

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Biologisch-Pharmazeutische Fakultät

Max-Planck-Institut für chemische Ökologie
Abteilung Bioorganische Chemie



seit 1558

**Charakterisierung von β -Glucosidasen aus dem Wehrsekret
der juvenilen Blattkäfer *Phaedon cochleariae* und
*Chrysomela populi***

Bachelorarbeit

zur Erlangung des Grades eines
Bachelor of Science

vorgelegt von
Wiebke Häger

geboren am 19.01.1991 in Hamburg
Jena, 23.09.2013

Gutachter:

Prof. Dr. Wilhelm Boland

Dr. Roy Kirsch

Inhaltsverzeichnis

1	Abbildungsverzeichnis	III
2	Tabellenverzeichnis	III
3	Formelverzeichnis.....	III
4	Abkürzungsverzeichnis	IV
5	Einleitung.....	1
5.1	Allgemeine Verteidigungsstrategien der Käfer	1
5.2	Abwehrstrategien der Blattkäfer (<i>Chrysomelidae</i>).....	1
5.3	Synthese von Abwehrverbindungen der drei Blattkäferarten <i>P. cochleariae</i> , <i>C. populi</i> und <i>C. lapponica</i>	3
5.4	Evolutionäre Entwicklung der Verteidigungsstrategien von Blattkäfern.....	5
6	Zielstellung der Bachelorarbeit.....	7
7	Material und Methoden	8
7.1	Material.....	8
7.1.1	Geräte	8
7.1.2	Insekten.....	8
7.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	8
7.1.4	Chemikalien.....	8
7.1.5	Kommerzielle <i>Kits</i>	9
7.1.6	Zelllinien	10
7.1.7	Plasmide.....	10
7.1.8	Software	10
7.1.9	Puffer.....	10
7.2	Methoden	12
7.2.1	Zellkultur.....	12
7.2.2	Transfektion der Zellen	12
7.2.3	Selektion der transfizierten Zellen.....	13
7.2.4	Proteinexpression der β -Glucosidasen	13
7.2.5	Proteinaufreinigung der β -Glucosidasen.....	14
7.2.6	Dokumentation der Proteinaufreinigung mittels SDS-PAGE	15
7.2.7	Western Blot.....	15
7.2.8	Bestimmung des Proteingehalts	16
7.2.9	Aktivitätsbestimmung der β -Glucosidasen	16
7.2.10	Bestimmung des Aktivitätsbereichs der β -Glucosidasen bei verschiedenen pH-Werten	17

7.2.11	Bestimmung des Aktivitätsbereichs der β -Glucosidasen bei verschiedenen Temperaturen	17
7.2.12	Bestimmung der kinetischen Parameter	18
7.2.13	Haltung der <i>P. cochleariae</i> -Larven.....	20
7.2.14	Sammeln des Wehrsekrets von <i>P. cochleariae</i> -Larven.....	21
7.2.15	Bestimmung der Glucosekonzentration	21
7.2.16	Inhibierung der β -Glucosidasen durch Glucose	22
8	Ergebnisse	23
8.1	Ergebnisse der Zellkultur	23
8.2	Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie	23
8.2.1	Nachweis der β -Glucosidasen durch Western Blot	24
8.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	25
8.3	Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung	25
8.4	Aktivitätsbereich der β -Glucosidasen <i>Cp</i> β Glc und <i>Pc</i> β Glc bei verschiedenen pH-Werten	26
8.5	Aktivitätsbereich der β -Glucosidasen <i>Cp</i> β Glc und <i>Pc</i> β Glc bei verschiedenen Temperaturen	27
8.6	Kinetische Parameter v_{max} , K_M , k_{cat} und k_{cat}/K_M der β -Glucosidasen <i>Cp</i> β Glc und <i>Pc</i> β Glc	28
8.7	Glucosegehalt im Wehrsekret von <i>Pheadon cochleariae</i>	30
8.8	Inhibierung der β -Glucosidase <i>Pc</i> β Glc durch Glucose	31
9	Diskussion	32
9.1	Proteinexpression	32
9.2	Proteinaufreinigung	32
9.3	Aktivitätsbestimmung	33
9.4	Aktivitätsbereich der β -Glucosidasen bei verschiedenen pH-Werten	34
9.5	Aktivitätsbereich der β -Glucosidasen bei verschiedenen Temperaturen ...	35
9.6	Kinetische Parameter v_{max} , K_M , k_{cat} und k_{cat}/K_M	37
9.7	Glucosegehalt im Sekret von <i>P. cochleariae</i> und Inhibition von <i>Pc</i> β Glc durch Glucose	41
10	Ausblick	43
11	Zusammenfassung	44
12	Literaturverzeichnis	i
13	Anhang	iv
14	Danksagung	vi
15	Selbstständigkeitserklärung	vii

1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rekonstruktion der Phylogenie des Subtribus Chrysomelina unter Berücksichtigung der Biosynthesestrategien der Wehrverbindungen.....	4
Abbildung 2: Alignment der Aminosäuresequenzen der β -Glucosidasen aus <i>P. cochleariae</i> ($Pc\beta$ Glc), <i>C. populi</i> ($Cp\beta$ Glc) und <i>C. lapponica</i> ($C\beta$ Glc).	6
Abbildung 3: Polyacrylamid-Gel der Proteinaufreinigung der β -Glucosidase $Pc\beta$ Glc und der Kontrolle des Kulturüberstands nicht transfizierter Insektenzellen.....	24
Abbildung 4: Aktivitätsbestimmung der aufgereinigten β -Glucosidasen $Cp\beta$ Glc und $Pc\beta$ Glc.	26
Abbildung 5: Relative Aktivität der aufgereinigten β -Glucosidasen aus <i>Chrysomela populi</i> ($Cp\beta$ Glc) und <i>Pheadon chochleariae</i> ($Pc\beta$ Glc) bei verschiedenen pH-Werten.....	27
Abbildung 6: Relative Aktivität der aufgereinigten β -Glucosidasen aus <i>Chrysomela populi</i> ($Cp\beta$ Glc) und <i>Pheadon chochleariae</i> ($Pc\beta$ Glc) bei verschiedenen Temperaturen.....	28
Abbildung 7: Enzymkinetik für die β -Glucosidasen aus <i>Chrysomela populi</i> ($Cp\beta$ Glc) und <i>P. cochleariae</i> ($Pc\beta$ Glc) jeweils mit den Substraten Salicin und 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid.....	30
Abbildung 8: Inhibierung der aufgereinigten β -Glucosidase aus <i>P. cochleariae</i> ($Pc\beta$ Glc) durch Glucose.....	31
Abbildung 9: Vergleich der Graphen der aufgereinigten β -Glucosidasen $Pc\beta$ Glc und $Cp\beta$ Glc (jeweils mit dem Substrat 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid) mit der Berechnung nach „Michaelis-Menten“ und „Substratinhibition“	41

2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kinetische Parameter v_{max} , K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M und K_i für die aufgereinigten β -Glucosidasen aus <i>C. populi</i> ($Cp\beta$ Glc) und <i>P. cochleariae</i> ($Pc\beta$ Glc) jeweils mit den Substraten Salicin und 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid.....	29
Tabelle 2: pH-Aktivitätsoptima einiger β -Glucosidasen aus verschiedenen Organismen der Klasse Insecta.....	35
Tabelle 3: Temperatur-Aktivitätsoptima einiger β -Glucosidasen aus verschiedenen Organismen der Klasse Insecta.....	37

3 Formelverzeichnis

Formel 1: Substratinhibitions-Gleichung	20
Formel 2: Michaelis-Menten-Gleichung.....	20

4 Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumen/Volumen
(w/v)	Masse/Volumen
(w/w)	Masse/Masse
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
C β Glc	β -Glucosidase aus <i>Chrysomela lapponica</i>
C ρ β Glc	β -Glucosidase aus <i>Chrysomela populi</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CV	<i>Column Volume</i>
Da	Dalton
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC	<i>Enzyme Commission</i>
Em	Emission
Ex	Extinktion
g	Erdbeschleunigung
GDP	Geranyldiphosphat
His ₆	Hexahistidin
HK	Hexokinase
HRP	Meerrettich-Peroxidase
K	Kontrolle
k _{cat}	Wechselzahl
k _{cat} /K _M	Spezifitätskonstante
K _i	Inhibitor konstante
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
n	Anzahl
NAD	Nicotinamadenindinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamadenindinucleotid
PCR	Polymerasekettenreaktion

PcβGlc	β-Glucosidase aus <i>Phaedon cochleariae</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SE	Standardfehler
spp.	<i>species pluralis</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS(T)	<i>Tris-buffered saline with Tween-20</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
VIS-Licht	sichtbares Licht
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit

5 Einleitung

5.1 Allgemeine Verteidigungsstrategien der Käfer

Käfer (Coleoptera) stellen mit über 360.000 beschriebenen Arten die weltweit größte Ordnung in der Klasse der Insekten (Insecta) dar. Etwa 35% dieser Arten leben im Adult- und Larvenstadium phytophag [1]. Fast alle Blattkäfer (*Chrysomelidae*), die mit etwa 37.000 beschriebenen Arten eine der größten Familien innerhalb der Coleoptera bilden, leben ektophytisch, das heißt, sie ernähren sich mit ihren beißenden Mundwerkzeugen von Blatt-, Stängel- oder Wurzelstrukturen der Wirtspflanze [1]. Entsprechend halten sich bei vielen Blattkäfern die Larven und Adulten zeitlebens auf der Pflanzenoberfläche auf, wo sie Prädatoren wie Vögeln, Spinnen oder Ameisen, aber auch mikrobiellen Einflüssen ausgesetzt sind [2]. Um sich vor diesen ständig gegenwärtigen Bedrohungen zu schützen, entwickelten die Käfer zahlreiche defensive Verhaltensweisen. Dies beinhaltet sowohl chemische als auch physikalische Verteidigungsstrategien. Flucht, Warnsignale (Warngerüche, -geräusche und -tracht), Mimikry (Scheinwartracht, Imitation giftiger oder gefährlicher Arten), Krypsis (Tarnung durch Anpassen der Erscheinung), unbewegliches Verharren, Thanatose (Totstellreflex) oder Fallenlassen bei Erschütterungsreizen dienen dazu, eine Konfrontation mit dem Feind zu vermeiden oder von diesem nicht entdeckt zu werden. Aktiv werden Fressfeinde durch Drohgebärden, Gruppenbildung, Hervorwürgen von Darminhalt oder Bisse abgewehrt. Zusätzlich kann Wehrsekret durch Reflexbluten oder über spezielle Drüsen abgesondert werden [2], [3], [1].

5.2 Abwehrstrategien der Blattkäfer (*Chrysomelidae*)

Eine Abwehr von Fressfeinden mithilfe spezialisierter Drüsen findet sich bei vielen Arten der Blattkäfer sowohl bei den adulten Käfern als auch bei den Larven [4]. So besitzen beispielsweise die Larven des Subtribus Chrysomelina 18 paarig angeordnete Wehrdrüsen auf den letzten zwei Thorax- sowie auf den ersten sieben Abdominalsegmenten. Jedes Drüsensystem besteht dabei aus einem kutikulären Reservoir mit dorsaler Öffnung und daran anhaftenden sekretorischen Zellen, die Wehrsekret exokrin in das Reservoir sezernieren [5]. Wird die Larve gereizt, stülpt sie durch Erhöhung des Hämolymphtdrucks oder Muskeleinsatz das Reservoir nach außen, wobei Sekrettröpfchen entlassen werden. Ist die Gefahr vorüber, wird das Reservoir mit dem präsentierten Wehrsekret mithilfe von Muskelsträngen wieder eingezogen.

Die von den phytophagen Blattkäferlarven zur Verteidigung eingesetzten Verbindungen sind vielfältig und eng mit der chemischen Zusammensetzung der als Nahrung dienenden Wirtspflanzen verbunden. Im larvalen Wehrsekret der *Chrysomelina* konnte ein breites Spektrum an Abwehrsubstanzen nachgewiesen werden. Man findet beispielsweise Iridoide (cyclopentanoide Monoterpene, z.B. Chrysomelidial), Aldehyde (z.B. Salicylaldehyd), Ester (z.B. Phenylethylester) oder Naphtochinone (z.B. Juglon) [6], [7].

Im Laufe der Evolution haben sich bei den juvenilen Blattkäfern drei verschiedene Synthesewege für Abwehrsubstanzen herausgebildet. Die *de novo*-Synthese von Iridoiden wird dabei als ursprünglichste Strategie angesehen [8], bei der die defensiven Komponenten vollständig von den Larven selbst hergestellt werden. Diese sind folglich nicht auf das Vorhandensein bestimmter Sekundärmetabolite in ihrer Wirtspflanze angewiesen und können so unterschiedliche Pflanzen als Lebensraum und Nahrungsquelle nutzen [9], [10]. Hierzu zählt beispielsweise der Meerrettichblattkäfer *Phaedon cochleariae*. Sequestrierende Arten, wie zum Beispiel *Chrysomela populi*, nehmen pflanzliche Glucoside aus der Nahrung auf und verwenden diese als Ausgangsubstanzen für die Synthese von Abwehrverbindungen [9], [11]. Diese Strategie der Verwertung von Sekundärmetaboliten der Wirtspflanze hat sich vermutlich aus der *de novo*-Synthese entwickelt [6], [8]. Die hochspezialisierten Sequestrierer sind allerdings meist auf eine Wirtspflanze beschränkt [9]. Die verringerte Flexibilität, die durch die Abhängigkeit von Sekundärmetaboliten aus der Wirtspflanze entsteht, könnte eventuell durch die ökonomischen Vorteile des Sequestrierens kompensiert werden. Durch das Aufnehmen von Vorstufen, die durch wenige Reaktionen in die aktive Abwehrsubstanz umgewandelt werden können, können beispielsweise metabolische Schritte und somit Energie eingespart werden. Der dritte Syntheseweg kombiniert die beiden Strategien der *de novo*-Synthese und des Sequestrierens. Die Mitglieder der sogenannten *Interrupta*-Gruppe, die nach der Spezies *Chrysomela interrupta* benannt wurde und zu der auch *Chrysomela lapponica* zählt, sequestrieren glucosidisch gebundene Alkohole aus ihren Wirtspflanzen und verestern diese mit *de novo*-produzierten Carbonsäuren [12], [13]. Durch das unselektive Sequestrieren von pflanzlichen Sekundärmetaboliten werden ein Wirtspflanzenwechsel oder eine Veränderung der volatilen Abwehrverbindungen und damit ein Entkommen der Larven vor potentiellen Fressfeinden ermöglicht.

5.3 Synthese von Abwehrverbindungen der drei Blattkäferarten *P. cochleariae*, *C. populi* und *C. lapponica*

Der Meerrettichblattkäfer *P. cochleariae* ist in weiten Teilen Westeuropas, Vorder- und Mittelasien sowie Nordamerika verbreitet. Die fast schwarzen, grün oder blau metallisch glänzenden Käfer leben phytophag auf zahlreichen Kohl- (*Brassica spp.*) und Rettichspezies (*Raphanus spp.*), der Knoblauchsranke (*Alliaria petiolata*) und dem Gewöhnlichen Hirtentäschel (*Capsella bursa-pastoris*). Die Weibchen legen an der Blattunterseite oder am Stängel Eier in kleine Vertiefungen, aus denen nach 9 – 10 Tagen braungelbe Larven mit glänzendem, schwarzen Kopf schlüpfen. Diese bevorzugen Meerrettich (*Amoracia rusticana*), Schwarzen Senf (*Brassica nigra*), Wilde Sumpfkresse (*Rorippa sylvestris*) und in maritimen Gegenden Echtes Löffelkraut (*Cochlearia officinalis*) als Wirtspflanze [14], [15], [16]. Die Larven von *P. cochleariae* gehören zu den Iridoid-*de novo*-Produzenten, die in ihrem Sekret das Iridoid Chrysomelidial als Wehrverbindung besitzen. Die ersten Schritte der Iridoid-Synthese finden bei *P. cochleariae* im Fettkörper statt [17]. Dort werden die aus dem Acetat-Mevalonat-Weg stammenden Vorstufen Isopentenylidiphosphat und Dimethylallyldiphosphat durch die Geranyldiphosphat-Synthase zum Monoterpen Geranyldiphosphat (GDP) zusammengefügt [18], [19], [20]. Durch Oxidation und Glykosylierung von GDP entsteht 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid [21]. Über selektive Transporter gelangt dieses in das Drüsenreservoir und wird durch eine β -Glucosidase hydrolysiert [22]. Das entstehende 8-Hydroxygeraniol wird zum Dialdehyd 8-Oxogeranial oxidiert und durch eine Cyclase in das Iridoid Chrysomelidial umgewandelt [23].

Der Pappelblattkäfer *C. populi* ist in Europa aber auch in Teilen Asiens anzutreffen [24]. Wichtig ist dabei vor allem das Vorkommen seiner Wirtspflanzen, der Weidengewächse (Salicaceae). Sowohl der Imago mit roten Flügeldecken und schwarzem Kopf als auch die weiß-gräuliche, schwarz gepunktete Larve leben auf Pappeln (*Populus spp.*) und Weiden (*Salix spp.*) und ernähren sich von deren Blättern [25]. Aus dem aufgenommenen Pflanzenmaterial sequestrieren die Larven Salicin, das als Vorstufe für Salicylaldehyd, eine intensiv riechende Abwehrverbindung, dient [11]. Das Salicin gelangt dabei aus dem Darmlumen unselektiv in die Hämolymphe und wird von dort aktiv über selektive Transporter in das Drüsenreservoir transportiert [22]. Dort wird durch eine β -Glucosidase der Glucoserest abgespalten und das Aglucon Saligenin durch eine Salicylalkohol-Oxidase zum Salicylaldehyd oxidiert [6].

C. lapponica ist in Nordeuropa und -asien sowie vereinzelt auch in Mitteleuropa anzutreffen. Die adulten Käfer zeigen eine schwarz-rote Musterung ihrer Flügeldeckel und einen schwarzen Kopf während die Larven gänzlich schwarz gefärbt sind. Die allopatrischen Populationen sind in der Lage, entweder auf Weiden- oder Birkengewächsen (Betulaceae) zu leben [26]. Als Angehöriger der *Interrupta*-Gruppe synthetisiert *C. lapponica* wirtspflanzenabhängige Wehrsubstanzen. Bei Larven, die auf Weiden leben, findet sich Salicylaldehyd aber auch Blattalkoholester, während auf Birken lebende Larven hauptsächlich Blattalkoholester aufweisen [12], [13]. Letztere werden aus *de novo* synthetisierten Carbonsäuren und sequestrierten, glucosidisch gebundenen Blattalkoholen gebildet. Die Glucoside werden im Drüsenreservoir durch eine β -Glucosidase hydrolysiert und mit einer Carbonsäure verestert. Je nach Wirtspflanze und der Verfügbarkeit chemischer Verbindungen variiert die Zusammensetzung der unterschiedlichen Esterverbindungen im Wehrsekret [27].

Die drei möglichen Synthesealternativen für Wehrsubstanzen im Drüsensekret von Blattkäferlarven – und im Besonderen von *P. cochleariae*, *C. populi* und *C. lapponica* – unter Berücksichtigung der Abhängigkeit von der Wirtspflanze sind in Abbildung 1 dargestellt.

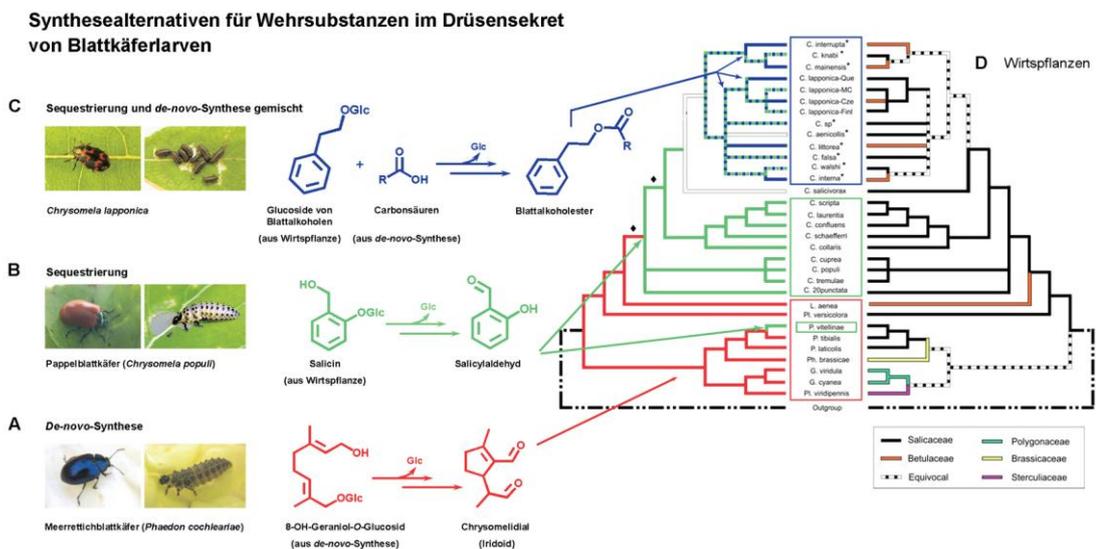


Abbildung 1: Rekonstruktion der Phylogenie des Subtribus Chrysomelina unter Berücksichtigung der Biosynthesestrategien der Wehrverbindungen. A: rot, autogene-Biosynthese von Iridoiden; B: grün, Produktion von Salicylaldehyd ausgehend von Salicin (Sequestrierung aus Pflanzen der *Salicaceae*-Familie); C: blau, Produktion von Esterverbindungen, die aus *de novo*-synthetisierter Carbonsäure und sequestrierten, glucosidisch gebundenen Alkoholen gebildet werden; D: Rekonstruktion der Phylogenie anhand mitochondrialer Kontrollregionen und unter Berücksichtigung der Wirtspflanzenabhängigkeit (nach Termonia et al. [8]).

Unverändert übernommen von Burse et al. (Max-Planck-Institut für chemische Ökologie) [22]

5.4 Evolutionäre Entwicklung der Verteidigungsstrategien von Blattkäfern

Die drei möglichen Synthesewege der Wehrverbindungen der *Chrysomelidae* – die *de novo*-Synthese, das Sequestrieren von Sekundärmetaboliten der Wirtspflanze und eine Kombination beider Strategien – weisen trotz offensichtlicher Unterschiede einige Gemeinsamkeiten auf.

Vorläufermoleküle, ob *de novo* synthetisiert oder sequestriert, zirkulieren glucosidisch gebunden in der Hämolymphe. Als Glucoside sind die Verbindungen weniger toxisch, stabiler und können aufgrund ihres polaren Charakters nicht durch Membranen diffundieren [6], [28]. Über selektive Transportsysteme gelangen sie aus der Hämolymphe in das Drüsenreservoir. Diese erlauben nur dem nativen Substrat – 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid bei *P. cochleariae* und Salicin bei *C. populi* – den Durchtritt. Entsprechend liegt im Drüsenreservoir nur das für die Synthese der Abwehrverbindungen wichtige Glucosid vor [29]. *C. lapponica* hingegen besitzt offenbar Transportsysteme, die ein breiteres Substratspektrum aufweisen und einer Vielzahl von Vorstufen den Eintritt in die Drüsenzellen erlauben [22]. Im Drüsenreservoir hydrolysiert im Sekret der *Chrysomelidae* eine β -Glucosidase das Glucosid zu Glucose und dem entsprechenden Aglucon, welches durch weitere Modifikationen in die entsprechende Wehrverbindung umgesetzt werden kann [6]. β -Glucosidasen (EC 3.2.1.21) spalten terminale, nicht-reduzierende β -D-glucosidisch gebundene Glucosereste hydrolytisch von ihrem Substrat ab. Sie besitzen meist eine breite Substratspezifität und setzen bei der Reaktion Glucose frei [30]. Für die weiterführende Umwandlung des Aglucons werden beispielsweise spezifische Oxidasen oder Cyclasen benötigt [6], [31].

Es wird davon ausgegangen, dass die Enzyme, die für die Konversion sowohl von autogen produzierten als auch der sequestrierten Glucoside in die aktive Wehrverbindung benötigt werden, bereits in den *de novo*-Produzenten vorhanden sind [8], [6]. Veränderungen in der Spezifität der Enzyme aber auch der selektiven Transporter der Drüsenzellen, die im Laufe der Evolution stattgefunden haben, ermöglichen die Verwertung von pflanzlichen Sekundärmetaboliten durch spezialisierte Sequestrierer [6], [29]. Eine zusätzliche Weiterentwicklung der Enzyme und Transportsysteme, die in der *Interrupta*-Gruppe vorliegt, ermöglicht die Verwertung zahlreicher Sekundärmetabolite aus der Wirtspflanze.

In der Arbeitsgruppe Boland wurde eine Proteom-Analyse der Blattkäfer *P. cochleariae*, *C. populi* und *C. lapponica* durchgeführt. Mit den daraus resultierenden Sequenzen der jeweiligen sekretorischen β -Glucosidasen des Wehrsekrets wurde mit dem Programm BioEdit ein Alignment erstellt (Abbildung 2).

```

C1βGlc MRTVFLIVLTSYGVFGHNGTFPPNFLFGVAHSAYQVEGAWNIDGKKDSIWDHFVHESESRILNNDTGLACDSYHLYKDD 80
CpβGlc MRTVFLIVLTSYGVFGHNGTFPPNFLFGVAHSAYQVEGAWNIDGKKDSIWDHFVHONRSRIENRDTGDVACDSYDLYKED 80
PcβGlc MRVVFLLTTSYGAFGRNRTFPPGFLFGVAQSAFQVEGAWNIDGKKDSIWDHFVHENRSRILNDRDTADVACDSYHLYRED 80

C1βGlc IRLAAAVGANMYRFSISWSRVLPNGDITINRRLGLRYERILQEVRRRDMIPVVVTIYHWDLPQSLMDRGI DWTNPKLV D Y 160
CpβGlc IRLAAALGVNMYRFSISWPRVLPNGDITVINRRLGLRYERILNEVRRHDMVPVVVTIYHWDLPQALMKRGI DWTNPKLV N Y 160
PcβGlc VKLAAAIQMKMYRFSISWPRVLPDGTGSKTINRKAIRFYEHLLVHEITRRHGMVVPVATLIYHWDLPQALMDAGV DWTNPKV V D H 160

C1βGlc FVDYARIVIRQFPFHYVWVTINEPHSFCROGYGLGAFAPGIRSSGKDEYKCIYTAALKAHAAVYRMYKREFPHYKGM S I V 240
CpβGlc FVDYARIVIRHFRHVGWVTINEPHTFCRLGYGLGAFAPGIRSSGKDEYKCIYTMKAAHAAVYRMYKREFPHYKGM S L V 240
PcβGlc FVDYARIVIKRHHVVGWVTVNEPHTFCREGYGVGFAPGIRSSGRDEYKCIYMMMAHAIVYRMYKNEFPHEGKMSMA 240

C1βGlc YDIQWYKPKNASSAEDIAARRGLDFDAGLYAHPVFLGGWPPEAEKRIAERSRLANLTTSRLPAFSPPEEIAFINGT H D F F 320
CpβGlc YDMQWYLKPKNASSAKDVEAVRRGLDFDAGLYVHPVFLGGWPPEAEKRIAERSRLANLTTSRLPAFSPPEEIAFINGT Y D F F 320
PcβGlc LDIQWFQPKNASSAADIAARRRFADEFDGLYAHVPVFLGGWPPEAEKRIAERSRANLTKSRLPAFSPVEIALINGT E D F F 320

C1βGlc GVNITYTGLIENLPEYNKSISSYEADVHSDMSFDPNWTLEAGYFAFAPDAPLHVLYKVKETYNNDPDIITEIGASDDG S T 400
CpβGlc GVNITYTGLLVENLPEYNKSISSYEADVHLELSFDPNWTLEAGYFAFAPDAPLHVLYKVKETYNNDPDIITEIGSSD Y G N T 400
PcβGlc GVNMYTGLLVENLPEFPHNVSSYEADVRSQLSFSFNWTLETGYFAETPNAPLHILRYKVKETYNNEELIITEIGSSDDG S T 400

C1βGlc LYDELRVKLFQNYFDSILRAIYDHGVNMIGLTIWSXIDNFEWASGYIHFGIYYVDMDDPRRTRYPKMSTVYVXQ L T S X N 480
CpβGlc LYDSLRILFQNYFDSILRAIYDHGVNMIGLTIWSLLDNFEWASGYIHFGIYYVDMDDPRRTRYPKMSVYVXK L T R H N 480
PcβGlc LYDELRIRLFFHNYFNSILDAIYDYDQVNSGLNIWSILDNFEWASGYALHFGIYYVDMDDPRRTRYPKMSTEFV N Q M P R L N 480

C1βGlc RLPADSIEPMYRKIVGNVTSNLRILDKLNSPKQVRRXQRFHHHLAQSRRIGT 536
CpβGlc RLPDIDSIEPLYTKMVGNVTTDLRILDKLNSPSEVRRRSHRPRHHLAPSRKIRA 536
PcβGlc RVPAIESIRPIYENSMRNATAQLNRIIEKMNNRSAERRLNRRPRHHLAPSRNV-- 534

```

Abbildung 2: Alignment der Aminosäuresequenzen der β -Glucosidasen aus *P. cochleariae* (*PcβGlc*), *C. populi* (*CpβGlc*) und *C. lapponica* (*CβGlc*). Das Alignment wurde mit BioEdit erstellt. Aminosäuren, die eine Übereinstimmung von mindestens 60% zeigen, wurden schwarz hinterlegt. Die Aminosäuresequenzen von *CβGlc* und *CpβGlc* stimmen zu 85% überein. Bei *CpβGlc* und *PcβGlc* sind 73% identisch und bei *CβGlc* und *PcβGlc* 71%.

Beim Alignment der Aminosäuresequenzen von *PcβGlc*, *CpβGlc* und *CβGlc* ist eine große Sequenzähnlichkeit der drei β -Glucosidasen erkennbar. *CβGlc* weist eine Übereinstimmung von 85% mit *CpβGlc* auf. *CpβGlc* und *PcβGlc* sind zu 73% identisch und *CβGlc* und *PcβGlc* zu 71%. Aufgrund der großen Sequenz-übereinstimmung ist ein gemeinsamer evolutionärer Ursprung der Enzyme wahrscheinlich. Über die biochemischen Eigenschaften und kinetischen Parameter der β -Glucosidasen kann anhand der Sequenzinformation allerdings keine Aussage getroffen werden.

6 Zielstellung der Bachelorarbeit

P. cochleariae, *C. populi* und *C. lapponica* gehören jeweils zu einer Gruppe Blattkäfern, die ihre defensiven Substanzen *de novo* synthetisieren, pflanzliche Sekundärmetabolite sequestrieren oder als Angehörige der *Interrupta*-Gruppe diese beiden Strategien kombinieren. Im Wehrsekret finden sich bei allen drei Spezies β -Glucosidasen, die im Verlauf dieser Bachelorarbeit charakterisiert werden sollen. Dafür sollen die β -Glucosidasen rekombinant exprimiert und aufgereinigt werden. Für die Bestimmung der Enzymeigenschaften soll deren Aktivität bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen untersucht werden. Außerdem sollen die jeweiligen kinetischen Parameter berechnet werden, um zu überprüfen, ob sich der evolutionäre Verlauf der Enzymentwicklung in der Substratspezifität widerspiegelt bzw. ob Substratpräferenzen für das native Substrat erkennbar sind.

7 Material und Methoden

7.1 Material

7.1.1 Geräte

Infinite [®] M200 Microplate Reader	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Mikroskop Axiovert 40 C	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Mini-PROTEAN [®] Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Molecular Devices SpectraMax 250 Microplate Reader	GMI Inc., Ramsey, MN, USA
Trans-Blot [®] Turbo [™] Transfer System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Transilluminator Biometra Ti5 (254 nm)	Biometra, Göttingen

7.1.2 Insekten

<i>P. chochleariae</i> -Larven	aus Zucht am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie
--------------------------------	---

7.1.3 Verbrauchsmaterialien

96 Well ELISA Microplatte, transparent	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
96 Well Polystyrol Microplatte, schwarz	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Any kD [™] Mini-PROTEAN [®] TGX Precast Gels	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CELLSTAR [®] 6 Well Zellkultur Multiwell Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PD-10 Desalting Columns	GE Healthcare, München
Poly-Prep Chromatography Columns	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PVDF Transfer Membrane (0,45 µm)	Thermo Fischer Scientific GmbH, Bonn
Reaktionsgefäße (1,6 ml, farblos, Low Binding)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
SnakeSkin Dialysis Tubing, 10K MWCO, 35 mm Trockendurchmesser	Thermo Fischer Scientific GmbH, Bonn
Zellkulturflaschen BD Falcon [™] (belüftet, 25 cm ²)	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkulturflaschen BD Falcon [™] (belüftet, 75 cm ²)	BD Biosciences, Heidelberg
ZelluTrans Dialysiermembranen T1, 3500 MWCO, 12 mm Trockendurchmesser	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

7.1.4 Chemikalien

1-Step [™] TMB-Blotting	Thermo Fischer Scientific GmbH, Bonn
4-Methylumbelliferyl-β-D-glucoside	AnaSpec, Inc., Fremont, CA, USA
8-Hydroxy-geraniol-β-D-glucosid	synthetisiert von Dr. Maritta Kunert (AG Boland)
Alkali-soluble Casein (5%)	Novagen [®] , Darmstadt

Blasticidin S-Hydrochloride	AppliChem GmbH, Darmstadt
Blasticidin S-Hydrochloride	BioVision, Inc., Milpitas, CA, USA
Bromphenolblau	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
D-(-)-Salicin	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
Dithiothreitol (DTT)	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
Essigsäure (100 mM)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Express Five [®] SFM	Gibco [®] , Darmstadt
FuGENE [®] Transfection Reagent	Promega GmbH, Mannheim
Gentamycin (50 mg/ml)	AMRESCO LCC, Solon, OH, USA
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
His•Tag [®] Antibody HRP Conjugate (1:5000)	Novagen [®] , Darmstadt
HisPur [™] Cobalt Resin	Thermo Fischer Scientific GmbH, Bonn
Imidazol PUFFERAN [®]	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
L-Glutamin 100x (200 mM)	Gibco [®] , Darmstadt
MA Lipofection Enhancer	IBA GmbH, Göttingen
Natriumacetat (100 mM)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Precision Plus Protein [™] Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Protease-Inhibitor-Mix HP (100x)	SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Roti [®] -Blue quick	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Tween [®] 20	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
α-D-(+)-Glucose Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz

Für alle Puffer und folgenden Versuche wurde Reinstwasser verwendet. Im Folgenden wird dieses nur noch als Wasser bezeichnet. Davon Abweichendes ist an entsprechender Stelle gekennzeichnet.

7.1.5 Kommerzielle Kits

Amplite [™] Glucose Quantitation Kit *Red <i>Fluorescence*</i>	AAT Bioquest, Inc., Sunnyvale, CA, USA
Glucose (HK) Assay Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Pierce [™] BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer Scientific GmbH, Bonn

7.1.6 Zelllinien

High Five™ (BTI-TN-5B1-4) Gibco®, Darmstadt

7.1.7 Plasmide

pIB/V5-His TOPO® Vector Invitrogen™, Darmstadt
pIB/V5-His-*PcβGlc* (codiert Leserahmen für β-Glucosidase aus *P. cochleariae*) von Peter Rahfeld (AG Boland)
pIB/V5-His-*CpβGlc* (codiert Leserahmen für β-Glucosidase aus *C. populi*)
pIB/V5-His-*CiβGlc* (codiert Leserahmen für β-Glucosidase aus *C. lapponica*)

7.1.8 Software

BioEdit Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA
GraphPad Prism 5 GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
i-control™ Microplate Reader Software Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
ImageJ 1.47 Wayne Rasband (National Institutes of Health), Bethesda, MD, USA
Microsoft Excel® 2010 Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
PASW Statistics 18 IBM Corporation, Armonk, NY, USA
ProtParam ExPaSy (Swiss Institute of Bioinformatics), Lausanne, Schweiz
PSORT Prediction Kenta Nakai (Institute for Medical Science), Tokyo, Japan
SigmaPlot™ Systat Software Inc., Chicago, IL, USA
SoftMax® Pro Microplate Data Acquisition & Analysis Software Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, USA

7.1.9 Puffer

Sämtliche pH-Werte der Puffer wurden mit NaOH eingestellt.

Acetat-Puffer Acetat-Puffer der pH-Werte 3,6; 4,0; 4,5; 5,0 und 5,5 wurden durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse von 110 mM Natriumacetat und 100 mM Essigsäure hergestellt.

Dialysepuffer	pH 7,4 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Imidazol 50 mM NaCl 2% Glycerol (v/v)
Elutionspuffer	pH 7,4 100 mM NaH ₂ PO ₄ 150 mM Imidazol 2% Glycerol (v/v)
Lagerungspuffer	pH 7 50 mM NaH ₂ PO ₄ 2% Glycerol (v/v)
Phosphat-Puffer	Phosphat-Puffer der pH-Werte 6,0; 6,5; 7,0 und 7,5 wurden durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse von 100 mM Na ₂ HPO ₄ und 100 mM NaH ₂ PO ₄ hergestellt.
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	1,92 M Glycerol 0,25 M Tris 10% SDS (w/v)
SDS-Probenpuffer (6x)	50% Glycerol (v/v) 30 mM Tris, pH 6,8 25% β-Mercaptoethanol (v/v) 10% SDS (m/v) 0,1 M DTT 0,002% Bromphenolblau (w/v)
TBS (1x) (<i>Tris-buffered saline</i>)	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
TBS(T) (1x) (<i>Tris-buffered saline with Tween-20</i>)	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 0,1% Tween-20

7.2 Methoden

7.2.1 Zellkultur

Die High Five™-Insektenzellen wurden im Wärmeschrank bei 27°C gelagert und alle 3 – 4 Tage bei einer Konfluenz von ca. 90% (2×10^4 – 5×10^4 lebende Zellen) passagiert [32].

Sämtliche Arbeiten mit Zellen wurden unter der Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen waren steril.

In belüfteten 25 cm² Zellkulturflaschen wurden die Zellen in 5 ml und in 75 cm² Zellkulturflaschen in 15 ml „Express Five® Serum-Free Medium“ kultiviert, dem L-Glutamin und Gentamycin zugesetzt wurde.

Medium	1 l	Express Five® SFM
	2 mM	L-Glutamin
	10 µg/µl	Gentamycin

Zum Subkultivieren der Zellen wurde das Medium mit einem Vakuum-Absaugsystem entfernt, die Zellen durch Spülen mit neuem Medium von der Oberfläche gelöst und so in ein neues Kulturgefäß überführt, dass in diesem eine 1:5-Verdünnung der Zellen in frischem Medium vorlag.

Im Gegensatz zu den nicht transfizierten Zellen, die als Kontrolle dienen, wurden transfizierte Zellen mit 60 µg/µl Blastocidin S Hydrochlorid versetzt.

7.2.2 Transfektion der Zellen

Bei einer Konfluenz der Wildtyp-Insektenzellen von ca. 80% wurde die Transfektion nach Angaben des Herstellers durchgeführt [33]. Die Volumina der eingesetzten Reagenzien berechnen sich über die relative Fläche der Zellkulturgefäße, die 1x für 0,32 cm² (96-Well-Platte) und entsprechend 235x für eine 75 cm² Zellkulturflasche beträgt.

Transfektionsansatz	1x	235x	
	0,04 µg	9,4 µg	Plasmid
	0,15 µl	35,25 µl	Transfektionsreagens FuGENE®
	ad. 2 µl	ad. 470 µl	Medium
	2 µl	470 µl	Gesamtvolumen

Es wurden jeweils die von Peter Rahfeld (AG Boland) zur Verfügung gestellten Plasmide pIB/V5-His-PcβGlc, pIB/V5-His-CpβGlc und pIB/V5-His-CIβGlc verwendet.

Diese codieren jeweils für die Leserahmen der sekretorischen β -Glucosidasen aus *P. cochleariae* (*Pc* β Glc), *C. populi* (*Cp* β Glc) und *C. lapponica* (*C* β Glc). Durch die Fusion der β -Glucosidasen mit einem His₆-Epitop wird eine Aufreinigung der Proteine über eine Cobalt-Agarose-Säule ermöglicht. Zusätzlich besitzen die Plasmide eine Resistenzkassette für Blastocidin S Hydrochlorid, mit dem die erfolgreich transfizierten Zellen selektiert werden können.

Die Transfektionsansätze wurden vorsichtig vermischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, in denen das Transfektionsreagens Komplexe mit der DNA bildet. Um die Transfektionseffizienz zu erhöhen, wurden zusätzlich je 9,4 μ l „MA Lipofection Enhancer“ äquivalent zur DNA-Menge (μ g = μ l) zum Transfektionsansatz gegeben. Dieser wurde weitere 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und jeweils mit dem Kulturüberstand der Wildtyp-Insektenzellen vermischt. Die Suspension magnetischer Kügelchen interagiert mit den Transfektionsreagens/DNA-Komplexen. Wird die Zellkulturflasche auf eine Magnetplatte gelegt, ziehen diese die Komplexe nach unten auf die adhärenen Zellen und erhöhen so die Aufnahme der DNA in die Zellen [34]. Nach 10 min kann die Zellkulturflasche ohne Entfernung des „FuGENE[®] Transfektionsreagens“ und des „MA Lipofection Enhancer“ bei 27°C im Wärmeschrank inkubiert werden.

7.2.3 Selektion der transfizierten Zellen

Nach der Transfektion der Zellen wurden diese einen Tag ohne Selektion im Wärmeschrank gehalten, damit die transfizierten Zellen die Plasmid-codierten Resistenzproteine exprimieren konnten. Ab dann wurde den Zellen jeweils 60 μ g/ μ l Blastocidin S Hydrochlorid zugesetzt, was nicht transfizierte Insektenzellen am Wachstum hindert. Nach zwei Selektionsrunden sollten nur noch transfizierte Zellen vorhanden sein und die Blastocidin S Hydrochlorid-Konzentration wurde auf 20 μ g/ μ l gesenkt.

7.2.4 Proteinexpression der β -Glucosidasen

Zur Proteinexpression wurde die Anzahl der Zellkulturflaschen (75 cm²) bei gleichbleibendem Passagierverhältnis der Zellen je nach Wachstum der Zellen auf 5 – 10 erhöht. Zusätzlich wurden jeweils 10 μ l „Protease-Inhibitor-Mix HP“ pro ml Medium der transfizierten Zellen zugegeben, um einen Abbau der sekretierten Proteine zu verhindern und eine möglichst große Proteinausbeute zu erhalten. Nach 3 – 4 Tagen wurde das Medium über den Zellen abgenommen und für die Proteinaufreinigung verwendet. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen parallel mitgeführt.

7.2.5 Proteinaufreinigung der β -Glucosidasen

7.2.5.1 Dialyse der Insektenzellüberstände

Der Kulturüberstand der Insektenzellen wurde gesammelt und 10 min bei 8 000 x g zentrifugiert. Dadurch sedimentieren noch im Medium befindliche Zellen, während die von den Zellen sekretierten Proteine sich löslich im Überstand befinden. Nach Zugabe von 250 μ l „Protease-Inhibitor-Mix HP“ pro 50 ml Medium wurde dieses in Dialyseschläuche (SnakeSkin Dialysis Tubing, 10K MWCO, 35 mm Trockendurchmesser) gefüllt, welche vorher mit zweifach destilliertem Wasser (ddH₂O) gespült und im Dialysepuffer äquilibriert wurden, und bei 4°C im 20fachen Volumen Dialysepuffer unter leichtem Rühren über Nacht dialysiert.

Die Proben wurden danach nochmals zentrifugiert (10 min, 10 000 x g), um während der Dialyse ausgefallene Proteine abzutrennen. Zur Dokumentation der Proteinaufreinigung wurden 50 μ l abgenommen (Probe 1). Alle folgenden Arbeiten wurden bei 4°C im Kühlraum durchgeführt.

7.2.5.2 Aufreinigung der Proteine mittels Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte mittels 400 μ l Cobalt-Agarose in „Poly-Prep Chromatography Columns“, die vorher mit 12,5 *Column Volume* (CV) ddH₂O (5 ml) und 12,5 CV Dialysepuffer (5 ml) gewaschen wurde. Über das His₆-Epitop binden die Proteine an die Säule, indem sie Chelatkomplexe mit den verbleibenden Bindungsstellen der Co²⁺-Ionen eingehen. Um eine bessere Beladung der Säule mit den Proteinen zu erreichen, wurde die Proteinlösung zwei Mal über die Säule gegeben. Aus dem Durchfluss wurden erneut 50 μ l (Probe 2) entnommen. Durch das Waschen mit 25 CV Dialysepuffer (10 ml) wurden nicht oder weniger spezifisch bindende Proteine aus der Säule entfernt und aus dem Durchfluss wieder 50 μ l (Probe 3) genommen. Anschließend wurde bei der Aufreinigung der Proteine aus Insektenzellen mit zwei Mal 1,275 ml Elutionspuffer in *Low Binding*-Reaktionsgefäße eluiert und davon 50 μ l (Probe 4) abgenommen, sodass am Ende 2,5 ml Proteinlösung vorlag.

7.2.5.3 Umpuffern der Proteine in Lagerungspuffer

Die 2,5 ml Proteinlösung wurden nach dem *Gravity Protocol* des Herstellers auf „PD-10 Desalting Columns“ gegeben, die zuvor mit drei Mal 10 ml ddH₂O (3 x 1,2 CV) und vier Mal mit 10 ml Lagerungspuffer (4 x 1,2 CV) gespült worden waren. Das Trennprinzip basiert auf chromatographischer Gelfiltration. Dabei interagieren kleinere Moleküle, wie z.B. Salze, aufgrund des Größenunterschieds länger mit dem porösen Säulenmaterial als größere Moleküle, wie beispielsweise Proteine, und

eluieren dementsprechend später von der Säule. Hierdurch ist es möglich, Proteine von Salzen und anderen kleinen Molekülen zu separieren [35]. Nachdem die Proteinlösung komplett in das Säulenmaterial eingezogen war und der Durchfluss verworfen wurde, wurde mit 3,5 ml Lagerungspuffer eluiert und 50 µl (Probe 5) zur Überprüfung der einzelnen Aufreinigungsschritte entnommen.

7.2.5.4 Dialyse der Proteinlösungen

Das umgepufferte Eluat wurde in „ZelluTrans Dialysiermembranen“ (3500 MWCO, 12 mm Trockendurchmesser) im 100fachen Volumen über Nacht bei 4°C dialysiert.

7.2.5.5 Aliquotierung und Lagerung der Proteinlösungen

Die Proteinlösungen wurden jeweils in 300 µl Aliquots in *Low-Binding*-Reaktionsgefäße aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert.

7.2.6 Dokumentation der Proteinaufreinigung mittels SDS-PAGE

Mit dem Programm ProtParam (ExPaSy, <http://web.expasy.org/protparam/>) wurden aus den Aminosäuresequenzen der β -Glucosidasen *Cp* β Glc und *Pc* β Glc (siehe Anhang) zuzüglich der C-terminalen Aminosäuren, die das His₆-Epitop beinhalten, [36] und der postulierten Glykosylierungsstellen (<http://psort.hgc.jp/form.html>) das jeweilige Molekulargewicht berechnet.

Die über die einzelnen Schritte der Proteinaufreinigung gesammelten Proben wurden jeweils entsprechend mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 90°C aufgeköcht. Anschließend wurden sie auf ein Gel aufgetragen und dieses bei 300 V (V = const.) laufen gelassen. Als Größenstandard wurde „Precision Plus Protein™ Dual Color Standards“ verwendet.

7.2.7 Western Blot

Mithilfe des „Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systems“ wurden die Proteine in einer „Mini-PROTEAN® Tetra Cell“ bei 25 V (V = const.) und 1,2 A in 15 min auf eine PVDF-Membran übertragen. Über Nacht wurde die Membran mit 20 ml 1% „Alkali-soluble Casein“-Lösung blockiert und anschließend jeweils 10 min bei 4°C mit 20 ml 1x TBS, 1x TBS(T) und wieder 1x TBS gewaschen. Nach Zugabe von „His•Tag® Antibody HRP Conjugate“ (1:5000 in 1% Casein-Lösung) wurde 1 h bei 4°C inkubiert und danach wieder jeweils 10 min mit je 20 ml TBS, TBS(T) und TBS gewaschen. Mit „1-Step™ TMB-Blotting“-Entwicklerlösung wurde die Membran gefärbt bis Banden sichtbar wurden.

7.2.8 Bestimmung des Proteingehalts

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts der aufgereinigten Proben wurde das „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“ (*Microplate Procedure*) verwendet, welches einen Detektionsbereich zwischen 20 und 2.000 µg/ml aufweist. Die Reaktion basiert auf der Reduktion von Cu²⁺- zu Cu⁺-Ionen in alkalischem Milieu durch vorhandene Proteine und die anschließende Chelatierung der Cu⁺-Kationen durch jeweils zwei Moleküle Bicinchoninsäure (BCA). Dieser violett gefärbte Komplex weist eine starke Absorption bei 562 nm auf, die linear mit der Proteinkonzentration der Lösung korreliert [37].

Nach Anleitung des Herstellers wurden pro *Well* jeweils 200 µl „Working Reagent“ mit je 25 µl Proteinlösung in eine transparente 96-*Well*-Platte pipettiert, durch 30 s Schütteln vermischt, mit einer Klebefolie abgedeckt und 30 min bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Absorption bei 562 nm im Microplate Reader gemessen.

Als Referenz wurde eine Standardkurve mit bekannten Konzentrationen von Rinderserumalbumin (BSA) erstellt, mit der die unbekannt Proteinkonzentrationen der aufgereinigten Proteinlösungen bestimmt werden können.

Die Auswertung wurde mit Microsoft Excel® 2010 durchgeführt.

7.2.9 Aktivitätsbestimmung der β-Glucosidasen

4-Methylumbelliferyl-β-D-glucosid ist ein allgemeines Substrat für β-Glucosidasen und wird aufgrund seiner fluorogenen Eigenschaften für deren Detektion verwendet. Wird das Substrat durch in der Probe vorhandene β-Glucosidasen gespalten, emittiert das Produkt 4-Methylumbelliferon unter UV/VIS-Licht (Absorption bei 360 nm) im VIS-Bereich bei 499 nm [38], was unter dem Transilluminator beobachtet werden kann.

Reaktionsansatz	80 µl	Puffer pH 4,5
	10 µl	4-Methylumbelliferyl-β-D-glucosid (0,5 mg/ml)
	10 µl	Proteinlösung

Der Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung der Proteinlösungen wurde 5 min bei 30°C im Wärmeschrank inkubiert und dann die Emission des Produkts im sichtbaren Bereich unter dem Transilluminator betrachtet.

7.2.10 Bestimmung des Aktivitätsbereichs der β -Glucosidasen bei verschiedenen pH-Werten

β -Glucosidasen spalten Glucose vom Substrat 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid ab. Um das pH-Aktivitätsoptimum zu bestimmen, wurde die jeweilige Reaktion der aufgereinigten Proteinlösungen mit ihrem Substrat in Puffer mit verschiedenen pH-Werten (3,6; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 und 7,5) untersucht. Der Reaktionsansatz wurde in 1,5 ml-Glas-Gefäßen 1 h bei 40°C und 150 rpm auf einem Thermoschüttler inkubiert.

Reaktionsansatz	70 μ l	Phosphat- bzw. Acetat-Puffer
	20 μ l	Proteinlösung
	10 μ l	8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid (100 mM in H ₂ O)
	100 μ l	Gesamtvolumen

Als Negativkontrolle wurden sowohl Proben mit 20 μ l aufgereinigter Proteinlösung nicht transfizierter Insektenzellen als auch mit 20 μ l des entsprechenden Puffers untersucht.

Von den erhaltenen Rohdaten wurden die Negativkontrollen subtrahiert und anschließend normiert (höchster Wert = 100%). Analog wurden die Standardabweichungen angepasst.

7.2.11 Bestimmung des Aktivitätsbereichs der β -Glucosidasen bei verschiedenen Temperaturen

Zur Bestimmung des Temperatur-Aktivitätsoptimums der β -Glucosidasen wurden die jeweiligen aufgereinigten Proteinlösungen mit ihrem Substrat 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid in Phosphat-Puffer (pH 5,0) bei verschiedenen Temperaturen (20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 und 60°C) 1 h bei 150 rpm auf dem Thermoschüttler inkubiert.

Reaktionsansatz	70 μ l	Phosphat-Puffer pH 5,0
	20 μ l	Proteinlösung
	10 μ l	8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid (100 mM in H ₂ O)
	100 μ l	Gesamtvolumen

Als Negativkontrolle wurde ebenfalls die Reaktion von Proben mit 20 μ l Proteinlösung nicht transfizierter Insektenzellen und mit 20 μ l Puffer untersucht.

Von den Rohdaten wurden die entsprechenden Negativkontrollen subtrahiert und anschließend normiert (höchster Wert = 100%). Analog wurde mit den Standardabweichungen verfahren.

7.2.12 Bestimmung der kinetischen Parameter

Das „Amplite™ Glucose Quantitation Kit“ ermöglicht eine Quantifizierung der in einer Probe vorhandenen Glucose und die Dokumentation der Änderung der Glucosekonzentration über die Zeit.

Nach Zugabe des „Assay Reaction Mixtures“ wird Glucose durch die Glucose-Oxidase unter Freisetzung von Wasserstoffperoxid oxidiert. Dieser wird von der Meerrettich-Peroxidase (HRP) zur Oxidation des „Amplite™ Red-Peroxidase-Substrats“ genutzt, welches am „Microplate Kinetic Reader“ detektiert werden kann (Ex/Em = 540/590 nm) [39].

Assay Reaction Mixture (2x)	20 µl	Amplite™ Red Stock Solution (250x)
pro 96-Well-Platte	100 µl	HRP Stock Solution (10 U/ml)
	100 µl	Glucose Oxidase Solution (100 U/ml)
	4,78 ml	Assay Buffer
	5 ml	Gesamtvolumen

Versetzt man nun einen Reaktionsansatz aus Substrat und β -Glucosidase mit dem „Assay Reaction Mixture“, kann anhand der zunehmenden Fluoreszenz die bei der Reaktion freiwerdende Glucose in Echtzeit quantifiziert und daraus später die entsprechenden kinetischen Parameter berechnet werden. Als Standard wurde Glucose verschiedener bekannter Konzentrationen und als Negativkontrolle Ansätze mit Puffer pH 5,5 statt Glucose-Verdünnung mitgeführt.

Alle folgenden Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt.

Sowohl von beiden Substraten, Salicin und 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid, als auch vom Glucose-Standard wurden Verdünnungen verschiedener bekannter Konzentrationen angesetzt. 50 µl des Glucose-Standards wurden auf einer schwarzen 96-Well-Platte vorgelegt. Um die Reaktion möglichst schnell und annähernd gleichzeitig zu starten, wurden Proteinlösung bzw. Lagerpuffer mit Puffer pH 5,5 vermischt und auf die Platte gegeben. Die Wells, die statt Proteinlösung Lagerpuffer enthalten, dienen als Negativkontrolle. Die verschiedenen Substrat-Verdünnungen wurden jeweils mit „Assay Reaction Mixture“ vermischt und das Substrat/„Assay Reaction Mixture“-Gemisch in die Wells mit vorgelegtem

Protein/Puffer pH 5,5, bzw. Lagerpuffer/Puffer pH 5,5 gegeben. Zu den *Wells* mit vorgelegter Glucose wurde nur „Assay Reaction Mixture“ gegeben.

Ansatz Glucose	50 µl	Assay Reaction Mixture (2x)
pro <i>Well</i>	50 µl	Glucose-Verdünnung (2x)
	100 µl	Gesamtvolumen
Ansatz Substrat	50 µl	Assay Reaction Mixture (2x)
pro <i>Well</i>	10 µl	Substrat-Verdünnung (10x)
	5 µl	Proteinlösung
	35 µl	Puffer pH 5,5
	100 µl	Gesamtvolumen

Die β -Glucosidasen spalten Glucose von ihren Substraten ab und die Fluoreszenz, die sich proportional zur Glucosekonzentration verhält, wurde alle 90 s mit dem „Infinite[®] M200 Microplate Reader“ gemessen.

In der Anleitung des „Amplite[™] Glucose Quantitation Kit“ wird ein Arbeitsbereich von pH 7 – 8 empfohlen [39]. Dass die Reaktion mit Puffer pH 5,5 durchgeführt wird, ist auf einen Kompromiss zwischen dem empfohlenen Arbeitsbereich des Kits und dem Aktivitätsbereich der β -Glucosidasen zurückzuführen.

Die Auswertung wurde mit Microsoft Excel[®] 2010 und PASW Statistics 18 durchgeführt. Für jede Substratkonzentration wurde eine Negativkontrolle mit Lagerpuffer statt Proteinlösung gemessen und von den Messwerten der entsprechenden Substratkonzentration abgezogen. Aus den Dreifachreplikaten wurde der Mittelwert gebildet und gegen die Zeit aufgetragen. Im linearen Bereich kommt es nach der Anlaufphase und vor der Sättigung des Enzyms zu einem konstanten Substratumsatz durch die β -Glucosidasen. Die Steigung kann hier vereinfacht als Reaktionsgeschwindigkeit angesehen werden. Mittels linearer Regression wurde für jede Substratkonzentration der lineare Bereich mit dem höchsten Bestimmtheitsmaß (R^2) und der Standardfehler des Anstiegs der Geraden berechnet.

Um die verschiedenen Messwerte unterschiedlicher 96-*Well*-Platten vergleichen zu können, wurde die gemessene Fluoreszenz mithilfe des Glucose-Standards in freigeordnete Glucose umgerechnet. Vom Glucose-Standard wurden Negativkontrollen subtrahiert, die Puffer (pH 5,5) statt Glucoselösung enthielten und aus den Dreifachreplikaten der Mittelwert gebildet. Durch lineare Regression wurde zu jedem gemessenen Zeitpunkt aus dem Standard bekannter Glucosekonzentrationen

eine Geradengleichung berechnet, mit der die in der Probe gemessene Fluoreszenz der entsprechenden Glucosekonzentration zugeordnet werden konnte. Dabei wurde darauf geachtet, dass bei den β -Glucosidasen *Cp* β Glc und *Pc* β Glc ein Substratumsatz von 10% nicht überschritten wurde und die Reaktion somit im Bereich des Substratüberschusses stattfand. Zwischen Start- und Endpunkt des linearen Bereichs wurde die Zunahme der Glucose – und damit der Substratumsatz – pro Zeiteinheit und mg Protein berechnet. Der Substratumsatz pro Zeiteinheit entspricht der Reaktionsgeschwindigkeit.

Die kinetischen Parameter v_{max} , K_M , k_{cat} und k_{cat}/K_M wurden mit GraphPad Prism 5 berechnet. Hierzu wurde die Substratkonzentration gegen die spezifische Enzymaktivität aufgetragen und mittels nichtlinearer Regression analysiert. War im Graph ein Absinken der Aktivität bei steigender Substratkonzentration vorhanden, wurde die Regressions-Voreinstellung „Substratinhibition“ (Formel 1) verwendet. Wies der Graph einen hyperbolen Verlauf auf, wurde die Regression mittels der Michaelis-Menten-Gleichung (Formel 2) (Voreinstellung „Michaelis-Menten“) durchgeführt. Der k_{cat} -Wert wird bei GraphPad Prism 5 ebenfalls mit dieser Einstellung berechnet. Für beide Regressionstypen wurde die Methode der kleinsten Quadrate verwendet.

$$Y = \frac{v_{max} \cdot X}{K_M + X \cdot \left(\frac{1 + X}{K_i}\right)}$$

Formel 1: Substratinhibitions-Gleichung

$$Y = \frac{v_{max} \cdot X}{K_M + X}$$

Formel 2: Michaelis-Menten-Gleichung

X: Substratkonzentration, Y: Enzymaktivität, v_{max} : maximale Enzymaktivität, K_M : Michaelis-Menten-Konstante für die Enzymaktivität, K_i : Dissoziationskonstante für die Bindung des Substrates an das Enzym

7.2.13 Haltung der *P. cochleariae*-Larven

Die Blattkäfer *P. cochleariae* werden am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie ganzjährig gezüchtet. Die adulten Käfer werden zur Eiablage 24 h auf im Institut selbstgezogenem Weißkohl (*Brassica oleracea* convar. *capitata* var. *alba*) gesetzt und danach von ihrem Gelege getrennt. Die Larven schlüpfen nach ungefähr 7 Tagen und werden, wie die Käfer, alle 3 – 4 Tage mit Weißkohl gefüttert. Käfer, Larven und Eier werden in einem konstantem Tag-/Nacht-Rhythmus von 16/8 h bei 18°C gehalten.

7.2.14 Sammeln des Wehrsekrets von *P. cochleariae*-Larven

Reizt man die *P. cochleariae*-Larven, beispielsweise durch leichtes Berühren, stülpen diese 18 paarig angeordnete Wehrsekretreservoirs nach außen, von denen mit einer ausgezogenen Glaskapillare die daran befindlichen Tröpfchen Wehrsekret abgesammelt werden können.

7.2.15 Bestimmung der Glucosekonzentration

Zur Bestimmung der Glucosekonzentrationen wurde das „Glucose (HK) Assay Kit“ verwendet. Das zugehörige „Glucose (HK) Assay Reagent“ beinhaltet nach dem Lösen in 20 ml Wasser 1,5 mM NAD, 1,0 mM ATP, 1,0 U/ml Hexokinase und 1,0 U/ml Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase. Die in den Reaktionsansätzen der vorangegangenen Versuche vorhandene Glucose wird von der Hexokinase unter ATP-Verbrauch zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert. Dieses wird von der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconat oxidiert, wobei NAD als Reduktionsäquivalent zu NADH reduziert wird. Pro umgesetztem Molekül Glucose wird also eine äquimolare Menge NAD zu NADH reduziert, was durch die Zunahme der Absorption bei 340 nm verfolgt werden kann, welche direkt proportional zur Glucosekonzentration in der Probe ist [40].

Ansatz	100 µl	Glucose (HK) Assay Reagent
pro Well	20 µl	Reaktionsansatz
	120 µl	Gesamtvolumen

Für die Quantifizierung der freigewordenen Glucose bei der Bestimmung des Aktivitätsbereichs der β -Glucosidasen bei verschiedenen pH-Werten und Temperaturen wurden auf einer 96-Well-Platte „Glucose (HK) Assay Reagents“ und der jeweilige Reaktionsansatz als Dreifachreplikate auf Eis vermischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 340 nm mittels *Microplate Reader* gemessen.

Bei der Quantifizierung des Glucosegehalts im Wehrsekret von *P. cochleariae* wurde das Gemisch aus „Glucose (HK) Assay Reagent“ und dem jeweiligen Reaktionsansatz so lange bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption gemessen, bis die Absorptionswerte nicht mehr stiegen, aber auch noch nicht wieder zu sinken begannen, was auf einen Zerfall des Produkts NADH hinweisen würde. So wurde sichergestellt, dass auch bei höheren Konzentrationen die im Reaktionsansatz vorhandene Glucose vollständig reagiert hatte und ein

entsprechender linearer Zusammenhang zwischen der Glucosekonzentration und der Absorption vorlag.

Als Standard wurden Dreifachreplikate bekannter Glucosekonzentrationen mitgeführt.

Die Auswertung wurde mit Microsoft Excel[®] 2010 durchgeführt. Mit Lösungen bekannter Glucosekonzentrationen wurde mittels linearer Regression eine Geradengleichung erstellt mithilfe derer die unbekanntes Konzentrationen berechnet werden konnten.

7.2.16 Inhibierung der β -Glucosidasen durch Glucose

Um zu überprüfen, ob eine Inhibierung der β -Glucosidasen durch Glucose stattfindet, wurde ein Gemisch aus Puffer pH 5,5, Proteinlösung und 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucosid mit Lösungen steigender Glucosekonzentration versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Unter dem Transilluminator kann eine mit der Aktivität korrelierende Fluoreszenz beobachtet werden. Als Kontrolle wurden Ansätze mit Wasser statt Proteinlösung verwendet.

Reaktionsansatz	60 μ l	Puffer pH 5,5
	40 μ l	Proteinlösung
	20 μ l	4-Methylumbelliferyl- β -D-glucosid (0,5 mg/ml)
	80 μ l	Glucoselösung
	200 μ l	Gesamtvolumen

8 Ergebnisse

8.1 Ergebnisse der Zellkultur

Die High FiveTM-Insektenzellen wurden mit den von Peter Rahfeld (AG Boland) zur Verfügung gestellten Plasmiden pIB/V5-His-*PcβGlc*, pIB/V5-His-*CpβGlc*, pIB/V5-His-*ClβGlc* transfiziert, die für die Leserahmen der sekretorischen β -Glucosidasen aus *P. cochleariae* (*PcβGlc*), *C. populi* (*CpβGlc*) und *C. lapponica* (*ClβGlc*) codieren (siehe 7.2.2). Die mit pIB/V5-His-*PcβGlc* und pIB/V5-His-*CpβGlc* transfizierten Zellen konnten erfolgreich kultiviert werden, während die mit pIB/V5-His-*ClβGlc* transfizierten Zellen keine ausreichende Proliferation zeigten und nach einigen Runden Subkultivierung verworfen wurden. Für die Proteinexpression (siehe 7.2.4) wurden dementsprechend die mit pIB/V5-His-*PcβGlc* und pIB/V5-His-*CpβGlc* transfizierten Zellen eingesetzt.

8.2 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Mit dem Programm ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) wurde aus den Aminosäuresequenzen der β -Glucosidasen (siehe Anhang) das Molekulargewicht berechnet. Dieses beträgt zuzüglich der C-terminalen Aminosäuren, die das His₆-Epitop beinhalten [36], und der postulierten Glykosylierungsstellen (<http://psort.hgc.jp/form.html>) für *PcβGlc* 73,4 kDa und für *CpβGlc* 73,6 kDa.

Die nach der Proteinexpression abgenommenen Kulturüberstände der Insektenzellen wurden dialysiert und anschließend zur Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie eingesetzt (siehe 7.2.5). Da die rekombinant hergestellten β -Glucosidasen *CpβGlc* und *PcβGlc* ein His₆-Epitop aufweisen, binden diese damit an Cobalt-Agarose und können mit 150 mM Imidazol eluiert werden.

Während der einzelnen Schritte der Proteinaufreinigung wurden wiederholt Proben entnommen, um den Verlauf mittels SDS-Gelelektrophorese und Gelfärbung zu dokumentieren und eine erfolgreiche Aufreinigung der β -Glucosidasen nachzuweisen.

Der Verlauf der Proteinaufreinigung stimmt bei *CpβGlc* und *PcβGlc* überein. Exemplarisch ist das gefärbte Gel der Proben von *PcβGlc* in Abb. 3 dargestellt.

Im Kulturüberstand der Insektenzellen (Probe 1) findet sich ein breites Spektrum an Proteinen, die als ineinander übergehende Proteinbanden im gesamten Bereich des Gels zu sehen sind. Im Durchfluss nach dem Auftragen der Überstände auf die Säule (Probe 2) sind wieder zahlreiche Proteinbanden im gesamten Bereich des Gels zu erkennen. Hierbei handelt es sich um die Proteine, die nicht an das Säulenmaterial gebunden haben. Im Durchfluss des Waschschrilles (Probe 3) finden sich nur sehr schwache Spuren von Proteinen. Nach der Elution mit Imidazol

sind im Eluat zwei Banden erkennbar. Die kräftigere der beiden liegt bei 75 kDa, eine schwächere, dünne Bande findet sich knapp darüber im Bereich zwischen 75 und 100 kDa. Nach dem Entsalzen haben beide Banden wesentlich an Intensität verloren. Bei *CpβGlc* findet sich statt der zwei Banden bei den Proben 3 – 5 eine breite verschwommene Bande im Bereich von 75 bis 100 kDa. Beim Waschschrift werden also bereits Proteine von der Säule gelöst, die sich auch in der Eluatfraktion wiederfinden.

Bei der Kontrolle sind im Kulturüberstand der nicht transfizierten Zellen im Überstand und im Durchfluss wie bei den Proteinlösungen von *CpβGlc* und *PcβGlc* zahlreiche schwache Banden erkennbar. Auch im Durchfluss des Waschschriftes finden sich kaum Proteine. Eine sehr schwache Bande ist hier im Eluat ebenfalls bei 75 kDa erkennbar. Diese ist nach dem Umpuffern nicht mehr sichtbar.

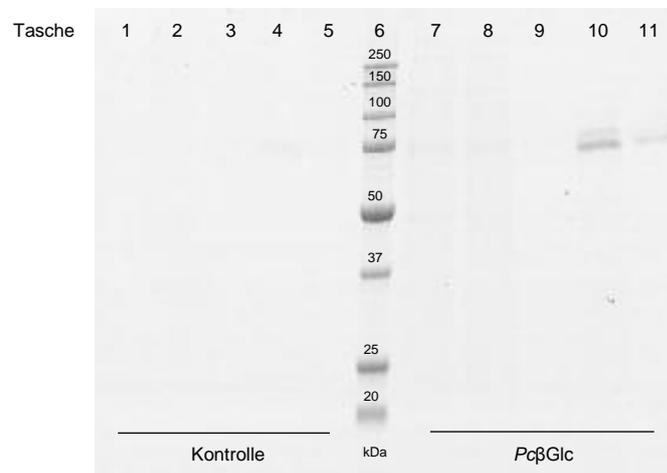


Abbildung 3: Polyacrylamid-Gel der Proteinaufreinigung der β -Glucosidase *PcβGlc* und der Kontrolle des Kulturüberstands nicht transfizierter Insektenzellen. Die Proben 1 – 5 wurden mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 90°C aufgekocht und 20 μ l auf das Gel aufgetragen. Vom Größenstandard „Precision Plus Protein™ Dual Color Standards“ wurden 5 μ l eingesetzt.

Tasche 1: Kontrolle Probe 1 (Kulturüberstand der Insektenzellen), Tasche 2: Kontrolle Probe 2 (Durchfluss nach Beladen der Säule), Tasche 3: Kontrolle Probe 3 (Durchfluss des Waschschriftes), Tasche 4: Kontrolle Probe 4 (Eluat), Tasche 5: Kontrolle Probe 5 (Durchfluss nach Umpuffern), Tasche 6: Proteingrößenstandard, Tasche 7: *PcβGlc* Probe 1 (Kulturüberstand der Insektenzellen), Tasche 8: *PcβGlc* Probe 2 (Durchfluss nach Beladen der Säule), Tasche 9: *PcβGlc* Probe 3 (Durchfluss des Waschschriftes), Tasche 10: *PcβGlc* Probe 4 (Eluat), Tasche 11: *PcβGlc* Probe 5 (Durchfluss nach Umpuffern). In *PcβGlc* Probe 4 ist bei 75 kDa eine Proteinbande erkennbar; darüber befindet sich im Bereich von 75 – 100 kDa eine zweite, schwächere Bande. Beide Banden sind auch in *PcβGlc* Probe 5 vorhanden, allerdings in geringerer Intensität. Bei Kontrolle Probe 4 ist ebenfalls eine schwache Bande bei 75 kDa sichtbar.

8.2.1 Nachweis der β -Glucosidasen durch Western Blot

Um zu überprüfen, ob es sich bei den aufgereinigten Proteinen tatsächlich um die β -Glucosidasen *CpβGlc* und *PcβGlc* handelt, wurden die Eluate der Proteinaufreinigungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen (siehe 7.2.7). Der zugegebene monoklonale Antikörper

bindet spezifisch an ein His₆-Epitop. Dieses sollte nur bei den rekombinant hergestellten Proteinen vorhanden sein.

Bei der Kontrolle, der Proteinlösung aus dem Überstand der nicht transfizierten Zellen, ist nach Behandlung mit der Färbelösung kein Protein auf der Membran erkennbar. Sowohl bei *CpβGlc* als auch bei *PcβGlc* ist nach dem Färben eine Proteinbande bei 75 kDa sichtbar.

8.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Nach Aufreinigung und Dialyse der Proteinlösungen der β -Glucosidasen *CpβGlc* und *PcβGlc* sollte die darin enthaltene Proteinmenge quantifiziert werden (siehe 7.2.8). Mit Lösungen bekannter Konzentrationen Rinderserumalbumin (BSA) wurde mittels linearer Regression eine Geradengleichung erstellt, anhand derer die unbekannt Proteinkonzentrationen von *CpβGlc* und *PcβGlc* berechnet werden konnten.

Die aufgereinigte Lösung von *PcβGlc* enthielt 27,2 $\mu\text{g/ml}$ und *CpβGlc* 33,1 $\mu\text{g/ml}$ Protein.

8.3 Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung

Um vor den weiterführenden Analysen (Bestimmung der pH- und Temperatur-Aktivitätsbereiche und kinetischen Parameter) zu überprüfen, ob eine allgemeine β -Glucosidase-Aktivität der Proteine vorhanden ist, wurde eine Aktivitätsbestimmung mithilfe von 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucosid vorgenommen (siehe 7.2.9). Nur Proteinlösungen, die in dieser Voruntersuchung eine Aktivität aufweisen, wurden für die weiteren Analysen verwendet.

Ein Foto der Aktivitätsbestimmung unter dem Transilluminator ist exemplarisch in Abb. 4 dargestellt. Als Negativkontrollen wurden aufgereinigte Proteinlösung des Mediums nicht transfizierter Insektenzellen (K) und Wasser (H₂O) verwendet. Beide zeigen keine Fluoreszenz. Sowohl bei den Proteinlösungen von *CpβGlc* als auch von *PcβGlc* ist Fluoreszenz sichtbar.

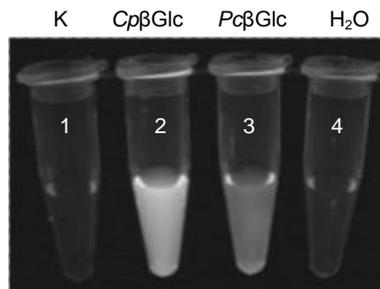


Abbildung 4: Aktivitätsbestimmung der aufgereinigten β -Glucosidasen $Cp\beta Glc$ und $Pc\beta Glc$. Für die Aktivitätsbestimmung wurden jeweils 80 μl Puffer (pH 4,5), 10 μl 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucosid (0,5 mg/ml) und 10 μl Proteinlösung bzw. H_2O verwendet, 5 min bei 30°C inkubiert und unter dem Transilluminator (254 nm) fotografiert. Die Fluoreszenz korreliert mit der in der Reaktion frei gewordenen Glucose und somit der β -Glucosidase-Aktivität.

1: Negativkontrolle K (aufgereinigte Proteinlösung aus dem Kulturüberstand nicht transfizierter Insektenzellen), 2: $Cp\beta Glc$, 3: $Pc\beta Glc$, 4: Negativkontrolle H_2O . Die Negativkontrollen K und H_2O weisen keine Fluoreszenz auf. Sowohl bei $Cp\beta Glc$ als auch bei $Pc\beta Glc$ ist Fluoreszenz erkennbar.

8.4 Aktivitätsbereich der β -Glucosidasen $Cp\beta Glc$ und $Pc\beta Glc$ bei verschiedenen pH-Werten

Zur Bestimmung des pH-Aktivitätsbereichs der β -Glucosidasen $Cp\beta Glc$ und $Pc\beta Glc$ (siehe 7.2.10) wurden diese mit ihrem Substrat 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid bei verschiedenen pH-Werten zwischen 3,6 und 7,5 inkubiert und die in der Reaktion freigewordene Glucose quantifiziert (siehe 7.2.15).

Die Graphen der relativen Aktivität der β -Glucosidasen $Pc\beta Glc$ und $Cp\beta Glc$ sind in Abb. 5 dargestellt. Sowohl der Graph der relativen Aktivität der β -Glucosidase $Cp\beta Glc$ als auch der von $Pc\beta Glc$ weisen zwei Maxima auf. Dies ist bei $Pc\beta Glc$ stärker ausgeprägt als bei $Cp\beta Glc$.

Die höchste Aktivität der β -Glucosidase $Cp\beta Glc$ findet sich bei pH 4,5. Bei pH 3,6 sind 74% der Aktivität vorhanden. Zwischen pH 4,0 und pH 6,5 findet sich ein Plateaubereich mit einer hohen relativen Aktivität (82% bei pH 4,0, 91% bei pH 5,0, 85% bei pH 5,5, 90% bei pH 6,0, 80% bei pH 6,5). Diese sinkt bei pH 7,0 stark auf 32% und ist mit 6% bei pH 7,5 kaum noch vorhanden.

$Pc\beta Glc$ weist bei pH 5,0 die höchste Aktivität auf, besitzt jedoch bei pH 6,0 mit 99% relativer Aktivität ein zweites, annähernd gleich hohes Maximum. Bei pH 3,6 ist eine Aktivität von 74% vorhanden. Die β -Glucosidase zeigt bei pH 4,0 und 4,5 mit 83% und 97% eine hohe relative Aktivität. Nach dem pH-Aktivitätsoptimum bei pH 5,0 sinkt diese bei pH 5,5 auf 73%. Bei pH 6,5 beträgt die relative Aktivität 77% und sinkt bei höheren pH-Werten schnell (24% bei pH 7,0) bis bei pH 7,5 mit 8% fast keine Aktivität mehr zu beobachten ist.

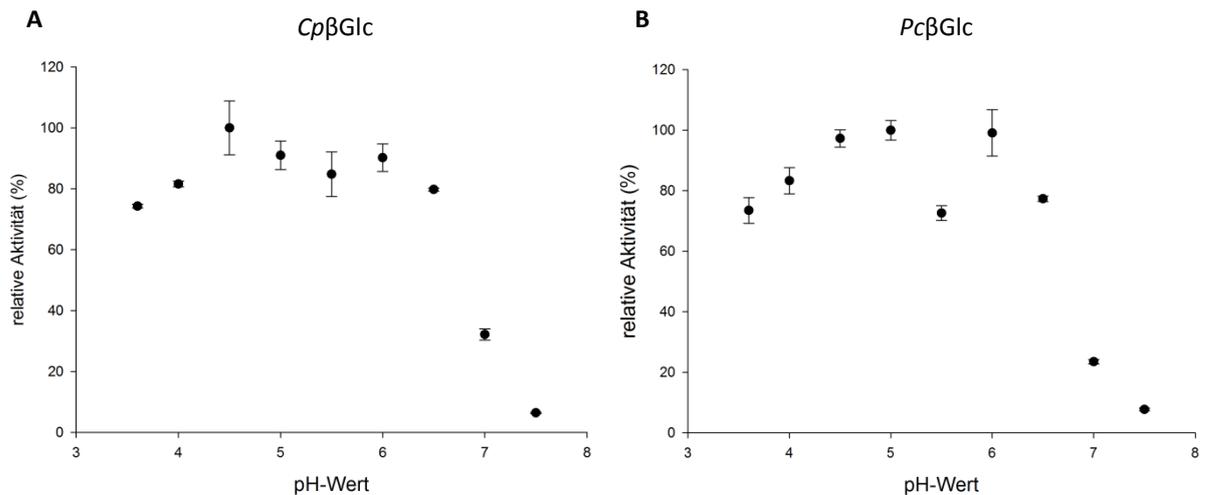


Abbildung 5: Relative Aktivität der aufgereinigten β -Glucosidasen aus *Chrysomela populi* ($Cp\beta$ Glc) und *Pheadon chochleariae* ($Pc\beta$ Glc) bei verschiedenen pH-Werten. Der Reaktionsansatz (70 μ l Puffer (pH 3,6 – 7,5), 20 μ l Proteinlösung, 10 μ l 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid (100 mM in H_2O)) wurde 1 h bei 40°C und 150 rpm auf einem Thermoschüttler inkubiert und anschließend 20 μ l davon mit 100 μ l „Glucose (HK) Assay Reagent“ zur Quantifizierung der freigewordenen Glucose eingesetzt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) dar. A: $Cp\beta$ Glc mit einem Aktivitätsmaximum bei pH 4,5; B: $Pc\beta$ -Glc mit einer maximalen Aktivität bei pH 5,0.

8.5 Aktivitätsbereich der β -Glucosidasen $Cp\beta$ Glc und $Pc\beta$ Glc bei verschiedenen Temperaturen

Um das Temperatur-Aktivitätsoptimum der β -Glucosidasen $Cp\beta$ Glc und $Pc\beta$ Glc zu bestimmen (siehe 7.2.11), wurden diese mit ihrem Substrat 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid bei verschiedenen Temperaturen von 20 bis 60°C inkubiert und anschließend die dabei freigewordene Glucose quantifiziert (siehe 7.2.15).

Die Graphen der relativen Aktivität der β -Glucosidasen $Pc\beta$ Glc und $Cp\beta$ Glc sind in Abb. 6 dargestellt.

Die Aktivität der β -Glucosidase $Cp\beta$ Glc ist bei 40°C maximal. Im Plateaubereich von 45°C und 50°C zeigt sich noch eine hohe relative Aktivität von je 92% und 88%. Bei über 50°C kommt es zu einem starken Aktivitätsverlust der β -Glucosidase (27% bei 60°C). Sinkt die Temperatur unter die optimale Temperatur von 40°C, nimmt die Aktivität kontinuierlich ab (76% bei 35°C, 74% bei 30°C, 61% bei 25°C) bis sie bei 20°C nur noch knapp die Hälfte (56%) der β -Glucosidase-Aktivität besitzt.

Bei $Pc\beta$ Glc zeigt sich bei 35°C die größte Aktivität. Zwischen 30°C und 45°C ist eine hohe relative Aktivität erkennbar (83% bei 30°C, 94% bei 40°C und 83% bei 45°C). Bei 50°C ist nur noch 76% Aktivität zu verzeichnen, die bei 60°C auf 20% abfällt. Sinkt die Temperatur unter 30°C, nimmt die relative Aktivität mit 60% bei 25°C stetig ab und beträgt bei 20°C nur noch 50%.

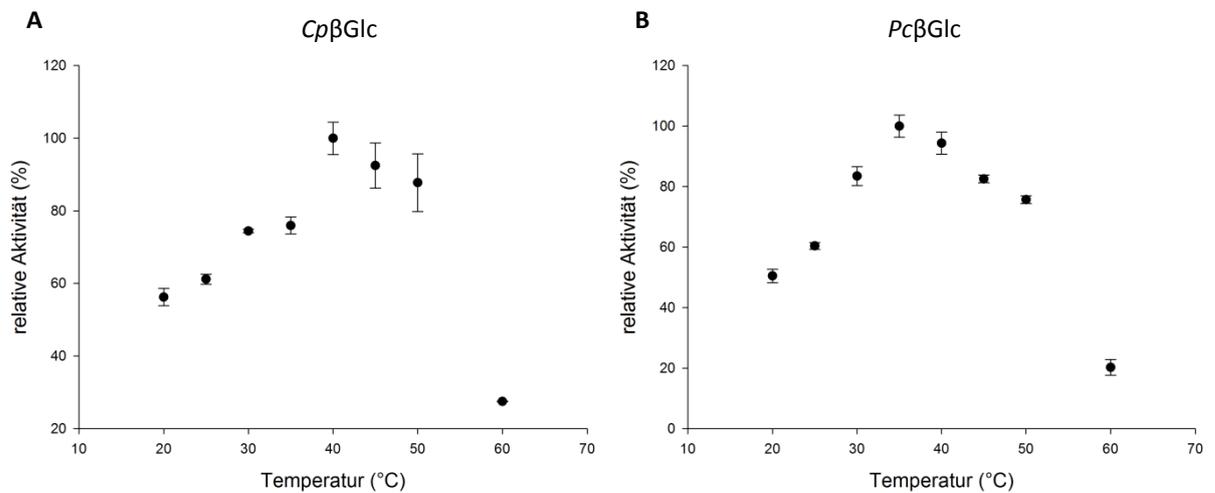


Abbildung 6: Relative Aktivität der aufgereinigten β -Glucosidasen aus *Chrysomela populi* ($Cp\beta$ Glc) und *Pheadon chochleariae* ($Pc\beta$ Glc) bei verschiedenen Temperaturen. Der Reaktionsansatz (70 μ l Puffer (pH 5,0), 20 μ l Proteinlösung, 10 μ l 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid (100 mM in H_2O)) wurde 1 h bei verschiedenen Temperaturen (20°C – 60°C) und 150 rpm auf einem Thermoschüttler inkubiert und anschließend 20 μ l davon mit 100 μ l „Glucose (HK) Assay Reagent“ zur Quantifizierung der freigewordenen Glucose eingesetzt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) dar.

A: $Cp\beta$ Glc mit einem Aktivitätsmaximum bei 40°C; B: $Pc\beta$ Glc mit einer maximalen Aktivität bei 35°C.

8.6 Kinetische Parameter v_{max} , K_M , k_{cat} und k_{cat}/K_M der β -Glucosidasen $Cp\beta$ Glc und $Pc\beta$ Glc

Die β -Glucosidasen $Cp\beta$ Glc und $Pc\beta$ Glc spalten Glucose von den Substraten Salicin und 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid ab. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter K_M , k_{cat} und k_{cat}/K_M (siehe 7.2.12) wurden $Cp\beta$ Glc und $Pc\beta$ Glc jeweils mit verschiedenen Substratkonzentrationen an Salicin und 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid als Dreifachreplikate inkubiert und die in dieser Reaktion über die Zeit frei werdende Glucose quantifiziert. Die mittels „Microplate Kinetic Reader“ gemessene Fluoreszenz ist proportional zur Glucosekonzentration. Zur Normierung der Fluoreszenz, die einen Vergleich der einzelnen Messungen ermöglicht, wurde auf jeder 96-Well-Platte ein Standard bekannter Glucosekonzentrationen mitgeführt.

Die Berechnung der kinetischen Parameter v_{max} , K_M , k_{cat} und k_{cat}/K_M wurde mit GraphPad Prism 5 durchgeführt. Hierzu wurde die Substratkonzentration gegen die spezifische Enzymaktivität aufgetragen und mittels nichtlinearer Regression analysiert. War im Graph ein Absinken der Aktivität bei steigender Substratkonzentration zu erkennen, wurde die Regressions-Voreinstellung „Substratinhibition“ verwendet. Wies der Graph einen hyperbolischen Verlauf auf, wurde die Regression mittels der Michaelis-Menten-Gleichung (Voreinstellung „Michaelis-Menten“) durchgeführt.

Die Graphen der Enzymkinetik für *CpβGlc* und *PcβGlc* sind in Abb. 7 dargestellt. Bei *PcβGlc* und *CpβGlc* wurde für die hyperbolen Graphen vom Substrat Salicin die Berechnung mithilfe der Michaelis-Menten-Gleichung durchgeführt. Bei höheren Konzentrationen des Substrats 8-Hydroxy-geraniol-β-D-glucosid kam es bei *CpβGlc* zu einem Absinken der spezifischen Aktivität. Entsprechend wurde die Voreinstellung verwendet, die eine Substratinhibition berücksichtigt. Auch bei *PcβGlc* scheint bei hohen Konzentrationen des Substrats 8-Hydroxy-geraniol-β-D-glucosid eine Inhibition des Enzyms vorzuliegen, doch da zu wenig Werte im Bereich der hohen Substratkonzentration vorlagen, konnte keine Auswertung mit der Voreinstellung „Substratinhibition“ mit GraphPad Prism 5 durchgeführt werden. Obwohl eine passende Kurve angezeigt wird (siehe Abb. 7 und 9), ist eine Berechnung der kinetischen Parameter hiermit nicht möglich. Deswegen wurde die Berechnung nach Michaelis-Menten verwendet.

Die berechneten kinetischen Parameter für *CpβGlc* und *PcβGlc* sind in Tabelle 1 aufgelistet. Der K_M -Wert entspricht derjenigen Substratkonzentration, bei der die Umsatzgeschwindigkeit $v = \frac{1}{2} v_{max}$ entspricht. Die Wechselzahl k_{cat} gibt die maximale Anzahl Substratmoleküle an, die pro Zeiteinheit von einem Molekül Enzym umgesetzt werden kann. Ein Maß für die katalytische Effizienz ist durch die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M gegeben. Findet eine Substratinhibition statt, wird die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes, bzw. die Bindungsaffinität des Inhibitors an das Enzym, als Inhibitorkonstante K_i bezeichnet.

Tabelle 1: Kinetische Parameter v_{max} , K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M und K_i für die aufgereinigten β-Glucosidasen aus *C. populi* (*CpβGlc*) und *P. cochleariae* (*PcβGlc*) jeweils mit den Substraten Salicin und 8-Hydroxy-geraniol-β-D-glucosid.

Enzym	Substrat	v_{max} [mmol/min/mg]	K_M [mM]	k_{cat} [min ⁻¹]	k_{cat}/K_M [mM ⁻¹ min ⁻¹]	K_i [mM]
<i>CpβGlc</i>	Salicin	6,442 (± 0,2427)	17,35 (± 1,883)	6,442 (± ,2427)	0,371	
	8-Hydroxygeraniol-β-D-glucosid	11,52 (± 0,9912)	4,566 (± 1,118)	10,25 (± 0,429)	2,245	465,5 (± 337,5)
<i>PcβGlc</i>	Salicin	2,608 (± 0,2047)	29,22 (± 5,471)	2,608 (± 0,2047)	0,089	
	8-Hydroxygeraniol-β-D-glucosid	1,552 (± 0,1918)	5,637 (± 2,601)	1,552 (± 0,1918)	0,275	

Die kinetischen Parameter wurden mit GraphPad Prism 5 berechnet (*CpβGlc* Salicin und *PcβGlc* Salicin, 8-Hydroxy-geraniol-β-D-glucosid mit der Einstellung „Michaelis-Menten“, *CpβGlc* 8-Hydroxy-geraniol-β-D-glucosid mit „Substratinhibition“). In Klammern ist die Standardabweichung (± SD) angegeben.

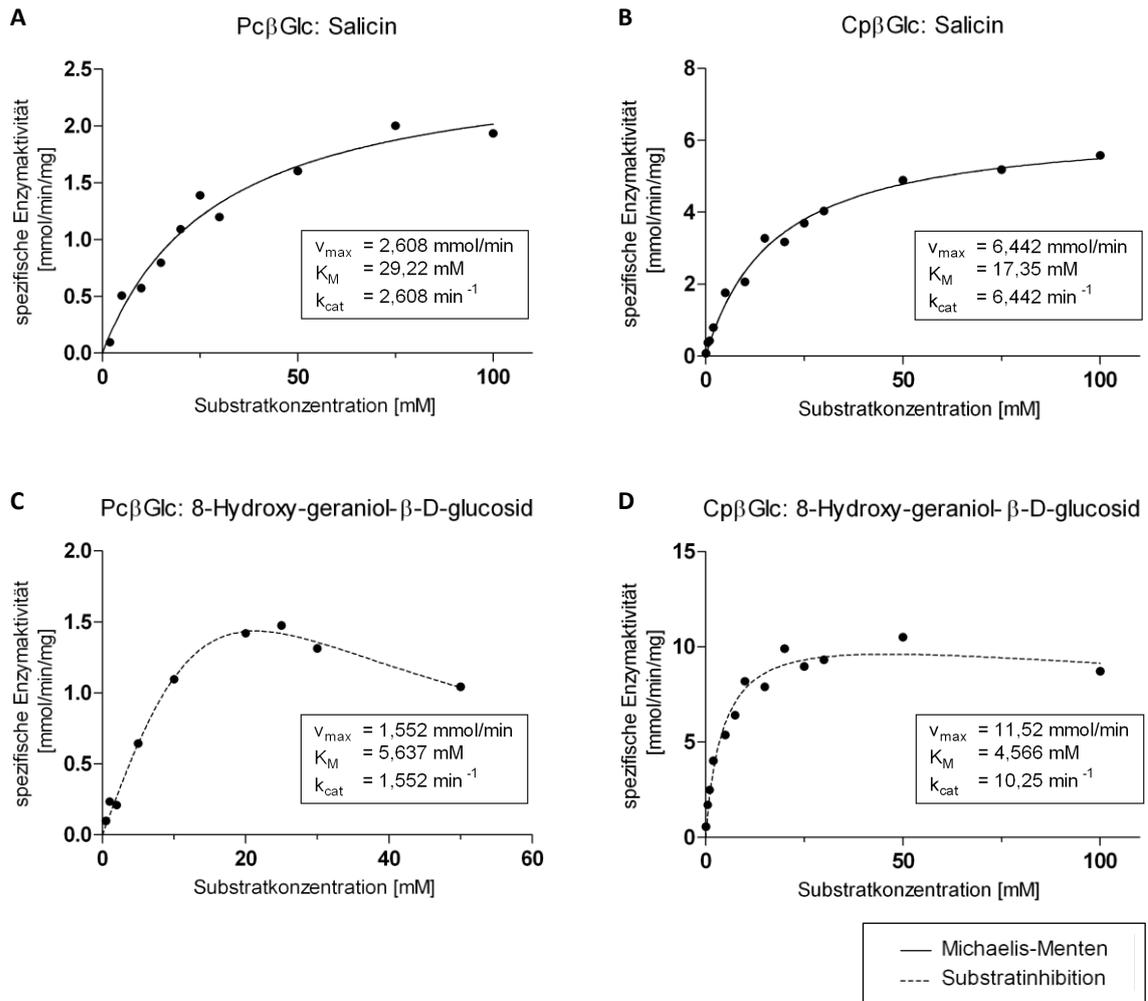


Abbildung 7: Enzymkinetik für die β -Glucosidasen aus *Chrysomela populi* (Cp β Glc) und *P. cochleariae* (Pc β Glc) jeweils mit den Substraten Salicin und 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid. Die spezifische Enzymaktivität wurde gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die Graphen und kinetischen Parameter wurden mit GraphPad Prism berechnet (Pc β Glc Salicin, Cp β Glc Salicin Graph und Parameter, Pc β Glc 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid Parameter und Cp β Glc 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid k_{cat} nach „Michaelis Menten“, Pc β Glc 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid Graph und Cp β Glc 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid Graph nach „Substratinhibition“). Die zugehörigen Werte für v_{max} , K_M und k_{cat} befinden sich im Kasten bei den jeweiligen Graphen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (SE) der Steigung dar. A: Pc β Glc mit Substrat Salicin, B: Cp β Glc mit Substrat Salicin, C: Pc β Glc mit Substrat 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid, D: Cp β Glc mit Substrat 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid.

8.7 Glucosegehalt im Wehrsekret von *Pheadon cochleariae*

Um die Glucosekonzentration im Wehrsekret von *P. cochleariae* zu bestimmen, wurde dieses mit Glaskapillaren von den ausgestülpten Drüsenreservoirs der Larven gesammelt (siehe 7.2.14) und in Wasser aufgenommen. Die Glucose in den Wehrsekret-Lösungen wurde nach 7.2.15 quantifiziert.

Die Glucosekonzentration im Wehrsekret von *P. cochleariae* lag zwischen 5,3% und 8,2% (w/w). Es wurden pro gesammeltem Wehrsekret ($n = 4$) zwei verschiedene Verdünnungen in Wasser als Dreifachreplikate vermessen.

Durchschnittlich war 6,5% (\pm 1,1% SD) Glucose im Sekret vorhanden. Dies entspricht 361 mM (\pm 61 mM SD) Glucose.

8.8 Inhibierung der β -Glucosidase *Pc* β Glc durch Glucose

Die β -Glucosidase *Pc* β Glc wurde mit dem Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucosid bei verschiedenen Glucosekonzentrationen (1,8 M, 720 mM, 180 mM, 72 mM, 0 mM) versetzt, um zu überprüfen, ob und bei welcher Konzentration eine Inhibierung durch Glucose stattfindet (siehe 7.2.16). Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Reaktionsansätze unter dem Transilluminator fotografiert. Als Negativkontrollen wurden Ansätze mit Wasser statt Proteinlösung verwendet.

Die Auswertung erfolgte mit ImageJ 1.47, welches eine Graustufenmessung und somit den Vergleich der β -Glucosidase-Aktivität über die Fluoreszenz ermöglicht. Die Kontrollen weisen keine Fluoreszenz auf und wurden von den Werten von *Pc* β Glc abgezogen. In Anpassung an die Fluoreszenz des Ansatzes, dem keine Glucose zugesetzt wurde (= 100%), wurden die Werte normiert. Man erkennt eine zunehmende Inhibierung der β -Glucosidase *Pc* β Glc mit steigender Glucosekonzentration (Abb. 8). Bei 72 mM Glucose ist 86% relative Aktivität vorhanden, bei 180 mM 84% und bei 720 mM 67%. Allerdings ist auch bei einer Glucosekonzentration von 1,8 M ist noch 36% relative β -Glucosidaseaktivität vorhanden.

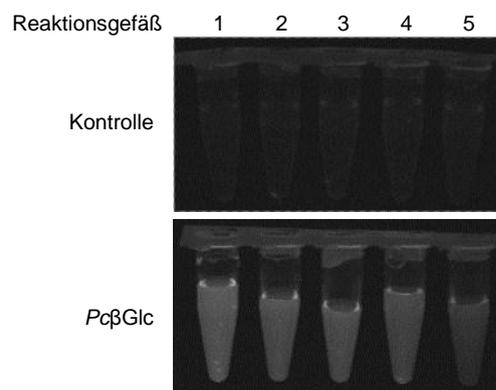


Abbildung 8: Inhibierung der aufgereinigten β -Glucosidase aus *P. cochleariae* (*Pc* β Glc) durch Glucose. Der Reaktionsansatz (60 μ l Puffer (pH 5,5), 40 μ l Proteinlösung, 20 μ l 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucosid (0,5 mg/ml), 80 μ l Glucoselösung) enthielt verschiedene Glucosekonzentrationen (0 – 1,8 M), wurde über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und unter dem Transilluminator fotografiert. Die Fluoreszenz korreliert mit der Menge an der in der Reaktion frei gewordenen Glucose.

1: 0 mM Glucose, 2: 72 mM Glucose, 3: 180 mM Glucose, 4: 720 mM Glucose, 5: 1,8 M Glucose. Man erkennt im Vergleich zum Ansatz, dem keine Glucose zugesetzt wurde, eine kontinuierliche Abnahme der Fluoreszenz. Allerdings ist auch bei der höchsten Glucosekonzentration noch Fluoreszenz sichtbar.

9 Diskussion

9.1 Proteinexpression

Die β -Glucosidasen aus *P. cochleariae* ($Pc\beta$ Glc) und *C. populi* ($Cp\beta$ Glc) wurden in High Five™-Insektenzellen hergestellt, die zuvor mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert wurden (siehe 7.2.2 und 7.2.4).

Bevor die Wahl des Expressionssystems auf Insektenzellen fiel, wurde ein Versuch unternommen, die Proteine in *Escherichia coli* herzustellen. So hätten größere Mengen Protein gewonnen werden können, während gleichzeitig die Kultivierung von *E. coli* einfacher und kostengünstiger gewesen wäre als in Insektenzellen. Dies war allerdings nicht erfolgreich. Deswegen wurden High Five™-Insektenzellen als Expressionssystem für $Pc\beta$ Glc, $Cp\beta$ Glc und $C\beta$ Glc verwendet, da für die Expression von Insekten- β -Glucosidasen oft mit Insektenzellen durchgeführt wird (z.B. [41], [42]) und andere sekretorische β -Glucosidasen bereits erfolgreich in eukaryotischen Systemen hergestellt werden konnten (z.B. [43]).

9.2 Proteinaufreinigung

Die Proteinaufreinigung der β -Glucosidasen aus *P. cochleariae* ($Pc\beta$ Glc) und *C. populi* ($Cp\beta$ Glc) wurde mittels Affinitätschromatographie durchgeführt (siehe 7.2.5). Das berechnete Molekulargewicht für $Cp\beta$ Glc beträgt 73,6 kDa und für $Pc\beta$ Glc 73,4 kDa.

Bei allen drei Ansätzen – $Cp\beta$ Glc, $Pc\beta$ Glc und der Kontrolle – ist erkennbar, dass Proteine aufgereinigt wurden, die im Eluat als Bande bei 75 kDa zu sehen sind (für Kontrolle und $Pc\beta$ Glc siehe Abb. 3). Aufgrund des Molekulargewichts ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um die β -Glucosidasen $Cp\beta$ Glc und $Pc\beta$ Glc handelt. Diese Bande ist bei $Cp\beta$ Glc und $Pc\beta$ Glc stärker sichtbar als bei der Kontrolle. Zusätzlich ist bei $Pc\beta$ Glc eine zweite schwächere Bande im Bereich zwischen 75 und 100 kDa und bei $Cp\beta$ Glc eine verschwommene Ausweitung der 75 kDa-Bande in dem Bereich bis 100 kDa zu sehen. Dabei handelt es sich vermutlich um eine Verunreinigung. Da diese nur in den aufgereinigten Proteinlösungen von $Cp\beta$ Glc und $Pc\beta$ Glc nicht aber in der Kontrolle vorhanden ist, steht diese wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Überexpression der Proteine. Außerdem ist eine Interaktion der vorliegenden Proteinverunreinigung mit den überexprimierten Proteinen oder deren angefügten His₆-Epitop möglich. Bei einer erneuten Durchführung der Proteinaufreinigung sollte mit zusätzlichen Aufreinigungsmethoden, wie zum Beispiel Größenausschlusschromatographie, versucht werden, die Proteine von den vorhandenen Verunreinigungen zu trennen. Auch möglich wäre die Verwendung eines alternativen Expressionssystems. Da bereits der

Versuch unternommen wurde, die sekretorischen β -Glucosidasen $Pc\beta$ Glc, $Cp\beta$ Glc und $C\beta$ Glc in dem Prokaryoten *E. coli* herzustellen und dieser nicht erfolgreich verlief, sollte ein anderes eukaryotisches Expressionssystem, wie zum Beispiel Hefe, genutzt werden.

Die Abnahme der Intensität der Banden vom Eluat im Vergleich zur Probe, die nach dem Umpuffern entnommen wurde, ist auf eine Verdünnung des Proteins durch die Volumenzunahme von 2,5 ml auf 3,5 ml beim Umpuffern zurückzuführen.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den aufgereinigten Proteinen um die rekombinant hergestellten β -Glucosidasen handelt, wurden die einzelnen Proteinfaktionen der Aufreinigung mittels eines Western Blots analysiert (siehe 7.2.7). Da keine Dokumentation des Western Blots vorliegt, sollte dieser wiederholt und dokumentiert werden. Auf der Membran von $Cp\beta$ Glc und $Pc\beta$ Glc ist jeweils eine Bande bei 75 kDa vorhanden. Bei der Kontrolle ist jedoch keine Bande zu erkennen. An die Proteine der anderen Banden (bei 75 kDa der Kontrolle und zwischen 75 und 100 kDa bei $Cp\beta$ Glc und $Pc\beta$ Glc) bindet der Antikörper nicht. Diese entsprechen also nicht den rekombinant hergestellten β -Glucosidasen mit His₆-Epitop.

Da auf der Membran von $Cp\beta$ Glc und $Pc\beta$ Glc jeweils eine Bande bei 75 kDa vorhanden ist, bei der Kontrolle jedoch keine Bande detektiert werden kann, ist davon auszugehen, dass es sich bei den aufgereinigten Proteinen um die β -Glucosidasen $Cp\beta$ Glc und $Pc\beta$ Glc handelt. Eine Proteinexpression in transfizierten High FiveTM-Insektzellen war also für die β -Glucosidasen $Pc\beta$ Glc und $Cp\beta$ Glc erfolgreich möglich.

Bei der Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 7.2.8) wurde der Gesamtproteingehalt der Probe ermittelt. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass der erhaltene Wert von $Cp\beta$ Glc und $Pc\beta$ Glc sich aus den aufgereinigten β -Glucosidasen und den enthaltenen Verunreinigungen zusammensetzt. Diese Verunreinigungen wurden bei den weiteren Versuchen und Berechnungen nicht berücksichtigt.

9.3 Aktivitätsbestimmung

Die Aktivität von $Cp\beta$ Glc und $Pc\beta$ Glc wurde mithilfe von 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucosid bestimmt (siehe 7.2.9), welches von vorhandenen β -Glucosidasen in Glucose und das unter UV/VIS-Licht fluoreszierende 4-Methylumbelliferon gespalten wird.

In den Negativkontrollen ist keine Fluoreszenz und damit auch keine β -Glucosidaseaktivität vorhanden. Da trotz der im Gelbild erkennbaren Verunreinigungen bei der Kontrolle keine β -Glucosidase-Aktivität in der eluierten Proteinfraktion der nicht

transfizierten Zellen vorhanden ist, wurden diese im Folgenden vernachlässigt. Sowohl bei *CpβGlc* als auch bei *PcβGlc* ist Fluoreszenz erkennbar (siehe Abb. 3). Die β -Glucosidasen *CpβGlc* und *PcβGlc* sind folglich aktiv.

Vergleicht man die Fluoreszenz von *CpβGlc* und *PcβGlc* ist zu erkennen, dass bei *CpβGlc* mehr Substrat umgesetzt wurde als bei *PcβGlc*. Da gleiche Volumina der Proteinlösungen eingesetzt wurden, *CpβGlc* jedoch eine höhere Proteinkonzentration aufweist als *PcβGlc*, ist ein direkter Aktivitätsvergleich mit diesem Test nicht möglich.

Nur aufgereinigte Proteinlösungen von *CpβGlc* und *PcβGlc*, die in diesem Vorversuch eine β -Glucosidase-Aktivität aufwiesen, wurden für die weiteren Analysen verwendet.

9.4 Aktivitätsbereich der β -Glucosidasen bei verschiedenen pH-Werten

Um den Einfluss des pH-Werts auf den Aktivitätsbereich der β -Glucosidasen *CpβGlc* und *PcβGlc* zu ermitteln, wurden diese mit ihrem Substrat in Puffern mit verschiedenen pH-Werten inkubiert und anschließend die dabei freigewordene Glucose quantifiziert (siehe 7.2.10 und 7.2.15). Für *CpβGlc* ergab sich dabei eine maximale Aktivität bei pH 4,5. Im Bereich zwischen pH 4,0 – 6,5 besteht eine hohe relative Aktivität ($\geq 80\%$). *PcβGlc* weist bei pH 5,0 ein Optimum auf und ist im Bereich pH 4,0 – 5,0 noch äußerst aktiv ($\geq 80\%$ relative Aktivität). Obwohl bei pH 5,5 die relative Aktivität auf 73% sinkt, steigt diese bei pH 6,0 wieder auf 99%. Diese zwei Maxima können beispielsweise auf eine unterschiedliche Protonierung des Enzyms bei verschiedenen pH-Werten und eine daraus resultierende veränderte Aktivität zurückzuführen sein.

Die meisten bei Insekten untersuchten β -Glucosidasen erfüllen eine Funktion bei der Verdauung und sind entsprechend in mit der Verdauung assoziierten Organen (z.B. Darm oder Speicheldrüsen) lokalisiert. Über β -Glucosidasen außerhalb des Verdauungstraktes finden sich so gut wie keine Informationen, die deren Aktivität bei verschiedenen pH-Werten betreffen. Exemplarisch sind einige β -Glucosidasen aus Insekten in Tabelle 2 zusammengestellt.

Die meisten β -Glucosidasen besitzen ein pH-Optimum im Bereich von pH 5,0 bis pH 6,0. Dies trifft auch für *PcβGlc* mit einer maximalen Aktivität bei pH 5,0 zu. *CpβGlc* liegt mit einem Maximum bei pH 4,5 knapp darunter. Die β -Glucosidase aus den Speicheldrüsen aus *Glyphodes pyloalis* Walker zeigt ein pH-Optimum im Alkalischen bei pH 8 – 9.

Während einige β -Glucosidasen nur in einem pH-Bereich von 1 – 1,5 Einheiten eine hohe Aktivität ($\geq 80\%$) besitzen (z.B. [41], [44], [45]), sind andere auch bei weiter

vom Optimum abweichenden pH-Werten sehr aktiv (z.B. [46], [47]). Hier ist auch *Cp*βGlc einzuordnen, die zwischen pH 4,0 – 6,5 eine hohe Aktivität zeigt. *Pc*βGlc besitzt eher einen schmalen Aktivitätsbereich mit einem zusätzlichen Maximum. Nimmt man die in einigen Veröffentlichungen vertretene Grenze von ≥ 70% als hohe Aktivität an, erstreckt sich dieser sowohl bei *Pc*βGlc als auch bei *Cp*βGlc von pH 3,6 – 6,5. Einen sehr breiten pH-Bereich von pH 4,5 – 8,0 mit einer relativen Aktivität von über 80% zeigt die β-Glucosidase aus *Macrotermes barneyi* [47].

Tabelle 2: pH-Aktivitätsoptima einiger β-Glucosidasen aus verschiedenen Organismen der Klasse Insecta.

Taxon	Organismus	pH-Optimum	Quelle
Insecta			
Coleoptera	<i>C. populi</i> (Larve)	4,5	
	<i>P. cochleariae</i> (Larve)	5,0	
	<i>Rhynchophorus palmarum</i> (Larve)	5,0	[48]
Diptera	<i>Rhynchosciara americana</i> (Larve)	6,2	[49]
	<i>Bombyx mori</i>	6,0	[41]
Lepidoptera	<i>Glyphodes pyloalis</i> Walker (Mitteldarm)	5,5	[44]
	<i>Glyphodes pyloalis</i> Walker (Speicheldrüsen)	8 – 9	[44]
	<i>Isoptera</i>		
	<i>Coptotermes formosanus</i>	5,6 – 6,2	[50]
	<i>Globitermes sulphureus</i>	6,0	[46]
	<i>Nasutitermes takasagoensis</i>	6,0	[45]
	<i>Macrotermes barneyi</i>	5,0	[47]

Alle in der Tabelle aufgeführten β-Glucosidasen sind in mit der Verdauung assoziierten Organen (z.B. Darm oder Speicheldrüsen) lokalisiert, abgesehen von den β-Glucosidasen aus *C. populi* und *P. cochleariae*, die sich in deren Wehrsekret befinden.

Der pH-Wert des Sekrets von *P. cochleariae* wurde mit einer Mikrodiode gemessen (durchgeführt in der Arbeitsgruppe Boland) und betrug pH 4,5. Dies liegt nahe am Aktivitätsoptimum von *Pc*βGlc bei pH 5,0 und auch bei pH 4,5 ist die β-Glucosidasen mit 91% fast vollständig aktiv.

9.5 Aktivitätsbereich der β-Glucosidasen bei verschiedenen Temperaturen

Die β-Glucosidasen *Cp*βGlc und *Pc*βGlc wurden mit ihrem Substrat bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und die dabei freigewordene Glucose quantifiziert, um das Temperatur-Aktivitätsoptimum zu bestimmen (siehe 7.2.11 und 7.2.15). Dieses lag für *Cp*βGlc bei 40°C. Eine hohe relative Aktivität (≥ 80%) ist zwischen 40°C und 50°C vorhanden. Für *Pc*βGlc findet sich ein Temperatur-

Aktivitätsoptimum bei 35°C. Die β -Glucosidase ist im Bereich von 30°C – 45°C äußerst aktiv ($\geq 80\%$ relative Aktivität).

Auch hier gilt wie bei 9.4, dass die meisten bei Insekten untersuchten β -Glucosidasen sich in mit der Verdauung assoziierten Organen befinden und so gut wie keine Information über den Einfluss der Temperatur auf die Aktivität von β -Glucosidasen in anderen Organen vorliegt. Exemplarisch sind in Tabelle 3 verschiedene β -Glucosidasen zusammengestellt.

Die meisten β -Glucosidasen aus Insekten besitzen ein Temperatur-Aktivitätsoptimum im Bereich zwischen 30 und 50°C. Hier sind auch $Cp\beta$ Glc und $Pc\beta$ Glc mit jeweils 40 und 35°C einzuordnen. Thermostabile β -Glucosidasen, die ein Aktivitätsoptimum bei Temperaturen zwischen 80 und 90°C besitzen, finden sich bei Bakterien (z.B. [51]), Archaeen (z.B. [52]), Pilzen (z.B. [53]) und auch bei Insekten. So bleibt beispielsweise bei einer β -Glucosidase aus der Termitenart *Globitermes sulphureus* mit einem Maximum bei 90°C im Bereich von 70 – 95°C über 70% der Aktivität erhalten [46]. Auch kälteaktive β -Glucosidasen sind bekannt. Beispielsweise besitzt eine β -Glucosidase aus dem Bakterium *Micrococcus antarcticus*, die ihre maximale Aktivität bei 25°C zeigt, bei 10°C 57% ihrer Aktivität und weist sogar bei 0°C noch 27% der relativen Aktivität auf [54].

Auch in der Breite ihres Aktivitätsbereichs ähneln die β -Glucosidasen $Cp\beta$ Glc (40 – 50°C) und $Pc\beta$ Glc (30 – 45°C) den meisten anderen aus Insekten, deren Aktivitätsbereich sich über 10 – 20 Einheiten erstreckt (z.B. [48], [44], [45]). Einen breiteren Toleranzbereich besitzen nur wenige Insekten- β -Glucosidasen (z.B. [50]).

Tabelle 3: Temperatur-Aktivitätsoptima einiger β -Glucosidasen aus verschiedenen Organismen der Klasse Insecta.

Taxon	Organismus	Temperatur-Optimum [°C]	Quelle
Insecta			
Coleoptera	<i>C. populi</i> (Larve)	40	
	<i>P. cochleariae</i> (Larve)	35	
	<i>Rhynchophorus palmarum</i> (Larve)	55	[48]
Lepidoptera	<i>Bombyx mori</i>	35	[41]
	<i>Glyphodes pyloalis</i> Walker (Mitteldarm)	45	[44]
Isoptera	<i>Coptotermes formosanus</i>	49	[50]
	<i>Globitermes sulphureus</i>	90	[46]
	<i>Nasutitermes takasagoensis</i>	50	[45]
	<i>Macrotermes barneyi</i>	50	[47]

Alle in der Tabelle aufgeführten β -Glucosidasen sind in mit der Verdauung assoziierten Organen (z.B. Darm oder Speicheldrüsen) lokalisiert, abgesehen von den β -Glucosidasen aus *C. populi* und *P. cochleariae*, die sich in deren Wehrsekret befinden.

9.6 Kinetische Parameter v_{\max} , K_M , k_{cat} und k_{cat}/K_M

Die kinetischen Parameter v_{\max} , K_M , k_{cat} und k_{cat}/K_M sollten für die β -Glucosidasen $Cp\beta\text{Glc}$ und $Pc\beta\text{Glc}$ mit jeweils den Substraten Salicin und 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid bestimmt werden (siehe 7.2.12). Hierfür wurden $Cp\beta\text{Glc}$ und $Pc\beta\text{Glc}$ jeweils mit verschiedenen Substratkonzentrationen inkubiert und die dabei frei werdende Glucose über die Zeit quantifiziert. Aus den Rohdaten wurden die relative Enzymaktivität bei den einzelnen Substratkonzentrationen und die kinetischen Parameter berechnet. Diese sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Bei der Bildung von Iridoiden im Wehrsekret von *Chrysomelidae* wird die *de novo*-Synthese allgemein als evolutionär ursprüngliche Strategie angesehen [8]. Weiter entwickelte Subtribus der Blattkäfer, wie zum Beispiel *C. populi*, besitzen die Fähigkeit Pflanzeninhaltsstoffe aus der Nahrung zu sequestrieren und als Ausgangssubstanzen für die Synthese von Abwehrstoffen zu nutzen [9], [11]. Es wird vermutet, dass die Enzyme, die zur Umwandlung sequestrierter Substanzen in die aktiven Verbindungen benötigt werden, sich von bereits bei *de novo*-Produzenten vorhandenen Enzymen ableiten [6].

P. cochleariae gehört zu den *de novo*-Produzenten und synthetisiert das Iridoid Chrysomelidial aus Vorstufen des Acetat-Mevalonat-Wegs über das transportable Zwischenprodukt 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid [18], [19], [20], [21]. *C. populi*

hingegen sequestriert Salicin aus der Wirtspflanze Weide und setzt es in den Wehrdrüsen zu Salicylaldehyd um [11], [6]. Beide besitzen eine β -Glucosidase, die im Wehrsekret unter Freisetzung von Glucose die Aglucone von den jeweiligen Glucosiden 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid und Salicin abspaltet [6].

Es wird vermutet, dass es sich bei *Pc* β Glc um das entwicklungsgeschichtlich ältere Enzym und bei *Cp* β Glc um eine sich daraus entwickelte β -Glucosidase handelt. Dies ist auch aufgrund der großen Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von *Pc* β Glc und *Cp* β Glc wahrscheinlich. Daher wäre es interessant zu sehen, ob bestimmte Substratpräferenzen bei den β -Glucosidasen vorhanden sind. Falls das der Fall sein sollte, wäre zu überprüfen, ob sich diese bei *C. populi* an das sequestrierte Substrat Salicin anstelle des *de novo* synthetisierten 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosids angepasst haben.

Die Substratpräferenzen sollten anhand der kinetischen Parameter der Enzyme untersucht werden. Der K_M -Wert stellt diejenige Substratkonzentration dar, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms halbmaximal ist und ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat. Je kleiner der K_M -Wert ist, desto höher ist die Affinität zum jeweiligen Substrat. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird als v_{max} bezeichnet und die Wechselzahl k_{cat} repräsentiert die maximale Anzahl an Substratmolekülen, die pro Zeiteinheit von einem Molekül Enzym umgesetzt werden kann. Hier ist zu bedenken, dass die Werte bei der Berechnung auf den Gesamtproteingehalt bezogen wurden. Dieser setzt sich allerdings aus den aufgereinigten β -Glucosidasen und zusätzlich vorhandenen Proteinverunreinigungen zusammen. Bei zukünftigen Proteinaufreinigungen ist darauf zu achten, dass diese Verunreinigungen abgetrennt werden, um genauere Werte für k_{cat} zu erhalten. Ein Maß für die katalytische Effizienz ist die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M . Je höher diese ist, desto effizienter wird ein Substrat vom Enzym umgesetzt. Bei *Pc* β Glc ist der K_M -Wert für 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid mit 5,64 mM deutlich niedriger als für Salicin (29,22 mM). Dasselbe gilt für *Cp* β Glc (4,57 mM für 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid, 17,35 mM für Salicin). Beide Enzyme besitzen also eine Substratpräferenz für 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid. Die K_M -Werte sowohl für Salicin als auch für 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid sind bei *Cp* β Glc niedriger als bei *Pc* β Glc. Das Enzym hat *in vitro* generell eine höhere Substrataffinität als *Pc* β Glc.

Betrachtet man k_{cat} und v_{max} kann man erkennen, dass diese bei *Pc* β Glc für 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid ($v_{max} = 1,55$ mmol/min/mg, $k_{cat} = 1,55$ min⁻¹) niedriger sind als für Salicin ($v_{max} = 2,61$ mmol/min/mg, $k_{cat} = 2,61$ min⁻¹). Es wird von *Pc* β Glc dementsprechend mehr Salicin als 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid pro Minute

umgesetzt. Bei $C\beta$ Glc ist der umgekehrte Fall zu finden. Die Werte für v_{\max} und k_{cat} sind für 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid ($v_{\max} = 11,52 \text{ mmol/min/mg}$, $k_{\text{cat}} = 10,25 \text{ min}^{-1}$) höher als für Salicin ($v_{\max} = 6,44 \text{ mmol/min/mg}$, $k_{\text{cat}} = 6,44 \text{ min}^{-1}$). 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid wird entsprechend schneller von $C\beta$ Glc umgesetzt als Salicin.

Setzt man k_{cat} und K_M allerdings zueinander ins Verhältnis erkennt man dieselben Tendenzen wie beim K_M -Wert. Die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M ist bei $P\beta$ Glc für 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid mit $0,28 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ höher als für Salicin mit $0,09 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$. $P\beta$ Glc spaltet das Aglucon von 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid ungefähr drei Mal effizienter ab als von Salicin. Auch für $C\beta$ Glc übersteigt die Spezifitätskonstante für 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid ($2,25 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$) die für Salicin ($0,37 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$) deutlich. 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid wird von $C\beta$ Glc circa sechs Mal effizienter umgesetzt als Salicin. Es ist folglich für beide β -Glucosidasen $P\beta$ Glc und $C\beta$ Glc eine Substratpräferenz für 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid vorhanden.

Vergleicht man zusätzlich die katalytische Effizienz von $P\beta$ Glc und $C\beta$ Glc, ist zu sehen, dass $C\beta$ Glc beide Substrate besser umsetzt als $P\beta$ Glc. $C\beta$ Glc spaltet Glucose von Salicin vier Mal effizienter ab als $P\beta$ Glc und die katalytische Effizienz ist für 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid sogar acht Mal höher als bei $P\beta$ Glc.

Mit einer vierfach verbesserten Umsetzung von Salicin durch $C\beta$ Glc im Gegensatz zu $P\beta$ Glc scheint bei *C. populi* eine Anpassung an das für die Synthese der Wehrverbindungen wichtige Substrat stattgefunden zu haben. Auffällig ist, dass $C\beta$ Glc beide Substrate, nicht nur Salicin sondern auch 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid, wesentlich effizienter umsetzt als $P\beta$ Glc. Dies könnte die Folge einer generellen Weiterentwicklung des Enzyms in Anpassung an die bei *C. populi* vorliegenden Reaktionsbedingungen und Substratverfügbarkeiten sein.

Die Transporter, die die Vorstufen aus der Hämolymphe in die Drüsenzellen transportieren, sind selektiv und erlauben nur dem nativen Substrat – 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid bei *P. cochleariae* und Salicin bei *C. populi* – den Durchtritt. Entsprechend liegt im Drüsenreservoir nur eines der beiden Glucoside vor [29]. Aufgrund der Substratverfügbarkeit herrscht im Sekret der beiden Blattkäfer *P. cochleariae* und *C. populi* also vermutlich kein Selektionsdruck, der die beiden β -Glucosidasen zwingen würde, sich auf ihr für die Verteidigung wichtiges Substrat zu spezialisieren.

Nach der Abspaltung des Aglucons von Salicin durch $C\beta$ Glc ist nur noch ein weiterer Reaktionsschritt (Oxidation) bis zum Endprodukt Salicylaldehyd nötig, während bei der Synthese von Chrysolidial bei *P. cochleariae* zwei weitere

Reaktionsschritte (Oxidation und Zyklisierung) zwischen der Hydrolyse des 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosids und dem Endprodukt liegen [6], [23]. Es ist bislang nicht bekannt, welcher der Reaktionen geschwindigkeitsbestimmend ist. Liegt bei der Synthese von Chrysolidial der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beispielsweise in der nachfolgenden Oxidation oder Zyklisierung, wäre keine Effizienzsteigerung der β -Glucosidase erforderlich. Da diese Reaktionen bei *P. cochleariae* und *C. populi* eventuell unterschiedlich schnell verlaufen, wäre in dem Fall ein höherer Substratumsatz an der β -Glucosidase $Cp\beta$ Glc im Vergleich zu $Pc\beta$ Glc möglich. Dies könnte für die Effizienzerhöhung von $Cp\beta$ Glc mitbestimmend sein.

Zusätzlich muss bedacht werden, dass die Untersuchungen *in vitro* in einem wässrigen Puffer durchgeführt wurden. *C. populi* besitzt ein zweiphasiges Sekret, bei dem sich das hydrophobe Salicylaldehyd als organische Phase von der wässrigen Phase, in der sich die β -Glucosidase und Salicin befinden, trennt [6]. Das Wehrsekret von *P. cochleariae* liegt als Emulsion feiner potentieller organischer Vesikel in der wässrigen Phase vor; die Phasen sind nicht so stark voneinander getrennt wie bei *C. populi*. Dies könnte zur Folge haben, dass $Cp\beta$ Glc besser an die wässrigen Reaktionsbedingungen angepasst ist als $Pc\beta$ Glc und dementsprechend eine höhere Effizienz zeigt. Wie die kinetischen Parameter *in vivo* aussehen, kann nur spekuliert werden.

Dass die kinetischen Parameter für 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid bei $Pc\beta$ Glc und $Cp\beta$ Glc unterschiedlich berechnet wurden, muss außerdem bedacht werden. Obwohl für $Pc\beta$ Glc augenscheinlich eine Substratinhibition vorliegt, konnten diese mit dem Programm GraphPad Prism 5 nur mit einer Anpassung nach „Michaelis-Menten“ berechnet werden. Um den unterschiedlichen Verlauf der Graphen für 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid bei der Berechnung nach „Michaelis-Menten“ und „Substratinhibition“ zu demonstrieren, sind diese vergleichend in Abb. 9 dargestellt. Während bei $Cp\beta$ Glc die beiden Graphen nur geringfügig voneinander abweichen, sind bei $Pc\beta$ Glc jedoch zwei verschiedene Kurvenverläufe zu sehen. Deswegen weichen die tatsächlichen kinetischen Parameter, die hier nicht berechnet werden konnten, für $Pc\beta$ Glc vermutlich von den hier ermittelten ab. Um bessere Ergebnisse zu erhalten, sollte die Bestimmung der Parameter für $Pc\beta$ Glc mit 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid mit mehr Messpunkten, vor allem bei höheren Substratkonzentrationen, wiederholt werden. Allerdings ist davon auszugehen, dass auch unter Einbeziehung zusätzlicher Messpunkte die momentan ermittelten Werte nur noch genauer definiert werden würden. Ein Abweichen der berechneten Werte im Dezimalbereich ist unwahrscheinlich.

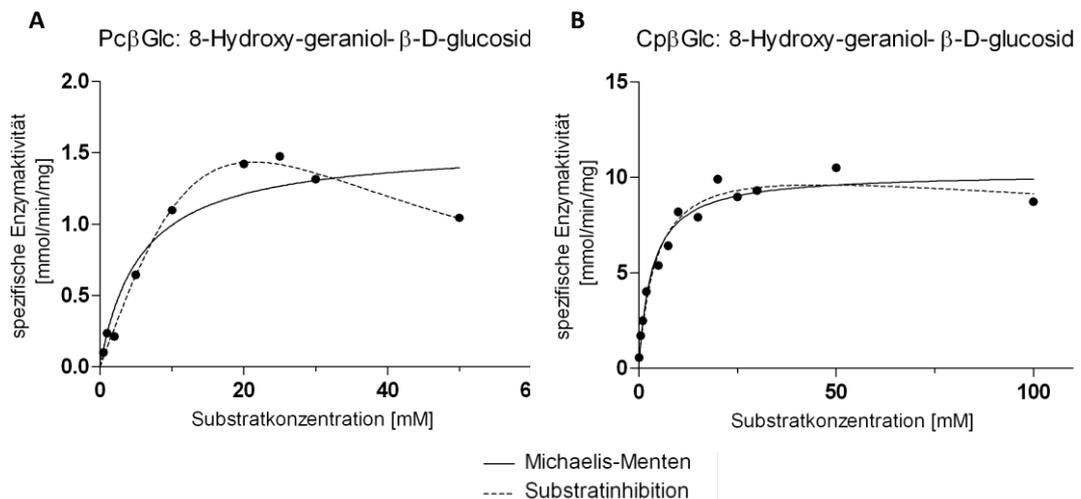


Abbildung 9: Vergleich der Graphen der aufgereinigten β -Glucosidasen $Pc\beta$ Glc und $Cp\beta$ Glc (jeweils mit dem Substrat 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid) mit der Berechnung nach „Michaelis-Menten“ und „Substratinhibition“. Die spezifische Enzymaktivität wurde gegen die Substratkonzentration aufgetragen und die Berechnung der Graphen mit GraphPad Prism durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler (SE) der Steigung dar.

A: $Pc\beta$ Glc mit Substrat 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid. B: $Cp\beta$ Glc mit Substrat 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid. Beide möglichen Verläufe der Graphen, die jeweils nach „Michaelis-Menten“ und „Substratinhibition“ berechnet wurden, sind dargestellt. Da die spezifische Enzymaktivität bei höheren Substratkonzentrationen $Pc\beta$ Glc im vergleichsweise stärker abnimmt als bei $Cp\beta$ Glc, unterscheiden sich die beiden Kurvenverläufe bei $Pc\beta$ Glc auch mehr voneinander ab als bei $Cp\beta$ Glc.

Da die kinetischen Parameter nicht mit der Einstellung für eine Substratinhibition berechnet werden konnten, liegt auch für $Pc\beta$ Glc keine Inhibitor konstante K_i vor. Für $Cp\beta$ Glc mit dem Substrat 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid beträgt diese 465,5 mM (\pm 337,5 SD) und besitzt eine sehr hohe Standardabweichung. Um einen genaueren Wert zu erhalten, hätten mehr Datenpunkte oberhalb einer Substratkonzentration von 50 mM gemessen werden müssen. Im Bereich von 100 mM und höher ist in der verwendeten 10x Stammlösung das Substrat 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid allerdings nicht mehr vollständig löslich und es ist folglich problematisch bei diesen Substratkonzentrationen Messungen durchzuführen.

9.7 Glucosegehalt im Sekret von *P. cochleariae* und Inhibition von $Pc\beta$ Glc durch Glucose

Das Wehrsekret von *P. cochleariae*-Larven im 3. Wachstumsstadium wurde gesammelt und die darin enthaltene Glucose quantifiziert (siehe 7.2.14 und 7.2.15). Die gemessene Glucosekonzentration im Wehrsekret lag zwischen 5,3% und 8,2% (w/w). Durchschnittlich enthielt das Sekret 6,5% (\pm 1,1% SD) bzw. 361 mM (\pm 61 mM SD). Aufgrund des hohen Glucosegehalts im Wehrsekret lag die Untersuchung nahe, ob eine Inhibition der β -Glucosidase $Pc\beta$ Glc durch die vorhandene Glucose stattfindet.

Um zu überprüfen, ob die β -Glucosidase *Pc β Glc* durch Glucose inhibiert wird, wurde diese mit 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucosid bei verschiedenen Glucosekonzentrationen (0 – 1,8 M) inkubiert und unter dem Transilluminator fotografiert (siehe 7.2.16).

Eine zunehmende Inhibition bei steigender Glucosekonzentration ist erkennbar (86% relative Aktivität bei 72 mM Glucose, 84% bei 180 mM, 67% bei 720 mM, 36% bei 1,8 M). Im Sekret wurde eine durchschnittliche Glucosekonzentration von 361 mM gemessen. Bei dieser würde *Pc β Glc* eine Aktivität von 67 – 84% aufweisen.

Die meisten β -Glucosidasen werden durch Glucose inhibiert. Für den industriellen Einsatz (z.B. Produktion von Bioethanol aus Cellulose) ist es von großem Interesse, β -Glucosidasen zu finden, die ihr Substrat (z.B. Cellobiose) effektiv spalten und gleichzeitig nicht durch die dabei frei werdende Glucose inhibiert werden.

Unter den Insekten sind nur sehr wenige Glucose-tolerante β -Glucosidasen bekannt. Im Mitteldarm (G1mgNtBG1) [55] und den Speicheldrüsen (G1s-gNtBG1) [45] der Termiten *Nasutitermes takasagoensis* beispielsweise finden sich Glucose-tolerante β -Glucosidasen. G1s-gNtBG1 wurde bei einer Glucosekonzentration von 500 mM zu 50% inhibiert und besaß bei 1 M Glucose noch 20% Aktivität. G1mgNtBG1 zeigte bis zu einer Glucosekonzentration von 100 mM keinen Aktivitätsverlust und war auch bei 600 mM Glucose noch zu 70% aktiv.

Vergleichbare Werte weist auch *Pc β Glc* auf, die beispielsweise bei 720 mM 67% Aktivität zeigt. Allerdings ist *Pc β Glc* auch bei 1,8 M immer noch zu 36% aktiv. *Pc β Glc* kann nach den Maßstäben auch als Glucose-tolerant bezeichnet werden.

Allerdings ist für die oben genannten Ergebnisse der Inhibition von *Pc β Glc* durch Glucose nur eine Messung mit sehr wenigen Messpunkten und ohne Replikate durchgeführt worden. Um die oben genannten Werte zu überprüfen und eventuell zu bestätigen, müssten weitere Messungen mit mehr Datenpunkten und Replikaten durchgeführt werden. So sind alle Aussagen über die Inhibition von *Pc β Glc* durch Glucose unter Vorbehalt zu treffen.

10 Ausblick

Bei einer erneuten Proteinaufreinigung der rekombinant hergestellten β -Glucosidasen sollte darauf geachtet werden, die vorhandenen Proteinverunreinigungen zu entfernen. Hierfür könnten zusätzliche Aufreinigungsmethoden angewandt oder ein anderes Expressionssystem verwendet werden.

Um die ermittelten kinetischen Parameter für $Pc\beta$ Glc und $Cp\beta$ Glc zu überprüfen und zu bestätigen, sollten die Analysen nochmals durchgeführt werden. Zusätzlich zu den technischen Replikaten sollten biologische Replikate ausgeführt werden, bei denen unabhängig voneinander aufgereinigte Proteinfractionen für die kinetischen Messungen verwendet werden sollten.

Da $Pc\beta$ Glc konzentrationsabhängig von Glucose inhibiert wird und es nach einem ersten Versuch so aussieht, als ob $Pc\beta$ Glc bei hohen Konzentrationen trotzdem noch Restaktivität aufweist, sollte die Inhibierungskonstante K_i für die untersuchten β -Glucosidasen ermittelt werden.

Interessant wäre außerdem ein Vergleich der untersuchten β -Glucosidasen $Pc\beta$ Glc und $Cp\beta$ Glc mit $C\beta$ Glc aus *C. lapponica* hinsichtlich der Substratpräferenz und kinetischen Effizienz. Hierfür sollte $C\beta$ Glc rekombinant hergestellt und aufgereinigt werden. So wäre ein Vergleich der kinetischen Parameter der β -Glucosidasen je eines Vertreters der *de novo*-Produzenten, Sequestrierer und *Interrupta*-Gruppe möglich, was zum evolutionären Verständnis der Synthese von Wehrverbindungen der Blattkäfer beitragen würde.

11 Zusammenfassung

Da sich phytophage Käfer meist zeitlebens auf der Wirtspflanze aufhalten und dort Fressfeinden ausgesetzt sind, entwickelten sich zu deren Schutz sowohl bei den Imagines als auch bei den Larven mannigfaltige Abwehrstrategien [1]. Die Larven der Blattkäfer (*Chrysomelidae*) beispielsweise besitzen 18 dorsal paarig angeordnete, defensive Drüsen, die bei einer drohenden Gefahr nach außen gestülpt werden können und Wehrsekret präsentieren. Dieses enthält je nach Art unterschiedliche defensive Substanzen [5], [6].

Im Laufe der Evolution haben sich bei den Blattkäferlarven drei verschiedene Synthesewege für Abwehrsubstanzen herausgebildet. Die *de novo*-Synthese von Iridoiden (cyclopentanoiden Monoterpenen) wird dabei als ursprünglichste Strategie angesehen. Die in den *de novo*-Produzenten vorhandenen Enzyme bildeten vermutlich den Ursprung, aus dem im Laufe der Evolution Enzyme mit veränderter Substratspezifität entstanden [8], [6]. Weiterentwickelte, sequestrierende Arten nehmen pflanzliche Glucoside aus der Nahrung auf und verwenden diese als Ausgangsubstanzen für die Synthese von Abwehrverbindungen [9], [11]. Der dritte Syntheseweg kombiniert die beiden vorherigen Strategien. Mitglieder der sogenannten *Interrupta*-Gruppe sequestrieren glucosidisch gebundene Alkohole aus ihren Wirtspflanzen und verestern diese mit *de novo*-produzierten Carbonsäuren [12], [13].

Um zu überprüfen, ob der evolutionäre Verlauf anhand der Substratspezifität und der kinetischen Effizienz der Enzyme nachzuvollziehen ist, wurden β -Glucosidasen aus dem *de novo*-Produzenten *Phaedon cochleariae* (*Pc* β Glc) und dem Sequestrierer *Chrysomela populi* (*Cp* β Glc) rekombinant in High FiveTM-Insektenzellen exprimiert und aufgereinigt. Die enzymatische Charakterisierung ergab eine maximale Aktivität für *Pc* β Glc und *Cp* β Glc jeweils bei einer Temperatur von 35°C und 40°C und einem pH-Wert von pH 5,0 und pH 4,5. Anhand der kinetischen Parameter konnte festgestellt werden, dass sowohl *Pc* β Glc als auch *Cp* β Glc eine Substratpräferenz für 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid besitzen. Dies passt zu der Theorie, dass sich die β -Glucosidase *Cp* β Glc, die als natives Substrat Salicin besitzt, aus der 8-Hydroxy-geraniol- β -D-glucosid hydrolysierenden β -Glucosidase *Pc* β Glc des Iridoid-*de novo*-Synthesewegs entwickelt haben könnte. Eine kinetische Charakterisierung der β -Glucosidase aus *Chrysomela lapponica* würde die Ergebnisse vervollständigen und weiter zum Verständnis der Evolution der Synthesewege verschiedener Wehrverbindungen in Blattkäferlarven beitragen.

12 Literaturverzeichnis

1. **Dettner, K. and Peters, W.**, *Lehrbuch der Entomologie*. 2. Auflage. 2003, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. p. 499-501; 560-591.
2. **Tolzin-Banasch, K.**, Dissertation. *Wehrchemie in Blattkäfern: Aufklärung eines neuen Acylierungskomplexes in Insekten am Beispiel von Chrysomela lapponica*. 2009, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
3. **Jolivet, P., Vasconcellos-Neto, J. and Weinstein, P.**, *Cycloalexyn: A new concept in the larval defense of insects*. *Insecta mundi*, 1990. 04: p. 133-142.
4. **Laurent, P., Braekman, J.C. and Daloze, D.**, *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals II*. *Topics in Current Chemistry*. Vol. 240. 2005: Springer Verlag. p. 167-299.
5. **Pasteels, J.M., Rowell-Rahier, M., Braekman, J.C., et al.**, *Evolution of exocrine chemical defense in leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae)*. *Experientia*, 1989. 45(3): p. 295-300.
6. **Pasteels, J.M., Duffey, S. and Rowell-Rahier, M.**, *Toxins in chrysomelid beetles Possible evolutionary sequence from de novo synthesis to derivation from food-plant chemicals*. *Journal of Chemical Ecology*, 1990. 16(1): p. 211-222.
7. **Blum, M.S.**, *Chemical Defenses of Arthropods*. 1981, New York: Academic Press, Inc.
8. **Termonia, A., Hsiao, T.H., Pasteels, J.M., et al.**, *Feeding specialization and host-derived chemical defense in Chrysomelinae leaf beetles did not lead to an evolutionary dead end*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(7): p. 3909-3914.
9. **Pasteel, J.M., Rowell-Rahier, M., Braekman, J.-C., et al.**, *Chemical defences in leaf beetles and their larvae: The ecological, evolutionary and taxonomic significance*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1984. 12(4): p. 395-406.
10. **Rowell-Rahier, M. and Pasteels, J.M.**, *Economics of chemical defense in chrysomelinae*. *Journal of Chemical Ecology*, 1986. 12(5): p. 1189-1203.
11. **Pasteels, J.M., Rowell-Rahier, M., Braekman, J.C., et al.**, *Salicin from host plant as precursor of salicylaldehyde in defensive secretion of Chrysomelinae larvae*. *Physiological Entomology*, 1983. 8(3): p. 307-314.
12. **Hilker, M. and Schulz, S.**, *Composition of larval secretion of Chrysomela lapponica (Coleoptera, Chrysomelidae) and its dependence on host plant*. *Journal of Chemical Ecology*, 1994. 20(5): p. 1075-1093.
13. **Schulz, S., Gross, J. and Hilker, M.**, *Origin of the defensive secretion of the leaf beetle Chrysomela lapponica*. *Tetrahedron*, 1997. 53(27): p. 9203-9212.
14. Website of the Watford Coleoptera Group. *Phaedon cochleariae (Fabricius, 1792)*. [Online] <http://www.thewcgroup.org.uk/chrysomelidae/0186G.htm> [Zitat vom 21. August 2013].
15. Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries. *Phaedon cochleariae Fabricius - Mustard Leaf Beetle*. [Online] http://www.agroatlas.ru/en/content/pests/Phaedon_cochleariae/ [Zitat vom 21. August 2013].
16. *Der Meerrettichblattkäfer (Phaedon cochleariae Fbr.)*. *Anzeiger für Schädlingkunde*, 1929. 5(7): p. 84-85.
17. **Burse, A., Schmidt, A., Frick, S., et al.**, *Iridoid biosynthesis in Chrysomelina larvae: Fat body produces early terpenoid precursors*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2007. 37(3): p. 255-265.

18. **Lorenz, M., Boland, W. and Dettner, K.,** *Biosynthese von Iridodialen in Wehrdrüsen von Blattkäferlarven (Chrysomelinae)*. *Angewandte Chemie*, 1993. 105(6): p. 904-905.
19. **Belles, X., Martin, D. and Piulachs, M.D.,** *The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects*. *Annu Rev Entomol*, 2005. 50: p. 181-199.
20. **Frick, S., Nagel, R., Schmidt, A., et al.,** *Metal ions control product specificity of isoprenyl diphosphate synthases in the insect terpenoid pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(11): p. 4194-4199.
21. **Veith, M., Lorenz, M., Boland, W., et al.,** *Biosynthesis of Iridoid Monoterpenes in Insects: Defensive Secretions from Larvae of Leaf Beetles (Coleoptera: Chrysomelidae)*. *Tetrahedron*, 1994. 50(23): p. 6859-6874.
22. **Burse, A., Frick, S., Discher, S., et al.,** *Always being well prepared for defense: the production of deterrents by juvenile Chrysomelina beetles (Chrysomelidae)*. *Phytochemistry*, 2009. 70(15-16): p. 1899-1909.
23. **Kunert, M., Rahfeld, P., Shaker, K.H., et al.,** *Beetles do it differently: two stereodivergent cyclisation modes in iridoid-producing leaf-beetle larvae*. *Chembiochem*, 2013. 14(3): p. 353-360.
24. **Urban, J.,** *Occurrence, bionomics and harmfulness of Chrysomela populi L (Coleoptera, Chrysomelidae)*. *Journal of Forest Science*, 2006. 52: p. 255-284.
25. Haselböck, A., *Naturspaziergang. Chrysomela populi / Pappelblattkäfer / Weidenblattkäfer*. [Online] http://www.naturspaziergang.de/Kaefer/Chrysomela_populi.htm [Zitat vom 21. August 2013].
26. **Fatouros, N., Hilker, M. and Gross, J.,** *Reproductive isolation between populations from Northern and Central Europe of the leaf beetle Chrysomela lapponica L*. *CHEMOECOLOGY*, 2006. 16(4): p. 241-251.
27. **Kuhn, J.,** Dissertation. *Diversität der Wehrchemie von Blattkäferlarven, Sequestrierung und de novo Synthese als Aspekte der Evolution von Chrysomeliden*. 2005, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
28. **Kuhn, J., Pettersson, E.M., Feld, B.K., et al.,** *Selective transport systems mediate sequestration of plant glucosides in leaf beetles: a molecular basis for adaptation and evolution*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(38): p. 13808-13813.
29. **Discher, S., Burse, A., Tolzin-Banasch, K., et al.,** *A Versatile Transport Network for Sequestering and Excreting Plant Glycosides in Leaf Beetles Provides an Evolutionary Flexible Defense Strategy*. *ChemBioChem*, 2009. 10(13): p. 2223-2229.
30. ExPaSy Bioinformatics Resource Portal. *ENZYME entry: EC 3.2.1.21*. [Online] <http://enzyme.expasy.org/EC/3.2.1.21> [Zitat vom 21. August 2013].
31. **Lorenz, M.,** *Biosynthese von Iridoiden in Blattkäfern*. 1993: Universität Karlsruhe (T.H.).
32. *Growth and Maintenance of Insect Cell Lines*, Invitrogen™, Darmstadt.
33. Technical Manual. *FuGENE® Transfection Reagent*, Promega GmbH, Mannheim.
34. Data Sheet. *MA Lipofection Enhancer*, IBA GmbH, Göttingen.
35. Instructions. *52-1308-00 BB, PD-10 Desalting Columns*, GE Healthcare, München.
36. Produktinformation. *pIB/V5-His TOPO® TA Expression Kit*, Invitrogen™, Darmstadt.
37. Instructions. *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*, Thermo Fischer Scientific GmbH, Bonn.
38. Produktinformation. *4-Methylumbelliferyl-β-D-glucoside*, AnaSpec, Inc., Fremont, CA, USA.

39. Product Technical Information Sheet. *Amplite™ Glucose Quantitation Kit *Red Fluorescence**, AAT Bioquest, Inc., Sunnyvale, CA, USA.
40. Product Information. *Glucose (HK) Assay Kit*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München.
41. **Byeon, G.M., Lee, K.S., Gui, Z.Z., et al.**, A digestive beta-glucosidase from the silkworm, *Bombyx mori*: cDNA cloning, expression and enzymatic characterization. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2005. 141(4): p. 418-427.
42. **Xia, D., Wei, Y., Zhang, G., et al.**, cDNA cloning, expression, and enzymatic activity of a novel endogenous cellulase from the beetle *Batocera horsfieldi*. *Gene*, 2013. 514(1): p. 62-68.
43. **Chen, P., Fu, X., Ng, T.B., et al.**, Expression of a secretory beta-glucosidase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and its characterization. *Biotechnol Lett*, 2011. 33(12): p. 2475-2479.
44. **Ghadamyari, M., Hosseiniaveh, V. and Sharifi, M.**, Partial biochemical characterization of alpha- and beta-glucosidases of lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker (Lep.: Pyralidae). *C R Biol*, 2010. 333(3): p. 197-204.
45. **Uchima, C.A., Tokuda, G., Watanabe, H., et al.**, A novel glucose-tolerant beta-glucosidase from the salivary gland of the termite *Nasutitermes takasagoensis*. *J Gen Appl Microbiol*, 2013. 59(2): p. 141-145.
46. **Wang, Q., Qian, C., Zhang, X.Z., et al.**, Characterization of a novel thermostable beta-glucosidase from a metagenomic library of termite gut. *Enzyme Microb Technol*, 2012. 51(6-7): p. 319-324.
47. **Wu, Y., Chi, S., Yun, C., et al.**, Molecular cloning and characterization of an endogenous digestive beta-glucosidase from the midgut of the fungus-growing termite *Macrotermes barneyi*. *Insect Mol Biol*, 2012. 21(6): p. 604-614.
48. **Yapi Assoi Yapi, D., Gnakri, D., Lamine Niamke, S., et al.**, Purification and biochemical characterization of a specific beta-glucosidase from the digestive fluid of larvae of the palm weevil, *Rhynchophorus palmarum*. *J Insect Sci*, 2009. 9: p. 4.
49. **Ferreira, C. and Terra, W.R.**, Physical and kinetic properties of a plasma-membrane-bound beta-D-glucosidase (cellobiase) from midgut cells of an insect (*Rhynchosciara americana* larva). *Biochem J*, 1983. 213(1): p. 43-51.
50. **Zhang, D., Allen, A.B. and Lax, A.R.**, Functional analyses of the digestive beta-glucosidase of Formosan subterranean termites (*Coptotermes formosanus*). *J Insect Physiol*, 2012. 58(1): p. 205-210.
51. **Dion, M., Fourage, L., Hallet, J.N., et al.**, Cloning and expression of a beta-glycosidase gene from *Thermus thermophilus*. Sequence and biochemical characterization of the encoded enzyme. *Glycoconj J*, 1999. 16(1): p. 27-37.
52. **Kim, H.J., Park, A.R., Lee, J.K., et al.**, Characterization of an acid-labile, thermostable beta-glycosidase from *Thermoplasma acidophilum*. *Biotechnol Lett*, 2009. 31(9): p. 1457-1462.
53. **Parry, N.J., Beever, D.E., Owen, E., et al.**, Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable beta-glucosidase purified from *Thermoascus aurantiacus*. *Biochem J*, 2001. 353(Pt 1): p. 117-127.
54. **Fan, H.X., Miao, L.L., Liu, Y., et al.**, Gene cloning and characterization of a cold-adapted beta-glucosidase belonging to glycosyl hydrolase family 1 from a psychrotolerant bacterium *Micrococcus antarcticus*. *Enzyme Microb Technol*, 2011. 49(1): p. 94-99.
55. **Uchima, C.A., Tokuda, G., Watanabe, H., et al.**, Heterologous expression in *Pichia pastoris* and characterization of an endogenous thermostable and high-glucose-tolerant beta-glucosidase from the termite *Nasutitermes takasagoensis*. *Appl Environ Microbiol*, 2012. 78(12): p. 4288-4293.

13 Anhang

Aminosäuresequenzen der β -Glucosidasen:

Cp β Glc:

MRTVFLIVLTSYGVFGHNGTFPPNFLFGVAHSAYQVEGAWNIDGKKDSIWDHFVH
QNRSRIHNRDTGDVACDSYDLYKEDIRLAAALGVNMYRFSISWPRVLPNGDTTVIN
KRGLRYIERILNEVRRHDMVPVVTIYHWDLPQALMKRGIDWTNPKLVNYFVDFARI
VIRHLRHVGYWVTINEPHTFCRLGYGLGIFAPGIESSGRDEYKCIYTMMAHAAVY
RMYKREFPHYKGMKSLVYDMQWYLPKNASSAKDVEAVRRGLDFDAGLYVHPVFL
GGWPPEAEKRIAERSRLANLTTSRLPAFSPEEIAFINGTYDFFGVNIYTGLLENLPE
YNKSISSYEADVHLELSFDPNWTLEAGYFAFAPDAPLHVLYKETYNNPDILITEIG
SSDYGNTLYDSLRLITLQNYFDSILRAIYDHGVNMIWGLTIWLLDNFEWASGYGIHF
GIYYVDMDDPRRTRYPKMSSVYVKNLTRHNRLPDIDSIEPLYTKMVGNTTDLKRIL
DKINPSEVRRRSHRPRHHLAPASRKIRA.

Pc β Glc:

MRVVFLIILTSYGAFGRNRTFPPGFLFGVAQSAFQVEGAWNIDGKKDSIWDHFVHE
NRSRILNRDTADVACDSYHLYREDVKLAAAIGMKMYRFSISWPRVLPDGTSKTINR
KALRFYEHVHEIRRHGMVPVATLYHWDLPQALMDAGVDWTNPKVVDHFVDYARI
VIKRLHHVGYWVTVNEPHTFCREGYGVGVFAPGIRSSGRDEYKCIYMMMMAHAT
VYRMYKNEFPHEGKMSMALDIQWFQPKNASSAADIAATRRTADFDGLYAHPVF
LGGWPPEAERRIAERSRRANLTKSRLPAFSPEEIALINGTFDFFGVNMYTGYLEN
LPEFPHNVSSYEADVRSQSFSPNWTLETGYFAFTPNAPLHILRYKETYNNPEILIL
EIGSSDDGSTLYDELRLRFHNYFNSILDAIYDYDVNVSGLNIWSILDNFEWASGYAL
HFGLYYVDMDDPHRTRYPKMSTEFVNQMTRLNRVPAIESIRPIYENSMRNATAQL
NRIIEKMNNRSAERKRLNRPRHHLAPRSRNV.

CβGlc:

MRTVFLIVLTSYGVFGHNGTFPPNFLFGVAHSAYQVEGAWNIXGKKDSIWDHFVH
ESPSRILNNDTGDIACDSYHLYKDDIRLAAAVGANMYRFSISWSRVLPNGDTTIINR
RGLRYYERILQEVRRRDMIPVVTIYHWDLPQSLMDRGIDWTNPKLVDYFVDYARIVI
RQFPHVAYWVTINEPHSFCRQGYGLGAFAPGIRSSGKDEYKCIYTALKAHAAYR
MYKREFPHYKGMMSIVYDIQWYKPKNASSAEDIAAARRGLDFDAGLYAHPVFLGG
WPPEAEKRIAERSRLANLTT SRLPAFSPEEIAFINGTHDFFGVNIYTGVLINLPEYN
KSISSYEADVHSDMSFDPNWTLEAGYFAFAPDTPLHVLKYVKETYNNPDIMITEIGA
SDDGSTLYDHLRVKLFQNYFDSILRAIYDHGVNMIGLTIWSXIDNFEWASGYGIHFGI
YYVDMXDPRRTRYPKMSTVYVXQLTSXNRLPAIDSI EPMYRKIVGNVTSNLNRILDK
LNSPXQVKRRXQRPHHHLAAQSRRIGT.

14 Danksagung

Ich möchte Prof. Dr. Wilhelm Boland danken, dass er es mir ermöglicht hat am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie in seiner Abteilung „Bioorganische Chemie“ meine Bachelorarbeit durchzuführen. Außerdem danke ich ihm für die Hilfe bei organisatorischen Angelegenheiten.

Bei Dr. Antje Burse möchte ich mich ausdrücklich für die nette Unterstützung und Hilfestellung in allen Bereichen meiner Bachelorarbeit bedanken sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei Dr. Roy Kirsch möchte ich mich dafür bedanken, dass er stets offen für Diskussion und Fragen war.

Sindy Frick danke ich für ihre Anleitung und Hilfe bei der Auswertung der Enzymkinetik.

Dr. Franziska Beran möchte ich für ihre Hilfe bei den enzymkinetischen Messungen danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Peter Rahfeld sowohl für die Bereitstellung dieses interessanten Themas im Rahmen seiner Doktorarbeit als auch für die hervorragende Betreuung bedanken, bei der er mich zu jeder Zeit mit Rat und Tat unterstützt hat. Zudem danke ich ihm für seine Geduld sowie für das Verständnis und Vertrauen, das er mir entgegengebracht hat, und auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts für chemische Ökologie sowohl für die angenehme Arbeitsatmosphäre als auch für die Hilfsbereitschaft bedanken, die sie mir gegenüber bei auftretenden Fragen oder Problemen gezeigt haben.

15 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, wurden kenntlich gemacht. Diese Arbeit war in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Studien- oder Prüfungsleistung.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift

