	Studium der Pharmazie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig <ul style="list-style-type: none">○ 1. Staatsexamen im März 2004 erfolgreich absolviert○ 2. Staatsexamen im Oktober 2005 erfolgreich absolviert○ 3. Staatsexamen im Januar 2007 erfolgreich absolviert
16.01.2007	Erhalt der Approbation zur Apothekerin

Berufliche Tätigkeiten

08/99 – 09/00	AuPair in den Vereinigten Staaten von Amerika, Raleigh, N.C.
12/05 – 05/06	Pharmaziepraktikum in der Spitzweg-Apotheke, Braunschweig
06/06 – 11/06	Pharmaziepraktikum an der University of Florida, Gainesville, FL.
02/07 – 09/10	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen einer Promotion am Botanischen Institut der Christian-Albrechts-Universität Kiel, unter Anleitung von Prof. Dr. Dietrich Ober
10/10 – 08/11	Apothekerin in der Adler-Apotheke, Kappeln
seit 09/11	Pächterin der Adler-Apotheke