

**Friedrich-Schiller-Universität Jena**  
Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena  
Abteilung Entomologie



---

seit 1558

**Isolierung und Charakterisierung einer putativen Mannanase  
aus dem Ampferblattkäfer *Gastrophysa viridula***

Bachelorarbeit  
zur Erlangung des Grades eines  
Bachelor of Science (B.Sc.) Biochemie/Molekularbiologie

vorgelegt von  
**Tobias Roth**  
geboren am 24.01.1991 in Schmalkalden

Jena, im September 2013

Gutachter

Prof. Dr. Oliver Holger Krämer

Dr. Yannick Pauchet

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	5
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	7
<b>1 Einleitung</b> .....	8
<b>2 Material</b> .....	12
2.1 Geräte .....	12
2.2 Verbrauchsmaterialien .....	12
2.3 Chemikalien .....	13
2.4 Biochemische Utensilien.....	14
<b>3 Methoden</b> .....	15
3.1 Proteingewinnung aus dem Mitteldarm von <i>Gastrophysa viridula</i> .....	15
3.2 Zweidimensionale Proteinauftrennung .....	15
3.2.1 Isoelektrische Fokussierung .....	15
3.2.2 Nicht-denaturierende SDS-PAGE.....	16
3.2.3 Analyse mannolytisch aktiver Proteine.....	16
3.3 DNA-Klonierung.....	17
3.3.1 Ausgangsmaterial .....	17
3.3.2 Polymerasekettenreaktion .....	17
3.3.3 Aufreinigung der PCR-Amplifikate.....	19
3.3.4 TOPO <sup>®</sup> TA-Klonierung .....	19
3.3.5 Transformation chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen .....	20
3.3.6 Kolonie-PCR .....	20
3.3.7 Inokulation der korrekten Transformanten und DNA-Isolation .....	21
3.3.8 DNA-Sequenzierung .....	22
3.4 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	22
3.4.1 Passagierung.....	22
3.4.2 Transfektion .....	23
3.5 Proteinnachweis .....	23
3.5.1 Proteinpräzipitation .....	23
3.5.2 Denaturierende SDS-PAGE .....	24
3.5.3 Western-Blot .....	24
3.5.4 Coomassie-Proteinfärbung.....	25
3.6 Enzymcharakterisierung.....	25

3.6.1	<i>in-gel</i> -Zymogram .....	25
3.6.2	Untersuchung des enzymatischen pH-Optimums .....	26
3.6.3	Agar-Diffusionstest .....	27
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>28</b>
4.1	Voruntersuchungen zur Enzymaktivität im Mitteldarm .....	28
4.2	Isolation eines mannolytischen Enzyms durch 2D-Auftrennung .....	29
4.3	Klonierung der GVI_GH5-1-cDNA .....	31
4.3.1	PCR-Amplifizierung der GVI_GH5-1-cDNA .....	31
4.3.2	TOPO <sup>®</sup> TA-Klonierung des PCR-Amplifikats in den pIB/V5- His-Vektor .....	32
4.3.3	Sequenzierung des GVI_GH5-1-pIB/V5-His-Plasmids.....	33
4.4	Expression, Immundetektion und Aktivitätsbestimmung der rekombinanten Proteine .....	34
4.4.1	Proteinexpression .....	34
4.4.2	Proteindetektion durch Western-Blot.....	35
4.4.3	Test auf enzymatische Aktivität.....	36
4.5	Charakterisierung enzymatischer Eigenschaften .....	38
4.5.1	Substratspezifität .....	38
4.5.2	pH-Optimum .....	39
<b>5</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b> .....	<b>41</b>
	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis</b> .....	<b>46</b>
	<b>Anhang</b> .....	<b>49</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>55</b>
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b> .....	<b>56</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin
AA	Acrylamid
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cds	<i>coding DNA sequence</i>
°C	Grad Celsius
Da	Dalton (atomare Masseneinheit)
EC	<i>Enzyme commission number</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
fw	<i>forward</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
G	Guanin
g	Schwerebeschleunigung (relative centrifugal force / rcf)
GH	<i>glycoside hydrolase</i>
GVI	<i>Gastrophysa viridula</i>
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HF	<i>High Fidelity</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
M	mol pro Liter
min	Minute(n)
mp	millipore
MPI-CE	Max-Planck-Institut für chemische Ökologie
N	beliebiges Nukleotid
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>

---

ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pI	Isolektrischer Punkt
PCDWE	<i>Plant cell wall degrading enzyme</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RACE-PCR	<i>rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction</i>
rev	<i>reverse</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	Thymin
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i>
TG(S)	Tris-Glycin(-SDS)
TIM	Triosephosphat-Isomerase
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Aufbau und Hydrolyse von <i>O</i> -Acetyl-galactoglucomannan...	10
Abb. 2: <i>Gastrophysa viridula</i> während des Begattungsaktes.....	11
Abb. 3: Voruntersuchung enzymatischer Aktivität im Mitteldarm von <i>Gastrophysa viridula</i> und <i>Phaedon cochleariae</i> .....	29
Abb. 4: Zymogram nach 2D-Auftrennung des Mitteldarmextrakts von <i>G. viridula</i> ...	30
Abb. 5: Kolonie-PCR zum Test auf korrekte Orientierung des GVI_GH5-1–Inserts.	32
Abb. 6: SDS-PAGE zur Verifizierung der Proteinexpression durch SF9-Zellen.....	34
Abb. 7: Detektion der rekombinanten Proteine mittels Western-Blot.....	36
Abb. 8: Zymogram zur Aktivitätsbestimmung der GVI_GH5-1–V5-His <sub>6</sub> –Proteine..	37
Abb. 9: Überprüfung der Substratspezifität durch Agar-Diffusionstests.....	38
Abb. 10: Abhängigkeit der Enzymaktivität von ausgewählten pH-Werten.....	39
Abb. 11: Strukturvergleich von Galactomannan mit Buchenholz-Xylan.....	43
Tab. 1: Reaktionsansatz der PCR zur Amplifikation von GVI_GH5-1.....	18
Tab. 2: Thermocycler-Programm zur PCR-Amplifikation von GVI_GH5-1.....	18
Tab. 3: Ansatz zur Ligation von GVI_GH5-1 in den pIB/V5-His–Vektor.....	20
Tab. 4: Reaktionsansatz der Kolonie-PCR.....	21
Tab. 5: Thermocycler-Programm für die Kolonie-PCR.....	21
Tab. 6: Vergleich der Proteineigenschaften von GVI_GH5-1 mit dem mannolytischen Enzym aus dem Mitteldarm von <i>Gastrophysa viridula</i> .....	31

## 1 Einleitung

Mit über 400000 bereits beschriebenen Arten von Käfern (Coleoptera) machen sie nicht nur die größte Insektenordnung aus, sondern stellen zugleich etwa ein Viertel aller auf der Erde vorkommenden Lebewesen überhaupt dar [1, 2]. Ihre phylogenetischen Wurzeln reichen bis vor über 250 Millionen Jahre [3], in denen eine enorme evolutionäre Radiation zur heutigen Artenvielfalt der Käfer führte.

Zum Überleben entwickelten viele dieser Insekten ihre eigenen Ernährungsstrategien, die in ihrer Gesamtheit zu komplexen Interaktionen innerhalb der Biozöosen führen. Über ein Drittel aller Käfer leben phytophag, da sie ausschließlich Produkte auf pflanzlicher Basis konsumieren. Während sich Spezialisten auf lediglich eine oder wenige eng verwandte Pflanzenarten beschränken (mono- bzw. oligophag), können Generalisten auf Wirtspflanzen unterschiedlicher Familien leben (polyphag). Jede Gattung ist dabei auf eine bestimmte Nahrungsquelle angewiesen: neben dem Fraß an Samen, Wurzeln, Blüten, Stängeln oder Blättern sind einige Arten speziell als Pflanzensaftsauger adaptiert [4]. Eine Schlüsselposition nehmen karnivore Coleopteren ein, die sich räuberisch von anderen Insekten ernähren und auf diese Weise deren Populationsdichte regulieren können [2].

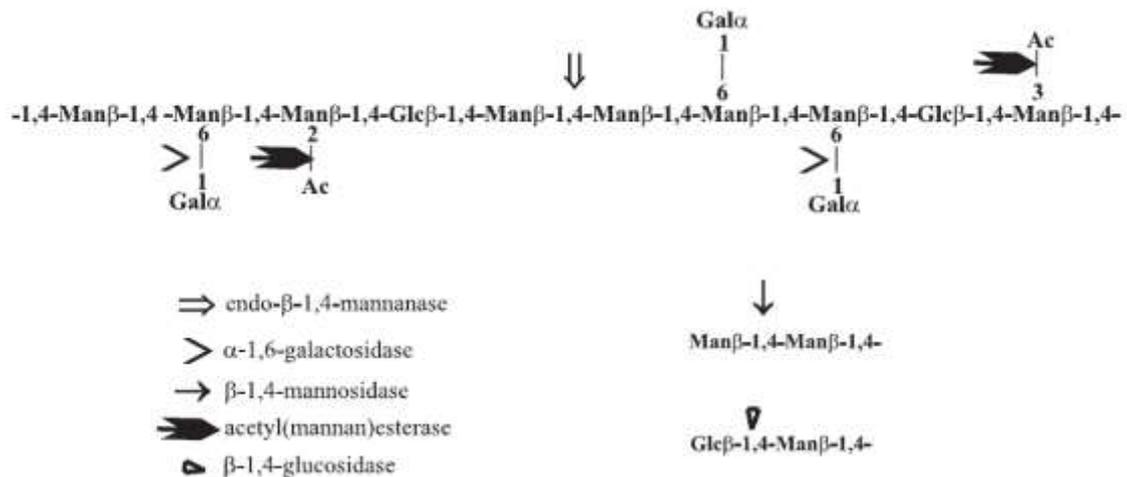
Blattkäfer (Chrysomelidae), welche die drittgrößte Familie der Coleoptera darstellen [2], gewinnen seit vielen Jahrzehnten eine immer größer werdende Relevanz in interdisziplinären Forschungsbereichen [5, 6, 7, 8]. Obwohl bereits ausgewählte Spezies erfolgreich zur biologischen Unkrautbekämpfung auf Weideflächen genutzt wurden [9], erlangen die meisten Phytophagen eher traurige Berühmtheit als Schädlinge heimischer Kulturpflanzen. Durch ihren Fraß auf Blättern reduzieren sie deren Fläche, sodass die Fotosyntheserate der geschädigten Wirtspflanzen enorm vermindert wird. Dies führt letztlich zu teils schwerwiegenden Stoffwechsel- und Wachstumsdefiziten. Die Folgen sind Ertragsminderung bis hin zum Kahlfraß und damit der vollständigen Vernichtung befallener Pflanzen [4].

Um dieser Problematik entgegenwirken zu können, ist ein prinzipielles Verständnis der physiologischen und biochemischen Prozesse sowie der daran beteiligten Moleküle beider Interaktionspartner essentiell. Um sich zu ernähren, benötigen Blattkäfer einige Enzyme, mit der sie die Polysaccharid-reiche Zellwand hydrolysieren können, die allen Pflanzenzellen mechanische Stabilität sowie Schutz gegenüber nichtspezialisierten Feinden verleiht [10]. Deren Grundgerüst wird durch Mikrofibrillen aus Cellulose gebildet, die nicht-kovalent über Hemicellulosen miteinander verbunden sind. Obwohl

beide Bestandteile strukturell homolog zueinander sind, kommen Hemicellulosen in einer Vielzahl chemischer Formen vor. Ihr Rückgrat kann Hexosen (vor allem Glukose, Mannose und Galaktose) und/oder Pentosen (hauptsächlich Xylose und Arabinose) enthalten, die über  $\beta(1,4)$ -glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Hemicellulosen sind neben Pektinen, welche die elastische Grundsubstanz der Zellwand bilden, zudem oft mit verschiedenartigen Seitenketten substituiert. Insgesamt gibt es daher nicht nur homogene Glykane (Xylane, Mannane, usw.), sondern auch eine Diversität heterogener Formen, wie etwa Xyloglucane, Galactomannane und viele andere [11].

Basierend auf dieser strukturellen Komplexität kodieren in Bakterien sowie phytophag lebenden Eukaryoten, wie etwa Pilzen und Arthropoden, oft mehrere Gene für Pflanzenzellwand-degradierende Enzyme (PCWDEs) [12]. Definitionsgemäß können diese in Polysaccharid-Lyasen, Kohlenhydrat-Esterasen und Glykosid-Hydrolasen (GH) unterteilt werden [13]. Letztere Enzymgruppe besteht aus 14 verschiedenen GH-Klanen, die entsprechend der Konservierung eines jeweiligen Hauptfaltungsmotivs ihrer Vertreter klassifiziert wurden. Allein Klan GH-A umfasst gegenwärtig 19 Familien, die sich in insgesamt 130 Subfamilien untergliedern [14]. Durch phylogenetische Analysen wurden jeder von ihnen Enzyme zugeordnet, die anhand ihrer Aminosäuresequenz auf eine konvergente Evolution rückschließen lassen und zudem die gleiche Substratspezifität besitzen [13]. Als Sekundärstruktur kommt bei allen Mitgliedern dieses Klans das TIM-*barrel* vor, welches sich aus jeweils acht alternierenden  $\alpha$ -Helices und parallelen  $\beta$ -Faltblättern zusammensetzt. Ebenso konserviert ist der enzymatische Mechanismus, der bei allen Glykosid-Hydrolasen eine Säure-Base-Katalyse darstellt [15]. Als katalytische Reste fungieren die Carboxylat-Seitengruppen zweier saurer Aminosäuren, von denen eine protoniert und die andere deprotoniert vorliegt. Die enzymatische Reaktion kann als  $S_N1$ - oder  $S_N2$ -Mechanismus ablaufen, wobei sich die  $\alpha/\beta$ -Konfiguration des anomeren Kohlenstoffatoms ändern kann [16, 17].

Endo- $\beta$ -1,4-D-Mannanasen (EC 3.2.1.78), welche den Familien GH5 und GH26 des Klans GH-A zugeordnet sind [14], hydrolysieren  $\beta(1,4)$ -glykosidische Bindungen an unwillkürlichen Stellen innerhalb von Mannanen. Eine vollständige Degradation wird erst möglich durch die synergistische Unterstützung von Exo- $\beta$ -Mannosidasen sowie Enzymen, die für den Abbau von Seitenketten zuständig sind (Abb. 1) [15, 18]. Während  $\beta$ -Mannanasen der GH26-Familie ausschließlich von Bakterien und einigen



**Abb. 1: Schematischer Aufbau von O-Acetyl-galactoglucomannan sowie die an dessen Hydrolyse beteiligten Enzyme.** Die Hauptkette besteht aus  $\beta(1,4)$ -verknüpften Mannose (Man)- und Glukose (Glc)-Molekülen. An einigen Mannosen befinden sich am C2-Atom O-Acetylreste (Ac) bzw.  $\alpha(1,6)$ -verzweigte Galactose (Gal)-Monomere.

Pilzen stammen [15], wurden jene der GH5-Familie auch in Eukaryoten (Pflanzen, Nematoden, Arthropoden und Mollusken) gefunden [13]. Letztere repräsentiert zudem eine große Vielfalt von Enzymaktivitäten, welche für die Hydrolyse von Cellulose und verschiedener Hemicellulosen von Bedeutung sind [14]. Trotz der Abundanz von Mannan-degradierenden Mikroorganismen, sind bisher nur wenige homologe Beispiele unter den Coleopteren bekannt, wie etwa die Blattkäfer *Callosobruchus maculatus* und *Hypothenemus hampei*. [12, 19]. Interessant hierbei ist, dass letzterer offensichtlich erst durch horizontalen Gentransfer von einem *Bacillus*-Stamm die Fähigkeit zur Hydrolyse von Mannanen erlangt hat [20].

Homo- und heterogene Formen dieses Polysaccharids sind mit unterschiedlicher Häufigkeit in der Flora verteilt, wo sie hauptsächlich als Strukturkomponente und Energiespeicher dienen. Während für Laubholz Glucomannane charakteristisch sind, findet man Galactomannane häufig in Samen von Leguminosen. In Nadelholz dagegen stellt O-Acetyl-galactoglucomannan (Abb. 1) die überwiegend vorkommende Hemicellulose dar. Einige Grün- und Rotalgen, Steinnusspalmen sowie die grüne Kaffeebohne sind bedeutsame Quellen für unsubstituierte Mannane [15, 18].

Meistens beginnt die Gensequenz von  $\beta$ -Mannanase mit einer Region, die für ein hydrophobes aminoterminalen Signalpeptid kodiert und dadurch deren extrazelluläre Lokalisation festlegt [12, 18]. Insekten sind so in der Lage diese Enzyme in den Epithelzellen ihres Mitteldarms zu synthetisieren und sie nahezu zeitgleich in sein Lumen zu sekretieren. Auch die Verdauungsprozesse sowie die Nährstoffresorption

finden ausschließlich im mittleren Darmabschnitt statt. Oft enthält dieser besondere Aussackungen, die als Symbiontenkrypten dienen. Vielen Phytophagen ist es dadurch möglich Mikroorganismen zu beherbergen, die für das Insekt unverdauliche Komponenten hydrolysieren und damit energetisch nutzbar machen können. Besonders für den Abbau von Cellulose spielen intestinale Symbiosen eine große Rolle [2, 21].

Im Dezember 2010 wurden als Ergebnis der 454-Pyrosequenzierung des Darm-Transkriptoms mehrerer Käfer aus den Überfamilien Chrysomeloidea und Curculionoidea insgesamt 167 für PCWDEs kodierende Gene publiziert. Zwölf dieser Transkripte stammen dabei von dem Ampferblattkäfer *Gastrophysa viridula* (Familie Chrysomelidae). Dabei handelt es sich um sieben pektolytische (GH28) und vier cellulolytische (GH45 bzw. GH48) Enzyme sowie eines (GH5), dessen Gensequenz einer Mannanase sehr ähnlich ist. Für letzteres (nachfolgend als „GVI\_GH5-1“ bezeichnet) wurde bisher allerdings noch keine hydrolytische Aktivität bestätigt [12, 22].

Die sich phytophag ernährende Spezies *G. viridula* lebt ausschließlich auf Blättern des hauptsächlich auf Wiesen zu findenden Ampfers (*Rumex spp.*, Familie Polygonaceae) (Abb. 2) [23]. Diese Nahrungsspezialisierung könnte in direktem Zusammenhang mit den in seinem Genom kodierten PCWDEs stehen, was



**Abb. 2: *Gastrophysa viridula* während der Kopulation.** Das Männchen (links) ist deutlich kleiner als das Weibchen (rechts).

den Ampferblattkäfer zu einem interessanten Forschungsobjekt macht. Die Aufklärung über Vorkommen und biochemische Eigenschaften seiner Enzyme sind daher essentiell, um deren physiologische Funktion zu verstehen.

Aus diesem Grund soll in der folgenden Arbeit untersucht werden, welche enzymatische Aktivität das vom GH5-Transkript kodierte Protein des Blattkäfers *Gastrophysa viridula* besitzt und inwiefern diese durch den pH-Wert beeinflusst wird.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Setup	Biometra
DNA Analyser 3730xl	ABI
Hypercassette™ Autoradiographie-Kassette	Amersham Biosciences
Inkubator	Heraeus
Kolbenhubpipetten	Eppendorf
Mini Trans-Blot® Cell	BioRad
nanoAcquity nano UPLC-System	Waters
Nano Drop	PeqLab Biotechnologie GmbH
pH-Meter	Mettler Toledo Seven Multi
Reaktionsschüttler	Sartorius
Schüttler	Heidolphs
SDS-PAGE-Setup	BioRad
Sicherheitswerkbank	HeraSafe (Thermo Scientific)
Synapt HDMS Tandem Massenspektrometer	Waters
Thermocycler	Eppendorf
Thermomixer	Eppendorf
Wasserbad	Dinkelberg Analytics
Zentrifuge	Eppendorf

### 2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
24-well-Platten	Greiner Bio-One
Criterion™ Gelkassetten	BioRad
Criterion™ Precast IEF-Gel, pH 3-10	BioRad
Handschuhe	AMPri GmbH
Immun-Blot PVDF-Membran (0,2 µm)	BioRad
Mini Trans-Blot Filterpapier	BioRad
Petrischalen	Greiner Bio-One
Lange Pipetten	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen	Eppendorf/ StarLab GmbH
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 1 ml, 1,5 ml)	Greiner Bio-One
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One
Vernichtungsbeutel	Nerbe plus GmbH
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One

### 2.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton (100%ig)	Carl Roth
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30%ig)	BioRad
Ampicillin	Carl Roth
APS	GE Healthcare
Agarose	Biozym
Buchenholz-Xylan	Sigma-Aldrich
1-Butanol	Carl Roth
Carboxymethyl-Cellulose	Sigma-Aldrich
Cumarsäure	Sigma-Aldrich
Essigsäure (100%ig)	Merck
Ethanol	Merck
Galactomannan	Carl Roth
Gentamicin	Gibco <sup>®</sup> by life technologies <sup>™</sup> (Invitrogen)
Glycin	Sigma-Aldrich
Kongorot	Carl Roth
Luminol	Fluka
2-Mercaptoethanol	Carl Roth
Methanol	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth
Rutheniumrot	Sigma-Aldrich
SDS	Amersham Biosciences
TEMED	Sigma-Aldrich
Trichloressigsäure (6,1 N)	Sigma-Aldrich
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween-20	Sigma-Aldrich
Wasser (Nuklease-frei)	Ambion
Wasser (RNase-frei)	Qiagen
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich
Zitronensäure	Carl Roth
Zitrusschalen-Pektin	Sigma-Aldrich

Millipore-Wasser (mpH<sub>2</sub>O) wurde über eine Reinstwasserbereitungsanlage (Milli-Q Synthesis A10) mit integriertem 0,22 µm Millipak<sup>®</sup>-Filter gewonnen und als Standardlösungsmittel verwendet.

## 2.4 Biochemische Utensilien

Utensil	Hersteller
Accu Prime™ PCR-Puffer I, 10x	Invitrogen
Accu Prime™ <i>Taq</i> DNA-Polymerase HF	Invitrogen
anti-V5-Antikörper HRP-konjugiert (aus Kaninchen)	Bethyl Laboratories
FuGene® HD Transfektionsreagenz	Promega
GelGreen™	Biotium
IEF–Anoden-Puffer, 10x	BioRad
IEF–Kathoden-Puffer, 10x	BioRad
IEF-Probenpuffer	BioRad
IEF-Standard, pI 4,45-9,6	BioRad
Laemmli Proben-Puffer, 2x	BioRad
NucleoSpin® Plasmid DNA Miniprep Kit	Macherey & Nagel
O'GeneRuler™ DNA-Größenstandard	Thermo Scientific
One Shot® TOP10 <i>E. coli</i> (chemisch kompetent)	life technologies™ (Invitrogen)
Oligonukleotide (PCR-Primer)	Eurofins MWG Operon®
Orange DNA-Ladepuffer, 6x	Thermo Scientific
Page Blue™ Protein-Färbelösung	Thermo Scientific
PageRuler™ Plus <i>Prestained</i> Protein-Größenstandard	Thermo Scientific
pIB/V5-His TOPO® TA Expression Kit	Invitrogen
Sf-900™ II SFM (1x)-Medium	Gibco® by life technologies™ (Invitrogen)
SOC-Medium	Invitrogen
<i>Taq</i> PCR Master Mix Kit	Qiagen
TG-Puffer, 1x	BioRad
TGS-Puffer, 1x	BioRad
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research Europe
Zymogram Renaturierungs-Puffer, 10x	BioRad

### 3 Methoden

**Eine Aufstellung der Zusammensetzung aller verwendeten Puffer, Medien, Lösungen und Standards (soweit bekannt) ist in Anhang 6 zu finden.**

#### 3.1 Proteingewinnung aus dem Mitteldarm von *Gastrophysa viridula*

Die folgende Beschreibung stellt das Standardvorgehen von Entomologen des MPI-CE/Jena zum Isolieren und Aufreinigen von Mitteldarmproteinen aus Blattkäfern dar. Aufgrund sehr ungünstiger saisonaler Bedingungen war es im Arbeitszeitraum nicht möglich dies selbst durchzuführen.

Auf der Unterseite von Ampferblättern abgelegte Eier von *Gastrophysa viridula* werden gesammelt und unter Laborbedingungen der Schlupf abgewartet. Im letzten larvalen Stadium werden 10 Organismen hintereinander seziiert und ihr Darmtrakt in 1x PBS, versetzt mit einem Mix aus Protease-Inhibitoren, überführt. Anschließend wird der Mitteldarm an einer Seite eröffnet, sodass sich dessen Inhalt im umgebenden PBS-Puffer verteilt. Der Darm wird dann verworfen und die Puffer-Darminhalt-Suspension zentrifugiert (5000 g, 5 min, 4 °C). Der entnommene Überstand stellt das Mitteldarmextrakt dar und dient der folgenden Untersuchung.

#### 3.2 Zweidimensionale Proteinauftrennung

Die im Eluat des Mitteldarms von *G. viridula* angereicherten Proteine wurden einer zweidimensionalen Elektrophorese unterzogen, um sie mit hoher Auflösung zu separieren. Dabei erfolgte die Auftrennung zunächst nach Nettoladung durch eine isoelektrische Fokussierung und anschließend nach dem Molekulargewicht durch eine nicht-denaturierende SDS-PAGE. Zur Durchführung wurde hierbei auf ein Mitteldarmextrakt aus der letzten Saison (August 2012) zurückgegriffen.

##### 3.2.1 Isoelektrische Fokussierung

Die nicht-denaturierende Auftrennung der Proteine nach ihrem pI erfolgte mithilfe eines Criterion<sup>™</sup> Precast IEF-Gels, das einen immobilisierten, vertikal von pH 10 bis pH 3 deszendierenden pH-Gradienten besitzt. Nach dem Einsetzen in die Elektrophoresekammer (Criterion<sup>™</sup>) wurde entsprechend der Herstellervorgabe IEF-Kathoden- bzw. Anodenpuffer bis zur jeweiligen Markierung eingefüllt. Ein Aliquot des

Mitteldarmextrakts wurde mit  $\frac{1}{2}$  Volumen IEF-Probenpuffer vermischt und davon anschließend zweimal jeweils 30  $\mu$ l sowie 5  $\mu$ l IEF-Standard aufgetragen. Während der elektrophoretischen Auftrennung variierte die angelegte Spannung unter Beachtung des Herstellerprotokolls: für die ersten 60 min 100 V, dann für weitere 60 min 250 V und in den letzten 30 min 500 V. Nach Beendigung wurde das IEF-Gel in 1x TGS-Puffer für 30 min auf dem Schüttler äquilibriert und anschließend die beiden vertikalen Gelkompartimente herausgeschnitten, in denen sich die separierten Mitteldarm-Proteine befinden.

### 3.2.2 Nicht-denaturierende SDS-PAGE

Zur Separation von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht und unter gleichzeitiger Beibehaltung ihrer physiologischen Funktion wurde eine nicht-denaturierende, diskontinuierliche SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli durchgeführt. Als Trennmedium fungierte hierbei ein Polyacrylamid-Gel (Criterion<sup>TM</sup>-System), das sich aus einem 12%igen Trenngel und einem 5%igen Sammelgel zusammensetzt. Die entsprechenden Herstellungsvorschriften sind in Anhang 1 zu finden. Für beide Gele wurden Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 37,5 zu 1 eingesetzt und unter Verwendung von APS und TEMED polymerisiert. Das im Sammel- und Trenngel sowie im Laufpuffer enthaltene anionische Detergens SDS interagiert durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäureresten, sodass Proteine negativ aufgeladen werden und damit eine Bewegung im elektrischen Feld möglich ist. Zum späteren Nachweis von Proteinen mit Mannanase-Aktivität wurde dem Trenngel außerdem 0,1% Galactomannan zugesetzt.

Einer der aus dem IEF-Gel abgetrennten vertikalen Streifen wurde in Horizontallage auf die obere Kante des Sammelgels positioniert. Nach dem Einsetzen in die Elektrophoresekammer wurde bis zur Herstellermarkierung 1x TGS-Puffer aufgefüllt und anschließend in das Referenz-*well* 5  $\mu$ l PageRuler<sup>TM</sup> aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte 2 h bei einer konstanten Spannung von 150 V.

### 3.2.3 Analyse mannolytisch aktiver Proteine

Nach Beendigung der Elektrophorese diente das Polyacrylamid-Gel als Grundlage für ein *in-gel*-Zymogram (Abschnitt 3.6.1, unterer Absatz). Enzymatisch aktive Bereiche

wurden anschließend aus dem Gel herausgeschnitten und an die hauseigene *Proteomics*-Abteilung zur massenspektrometrischen Untersuchung weitergeleitet.

Diese führte u.a. einen tryptischen *in-gel*-Verdau durch und extrahierte die daraus resultierenden Peptide aus dem Gelstückchen. Die zu analysierenden Proben wurden chromatografisch mittels eines nanoAcquity nano UPLC-Systems gereinigt, konzentriert und aufgetrennt. Nach Elution erfolgte die Analyse der Peptide durch ein Synapt HDMS Tandem Massenspektrometer, wobei zur Ionisation die Elektrospray-Methode genutzt wurde. Die Auswertung der erhaltenen und prozessierten Massenspektren erfolgte unter Verwendung der Software MASCOT v2.3 in Verbindung mit dem ProteinLynx Global Server, um Hintergrund-Proteine auszuschließen. Alle Details zum Experimentalverfahren, den Analyseparametern sowie der Auswertung der erhaltenen Daten entsprechen dem von Kirsch *et al.* beschriebenen Vorgehen [19].

### **3.3 DNA-Klonierung**

#### **3.3.1 Ausgangsmaterial**

Als Grundlage zur Amplifikation des ORF der putativen Mannanase GVI\_GH5-1 aus *Gastrophysa viridula* diente dessen bereits seit 2010 bekanntes Mitteldarm-Transkriptom: durch Isolation der gesamten Mitteldarm-RNA aus Larven wurde mittels reverser Transkription eine normalisierte cDNA-Bibliothek erstellt und durch 454-Pyrosequenzierung analysiert. Ausgehend von cDNA-Sequenzen, die nur einen partiellen ORF kodieren, wurden im Anschluss Primer-Paare konstruiert. Durch 5'- und 3' RACE-PCRs konnten damit die für den kompletten ORF kodierenden cDNA's generiert und gemeinsam gepoolt werden [12, 19]. Der cDNA-Mix diente als Ausgangspunkt für die nachfolgende Klonierung und enthält u.a. die vollständige Sequenz des GVI\_GH5-1-Gens (Anhang 4a).

#### **3.3.2 Polymerasekettenreaktion**

Durch PCR war es möglich eine geringe Menge des GVI\_GH5-1-Gens aus dem gepoolten cDNA-Mix exponentiell zu amplifizieren. Das zugrundeliegende Pipettierschema ist in Tab. 1 gezeigt. Zur Amplifikation im Thermocycler wurde das in Tab. 2 dargestellte Programm verwendet.

Hierbei kam zur Beachtung, dass die optimale Hybridisierungs-Temperatur der Primer etwa 5 °C weniger als ihre Schmelztemperatur  $T_M$  betragen sollte. Durch Eurofins MWG Operon<sup>®</sup> wurden folgende Werte angegeben:  $T_{M, fw\text{-Primer}} = T_{M, rev\text{-Primer}} = 64,8 \text{ °C}$ , weshalb eine *Annealing*-Temperatur von 60 °C gewählt wurde.

Außerdem ist berücksichtigt wurden, dass die eingesetzte *Taq*-Polymerase (*High Fidelity*) ein Temperatur-Optimum von lediglich 68 °C besitzt- bei konventionellen DNA-Polymerasen aus *Thermus aquaticus* sind dies hingegen 72 °C. Die terminale Transferase-Aktivität ist jedoch analog, sodass alle durch PCR produzierten DNA-Moleküle beidseitige 3'-A-Überhänge besitzen. Aufgrund der zu erwartenden Amplifikatlänge von über 1 kb wurde fernerhin die Elongationszeit von 60 s auf 90 s erhöht. Ein PCR-Zyklus (Schritt 2 bis 4) dauerte somit 135 s und wurde 30-mal wiederholt.

**Tab. 1: PCR-Ansätze der Amplifikation von GVI\_GH5-1 (+) und einer cDNA-freien Kontrolle (-)**

	PCR/ +	PCR/ -
	Volumen	Volumen
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	40,3 µl	42,8 µl
10x Accu Prime PCR Buffer I	5 µl	5 µl
GVI_GH5-1_ <i>fw</i> -Primer (10 µM)	1 µl	1 µl
GVI_GH5-1_ <i>rev</i> -Primer (10 µM)	1 µl	1 µl
Accu Prime <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	0,2 µl
cDNA-Mix	2,5 µl	-
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl</b>

**Tab. 2: Thermocycler-Programm zur Amplifikation von DNA mittels PCR**

Phase	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	1 min
2. Denaturierung	95 °C	15 s
3. Primer-Hybridisierung	60 °C	30 s
4. Elongation	68 °C	90 s
5. Terminale Elongation	68 °C	4 min
	4°C	∞

### 3.3.3 Aufreinigung der PCR-Amplifikate

Beide Reaktionsansätze wurden nach Beendigung der PCR mit 6x Orange DNA Ladepuffer versetzt und neben 5 µl O'GeneRuler™ auf ein 1,2%iges (w/v) Agarose-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 120 V.

Im Gel aufgetrennte DNA konnte anschließend auf einem Blaulicht-Tisch visualisiert werden, da der flüssigen Agarose der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff GelGreen™ (0,00005% v/v) anfangs zugesetzt wurde. Relevante Banden auf der erwarteten Höhe (ca. 1,1 kb) wurden mittels Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und gewogen. Um daraus die amplifizierte DNA zu isolieren, kam ein Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit zum Einsatz. Aus dem resultierenden Eluat wurde mittels Nano Drop eine DNA-Konzentration von  $85 \frac{ng}{\mu l}$  festgestellt.

### 3.3.4 TOPO® TA-Klonierung

Um die erhaltene DNA später exprimieren zu können, wurde das amplifizierte GVI\_GH5-1-Gen (Anhang 4a) in einen pIB/V5-His-Vektor (Anhang 5a) kloniert. Dabei handelt es sich um ein linearisiertes Konstrukt mit beidseitigen 3'-T-Überhängen, die kovalent jeweils mit einem Molekül Topoisomerase I assoziiert sind. Die darin gespeicherte Bindungsenergie ermöglicht den nukleophilen Angriff der 5'-OH-Gruppe eines PCR-amplifizierten DNA-Moleküls, was dessen Ligation und damit die Zirkularisierung des Vektors bewirkt. Stromabwärts der Insertionsstelle befinden sich ein V5-Epitop sowie ein Hexahistidin-tag, dem ein artifizielles Stopp-Codon folgt. Ein *origin of replication* (pUC ori) ermöglicht die Replikation und eine hohe Kopienzahl des Vektors in *E. coli*, wohingegen zwei Promotoren aus *Baculovirus* (P<sub>OpIe-1</sub> und P<sub>OpIe-2</sub>) sowie eine TATA-Box die Transkription des Vektors in einigen speziellen Insektzelllinien erlaubt. Als Selektionsmarker sind sowohl eine Ampicillin-, als auch eine Blasticidin-Resistenz-kassette vorhanden.

Zur Ligation der GVI\_GH5-1-DNA in den pIB/V5-His-Vektor wurde der in Tab. 3 dargestellte Reaktionsansatz pipettiert und anschließend 25 min bei RT inkubiert.

**Tab. 3: Ansatz zur Ligation des GVI\_GH5-1-Amplifikats mit dem pIB/V5-His-Vektor**

	<b>Ligation</b>
	Volumen
GVI_GH5-1-DNA (20 ng)	0,25 µl
Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl <sub>2</sub> )	0,5 µl
pIB/V5-His-Vektor	0,2 µl
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	2,05 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>3 µl</b>

### 3.3.5 Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Zur Vermehrung des Vektor-GVI\_GH5-1-Konstrukts erfolgte dessen Transformation in chemisch kompetente *One Shot*<sup>®</sup> *TOP10 E. coli*-Zellen. In ein auf Eis aufgetautes Aliquot wurde der komplette Ligationsansatz (3 µl) zugegeben und anschließend für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock im Thermomixer (0 rpm, 30 s, 42 °C) wurden die Zellen sofort wieder auf Eis gestellt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 200 µl SOC-Medium. Durch horizontale Inkubation im Reaktionsschüttler (300 rpm, 1 h, 37 °C) konnten erfolgreich transformierte Zellen ihren extrachromosomalen Vektor exprimieren und auf diese Weise eine Resistenz gegenüber Ampicillin und Blasticidin akquirieren. Die gesamte Zellsuspension wurde anschließend auf eine Ampicillin-haltige LB-Platte verteilt, die für 16 h bei 37 °C inkubiert wurde.

### 3.3.6 Kolonie-PCR

Durch Kolonie-PCR war es möglich, rekombinante Klone zu identifizieren, die im transformierten Vektor das PCR-Insert in richtiger Orientierung besitzen. Um das zu überprüfen, dienten über Nacht auf der LB-Platte angewachsene Einzelkolonien direkt als *template* für die Kolonie-PCR.

Mit einer sterilen Pipettenspitze erfolgte das Picken eines einzelnen, gut abgrenzbaren *E.coli*-Klons von der LB<sup>Amp</sup>-Platte. Die an der Spitze anhaftenden Zellen wurde in zwei Reaktionsgefäße durch Eintauchen verteilt: das erste enthielt 5 µl LB<sup>Amp</sup>-Medium (zur späteren Vermehrung korrekter Transformanten, Abschnitt 3.3.7), das zweite 10 µl des in Tab. 4 aufgeführten PCR-Mixes. Dieser Vorgang wurde für 16 verschiedene Einzelkolonien ausgeführt. Anschließend erfolgte die PCR im Thermocycler gemäß des in Tab. 5 gezeigten Programms.

**Tab. 4: Reaktionsansatz einer Kolonie-PCR zur Verifizierung der korrekten Insertion des GVI\_GH5-1-Amplifikats in den pIB/V5-His-Vektor**

	Kolonie-PCR
	Volumen
RNase-freies H <sub>2</sub> O	4,96 µl
GVI_GH5-1_fw-Primer (100 µM)	0,02 µl
OpIE2_rev-Primer (100 µM)	0,02 µl
Taq PCR-Mastermix	5 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>10 µl</b>

**Tab. 5: Thermocycler-Programm zur Durchführung einer Kolonie-PCR**

Phase	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
2. Denaturierung	95 °C	15 s
3. Primer-Hybridisierung	60 °C	30 s
4. Elongation	72 °C	120 s
5. Terminale Elongation	72 °C	5 min
	4 °C	∞

Die initiale Denaturierung gewährleistet die Lyse des dem Reaktionsansatz zugesetzten Zellmaterials, wodurch die Vektor-DNA frei für die *Taq*-Polymerase zugänglich ist. Da die Schmelztemperatur des genspezifischen GVI\_GH5-1\_fw-Primers ( $T_M=64,8$  °C) von der des vektorspezifischen OpIE2\_rev-Primers ( $T_M=68$  °C) abweicht, wurde als Kompromiss eine *Annealing*-Temperatur von 60 °C festgelegt. Aufgrund der enormen Vektorgröße (ca. 3,5 kb) wurde außerdem eine verlängerte Elongationsdauer von 120 s gewählt. Jeder der 35 PCR-Zyklen (Schritt 2-4) dauerte somit 165 s.

Nach PCR-Beendigung wurden alle 16 Proben für eine Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt, die so, wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben, ausgeführt wurde. Durch Visualisierung auf dem Blaulicht-Tisch konnten Transformanten mit korrekt in den Vektor inserierter GVI\_GH5-1-Sequenz identifiziert werden.

### 3.3.7 Inokulation der korrekten Transformanten und DNA-Isolation

Von den in jeweils 5 µl LB<sup>Amp</sup>-Medium sichergestellten *E. coli*-Einzelklonen, welche laut Kolonie-PCR ein korrekt orientiertes Insert besitzen, dienten 2 µl als *back-up* zum Ausstreichen auf eine neue LB<sup>Amp</sup>-Platte. Der Rest wurde jeweils in 5 ml LB<sup>Amp</sup>-Medium inokuliert und anschließend für 16 h bei 37 °C auf dem Reaktionsschüttler

inkubiert. Auf diese Weise vermehrten sich ausschließlich die den Vektor enthaltenden *E. coli*-Zellen. Außerdem nahm infolge der bakteriellen DNA-Replikation auch die Menge des gewünschten Expressionsvektors (*high copy*-Plasmid) in den Zellen zu.

Die Präparation von Plasmid-DNA aus den *E. coli*-Zellen der Schüttelkulturen erfolgte mit dem NucleoSpin® Plasmid DNA Miniprep-Kit gemäß der beiliegenden Herstellerbeschreibung. Aus den Eluaten wurde anschließend die DNA-Konzentration mittels Nano Drop bestimmt.

### 3.3.8 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde jede der präparierten Vektor-DNA's in zwei Ansätzen (je 140 ng) verwendet. Beide enthielten jeweils einen vektorspezifischen Primer, deren Bindestelle sich entweder stromaufwärts (OpIE2\_fw) oder stromabwärts (OpIE2\_rev) des inserierten PCR-Amplifikats befindet. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte durch Kettenabbruch-Synthese nach Sanger in einem 96-Kapillaren-basierten ABI 3730xl DNA Analyser. Das verwendete Protokoll ist in Anhang 2 zu finden. Anschließend wurden die erhaltenen Sequenzen mithilfe der Software Lasergene® Seq Man Pro™ der Firma DNASTAR ausgewertet und manuell korrigiert.

## 3.4 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Es wurde ausschließlich die *SF9*-Zelllinie verwendet, bei der sich um immortalisierte Zellen aus dem Ovar des Eulenfalters *Spodoptera frugiperda* handelt. Die Kultivierung erfolgte bei 27 °C und CO<sub>2</sub>-Normalatmosphäre in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen. Dabei kam Sf-900™ II SFM (1x)-Medium zum Einsatz, das zusätzlich mit 50 µg/ml Gentamicin versetzt wurde.

### 3.4.1 Passagierung

Um ein zu dichtes Wachstum in der Kulturflasche zu verhindern und ständig eine ausreichende Nährstoffbereitstellung zu gewährleisten, wurden die Zellkulturen regelmäßig gesplittet. Dies geschah, sobald die Zellen zu einem vollständig konfluenten Monolayer gewachsen sind. Nach dem Wechsel des Kulturmediums wurde dieses intensiv auf- und abpipettiert, um den semiadhärenten Zellrasen vom Untergrund

abzuspülen. Von der resultierenden Zellsuspension wurde nun ein Aliquot entnommen und damit eine 1:4-Verdünnung einer neuen Subkultur angelegt. Der Rest wurde entweder verworfen oder in einem Reaktionsgefäß im Verhältnis 1:4 mit Kulturmedium verdünnt, um diese Zellen für eine Transfektion zu nutzen (Abschnitt 3.4.2).

### 3.4.2 Transfektion

In die entsprechende Anzahl Kavitäten einer 24-*well*-Platte erfolgte zunächst das Aussäen von 0,5 ml einer 1:4 verdünnten Suspension von *SF9*-Zellen. Diese wurden daraufhin 24 h bei 27 °C inkubiert, sodass die Zellen adhärten und zu einer optimalen Dichte (ca. 70% Konfluenz) heranwuchsen.

Am nächsten Tag wurden folgende Ansätze hergestellt: 0,6 µg der zu transfizierenden DNA wurde mit Kulturmedium auf ein Volumen von 23,2 µl aufgefüllt und anschließend 1,8 µl FuGene<sup>®</sup> Transfektionsreagenz zugesetzt. Letzteres stellt ein Lipidgemisch dar, das durch vesikulären Einschluss der DNA deren Endocytose durch *SF9*-Zellen möglich macht (Lipofektion). Vor Zugabe in die einzelnen *wells* wurden alle Ansätze 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, das Medium vom Vortag aus den Kavitäten entfernt und 475 µl frisches Kulturmedium hinzupipettiert. Ein DNA-freier Ansatz wurde als Negativkontrolle mitgeführt.

Nach Inkubation der 24-*well*-Platte für 46 h bei 27 °C erfolgte die Ernte der zellfreien Kulturüberstände, welche als 100 µl Aliquots bei -21 °C gelagert wurden.

## 3.5 Proteinnachweis

### 3.5.1 Proteinpräzipitation

Aus je einem Kulturüberstand-Aliquot jedes Ansatzes wurden die enthaltenen Proteine durch Zugabe von 0,02% (v/v) Natriumdesoxycholat sowie 10% (v/v) Trichloressigsäure ausgefällt. Ersteres Agens interagiert über sein Steroid-Ringsystem mit unpolaren Aminosäureresten von Proteinmolekülen und wird durch TCA-Zusatz zur hydrophoben Desoxycholsäure protoniert. Durch Inkubation für 1 h auf Eis erfolgte dadurch die Kopräzipitation aller gebundenen Proteine. Diese wurden durch Zentrifugation bei 16,1 g und 4 °C sowie zweimaligem Waschen mit eiskaltem Aceton vom Kulturmedium abgetrennt. Die Resuspendierung des Proteinpellets erfolgte in 2x Laemmli-Puffer, der mit 5% (v/v) β-Mercaptoethanol versetzt wurde.

### 3.5.2 Denaturierende SDS-PAGE

Um Proteine unabhängig von der Molekülform nach ihrer Masse aufzutrennen, wurde eine denaturierende SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli durchgeführt. Dabei kamen präzipitierte Proteine der Kulturüberstände zum Einsatz, die in 2x Laemmli-Puffer resuspendiert wurden (Abschnitt 3.5.1). Das darin befindliche  $\beta$ -Mercaptoethanol bewirkte die Reduktion der inter- und innermolekularen Disulfidbrücken von Proteinen. Die Proben wurden anschließend auf dem Thermomixer gekocht (1000 rpm, 5 min, 95 °C) und sofort wieder auf Eis inkubiert. Dies führte zur Denaturierung der Sekundär- und Tertiärstruktur aller Proteine und verhinderte zugleich deren Rückfaltung. Die linearisierten Proteinketten können dadurch stöchiometrisch mit SDS interagieren, wodurch deren elektrophoretische Mobilität von ihrer Nettoladung unabhängig ist.

Zur Auftrennung wurde ein diskontinuierliches Polyacrylamid-Gel (Mini Protean™-System) genutzt, dessen Herstellungsvorschrift Anhang 1 entnommen werden kann. Anstelle von Galactomannan wurde hierbei das gleiche Volumen H<sub>2</sub>O verwendet. Nach Einfüllen des Laufpuffers wurde außer den Proteinproben noch 5  $\mu$ l PageRuler™ aufgetragen. Die Ausführung der Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 150 V für 1,5 h.

### 3.5.3 Western-Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss mittels Western-Blot nach dem *Wet-Electroblotting*-Verfahren bandengetreu auf eine PVDF-Membran übertragen. Letztere musste zunächst in Methanol aktiviert werden. Auf die Anodenseite der Blotting-Kassette wurden dann folgende zuvor für 10 min in Transfer-Puffer äquilibrierte Bestandteile aufgelegt: Schaumpad → Filterpapier → PVDF-Membran → Gel → Filterpapier → Schaumpad. Der Blotvorgang erfolgte in einer mit Transfer-Puffer gefüllten Mini Trans-Blot® Cell mit intrinsischer Eiskühlung. Durch Anlegen eines horizontal gerichteten elektrischen Felds wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V für 1 h der Proteintransfer ermöglicht.

Der Nachweis einer gewünschten Proteinbande geschah durch Immundetektion. Nach kurzem Abspülen der PVDF-Membran mit mpH<sub>2</sub>O erfolgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen durch 30 min Inkubation bei RT mit Blockierlösung. Anschließend wurde diese gegen einen anti-V5-Antikörper, der mit Blockierlösung im

Verhältnis 1 zu 20000 verdünnt wurde, ausgetauscht und 16 h bei 4 °C inkubiert. Der aus Kaninchen stammende anti-V5-Antikörper ist kovalent mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt und bindet hochaffin das V5-Epitop von Proteinen. Durch dreimal 10-minütiges Waschen mit 1x TBS, versetzt mit 0,1% Tween-20, wurden überschüssige und niederaffin gebundene Antikörper entfernt. Die so markierten Proteine auf der Membran konnten anschließend mittels Chemilumineszenz detektiert werden. Hierzu wurde eine Luminol-basierte Substratlösung zugegeben. Diese zyklische Verbindung wird in Gegenwart von HRP und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einem Produkt oxidiert, das sich in einem angeregten Zustand befindet. Durch einen Elektronenübergang, bei dem Lichtenergie (Photonen) frei wird, kehrt dieses in den Grundzustand zurück. Das emittierte Licht konnte dabei genutzt werden, um einen Röntgenfilm in einer Autoradiografie-Kassette zu schwärzen, der anschließend manuell entwickelt wurde.

#### **3.5.4 Coomassie-Proteinfärbung**

Zur Anfärbung der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden diese zunächst im Gel mittels einer Fixierlösung für 1 h auf dem Schüttler immobilisiert und dabei SDS ausgewaschen. Nach dreimal 5-minütigem Waschen mit mpH<sub>2</sub>O wurde das Gel mit Page Blue™ Protein-Färbelösung für 1 h auf dem Schüttler inkubiert. Die Entfärbung erfolgte mit mpH<sub>2</sub>O bis zum deutlichen Erscheinen der Proteinbanden.

Zur Färbung der PVDF-Membran nach der Immundetektion wurde eine Lösung bestehend aus 50% Methanol, 7% Essigsäure und 0,1% Page Blue™ Protein-Färbelösung verwendet. Die Entfärbelösung beinhaltete 50% Methanol und 7% Essigsäure.

### **3.6 Enzymcharakterisierung**

#### **3.6.1 *in-gel*-Zymogram**

Um nachzuweisen, dass Proteine einer Probe enzymatisch zur Hydrolyse eines bestimmten Substrats befähigt sind, erfolgte die Durchführung eines *in-gel*-Zymograms. Grundlage hierfür stellte eine nicht-denaturierende SDS-PAGE dar (Abschnitt 3.2.2), wobei das Trenngel mit 0,1% Galactomannan versetzt wurde. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung konnten dadurch Proteine identifiziert werden, welche Mannanase-Aktivität besitzen. Getestet wurden die Kulturüberstände aller Transfektionsansätze, einschließlich Negativkontrolle. Diese wurden vor dem Auftragen

auf das Polyacrylamid-Gel (Mini Protean™-System, Zusammensetzung: Anhang 1), mit ½ Volumen 2x Laemmli-Puffer vermischt. Durch Verzicht auf reduzierende Agenzien und Kochen der Proteinproben erfolgte keine irreversible Denaturierung der Tertiärstruktur von Proteinen. Die Elektrophorese wurde mit vorgekühltem Laufpuffer für 90 min bei 150 V und 4 °C ausgeführt.

Anschließend wurde das Gel dreimal für je 30 min bei 4 °C mit vorgekühltem Zymogram Renaturierungs-Puffer (1x) gewaschen, um SDS quantitativ zu entfernen. Dadurch konnten Proteine ihre native Molekülgestalt zurückerlangen, wodurch potentielle Enzymaktivitäten erhalten blieben. Nachdem 16 h bei 4 °C mit Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5,0) inkubiert wurde, stellte sich im gesamten Gel ein konstanter pH-Wert ein. Die enzymatische Hydrolyse des im Gel immobilisierten Substrats wurde am nächsten Tag bei 50 °C für 2 h eingeleitet. Danach erfolgte die Färbung des Gels für 45 min mit Kongorotlösung bis schließlich mit 1 M NaCl solange entfärbt wurde, dass deutliche Banden sichtbar waren.

### 3.6.2 Untersuchung des enzymatischen pH-Optimums

Um herauszufinden in welchem pH-Bereich ein Enzym seine maximale Hydrolyse-Aktivität zeigt, wurde ein *in-gel*-Zymogram durchgeführt (Abschnitt 3.6.1). Hierzu kam ein einzelnes Aliquot eines Kulturüberstands zur Verwendung, von dem bereits enzymatische Aktivität nachgewiesen wurde. Auf das Polyacrylamid-Gel (Criterion™-System, Zusammensetzung: Anhang 1) wurde neunmal alternierend PageRuler™ und Proteinprobe aufgetragen. Nach Ausführung der Elektrophorese und Renaturierung wurde das Gel in neun identische, vertikale Einheiten zerschnitten. Jede davon wurde für 16 h bei 4 °C in einem separaten Puffer mit individuellem pH-Wert äquilibriert. Ihrer Herstellung lagen dabei ein 0,1 M Citrat-Puffer sowie ein 0,2 M Natriumhydrogenphosphat-Puffer in entsprechenden Mischungsverhältnissen zugrunde. Außerdem kam ein Tris-HCl-Puffer (pH 8,5) zum Einsatz. Alle Puffer wurden mittels pH-Meter verifiziert, das folgende Werte lieferte: pH 2,8; pH 3,8; pH 4,9; pH 5,6; pH 6,0; pH 6,6; pH 6,9; pH 7,9 und pH 8,7. Nach Entfärbung war es durch Rekonstruktion des kompletten Gels möglich die Bandenstärken der bei verschiedenen pH-Werten inkubierten Einheiten untereinander zu vergleichen.

### 3.6.3 Agar-Diffusionstest

Ob ein Enzym in der Lage ist ein bestimmtes Kohlenhydrat zu verwerten, konnte durch einen Agar-Diffusionstest überprüft werden. Dabei kamen Petrischalen zur Verwendung, die mit einem Gemisch aus 2,5 ml mpH<sub>2</sub>O, 2,5 ml Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5,6), 1 ml Substratlösung (1%ig) sowie 4 ml flüssiger Agarose (1%ig) ausgegossen wurden. Nach dessen Aushärtung erfolgte das Ausstanzen kleiner Löcher ( $\varnothing \approx 2$  mm), welche anschließend mit 10  $\mu$ l zu testender Proteinprobe (Mitteldarmextrakt oder Kulturüberstand) bzw. 10  $\mu$ l Citrat-Phosphat-Puffer (Negativkontrolle) gefüllt wurden. Nach 1,5-stündiger Inkubation bei 50 °C wurden die Platten für 30 min mit Kongorot-Färbelösung (Galactomannan, Carboxymethyl-Cellulose und Buchenholz-Xylan) bzw. Rutheniumrot-Färbelösung (Zitruschalen-Pektin) gefärbt. Die Entfärbung erfolgte in ersterem Fall mit 1 M NaCl, im letzteren mit mpH<sub>2</sub>O. Anhand der Bildung von durchscheinenden Höfen im Umkreis des mit Proteinprobe beladenen Reservoirs konnte eine enzymatische Hydrolyse-Aktivität für ein bestimmtes Substrat bestätigt werden.

## 4 Ergebnisse

Im Mitteldarm des Ampferblattkäfers *G. viridula* existieren früheren Untersuchungen zufolge mindestens zwölf PCWDEs. Eines davon stammt aus der GH5-Familie und zeigt strukturelle Ähnlichkeiten mit einer Mannanase [12]. Um diese Enzymaktivität zu überprüfen, wurden zwei differentielle Vorgehensweisen verwendet:

- I. In einem **proteomischen Ansatz** wurde zunächst der Mitteldarminhalt des Ampferblattkäfers extrahiert und durch isoelektrische Fokussierung sowie SDS-PAGE zweidimensional aufgetrennt. Zur Visualisierung mannolytischer Enzymaktivität kam ein *in-gel*-Zymogram zum Einsatz, aus dem hydrolysierte Bereiche massenspektrometrisch auf Peptidsequenzen der darin vorliegenden Proteine untersucht wurden. Ein Datenbankabgleich mit dem Mitteldarm-Transkriptom von *G. viridula* sollte Aufschluss über das kodierende Gen geben.
- II. Beim **molekularbiologischen Ansatz** diente das bereits bekannte Gen „GVI\_GH5-1“ (Anhang 4a) als Grundlage zur Amplifikation der kodierenden DNA-Sequenz. Diese konnte in einen TOPO<sup>®</sup>-Vektor kloniert werden, der anschließend durch *Escherichia coli*-Zellen vervielfältigt und durch Kolonie-PCR verifiziert wurde. Isolierte Plasmid-DNA diente nach deren Sequenzierung zur Transfektion von SF9-Zellen. Die exprimierten rekombinanten Proteine wurden letztlich durch SDS-PAGE und Western-Blot detektiert sowie hinsichtlich enzymatischer Eigenschaften getestet.

### 4.1 Voruntersuchungen zur Enzymaktivität im Mitteldarm

Um die Hypothese zu überprüfen, dass das zu untersuchende Enzym tatsächlich eine Mannanase sein könnte, wurde zunächst der Mitteldarminhalt von *G. viridula* auf Kohlenhydrat-verdauende Enzymaktivitäten getestet. Als Referenz diente hierbei sowohl eine Negativkontrolle (Citrat-Phosphat-Puffer), als auch ein Mitteldarmextrakt des Meerrettichblattkäfers *Phaedon cochleariae* (Familie Chrysomelidae).

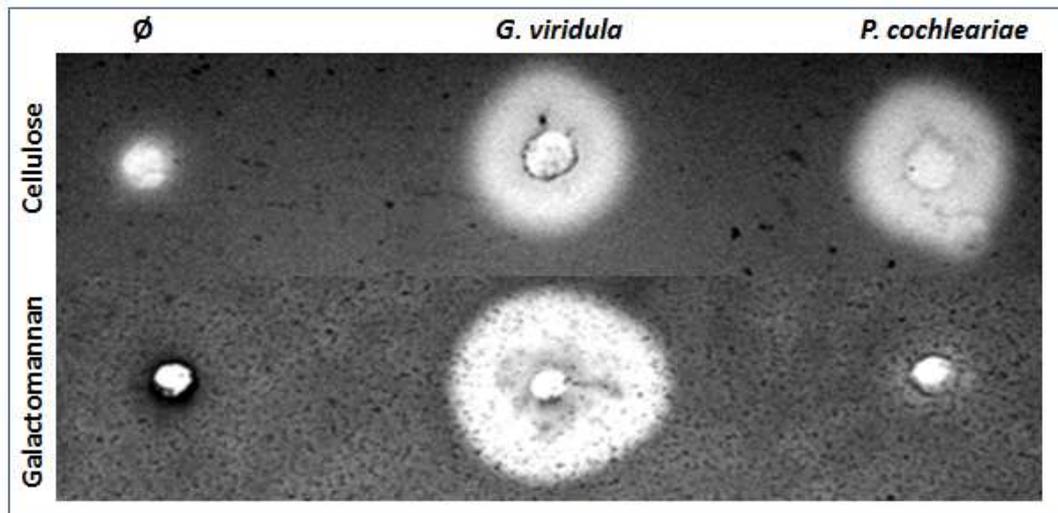


Abb. 3: Agar-Diffusionstest zur Untersuchung des Mitteldarmextrakts vom Ampferblattkäfer *Gastrophysa viridula* und vom Meerrettichblattkäfer *Phaedon cochleariae* auf cellulolytische (oben) und mannoytische (unten) Aktivität. Ø: Negativkontrolle (Citrat-Phosphat-Puffer).

Durch den Agar-Diffusionstest (Abb. 3) wird deutlich, dass sowohl *P. cochleariae*, als auch *G. viridula* Cellulose-verdauende Enzyme in ihrem Mitteldarm beinhalten. Hingegen kann nur der Ampferblattkäfer Galactomannan verwerten. Dies indiziert, dass *G. viridula* dafür ein spezielles Enzym in seinem Mitteldarm besitzt, das mannoytische Aktivität aufweist.

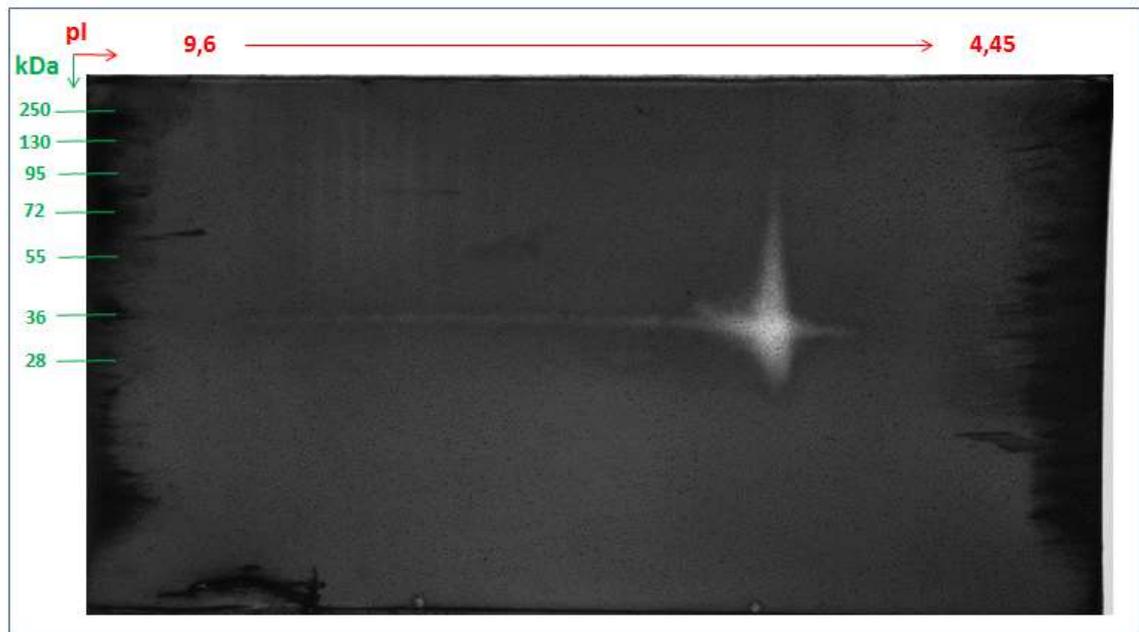
#### 4.2 Isolation eines mannoytischen Enzyms durch 2D-Auftrennung

Mittels zweidimensionaler Elektrophorese wurden Proteine aus dem Mitteldarmextrakt von *G. viridula* sowohl nach der Nettoladung ihrer sauren und basischen Aminosäuren, als auch nach ihrem Molekulargewicht separiert. Da das für die SDS-PAGE verwendete Gel Galactomannan enthielt, ist qualitativ eine *in situ*-Bestimmung mannoytischer Enzymaktivität möglich.

Im *in-gel*-Zymogram (Abb. 4) liegt ein entfärbter Bereich in Form einer einzigen Bande vor, die auf hydrolysiertes Galactomannan hindeutet. Dies lässt auf das Vorhandensein eines Proteins mit Mannanase-Aktivität schließen, das im verwendeten Extrakt aus dem Mitteldarm des Ampferblattkäfers enthalten ist.

Durch erfolgreiche 2D-Auftrennung ist ersichtlich, dass dessen Molekulargewicht etwa im Bereich von 36 kDa liegt. Eine Abschätzung des pI-Werts durch den IEF-Standard kann mangels Gelfärbung nicht vorgenommen werden. Lediglich durch die Lage des entfärbten Bereichs kann vermutet werden, dass der isoelektrische Punkt im neutralen

bis schwach sauren Bereich liegt. Eine Gegenüberstellung der für das GVI\_GH5-1-Protein vorhergesagten mit den experimentell von einem mannolytischen Protein beobachteten Eigenschaften ist in Tab. 6 gezeigt.



**Abb. 4:** *in-gel*-Zymogram (mit 0,1% Galactomannan) nach 2D-Auftrennung des Mitteldarmextrakts von *Gastrophysa viridula*. Die erste Dimension (horizontal, rot dargestellt) stellt eine isoelektrische Fokussierung dar, bei der Proteine entsprechend ihres pI im Gradienten-Gel (pH 9,6 bis pH 4,45) getrennt wurden. Bei der zweiten Dimension (vertikal, grün dargestellt) handelte es sich um eine nicht-denaturierende SDS-PAGE, die Proteine nach ihrem Molekulargewicht separiert. Der Größenstandard (PageRuler™) ist links abgebildet.

Die unregelmäßige Form der Bande ist vermutlich auf Diffusion zurückzuführen, die sich mangels Proteinfixierung nicht vermeiden lässt. Daher wurde zur Abschätzung der o.g. Proteineigenschaften lediglich das Zentrum der entfärbten Stelle in Betracht gezogen. Eine Aussage über die tatsächlichen Werte kann auch aufgrund der visuellen Auswertung nicht eindeutig getroffen werden.

Das im Anschluss aus der Mitte des Aktivitätsbereichs ausgeschnittene Gelstückchen diente als Quelle zur Isolation des darin befindlichen mannolytischen Proteins. Die daraus durch Trypsin-Verdau erhaltenen Peptide wurden mittels Tandem-Massenspektrometrie untersucht, lieferten allerdings keine Spektren. Eine reverse Zuordnung des kodierenden Gens ist daher nicht möglich. Somit bleibt auch offen, ob die Mannanase-Aktivität wirklich von einem der bisher bekannten PCWDE-Genen des Mitteldarms von *G. viridula* oder durch sekretierte Enzyme von im Darm lebenden Symbionten verursacht wird.

**Tab. 6: Vergleich der für das GVI\_GH5-1-Protein vorhergesagten mit den experimentell von einem mannolytischen Protein aus dem Mitteldarm von *G. viridula* beobachteten Eigenschaften.**

	vorhergesagt <sup>a</sup>	experimentell beobachtet
Isoelektrischer Punkt	4,84	neutral bis schwach sauer
Molekulargewicht	38,8 kDa	≈ 36 kDa

<sup>a</sup> Angaben laut ExPASy „ProtParam“ (<http://web.expasy.org/protparam/>) unter Verwendung der GVI\_GH5-1-Aminosäuresequenz (ohne Signalpeptid, Anhang 4b)

### 4.3 Klonierung der GVI\_GH5-1-cDNA

#### 4.3.1 PCR-Amplifizierung der GVI\_GH5-1-cDNA

Als Ausgangsmaterial kam cDNA zur Verwendung, die aus mRNA des Mitteldarms von *G. viridula* generiert wurde. Diese beinhaltet die für eine putative Mannanase kodierende Sequenz des GVI\_GH5-1-Gens (1209 bp), welche aus dem ORF (1119 bp) sowie der 5'- und 3' terminalen UTR besteht (Anhang 4a).

Um die Klonierung in einen TOPO<sup>®</sup> TA-Vektor und dessen Expression zu ermöglichen, sollte durch gezielte Basenmutation im *fw*-Primer (blau hervorgehoben) die Integration einer Kozak-Sequenz sichergestellt werden:

Kozak-Sequenz  $5' \text{--} \overset{\text{G}}{\underset{\text{A}}{\text{---}}}\text{NNATGG--}3'$

GVI\_GH5-1 21-50 5'-CGAAAGAACC**ATG**AAAGTCGCTGTGGTATT-3'

*fw*-Primer 5'-ACCATG**GA**AAGTCGCTGTGGTATTTCG-3' (ATG = Startcodon)

Zudem sollte das exprimierte Protein ein carboxyterminales V5-Epitop sowie einen His<sub>6</sub>-tag besitzen, weshalb der *rev*-Primer so konstruiert wurde, dass das native Stoppcodon von der Amplifikation ausgeschlossen bleibt:

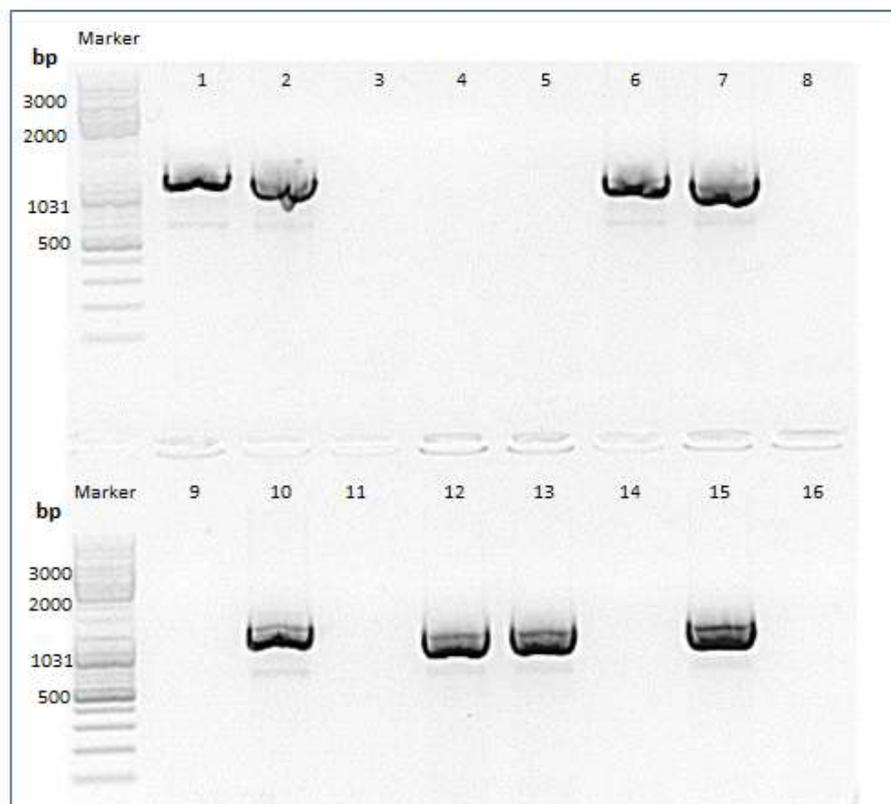
GVI\_GH5-1 1121-1150 5'-ACAACGGCAATGTCCATGTGACCCTT**TGAA**-3'

*rev*-Primer 3'-GTTGCCGTTACAGGTACTGGAA-5' (TGA = Stoppcodon)

Die Ziel-cDNA wurde durch PCR unter Verwendung der o.g. Oligonukleotide amplifiziert. Durch elektrophoretische Auftrennung des PCR-Ansatzes in einem Agarose-Gel resultierte eine einzelne Bande, der ein Molekulargewicht von knapp 1200 bp zugeordnet werden konnte (nicht gezeigt).

### 4.3.2 TOPO<sup>®</sup> TA-Klonierung des PCR-Amplifikats in den pIB/V5-His-Vektor

Das aus dem Gel isolierte DNA-Fragment (1120 bp) wurde anschließend durch TOPO<sup>®</sup> TA-Klonierung mit einem linearisierten pIB/V5-His-Vektor ligiert, indem die 3'-A-Überhänge des PCR-Amplifikats mit den 5'-T-sticky ends des Vektors hybridisierten. Der zirkuläre Expressionsvektor konnte nun in *E. coli*-Zellen transformiert werden. Positive Rekombinanten wurden auf Ampicillin-Basis selektiert, da sie durch Vektoraufnahme ein gegen dieses Antibiotikum gerichtetes Resistenzgen besitzen. Anschließend diente eine Kolonie-PCR zur Verifizierung, welche der positiven Klone das DNA-Fragment in korrekter Richtung inseriert haben. Durch Verwendung des genspezifischen GVI\_GH5-1-fw-Primers sowie des vektorspezifischen OpIE2-rev-Primers findet nur dann eine exponentielle Amplifikation statt, wenn die jeweilige Bindungsstelle beider Primer nicht auf dem gleichen DNA-Strang liegt. Ist das der Fall, entsteht ein 1292 bp großes PCR-Fragment (Anhang 4a, 5b).



**Abb. 5:** Agarose-Gel (1,2%ig) einer Kolonie-PCR mit 16 selektierten Transformanten, die den pIB/V5-His-Vektor mit dem GVI\_GH5-1-Insert aufgenommen haben. Erwartete Fragmentgröße bei Verwendung des genspezifischen GVI\_GH5-1-fw-Primers sowie des vektorspezifischen OpIE2-rev-Primers: 1292 bp. Marker: O'GeneRuler<sup>™</sup>.

Auf dem Gelfoto (Abb. 5) sind bei den Klonen 1/2/6/7/10/12/13/15 signifikante DNA-Banden zu erkennen. Diese befinden sich ungefähr auf gleicher Höhe und weisen ein Molekulargewicht zwischen etwa 1031 bp und 1500 bp auf. Daher kann geschlussfolgert werden, dass bei diesen Transformanten das GVI\_GH5-1-Insert in richtiger Orientierung im Vektor vorliegt. Bei allen anderen Klonen ist davon mangels eines sichtbaren Amplifikats nicht auszugehen. Diese würden später nicht zur Expression des gewünschten Proteins führen und wurden daher verworfen. Alle verifizierten Rekombinanten sind in Schüttelkulturen über Nacht vermehrt wurden, um signifikante Mengen der gewünschten Plasmid-DNA zu erhalten.

### 4.3.3 Sequenzierung des GVI\_GH5-1-pIB/V5-His-Plasmids

Die aus den *E.coli*-Zellen der Übernachtskulturen isolierte Plasmid-DNA diente als *template* für eine Sanger-Sequenzierung. Jede DNA wurde in zwei Ansätzen sequenziert, entweder unter Verwendung eines 5'- oder eines 3'-terminal vom GVI\_GH5-1-Insert hybridisierenden Primers. Die zurückerhaltenen Sequenzen konnten daraufhin auf ihre korrekte Basenabfolge und den richtigen Leserahmen geprüft werden. Aus den Sequenzierungsdaten (Anhang 3a) geht hervor, dass das vierte Nukleotid im ORF (Position 75) jedes Klons durch eine Transition (A→G) verändert ist. Dies lässt den Schluss zu, dass die durch den GVI\_GH5-1-*fw*-Primer induzierte PCR-Mutagenese erfolgreich war und damit in jedem Vektor eine korrekte Kozak-Sequenz vorliegt.

Am Ende der inserierten Gensequenz fehlt bei allen Klonen das native Stoppcodon, wie es durch die PCR-Amplifikation vorgesehen war (Abschnitt 4.3.1). Daher wurde auch in der Originalsequenz des GVI\_GH5-1-ORF's das Codon „TGA“ manuell entfernt (Anhang 3b, 3c). An Position 1187 (der dritten Base vom letzten kodierenden Codon in der Originalsequenz) tritt damit eine Punktmutation zum Vorschein, da 6 von 8 Klonen an dieser Stelle entweder eine Deletion (T→-) oder eine Transition (T→C) aufweisen. Dies ist vermutlich herstellerbedingt auf eine nicht optimale Qualität des *rev*-Primers zurückzuführen (Abschnitt 4.3.1): als erstes 5'-terminales Nukleotid scheint Adenin bei der Oligonukleotidsynthese entweder durch ein Guanin vertauscht oder gar nicht berücksichtigt worden zu sein.

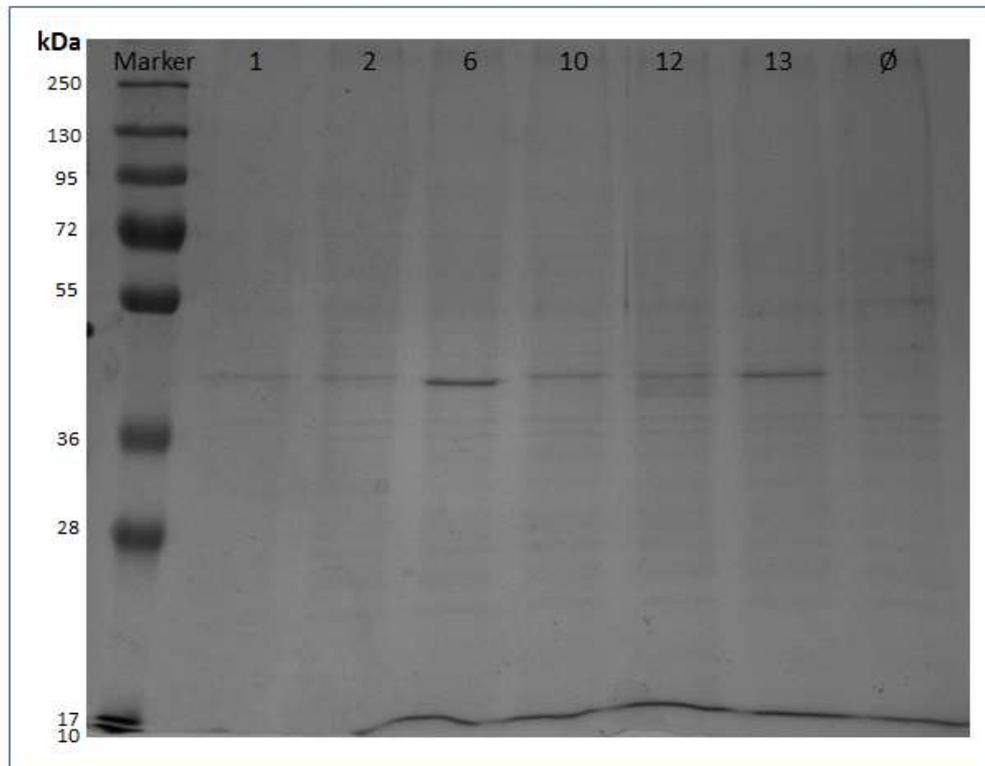
Infolge der Deletion im ORF käme es zu einer Verschiebung des Leserasters während der Translation. Dadurch würden weder das V5-Epitop und der His<sub>6</sub>-tag wie gewünscht ausgeprägt, noch bliebe das unmittelbar folgende Stoppcodon erhalten. Daher werden

die Klone 7/15 verworfen. Bei der Transition hingegen handelt es sich um eine stille Mutation, da die kodierende Aminosäure unverändert bleibt („CT $\frac{T}{C}$ “ $\rightarrow$ Leucin). Somit ist die DNA der Klone 1/2/6/10/12/13 zur weiteren Verwendung geeignet. Dafür spricht auch, dass in diesen Sequenzen sowohl Leseraster, als auch Start- und Stoppcodon sowie die zu erwartende Aminosäureabfolge des GVI\_GH5-1-Proteins korrekt vorliegen (Daten nicht vollständig gezeigt).

#### 4.4 Expression, Immundetektion und Aktivitätsbestimmung der rekombinanten Proteine

##### 4.4.1 Proteinexpression

Die erfolgreich klonierten und durch Sequenzierung verifizierten GVI\_GH5-1-pIB/V5-His-Plasmide konnten direkt als Expressionsvektoren verwendet werden. Hierzu erfolgte deren Transfektion in eukaryotische SF9-Zellen. Nach Ernte der Kulturüberstände wurde diese durch denaturierende SDS-PAGE auf das Vorhandensein der rekombinanten Proteine untersucht.



**Abb. 6: Polyacrylamid-Gel (12,5%ig) einer denaturierenden SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung zur Verifizierung der Proteinexpression durch SF9-Zellen.** Es wurden lediglich rekombinante GVI\_GH5-1-pIB/V5-His-Plasmide transfiziert, deren ORF durch Sequenzierung verifiziert wurde. Erwartete Größe der GVI\_GH5-1-V5-His<sub>6</sub>-Proteine: 43,6 kDa. Marker: PageRuler™, Ø: Negativkontrolle, bei der keine DNA transfiziert wurde.

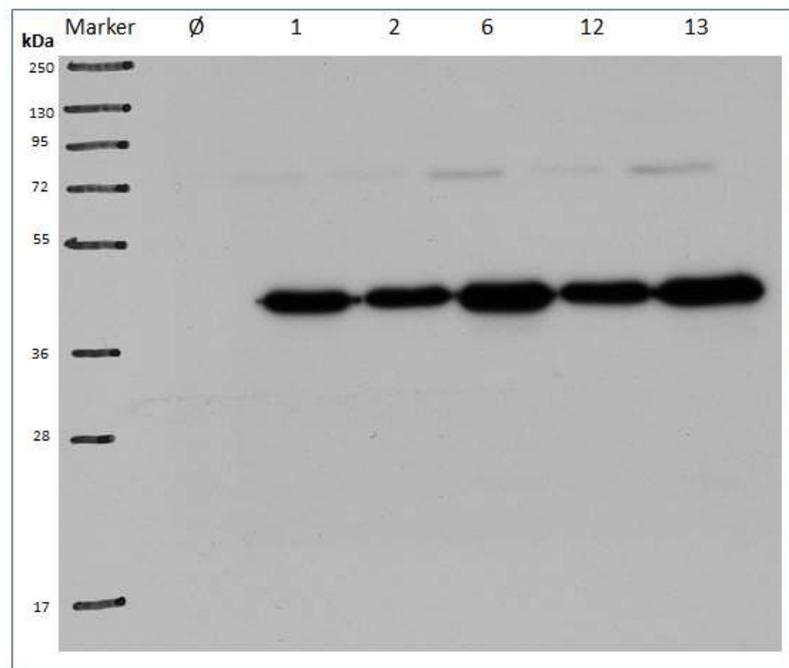
Wie anhand des Coomassie-gefärbten Polyacrylamid-Gels (Abb. 6) ersichtlich ist, liegt in der zweiten bis siebten Bahn jeweils eine deutliche Bande vor. Dass diese in der Negativkontrolle nicht vorhanden ist, stellt ein Indiz für die erfolgreiche Expression der transfizierten Plasmide dar. Den Banden kann ein Molekulargewicht von etwa 40 kDa bis 50 kDa zugeordnet werden. Dies spricht für das Vorliegen der durch Klonierung gewünschten Proteine, welche eine Größe von 43,6 kDa besitzen (Anhang 5c). Unterschiedliche Bandenintensitäten deuten darauf hin, dass die Transfektionseffizienz von Ansatz zu Ansatz variierte, was sich letztlich im Level der Proteinexpression widerspiegelte.

#### 4.4.2 Proteindetektion durch Western-Blot

Die durch SDS-PAGE ersichtlichen Proteinbanden (Abb. 6) konnten bisher nur aufgrund des der erwarteten Größe ähnlichen Molekulargewichts als die durch Klonierung erwünschten Ziel-Proteine vermutet werden. Um eine eindeutige Identifizierung vorzunehmen, wurde ein Western-Blot durchgeführt. Dabei kam ein polyklonaler anti-V5-Antikörper zum Einsatz, welcher das carboxyterminale V5-Epitop des rekombinanten GVI\_GH5-1-V5-His<sub>6</sub>-Proteins hochaffin bindet. Durch Konjugation dieses Antikörpers mit Meerrettich-Peroxidase ist eine direkte Detektion der gebildeten Immunkomplexe möglich, indem eine Chemilumineszenz-Reaktion deren Visualisierung auf einem Autoradiografie-Film bewirkt.

Durch Immundetektion zeigt sich im Western-Blot bei allen eingesetzten Proteinproben (außer der Negativkontrolle) eine markante Bande (Abb. 7). Deren Molekulargewicht deckt sich mit der erwarteten Größe des gewünschten Proteins (43,6 kDa) sowie den dominanten Proteinbanden im Polyacrylamid-Gel (Abb. 6). Zur Verifizierung der Immundetektion wurde die PVDF-Membran nachträglich gefärbt, was ein identisches Ergebnis lieferte (nicht gezeigt). Da SF9-Zellen selbst keine Proteine mit intramolekularem V5-Epitop sekretieren, liegt es nahe, dass die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe auf das Vorhandensein rekombinanter GVI\_GH5-1-V5-His<sub>6</sub>-Proteine zurückgehen. Es ist davon auszugehen, dass nach Transkription des Plasmids durch SF9-Zellen zunächst eine 417 Aminosäuren lange Protein-Vorstufe synthetisiert wird. Ein aminoterminaleres Signalpeptid (18 Aminosäuren) bedingt deren extrazelluläre Lokalisation, weshalb posttranslational die Sekretion der exprimierten Proteine in das Kulturmedium erfolgt. Dabei wird zeitgleich das Signalpeptid

abgespalten. Das verbleibende Protein besteht daher aus 399 Aminosäuren und besitzt eine zu erwartende Größe von 43,6 kDa (Anhang 5c). Neben den dominanten Banden sind zusätzlich schwächere mit einem Molekulargewicht zwischen 72 kDa und 95 kDa detektiert worden. Hierbei handelt es sich vermutlich um einen kleinen Anteil der denaturierten GVI\_GH5-1-V5-His<sub>6</sub>-Moleküle, die als linearisierte Aminosäureketten im Stande sind Dimere zu bilden.



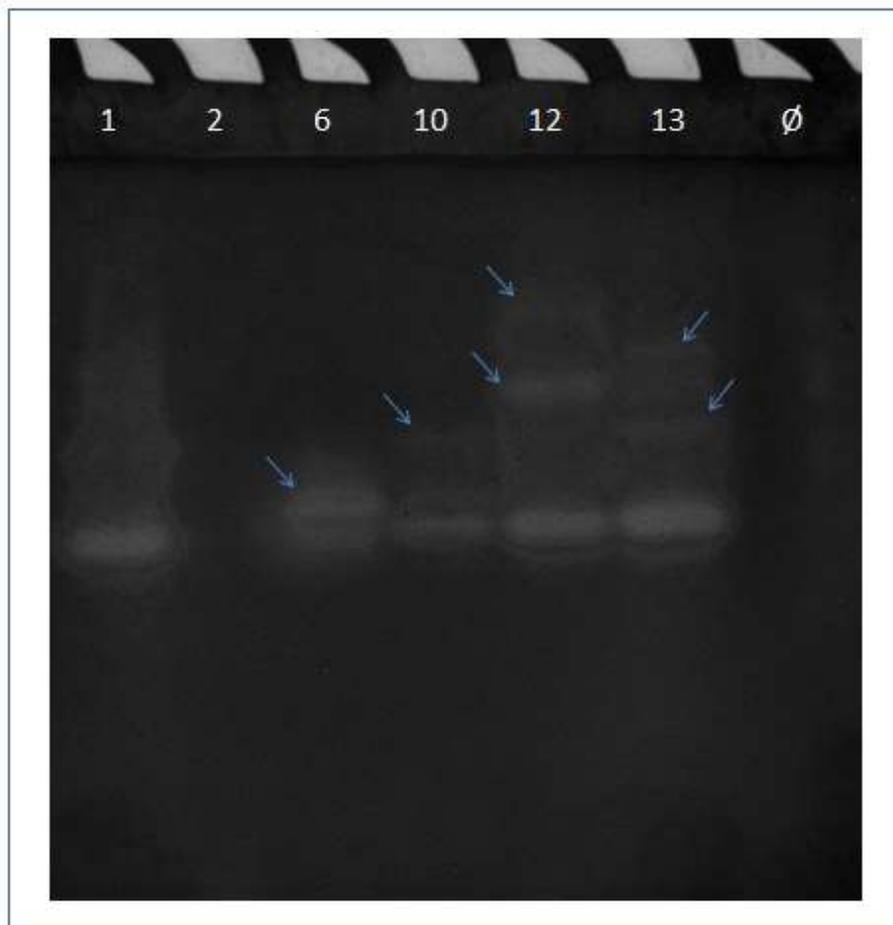
**Abb. 7: Autoradiografie-Film eines Western-Blots mit einem gegen das V5-Epitop gerichteten polyklonalen Antikörper.** Geblottet wurden die zuvor durch denaturierende SDS-PAGE aufgetrennten Proteine, die durch SF9-Zellen in das Kulturmedium sekretiert wurden (einschließlich einer nicht mit DNA transfizierten Negativkontrolle (Ø)). Probe 10 konnte hierfür nicht mehr verwendet werden. Die Detektion der Immunkomplexe erfolgte anschließend durch HRP-vermittelte Chemilumineszenz, die zur Schwärzung des Autoradiografie-Films führte. Molekulargewicht des erwarteten GVI\_GH5-1-V5-His<sub>6</sub>-Proteins: 43,6 kDa. Der Größenstandard (PageRuler™) wurde von der PVDF-Membran identisch übertragen (links).

#### 4.4.3 Test auf enzymatische Aktivität

Um zu überprüfen, ob die sekretierten Proteine enzymatisch aktiv sind, wurde ein *in-gel*-Zymogram durchgeführt (Abschnitt 3.6.1). Als Substrat kam dabei Galactomannan zur Verwendung, da bereits durch eine Voruntersuchung des Mitteldarmextrakts von *G. viridula* eine mannolytische Aktivität von bisher noch unbekannter Herkunft bestätigt werden konnte (Abschnitt 4.1).

Durch das Zymogram-Gel (Abb. 8) wird deutlich, dass in 5 von 6 Bahnen entfärbte Bereiche vorkommen, die auf Galactomannan-Hydrolyse schließen lassen. Es kann angenommen werden, dass hierfür die durch SF9-Zellen exprimierten

GVI\_GH5-1-V5-His<sub>6</sub>-Proteine verantwortlich sind, da diese Zelllinie selbst keine eigene Mannanase synthetisiert. Dies wird dadurch unterstützt, dass die Hauptenzymaktivität auf etwa identischer Höhe wie die durch denaturierende SDS-PAGE bzw. Western-Blot zustande gekommenen Proteinbanden liegt (Abb. 6, Abb. 7). Daraus folgt auch, dass das mannolytische Enzym als Monomer voll aktiv ist. Dennoch existieren einige unspezifische Banden (Abb. 8, blaue Pfeile), die aufgrund ihrer schwächeren Ausprägung auf geringfügige Hydrolyse-Aktivität hindeuten. Ihre geringere elektrophoretische Mobilität lässt vermuten, dass diese Banden möglicherweise durch retardierte Enzym-Substrat-Komplexe zustande kommen oder die Folge von intermolekularen Wechselwirkungen sind. Da beide Effekte von der relativen Anordnung bzw. Lage der Proteine abhängen, treten diese spontan und daher nicht in allen Laufspuren auf.



**Abb. 8:** *in-gel*-Zymogram (mit 0,1% Galactomannan) zum Test der heterolog exprimierten GVI\_GH5-1-V5-His<sub>6</sub>-Proteine auf enzymatische Aktivität. Blaue Pfeile zeigen hydrolysierte Bereiche, die außerhalb des erwarteten Molekulargewichts (43,6 kDa) liegen. Ø: Negativkontrolle, bei der keine DNA transfiziert wurde.

## 4.5 Charakterisierung enzymatischer Eigenschaften

### 4.5.1 Substratspezifität

Enzyme sind oft in der Lage neben ihrem eigentlichen Substrat noch andere, strukturell ähnlich aufgebaute Moleküle verwerten zu können. Um die Substratspezifität des heterolog exprimierten GVI\_GH5-1-V5-His<sub>6</sub>-Proteins zu überprüfen, wurden Agar-Diffusionstests auf Basis von Galactomannan, Carboxymethyl-Cellulose, Zitruschalen-Pektin und Buchenholz-Xylan durchgeführt. Unter Berücksichtigung des *in-gel*-Zymograms (Abb. 8) kam dabei als Probe ein Kulturüberstand zum Einsatz, der bereits deutliche enzymatische Aktivität aufzeigte. Ferner wurde zum Vergleich Mitteldarmextrakt aus *G. viridula* mitgeführt.

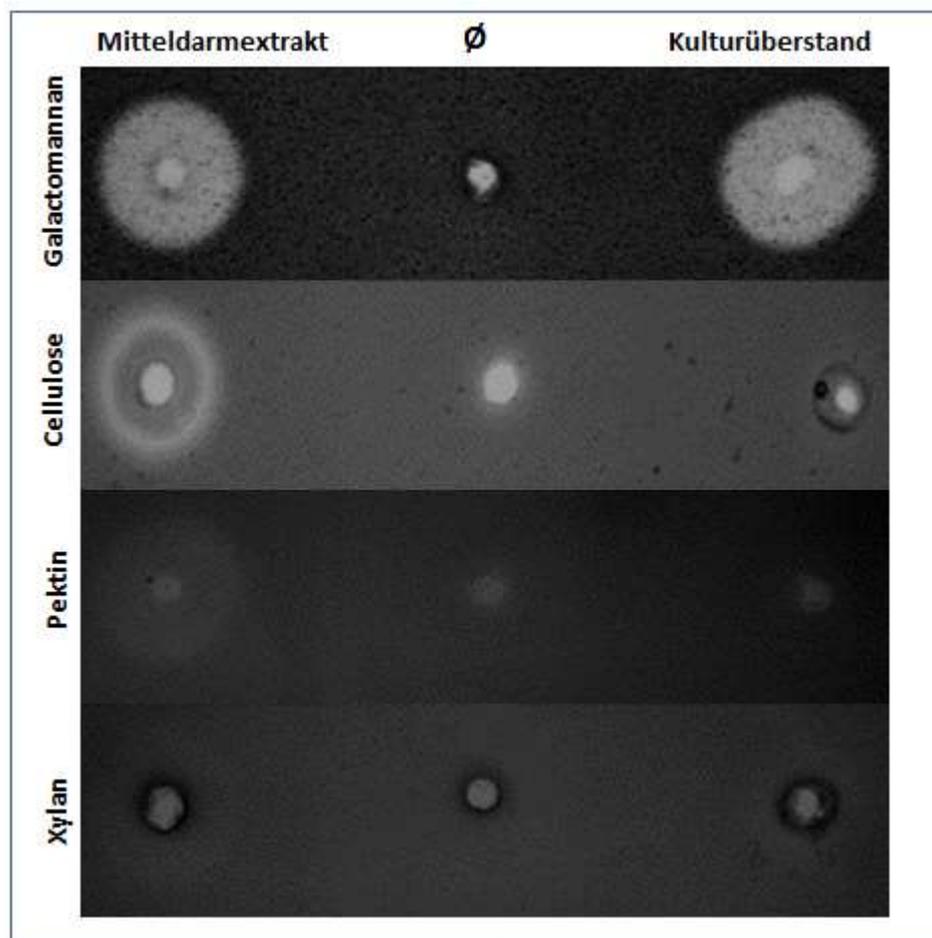


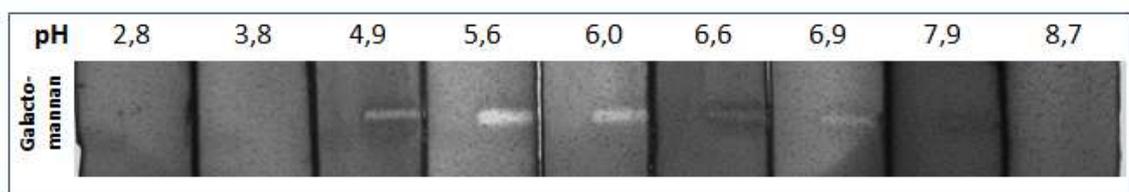
Abb. 9: Agar-Diffusionstests mit 0,1% verschiedener Substrate (Galactomannan, Carboxymethyl-Cellulose, Zitruschalen-Pektin und Buchenholz-Xylan) zum Test des rekombinanten GVI\_GH5-1-V5-His<sub>6</sub>-Proteins (Kulturüberstand) auf enzymatische Spezifität. Zum Vergleich wurde eine Negativkontrolle (Ø: Citrat-Phosphat-Puffer) sowie Mitteldarmextrakt aus *Gastrophysa viridula* mitgeführt.

Im Mitteldarm des Ampferblattkäfers lässt sich anhand der entfärbten Bereiche im Agar-Diffusionstest neben der bereits in den Voruntersuchungen (Abschnitt 4.1) beobachteten mannolytischen und cellulolytischen auch eine geringe pektolytische Aktivität feststellen. Xylan hingegen wird augenscheinlich nicht hydrolysiert. Auf dem Substrat-Agar konnte jedoch erkannt werden, dass durch das vorliegende Mitteldarmextrakt und durch GVI\_GH5-1 ein minimaler Abbau dieses Kohlenhydrats stattfand. Die unterschiedlichen Intensitäten der hydrolysierten Bereiche resultieren vermutlich daher, weil jedes Enzym in unterschiedlicher Konzentration im verwendeten Mitteldarmextrakt auftritt. Dies ist einerseits von der Effizienz der Extraktionsmethode abhängig (Abschnitt 3.1), wird andererseits aber auch durch das Expressions- bzw. Sekretionslevel des Mitteldarmepithels beeinflusst (Abb. 9, links).

Das durch SF9-Zellen in den Kulturüberstand sekretierte GVI\_GH5-1-V5-His<sub>6</sub>-Protein kann sowohl Galactomannan, als auch Xylan hydrolysieren. Cellulose und Pektin hingegen werden nicht verdaut. Da Galactomannan wesentlich stärker durch das rekombinante Protein abgebaut wird, liegt für dieses Substrat eine deutliche Hydrolyse-Spezifität vor (Abb. 9, rechts).

#### 4.5.2 pH-Optimum

Die katalytische Aktivität von Enzymen ist merklich von den Bedingungen in ihrer unmittelbaren Umgebung abhängig, darunter auch vom pH-Wert. Um das für die rekombinante Mannanase GVI\_GH5-1-V5-His<sub>6</sub> zu überprüfen, kam ein *in-gel*-Zymogram zur Anwendung. Hierzu wurde das Polyacrylamid-Gel nach der Elektrophorese in identische Einheiten zerschnitten, die vor Induktion der Enzymaktivität in Puffern unterschiedlichen pH-Werts äquilibriert wurden.



**Abb. 10:** Test des katalytischen pH-Optimums der rekombinanten Mannanase GVI\_GH5-1-V5-His<sub>6</sub> durch ein *in-gel*-Zymogram mit 0,1% Galactomannan. Das Gel wurde in neun identische Einheiten zerschnitten, welche vor Induktion der Enzymaktivität jeweils für 16 h in Puffern individuellen pH-Werts (obere Zeile) äquilibriert wurden.

Anhand des Zymograms (Abb. 10) lässt sich eindeutig eine Korrelation zwischen dem umgebenden pH-Wert und dem Grad des Galactomannan-Abbaus feststellen. Die stärkste Bande und damit der höchste Substratumsatz ist bei pH 5,6 vorhanden. Sowohl zum alkalischen, als auch zum sauren Bereich hin nimmt die Enzymaktivität stufenweise ab. Dies suggeriert, dass die rekombinante Mannanase lediglich ein einziges katalytisches pH-Optimum aufweist, welches im schwach sauren Bereich liegt. Dennoch ist das Enzym in der Lage auch bis zu einem pH-Minimum von 4,9 bzw. einem pH-Maximum von 7,9 noch hydrolytisch aktiv zu sein. Im extrem sauren oder extrem basischen Bereich findet kein sichtbarer Galactomannan-Verdau mehr statt. Zu berücksichtigen ist, dass hier nur ausgewählte pH-Werte getestet werden konnten und die Auswertung lediglich optisch erfolgte. Das Aktivitäts-Optimum sowie der katalytische Toleranzbereich können daher nur tendenziell angegeben werden und weichen von den tatsächlichen Werten vermutlich geringfügig ab.

## 5 Diskussion und Ausblick

Mannanasen sind trotz ihrer Bedeutsamkeit beim Abbau pflanzlicher Zellwände bisher nur in einer geringen Anzahl von Insekten gefunden wurden. In dieser wissenschaftlichen Arbeit konnte mit *Gastrophysa viridula* für die bislang dritte Blattkäfer-Spezies eine mannolytische Aktivität bestätigt werden, die durch ein im eigenen Genom kodiertes Enzym der GH5-Familie ausgeprägt wird.

Beruhend auf dessen Proteineigenschaften (isoelektrischer Punkt und Molekulargewicht) wurde es zunächst aus dem Mitteldarmextrakt von Larven durch 2D-Elektrophorese separiert und anschließend über seine Mannanase-Aktivität selektiert (Abb. 4). Trotz, dass die experimentell beobachteten Daten den vorhergesagten Werten stark ähneln (Tab. 6), konnte eine massenspektrometrische Analyse keine Bestätigung liefern. Hierbei ist ein falsch-negatives Ergebnis nicht auszuschließen. Dies kann einerseits technisch bedingt sein, denn zur Auftrennung und Analyse der tryptischen Peptide im Massenspektrometer müssen diese zuvor einer Ionisierung standhalten. Andererseits bedarf es hierzu einer ausreichenden Proteinmenge. Zwar werden Verdauungsenzyme ins Darmlumen sekretiert, können dort aber an der Glykokalyx, die schleimartig die Darmwand vieler Insekten auskleidet, adhärirt sein. Zudem wird durch das Mitteldarmepithel ständig ein Geflecht peritrophischer Membranen abgesondert, das die eintretende Nahrung umhüllt und vom restlichen Lumen abgrenzt. Digestive Enzyme können an diese adsorbieren und sogar deren Poren passieren [2, 21]. Dadurch kann ihre Konzentration außerhalb der peritrophischen Hülle wesentlich kleiner sein. Das mannolytische Protein lag im verwendeten Extrakt daher vermutlich zu stark verdünnt vor oder das eingesetzte Probenvolumen war zu gering.

Ungünstige Wetterbedingungen ließen es nicht zu weitere Ampferblattkäfer zu sammeln, um aus dem Mitteldarminhalt heraus das mannolytische Protein zu identifizieren. Daher wurde die putative Mannanase GVI\_GH5-1 heterolog synthetisiert. Hierzu diente vorrätige cDNA, die vom Mitteldarm-Transkriptom von *G. viridula* abstammt, um die kodierende Sequenz zu klonieren und nach Transfektion in SF9-Zellen zu exprimieren. Durch SDS-PAGE (Abb. 6) und Western-Blot (Abb. 7) konnte gezeigt werden, dass die rekombinanten Proteine im Kulturüberstand zu finden sind. Ein zur Sekretion nötiges Signalpeptid ist hierfür anhand der Primärsequenz identifiziert worden. Demnach lässt sich schlussfolgern, dass das GVI\_GH5-1-Genprodukt nicht nur mesenteronaler Herkunft ist [12], sondern auch im Lumen des Mitteldarms vorhanden sein muss. Ein *in-gel*-Zymogram auf

Galactomannan-Basis bestätigte im Anschluss die bis dahin nur hypothetische Mannanase-Aktivität (Abb. 8), die im schwach sauren Milieu am stärksten ausgeprägt wird (Abb. 10).

Wenngleich bisher keine Daten über den intestinalen pH-Wert von *G. viridula* existieren, wurden von einigen anderen Blattkäfer-Spezies bereits Werte von pH 4,5 (*Chrysomela scripta*) bis zu pH 7,0 (*Phaedon cochleariae*) experimentell ermittelt [24, 25, 26, 27, 28, 29]. Daraus lassen sich ähnliche, leicht saure Bedingungen für den Ampferblattkäfer vermuten. Die Anpassung der Mannanase GVI\_GH5-1 an die im Mitteldarm vorherrschenden pH-Verhältnisse stellt höchstwahrscheinlich sicher, dass ein möglichst schneller Substratumsatz erfolgen kann.

Dies ist für das Insekt von Vorteil, weil der Abbau pflanzlicher Zellwände vermutlich nicht alleine zur Gewinnung energetisch nutzbarer Zuckerverbindungen eine Rolle spielt, sondern auch dem direkten Zugang zum Protoplasten dient. Dieser enthält einige für den Käfer essentielle Metabolite, wie etwa Sterole und bestimmte Aminosäuren [2]. Da sich pflanzliche Nahrung im Vergleich zu tierischer als wesentlich weniger reichhaltig erweist [21], ist oftmals die Aufnahme einer größeren Nahrungsmenge erforderlich. Um den körpereigenen Bedarf an Nährstoffen ausreichend zu decken, muss damit auch ein rascher Aufschluss pflanzlicher Zellwände sichergestellt werden. Außerdem besitzen die meisten Vertreter der Unterordnung Polyphaga, wozu auch *G. viridula* zählt, keinen durch den Vorderdarm ausgebildeten Kropf [2, 21]. Aus diesem Grund sind Blattkäfer nicht fähig einen Teil der aufgenommenen Nahrung zu speichern und ihn erst bei Bedarf in den Mitteldarm zu überführen. Stattdessen erfolgt die Verdauung unmittelbar nach der Nahrungsaufnahme [2].

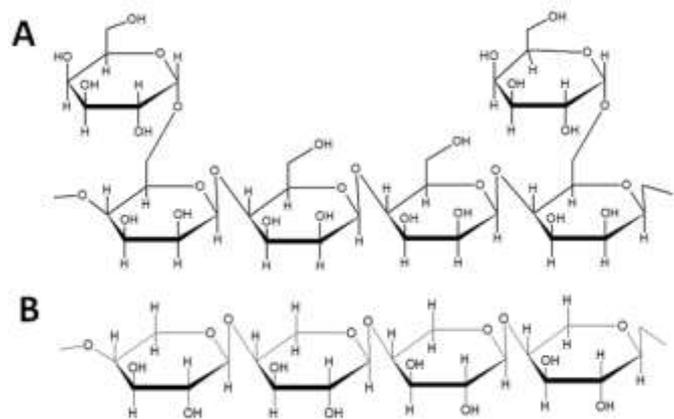
Der Besitz einer Mannanase erlaubt dem Ampferblattkäfer durch die Degradation von Mannanen das Hemicellulose-Netzwerk der Zellwand zu destabilisieren. Da dieses durch nicht-kovalente Interaktionen eng mit Cellulose assoziiert ist, kann die relative Lage der Mikrofibrillen beeinträchtigt werden. Infolgedessen wird nicht nur die Integrität der Zellwand gestört, sondern zugleich die Suszeptibilität von Cellulose gegenüber cellulolytischen Enzymen erhöht [18]. In *G. viridula* wurden derer bereits vier gefunden, die -ebenso wie sieben Polygalakturonasen- auch von Zellen des Mitteldarms transkribiert werden [12]. Ihre Beteiligung am Abbau von Cellulose bzw. Pektin konnte durch einen Agar-Diffusionstest nachgewiesen werden (Abb. 9, links). Demnach kodiert der Ampferblattkäfer für mehrere Glykosid-Hydrolasen mit unterschiedlicher Substratspezifität. Auf diesem Weg scheint es ihm möglich zu sein

eine Diversität kompliziert aufgebauter Polysaccharide in der Zellwand abbauen zu können.

Eine putative Xylanase konnte in den 2010 gefundenen PCWDE-Transkripten des Mitteldarms nicht identifiziert werden. Nichtsdestotrotz zeigte das Mitteldarmextrakt im Agar-Diffusionstest eine schwache xylanolytische Aktivität an (Abb. 9, links). Interessant ist hierbei, dass diese offensichtlich durch die untersuchte Mannanase GVI\_GH5-1 ausgeprägt wird (Abb. 9, rechts). Die meisten Enzyme der GH5-Familie wurden bisher als monofunktional beschrieben, da sie nur ein einziges katalytisches Modul besitzen [18]. Diese Annahme kann auch für GVI\_GH5-1 gemacht werden, das lediglich 38,8 kDa groß ist. Multimodulare Vertreter hingegen weisen Molekulargewichte von nahezu 100 kDa auf (in einigen Fällen sogar mehr) [15]. Die geringe Xylanase-Aktivität der rekombinanten Mannanase kann demnach vermutlich auf eine katalytische Domäne zurückgeführt werden, deren Spezifität nicht auf das Mannan-Rückgrat beschränkt ist. Die Substratbindung durch Glykosid-Hydrolasen basiert auf der Erkennung mehrerer, eng benachbarter Zuckerreste des zu degradierenden Oligo- oder Polysaccharids. Daran sind verschiedene, oft konservierte Aminosäuren des aktiven Zentrums beteiligt [18, 30, 31]. Um mit diesen zu interagieren, verhelfen dem verwendeten Xylan möglicherweise einige mit

Galactomannan strukturelle Gemeinsamkeiten, wie etwa seine  $\beta$ -1,4-D-Pyranose-Form oder die stereochemische Stellung der C3-Hydroxyl-Gruppe (Abb. 11). Xylan wird im Vergleich zu Galactomannan allerdings wesentlich schlechter abgebaut (Abb. 9) und scheint daher strukturbedingt nicht optimal vom katalytischen Zentrum gebunden zu werden.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, handelt es sich bei *G. viridula* um einen Nahrungsspezialisten, da er lediglich Ampferblätter für seine Ernährung beansprucht. Demnach ist dieser Blattkäfer einer viel geringeren Diversität potentieller Fressfeinde ausgesetzt im Vergleich zu polyphag lebenden Insekten [4]. Dieser Effekt erweist sich



**Abb. 11: Strukturvergleich der beiden durch die Mannanase GVI\_GH5-1 hydrolysierten Substrate. A: Galactomannan (mit zwei  $\alpha$ (1,6)-Galactose-Verzweigungen), B: Buchenholz-Xylan.**

als vorteilhaft für die evolutionäre Durchsetzungsfähigkeit des Ampferblattkäfers, was ihm zugleich eine exzellente Anpassung an seine ökologische Nische ermöglicht. Durch zeitlebens konstant bleibende Ressourcen ist die Spezies insbesondere auf die Etablierung eines geeigneten Systems Pflanzenzellwand-degradierender Enzyme angewiesen, das auf die chemischen Strukturmerkmale von Ampferblättern ausgelegt ist und eine hohe nutritive Effizienz sicherstellt. Man kann vermuten, dass die Spezialisierung von *G. viridula* auf seine Nahrungsquelle mit koevolutiven genomischen Veränderungen einher gegangen ist, die im Ergebnis zu seinen heute kodierten PCWDEs führten [4, 12, 13, 21]. Dabei kommt dem durch die Wirtspflanzen ausgeübten Selektionsdruck erhebliche Bedeutung zu [2]. Einige Entomologen gehen davon aus, dass pflanzlich produzierte Inhibitoren gegen PCWDEs von Käfern eine mögliche Ursache für die heutige Vielfalt dieser Enzyme darstellen könnte [12, 19]. Daher muss auch zukünftig mit neu in Erscheinung tretenden bzw. mutierten Genen gerechnet werden, die bisher unbekannt, aber gegenüber den Verteidigungsmechanismen der Wirtspflanzen zugleich adaptierte PCWDEs kodieren.

Trotz gestiegenem Interesse an der phylogenetischen und biochemischen Aufklärung von Kohlenhydrat-abbauenden Enzymen sind bisher vergleichsweise wenige Mannanasen beschrieben wurden; die Mehrheit davon stammt aus Mikroorganismen [13, 15]. Zwar wurden ebenso metazoische Vertreter in Arthropoden, Nematoden, Mollusken und einigen Pflanzen gefunden [13], ihre Charakterisierung ist jedoch gegenwärtig noch weitgehend lückenhaft. Um nicht nur zu verstehen wie, sondern auch welche Substrate die hier untersuchte Mannanase GVI\_GH5-1 hydrolysiert, ist es erforderlich ihre Tertiärstruktur vollständig aufzudecken. Ein lokales Alignment (protein-protein BLAST<sup>®</sup>, NCBI) konnte bisher lediglich signifikante Übereinstimmungen mit den Primärstrukturen der  $\beta$ -Mannanase aus den beiden Mollusken *Aplysia kurodai* und *Mytilus edulis* bestätigen. Hierzu existieren bereits veröffentlichte, sich gegenseitig stark ähnelnde 3D-Strukturen, in denen (neben zwei katalytischen Glutamat-Resten) einige hochkonservierte Aminosäuren bestimmt werden konnten, die an der Bindung des Substrats beteiligt sind [31, 32]. Inwiefern sich diese Beobachtungen in der Mannanase des Ampferblattkäfers widerspiegeln, kann nur durch eine kristallografische Analyse gezeigt werden. Hägglund nutzte hierbei katalytische Defekt-Mutanten, um natürliche Substrate, die nicht mehr durch das Enzym degradiert

werden können, in die Kristallstruktur miteinzubeziehen [15]. Auf diesem Weg wäre es auch für GVI\_GH5-1 denkbar intermolekulare Wechselwirkungen auf konkrete funktionelle Gruppen des aktiven Zentrums zurückzuführen und ferner deren Beeinflussung durch die Verwendung verschiedener Substrate zu analysieren.

Auch die Hydrolyse-Rate kann in Abhängigkeit des Substrats stark variieren, wie bereits für das untersuchte Enzym gezeigt werden konnte (Abb. 9). Um dies weiterführend zu quantifizieren und damit Rückschlüsse auf die Substratspezifität zu erhalten, empfiehlt es sich sowohl unterschiedliche Heteromannane, als auch strukturell ähnlich aufgebaute Polysaccharide zu testen. Dabei wäre es interessant herauszufinden, inwiefern auch der Verzweigungsgrad oder das Auftreten chemischer Modifikationen (z.B. Acetylierungen) Einfluss auf die Enzymgeschwindigkeit bzw. das Verhältnis der entstehenden Produkte nimmt.

Die so gewonnenen physiologischen und biochemischen Erkenntnisse über GVI\_GH5-1 erlauben es abzuwägen, ob dieses Enzym auch kommerziell Anwendung finden kann. Da in dieser Arbeit bewiesen werden konnte, dass auch eine rekombinante Form dieses Proteins nach heterologer Expression noch hydrolytische Aktivität besitzt, eignet es sich möglicherweise ebenso für gezieltes *protein-engineering*. Die so erreichten verbesserten enzymatischen Eigenschaften können GVI\_GH5-1 für industrielle Applikationen, wie sie bereits für einige mikrobielle Mannanasen etabliert wurden (z.B. als Waschmittel-Additive oder in der Papierproduktion), zunehmend attraktiv machen [18].

Aufgrund der für die Zukunft zu erwartenden steigenden Anzahl verfügbarer Sequenzdaten wird es möglich sein noch deutlich mehr Spezies zu identifizieren, die ein Mannanase-kodierendes Gen besitzen. Darum müsste ebenfalls überprüft werden, ob nicht auch weitere Metazoen solche Enzyme erst infolge eines horizontalen Gentransfers akquiriert haben.

## Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Natural History Museum London: Coleoptera research. [Online] URL: <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/life-sciences/terrestrial-invertebrates/research/coleoptera-research/index.html> (30.08.2013).
2. Dettner K, Peters W (2003): Lehrbuch der Entomologie. Berlin, Heidelberg: *Spektrum Akademischer Verlag*, 2. Auflage.
3. Ponomarenko AG (2000): New Beetles from the Permian of European Russia. *Palaentological Journal*, 34: S312-S316.
4. Martin K, Allgaier C (2011): Ökologie der Biozönosen. Berlin, Heidelberg: *Springer-Verlag*, 2. Auflage.
5. Schulz S (1998): Insect-Plant-Interactions- Metabolism of Plant Compounds to Pheromones and Allomones by Lepidoptera and Leaf Beetles. *European Journal of Organic Chemistry*, 1: 13-20.
6. Termonia A *et al.* (2001): Feeding specialization and host-derived chemical defense in Chrysomeline leaf beetles did not lead to an evolutionary dead end. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7): 3909-3914.
7. Feld BK, Pasteels JM, Boland W (2001): *Phaedon cochleariae* and *Gastrophysa viridula* (Coleoptera: Chrysomelidae) produce defensive iridoid monoterpenes *de novo* and are able to sequester glycosydically bound terpenoid precursors. *Chemoecology*, 11: 191-198.
8. Hatcher PE, Paul ND, Ayres PG, Whittaker JB (1994): Interactions between *Rumex spp.*, herbivores and a rust fungus: *Gastrophysa viridula* grazing reduces subsequent infection by *Uromyces rumicis*. *Functional Ecology*, 8: 265-272.
9. Heitefuss R (2000): Pflanzenschutz: Grundlagen der praktischen Phytomedizin. Stuttgart: *Georg Thieme Verlag*, 3. neubearbeitete Auflage.
10. Florida State University, Davidson MW: Molecular Expressions™: Plant Cell Wall. [Online] URL: <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html>. (30.08.2013).
11. University of Georgia, Complex Carbohydrate Research Center: Plant Cell Walls. [Online] URL: <http://www.crcr.uga.edu/~mao/cellwall/main.htm>. (30.08.2013).
12. Pauchet Y, *et al.* (2010): Diversity of Beetle Encoding Novel Plant Cell Wall Degrading Enzymes. *PLoS ONE*, 5(12): e15635.
13. Aspeborg H, Coutinho PM, *et al.* (2012): Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). *BMC Evolutionary Biology*, 12: 186.
14. Université d'Aix-Marseille: carbohydrate-active enzymes: Glycoside Hydrolase family classification. [Online] URL: <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html> (30.08.2013).

15. Högglund P (2001): Mannan-hydrolysis by hemicellulases: enzyme-polysaccharide interaction of a modular  $\beta$ -mannanase. Lund University Sweden: Doctoral Dissertation.
16. McCarter JD, Withers SG (1994): Mechanisms of enzymatic glycosid hydrolysis. *Current Opinion in Structural Biology*, 4: 885-892.
17. Nelson D, Cox M (2009): Lehninger Biochemie. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 4. Auflage, 2011.
18. Dhawan S, Kaur J (2007): Microbial Mannanases: An Overview of Production and Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27: 197-216.
19. Kirsch R, Wielsch N, *et al.* (2012): Combining proteomics and transcriptome sequencing to identify active plant-cell-wall-degrading enzymes in a leaf beetle. *BMC Genomics*, 13: 587.
20. Acuña R, Padilla BE, *et al.* (2012): Adaptive horizontal transfer of a bacterial gene to an invasive insect pest of coffee. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(11): 4197-4202.
21. Nation JL (2001): Insect Physiology and Biochemistry. Florida (USA): CRC Press LLC, 1st Edition.
22. National Center for Biotechnology Information (Maryland/USA): elektronische Suche von „*Gastrophysa viridula*“ in „Nucleotide“. [Online] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=gastrophysa+viridula> (30.08.2013).
23. Martinková Z, Honěk A (2004): *Gastrophysa viridula* (Coleoptera: Chrysomelidae) and biocontrol of *Rumex*- a review. *Plant Soil Environment*, 50(1): 1-9.
24. Lagadic L (1994): Some characteristics of digestive  $\alpha$ -glycosidases from adults of *Bruchus affinis* Frölich, in relation with intestinal pH. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 108(2-3): 249-253.
25. Allee LL *et al.* (1990): Infection by *Beauveria bassiana* of *Leptinotarsa decemlineata* larvae as a consequence of fecal contamination of the integument following *per os* inoculation. *Mycopathologia*, 111(1): 17-24.
26. Johnson KS, Rabosky D (2000): Phylogenetic distribution of cysteine proteinases in beetles: evidence for an evolutionary shift to an alkaline digestive strategy in Cerambycidae. *Comparative Biochemistry and Physiology- Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 126(4): 609-619.
27. Koller CN, Bauer LS, Hollingworth RM (1992): Characterization of the pH-Mediated Solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* Native  $\delta$ -Endotoxin Crystals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 184(2): 692-699.

28. Girard C, *et al.*(1998): High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28: 229-237.
29. Murdock LL, *et al.* (1987): Cysteine Digestive Proteinases in Coleoptera. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 87B(4): 783-787.
30. Davies GJ, Wilson KS, Henrissat B (1997): Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, 321: 557-559.
31. Larsson AM, Anderson L, *et al.* (2006): Three-dimensional Crystal Structure and Enzymic Characterization of  $\beta$ -Mannanase Man5A from Blue Mussel *Mytilus edulis*. *Journal of Molecular Biology*, 357: 1500-1510.
32. Mizutani K, *et al.* (2012): Structure of  $\beta$ -1,4-mannanase from the common sea hare *Aplysia kurodai* at 1.05 Å resolution. *Acta Crystallographica*, F68: 1164-1168.

Bildnachweise:

Abb. 1: Hägglund P (2001): Mannan-hydrolysis by hemicellulases: enzyme-polysaccharide interaction of a modular  $\beta$ -mannanase. Lund University Sweden: Doctoral Dissertation.

Abb. 2: Revell Ben (2010): *Gastrophysa viridula*- Green Dock Leaf Beetle. URL: <http://www.benrevell.co.uk/natureweb/others/pages/others84.php> [Online] (31.08.2013)

Abb. 11: eigene Erstellung mithilfe der Software „ChemSketch 12.0“

Anhang 5a, 5b: Bedienungsanleitung zu „pIB/V5-His TOPO<sup>®</sup> TA Expression Kit“

## Anhang

### Anhang 1: Herstellungsvorschrift von Polyacrylamid-Gelen für eine SDS-PAGE

	Trenngel (12%)			Sammelgel (5%)		
	End- konzentration	Volumen in ml		End- konzentration	Volumen in ml	
		Criterion	Mini Protean		Criterion	Mini Protean
H <sub>2</sub> O		3,5	1,2		2,7	1,4
1% Galactomannan	0,1%	1,5	0,5	-	-	-
30% AA-BisAA-Lösung	12%	6	2	5%	0,67	0,33
1,5 M Tris pH 8,8	0,375 M	3,75	1,25	-	-	-
1,5 M Tris pH 6,8	-	-	-	0,125 M	0,5	0,25
10% SDS	0,1%	0,15	0,05	0,1%	0,04	0,02
10% APS	0,1%	0,15	0,05	0,1%	0,04	0,02
TEMED	0,04%	0,01	0,002	0,01%	0,004	0,002
<b>Gesamtvolumen</b>		<b>15 ml</b>	<b>5 ml</b>		<b>4 ml</b>	<b>2 ml</b>

### Anhang 2: Programm der Sanger-Sequenzierung

Phase	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
2. Denaturierung	96 °C	20 s
3. Primer-Hybridisierung	55 °C	20 s
4. Elongation	60 °C	240 s

} 25x

### Anhang 3: Ergebnis der Sequenzierung des GVI\_GH5-1-Inserts

a: 5'-terminale Region des pIB/V5-His-Vektors und Start des ORF von GVI\_GH5-1

	60                      70                      80
▼ Translate ► Consensus	TGGTGGAAATGCCCCTTACCATGGAAGTCGCTGTGC
▼ Top	G G I A L T M E V A V V E L P L P W K S L W W W N C P Y H G S R C C
▼ Bottom	P P I A R V M S T A T I T S N G K G H F D S H H F Q G . W P L R Q P
► 1-0piE2F_A11.ab1 (19>292) →	TGGTGGAAATGCCCCTTACCATGGAAGTCGCTGTGC
► 2-0piE2F_B11.ab1 (10>246) →	TGGTGGAAATGCCCCTTACCATGGAAGTCGCTGTGC
► 6-0piE2F_C11.ab1 (22>298) →	TGGTGGAAATGCCCCTTACCATGGAAGTCGCTGTGC
► 7-0piE2F_D11.ab1 (21>295) →	TGGTGGAAATGCCCCTTACCATGGAAGTCGCTGTGC
► 10-0piE2F_E11.ab1 (6>294) →	TGGTGGAAATGCCCCTTACCATGGAAGTCGCTGTGC
► 12-0piE2F_F11.ab1 (11>338) →	TGGTGGAAATGCCCCTTACCATGGAAGTCGCTGTGC
► 13-0piE2F_G11.ab1 (19>370) →	TGGTGGAAATGCCCCTTACCATGGAAGTCGCTGTGC
► 15-0piE2F_H11.ab1 (10>385) →	TGGTGGAAATGCCCCTTACCATGGAAGTCGCTGTGC
GVI_GH5-1 (1>1119) →	↓ ATGAAAGTCGCTGTGC

**b:** Ende des ORF von GVI\_GH5-1 und 3'-terminale Region des pIB/V5-His-Vektors (unkorrigierte Rohdaten)

	1170	1180	1190	1200
▼ Translate ▶ Consensus	ACAACGGCAATGTCCATGTGACCCT- <b>YAAGGGCAATTCTGCA</b>			
▼ Top	<p style="text-align: center;">N G N V H V T L K G N S A  T T A M S M . P X R A I L Q  Q R Q C P C D P X G Q F C :</p>			
▼ Bottom	<p style="text-align: center;">L P L T W T V R L P L E A  V A I D M H G X L A I R C  C R C H G H S G . P C M Q L</p>			
▶ 1-OpiE2R_A12.ab1 (18>490) ←	ACAACGGCAATGTCCATGTGACCCT- <b>CAAGGGCAATTCTGCA</b>			
▶ 2-OpiE2R_B12.ab1 (13>552) ←	ACAACGGCAATGTCCATGTGACCCT- <b>CAAGGGCAATTCTGCA</b>			
▶ 6-OpiE2R_C12.ab1 (11>614) ←	ACAACGGCAATGTCCATGTGACCCT- <b>TAAGGGCAATTCTGCA</b>			
▶ 7-OpiE2R_D12.ab1 (12>556) ←	ACAACGGCAATGTCCATGTGACCCT- <b>AAGGGCAATTCTGCA</b>			
▶ 10-OpiE2R_E12.ab1 (13>552) ←	ACAACGGCAATGTCCATGTGACCCT- <b>AAGGGCAATTCTGCA</b>			
▶ 12-OpiE2R_F12.ab1 (6>155) ←	CCCA- <b>GGGCCCT-CAAGGGCAATTCTGCA</b>			
▶ 13-OpiE2R_G12.ab1 (12>678) ←	ACAACGGCAATGTCCATGTGACCCT- <b>CAAGGGCAATTCTGCA</b>			
▶ 15-OpiE2R_H12.ab1 (15>716) ←	ACAACGGCAATGTCCATGTGACCCT- <b>AAGGGCAATTCTGCA</b>			
GVI_GH5-1(1>1119) →	ACAACGGCAATGTCCATGTGACCCT <b>TTGA</b> ▶			

**c:** Ende des ORF von GVI\_GH5-1 und 3'-terminale Region des pIB/V5-His-Vektors (manuell korrigiert)

	1170	1180	1190	1200
▼ Translate ▶ Consensus	ACAACGGCAATGTCCATGTGACCCT <b>YAAGGGCAATTCTGCA</b>			
▼ Top	<p style="text-align: center;">N G N V H V T L K G N S A  T T A M S M . P X R A I L Q  Q R Q C P C D P X G Q F C F</p>			
▼ Bottom	<p style="text-align: center;">L P L T W T V R L P L E A S  V A I D M H G X L A I R C  C R C H G H S G . P C N Q L</p>			
▶ 1-OpiE2R_A12.ab1 (18>490) ←	ACAACGGCAATGTCCATGTGACCCT <b>CAAGGGCAATTCTGCAC</b>			
▶ 2-OpiE2R_B12.ab1 (13>552) ←	ACAACGGCAATGTCCATGTGACCCT <b>CAAGGGCAATTCTGCAC</b>			
▶ 6-OpiE2R_C12.ab1 (11>614) ←	ACAACGGCAATGTCCATGTGACCCT <b>TAAGGGCAATTCTGCAC</b>			
▶ 7-OpiE2R_D12.ab1 (12>556) ←	ACAACGGCAATGTCCATGTGACCCT- <b>AAGGGCAATTCTGCAC</b>			
▶ 10-OpiE2R_E12.ab1 (13>552) ←	ACAACGGCAATGTCCATGTGACCCT <b>AAGGGCAATTCTGCAC</b>			
▶ 12-OpiE2R_F12.ab1 (6>155) ←	CCCA- <b>GGGCCCTCAAGGGCAATTCTGCAC</b>			
▶ 13-OpiE2R_G12.ab1 (12>678) ←	ACAACGGCAATGTCCATGTGACCCT <b>CAAGGGCAATTCTGCAC</b>			
▶ 15-OpiE2R_H12.ab1 (15>716) ←	ACAACGGCAATGTCCATGTGACCCT- <b>AAGGGCAATTCTGCAC</b>			
GVI_GH5-1(1>1119) →	ACAACGGCAATGTCCATGTGACCCT <b>T</b> ▶			

**Anhang 4a: Nukleotidsequenz des GVI-GH5-1-Gens (GeneBank: HM175828.1)**

```

1  aggcagtcac  tcgaaatcga  cgaaagaacc  atgaaagtgc  ctgtggtatt  cgtgtagacc
61  cttggattgc  attccatcga  cgccttcctc  aaggtccaga  acaatgcttt  gtactacaac
121 aacgacaaag  tgttcctttc  cggtgccaac  atagcttggt  acaactatgg  atgggacttc
181 ggcagcggcg  cctacagcaa  cgtcaagacc  aactaccaac  aagccctcga  cgagatctcc
241 caagccggcg  gcaactccat  cagagtttgg  gtgcacatcg  acggccagtg  gtgcgcgaag
301 ttogactctg  agggctacgc  cacoggatca  gacaccgact  cctgatcag  cgacctcggc
361 gagctcctcg  actacgcgga  acagaagaac  gtgttcgtca  tcctctgctt  gtggaacctc
421 gcogtgcg  ccaccaagat  gtcctctc  tacaccgacg  acgccaagct  gcagagttac
481 ttggagaagg  tgctcaagcc  catggccgcc  ggcctcaagg  acaagaaagc  gctcgccgct
541 tgggacatca  tcaacgagcc  catcgggtcg  ttgaccacag  gcctcaccga  ttgaaacccc
601 tgctacgaca  ccaacaactt  gatcaacagc  ggggcccact  ggaccaacgt  ccatctcaag
661 cccaaggacg  tgctcaagtt  catcaatctc  cacgccgacg  ccatcaaatc  ggctgacccc
721 aaggcgctgg  tcaactgtgg  cgagtccagt  gagctgacgg  ccaccacat  ttgagagaaa
781 tgccgcgaca  tgtacagcga  cagctgtctg  gtccggtgct  gcggtaaagc  cctgggaacc
841 atogatttct  accagttgca  cagctacact  tggaaacggt  ctttctcgac  ctccagttcc
901 ttcaagaacg  cagcagcagc  cttcaagtcc  gacaaaccca  tcgtctggtg  agaattcgcg
961 acgtgttgca  gcgagctgca  agactccgcc  aagaactacc  agtacctcta  caactccggc
1021 ttctcggggg  ccctcagctg  gcagtacaac  gaaggtggaa  actgtgctga  ccggaagtgc
1081 gttatcgacc  agggaatgtc  tgccatcaaa  gactataact  acaacggcaa  tgtccatgtg
1141 acccttcgaa  tgttogatgt  gtgagaccag  ttttgtact  tgaattctaa  tgaaaccaat
1201 gaagtttag

```

Der ORF ist durch ein Start- sowie ein Stoppcodon (jeweils rot unterstrichen) begrenzt.

Die Bindungsstellen der PCR-Primer **GVI\_GH5-1-fw** und **GVI\_GH5-1-rev** sind markiert.

#### Anhang 4b: Aminosäuresequenz des GVI\_GH5-1-Genprodukts

```

1  MKVAVVFVLA LGLHSIDAFL KVQNNALYYN NDKVFLSGAN IAWNYGWDF
51  GSGAYSNVKT NYQQALDEIS QAGGNSIRVW VHIDQWSPK FDSEGYATGS
101 DTDSLISDLG ELLDYAEQKN VFVILCLWNL AVAPTKMLPL YTDDAKLQSY
151 LEKVLKPMMA GLKDKKALAA WDIINEPIGS LTQGLTDSNP CYDTNNLINS
201 GADWTNVHLK PKDVLKFINL HADAIKSADP KALVTVGESS ELTATTICEK
251 CRDMYSDSCL VGAGGKALGT IDFYQLHSYT WNGAFSTSSP FKNAAAAFKS
301 DKPIVVGEFA TCCSELQDSA KNYQYLYNSG FSGALSWQYN EGGNCADPKS
351 VIDQGMSAIK DYTNGNVHV TL

```

Das aminoternale Signalpeptid ist grün hervorgehoben.

Angabe laut ExPASy „SignalP 4.1 Server“ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) unter Verwendung der GVI\_GH5-1-Aminosäuresequenz und Beibehaltung der Standardeinstellungen.

Es wurden keine putativen N-Glykosylierungs-Motive gefunden.

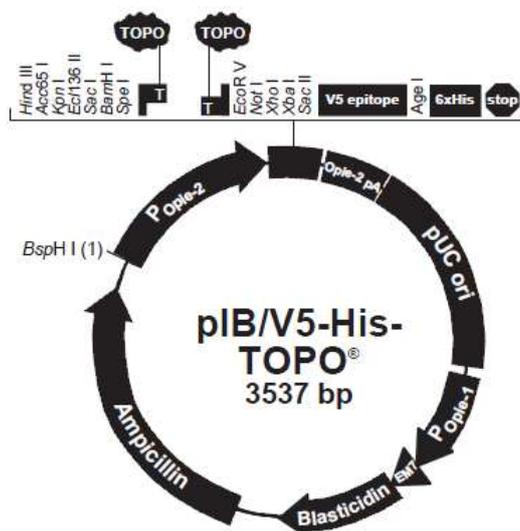
Angabe laut ExPASy „NetNGlyc 1.0 Server“ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) unter Verwendung der GVI\_GH5-1-Aminosäuresequenz und Beibehaltung der Standardeinstellungen.

Achtung: Deren Vorhandensein ist trotzdem möglich, da keine Arthropoden-spezifische Suchmaschine verwendet wurde.

Das Molekulargewicht des sekretierten Proteins (Signalpeptid bereits entfernt) beträgt 38,8 kDa.

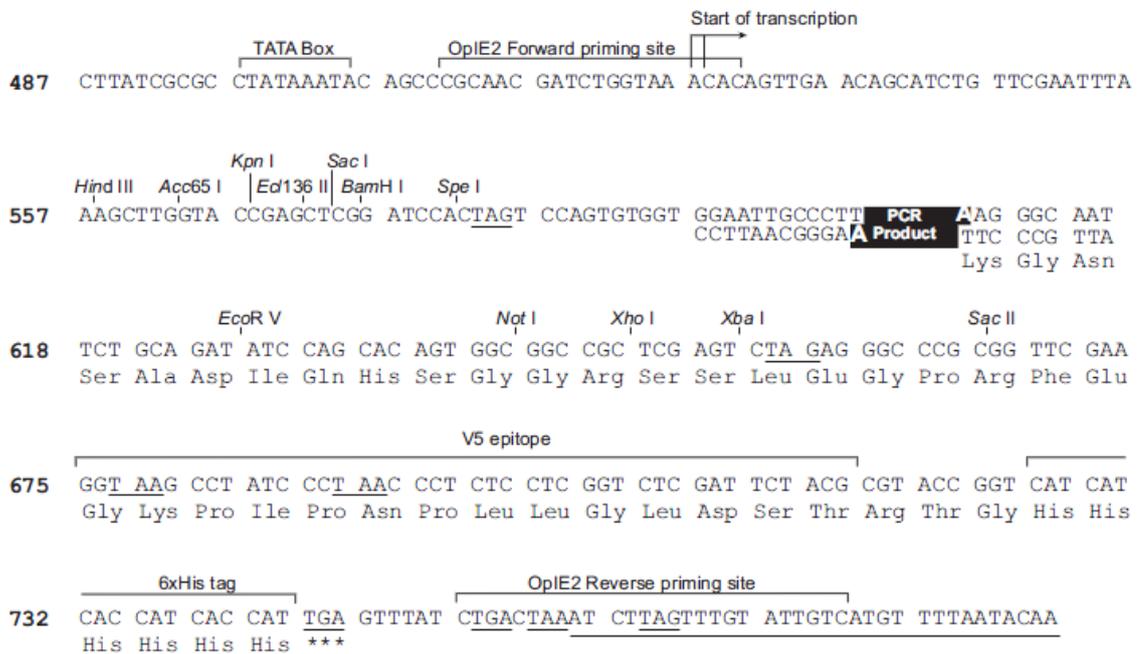
Angabe laut ExPASy „ProtParam“ (<http://web.expasy.org/protparam/>)

#### Anhang 5a: Genetische Konstitution des pIB/V5-His-Vektors (schematisch)



Promotoren:	P <sub>Opie-1</sub> , P <sub>Opie-2</sub> , EM7
Origin of replication:	pUC ori
Poly-(A)-Signal:	Opie-2 pA
Resistenzgene:	Ampicillin Blasticidin

### Anhang 5b: Nukleotidsequenz des für Transkription und Translation des GVI\_GH5-1-V5-His<sub>6</sub>-Proteins relevanten Bereichs auf dem pIB/V5-His-Vektor



### Anhang 5c: Aminosäuresequenz des GVI\_GH5-1-V5-His<sub>6</sub>-Proteins

1 FLKVQNNALY YNNDKVFLSG ANIAWYNYGW DFGSGAYSNV KTNYYQQALDE

51 ISQAGGNSIR VVWHIDGQWS PKFDSEGYAT GSDTDSLISD LGELLDYAEQ

101 KNVVFILCLW NLAVAPTKML PLYTDDAKLQ SYLEKVLKPM AAGLKDKKAL

151 AAWDIINEPI GSLTQGLTDS NPCYDTNNLI NSGADWTNVH LKPKDVLKFI

201 NLHADAIKSA DPKALVTVGE SSELTATTIC EKCRDMYSDS CLVGAGGKAL

251 GTIDFYQLHS YTWNGAFSTS SPFKNAAAAF KSDKPIVVGE FATCCSELQD

301 SAKNYQYLYN SGFSGALSWQ YNEGGNCADP KSVIQGMSA IKDYTYNGNV

351 HVTLKGNMAD IQHSGGRSSL EGPRFEGKPI **PNPLLGLDST** RTG**HHHHHH**

Das V5-Epitop ist in **blau**, das His<sub>6</sub>-tag hingegen in **orange** hervorgehoben.

Das Molekulargewicht des Proteins beträgt 43,6 kDa.

Angabe laut ExPASy „ProtParam“ (<http://web.expasy.org/protparam/>)

### Anhang 6: Zusammensetzung der verwendeten Puffer, Lösungen, Medien, Enzyme und Standards

<b>Accu Prime™ Taq DNA-Pol. HF</b>	20 mM Tris-HCl pH 8,0 0,1 mM EDTA 1 mM DTT 50% (v/v) Glycerol 5 U/μl Taq Polymerase	<b>Accu Prime™ PCR-Puffer I, 10x, pH 8,9</b>	600 mM Tris-SO <sub>4</sub> 180 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20 mM MgSO <sub>4</sub> je 2 mM dNTP 10% (v/v) Glycerol
<b>Blockierlösung</b>	5% (w/v) Milchpulver 0,1% (v/v) Tween-20 in 1x TBS pH 7,5	<b>IEF- Anodenpuffer, 10x</b>	7 mM Phosphorsäure
<b>IEF- Kathodenpuffer, 10x</b>	20 mM Lysin, 20 mM Arginin	<b>IEF- Probenpuffer</b>	50% (v/v) Glycerol
<b>IEF-Standard</b>	50% (v/v) Glycerol 0,02% (w/v) NaN <sub>3</sub> 16,5 mg Gesamtprotein <sup>1</sup>	<b>Kongorot- Färbelösung, pH 8,3</b>	0,1 M Tris-HCl 1 mg/ml Kongorot
<b>Laemli- Probenpuffer, 2x pH 6,8</b>	65,8 mM Tris-HCl 2,1% (w/v) SDS 26,3% (w/v) Glycerol 0,01% Bromphenol- blau	<b>LB<sup>Amp</sup>-Medium</b>	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl 100 μg/ml Ampicillin
<b>O'GeneRuler™ DNA- Größenstandard</b>	10 mM Tris-HCl pH 7,6 10 mM EDTA 0,025% Orange G 0,005% Xylencyanol 10% (v/v) Glycerol 0,1 μg/μl DNA	<b>Orange DNA- Ladepuffer, 6x, pH 7,6</b>	10 mM Tris-HCl 60 mM EDTA 0,15% Orange G 0,03% Xylencyanol 60% (v/v) Glycerol
<b>PageRuler™ Plus Prestained Protein- Größenstandard</b>	62,5 mM Tris-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 1 mM EDTA 2% (w/v) SDS 10 mM DTT 1 mM NaN <sub>3</sub> 33% (v/v) Glycerol 9 rekombinante Proteine	<b>SOC-Medium</b>	2% Trypton 0,5% Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glukose

<b>Substratlösung für HRP, pH 8,5</b>	10 ml Tris-HCl 0,1 M 22 µl Cumarsäure 50 µl Luminol 3 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<b>TBS-Puffer, 1x pH 7,5</b>	20 mM Tris 500 mM NaCl
<b>TG-Puffer, 1x pH 8,3</b>	25 mM Tris 192 mM Glycin	<b>TGS-Puffer, 1x pH 8,3 (Laufpuffer)</b>	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
<b>Transfer-Puffer</b>	1x TG-Puffer pH 8,3 10% (v/v) Methanol	<b>Zymogram Renaturierungspuffer, 10x</b>	2,5% (v/v) Triton X-100

<sup>1</sup> Phycocyanin, β-Lactoglobulin B, bovine Carboanhydrase, humane Carboanhydrase, equines Myoglobin, humanes Hämoglobin A, humanes Hämoglobin C, lentiles Lektin, Cytochrom C

## Danksagung

Im Anbetracht, dass es sich bei dieser wissenschaftlichen Arbeit um die letzte Hürde meines Bachelorstudiums handelt, möchte ich mich an dieser Stelle bei einigen Menschen bedanken, die mich dabei sehr unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt Herrn Dr. Yannick Pauchet für die hervorragende Betreuung des überlassenen Themas. Seine konstruktiven Anregungen haben nicht nur zwei differentielle Herangehensweisen entstehen lassen, sondern auch merklich zum guten Gelingen des Vorhabens beigetragen. In großzügiger Weise unterstützte er mich außerdem bei der Durchführung von Experimenten und stand mir mit seinem Rat bei allen Fragenstellungen zur Seite.

Herrn Prof. Dr. Oliver H. Krämer möchte ich für die Erstbegutachtung herzlich danken, für die er sich trotz seines Umzugs nach Mainz bedenkenlos engagierte.

Bei Herrn Dipl.-Biol. Andre Busch bedanke ich mich, dass er sich neben seinem laufenden Doktoranden-Projekt die Zeit genommen hat, um diese Thesis zu lesen und kritisch zu prüfen.

Für die zuverlässige Bereitstellung von Labormaterialien, die Anleitung so mancher Experimente und besonders das nette Miteinander bin ich unseren technischen Assistentinnen Nora Petersen und Bianca Wurlitzer zu großem Lob verpflichtet.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Entomologie möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft im Labor, als auch den alltäglich fröhlichen und harmonischen Umgang ein großes „Danke, liebe Enties!“ aussprechen.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

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, kenntlich gemacht sind und
- ✓ die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Studien- oder Prüfungsleistung war.

Jena, den 12. September 2013

.....

Tobias Roth