

Ernst-Abbe-Hochschule Jena
Hochschule für angewandte Wissenschaften

Fachbereich Medizintechnik/Biotechnologie
Studiengang Biotechnologie

Heterologe Expression und Charakterisierung der
Substratspezifität von beta-Glucosidasen der Maikäferlarve
(*Melolontha melolontha*)

Bachelorarbeit

vorgelegt von Alexander Riedel

Hochschulbetreuer: Prof. Dr. rer. nat. Werner Reichardt

Betrieblicher Betreuer: Meret Huber, Dr. Sandra Irmisch

Institut: Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena

Bearbeitet von: Alexander Riedel

Matrikelnummer: 635927

Studiengang: Biotechnologie

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
1. Einleitung.....	1
1.1 BETA-GLUCOSIDASEN	2
1.2 TARAXINIC ACID B-D-GLUCOPYRANOSYLESTER: EIN SESQUITERPENLACTONGLUCOSID AUS DER <i>TARAXACUM OFFICINALE</i> WURZEL	5
1.3 TA-G STOFFWECHSELWEG IM MAGEN VON <i>MELOLONTHA MELOLONTHA</i> ENGERLINGEN.....	6
1.4 ZIEL DIESER ARBEIT	7
2. Material & Methoden.....	8
2.1 CHEMIKALIEN	8
2.2 MIKROBIOLOGIE.....	8
2.2.1 Bakterienstämme und Insektenzellen.....	8
2.3 DNA TECHNIKEN	8
2.3.1 Synthetische Oligonukleotide / Primer	9
2.3.2 Vektoren	10
2.3.3 PCR Methoden.....	11
2.3.4 Amplifizierung der <i>M. melolontha</i> Glucosidasegene aus TOPO-Plasmiden.....	11
2.3.5 5' und 3'-RACE- und Nested-PCR.....	12
2.3.6 Kolonie PCR.....	13
2.3.7 Sequenzierung	14
2.3.8 Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion	15
2.3.9 Ligation und Transformation	15
2.3.10 Plasmidpräparation	16
2.3.11 Restriktionsverdau.....	16
2.3.12 Konzentrationsbestimmung	17
2.3.13 Transfektion der Expressionsvektoren in High-Five Zellen	17
2.4 GENEXPRESSION UND PROTEINBIOCHEMIE.....	17
2.4.1 Heterologe Expression der β -Glucosidasen in HighFive Zellen	17
2.4.2 Aufkonzentrieren und Umpuffern der Glucosidasen	18
2.4.3 SDS-PAGE und Western Blot	18
2.4.4 Enzymassays	19
2.4.5 Chromatographie und Massenspektrometrie.....	20

2.5 COMPUTERGESTÜTZTE ANALYTIK	22
2.5.1 Aminosäuresequenzanalyse und Phylogenetische Analyse.....	22
3. Ergebnisse	23
3.1. SEQUENZANALYSE PUTATIVER BETA-GLUCOSIDASEN	23
3.2. KLONIERUNG	27
3.3. HETEROLOGE EXPRESSION.....	28
3.4 CHARAKTERISIERUNG DER PUTATIVEN BETA-GLUCOSIDASEN.....	30
4. Diskussion.....	35
DIE BETA-GLUCOSIDASEN AUS M. MELOLONTHA ZEIGEN TYPISCHE SEQUENZMOTIVE ANDERER INSEKTEN BETA-GLUCOSIDASEN.....	35
M. MELOLONTHA BETA-GLUCOSIDASEN HYDROLYSIEREN TA-G UND ANDERE GLYKOSYLIERTE ABWEHRSTOFFE.	36
KLASSIFIKATION DER M. MELOLONTHA BETA-GLUCOSIDASEN NACH FERREIRA UND TERRA.....	37
5. Zusammenfassung.....	40
6. Literaturverzeichnis	41
Danksagung	44
Selbstständigkeitserklärung	45

Tabellenverzeichnis

TABELLE 2.1: AUFLISTUNG ALLER FÜR DIESE ARBEIT GENUTZTEN GENSPEZIFISCHEN PRIMER.....	9
TABELLE 2.2 AUFLISTUNG DER IN DIESER ARBEIT GENUTZTEN VEKTOR PRIMER.....	10
TABELLE 2.3: AUFLISTUNG DER IN DIESER ARBEIT GENUTZTEN PRIMER FÜR RACE- UND NESTED-PCR	10
TABELLE 2.4: AUFLISTUNG ALLER FÜR DIE ARBEIT GENUTZTEN VEKTOREN	10
TABELLE 2.5: KOMPONENTEN EINES PCR-ANSATZES	11
TABELLE 2.6: TEMPERATURPROFIL DER PHUSION-PCR (PROGRAMM: „PHUSION“)	11
TABELLE 2.7: KOMPONENTEN EINES RACE-PCR ANSATZES.....	12
TABELLE 2.8: KOMPONENTEN EINES NESTED-PCR ANSATZES.....	12
TABELLE 2.9: KOMPONENTEN EINES KOLONIE PCR-ANSATZES.....	13
TABELLE 2.10: TEMPERATURPROFIL DER KOLONIE PCR (PROGRAMM: „KOLONIE PCR“)	13
TABELLE 2.11: KOMPONENTEN EINES SEQUENZIERANSATZES.....	14
TABELLE 2.12: TEMPERATURPROFIL DER SEQUENZIER-PCR	14
TABELLE 2.13: ANSATZ KONTROLLVERDAU FÜR PIB/V5-HIS-TOPO	16
TABELLE 2.14: ANSATZ KONTROLLVERDAU FÜR PCR/TOPO-BLUNT	16
TABELLE 2.15: PUFFERZUSAMMENSETZUNG WESTERN BLOT	18
TABELLE 2.16: ELUTIONSGRADIENT DER HPLC FÜR DIE ZUCKERANALYSE	21
TABELLE 2.17: ELUTIONSGRADIENT DER HPLC FÜR DIE MBOA ANALYSE	21
TABELLE 2.18: ZUGANGSNUMMER DER ZUR PHYLOGENETISCHEN ANALYSE VERWENDETEN SEQUENZEN.....	22

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1.1: NACH INSEKTENFRAB KOMMEN DIE BETA-GLUCOSIDASE UND DER GLYCOSYLIERTE ABWEHRSTOFF (TOX-GLC) ZUSAMMEN UND ES BILDET SICH EIN TOXISCHES AGLYKON (TOX)	1
ABBILDUNG 1.2: REAKTIONSMCHANISMUS BEI GH1 BETA-GLUCOSIDASEN. GLUTAMINSÄURERESTE IM ENZYM DIENEN ALS SÄURE/BASE KATALYSATOR UND NUKLEOPHIL.....	3
ABBILDUNG 1.3: GRUNDSTRUKTUREN DER SESQUITERPENLACTONE. A: GERMACRANOLIDE, B: EUDESMANOLIDE, C: GUAIANOLIDE	5
ABBILDUNG 1.4: TARAXINIC ACID B-D-GLUCOPYRANOSYLESTER. EIN GLYCOSYLIERTES GERMACRANOLID SESQUITERPENLACTON.....	6
ABBILDUNG 3.1: PROTEINSEQUENZVERGLEICH DER PUTATIVEN BETA-GLUCOSIDASEN MIT BEREITS CHARAKTERISIERTEN BETA-GLUCOSIDASEN UND MYROSINASEN.....	25
ABBILDUNG 3.2: PHYLOGENETISCHER BAUM BEREITS CHARAKTERISierter BETA-GLUCOSIDASEN UND PUTATIVER M. MELOLONTHA BETA-GLUCOSIDASEN.....	26
ABBILDUNG 3.3: GELELEKTROPHORETISCHE ANALYSE DER 5' UND 3' RACE (BANDEN 1R BIS 4R) UND NESTED-PCR PRODUKTE (BANDEN 1N BIS 4N).....	27
ABBILDUNG 3.4: GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG DER MIT BAMHI UND XBAI KONTROLLVERDAUTEN PLASMIDE.....	28
ABBILDUNG 3.5: AUF FOTOPAPIER ENTWICKELTER WESTERN BLOT MIT CHEMOLUMINESZENT ANGEFÄRBTEN PROTEINBANDEN.....	29
ABBILDUNG 3.6: QUALITATIVER GLUCOSEGEHALT IN ENZYMASSAYS DER BETA-GLUCOSIDASEN MIT TA-G ALS SUBSTRAT.....	31
ABBILDUNG 3.7: QUALITATIVER GLUCOSEGEHALT IN ENZYMASSAYS DER BETA-GLUCOSIDASEN MM_BGLC_6 UND MM_BGLC_15 MIT TA-G ALS SUBSTRAT.	32
ABBILDUNG 3.8: QUALITATIVER GLUCOSEGEHALT IN ENZYMASSAYS DER BETA-GLUCOSIDASEN MIT CELLOBIOSE ALS SUBSTRAT.	32
ABBILDUNG 3.9: QUALITATIVER GLUCOSEGEHALT IN ENZYMASSAYS DER BETA-GLUCOSIDASEN MIT DIMBOA-GLC ALS SUBSTRAT.	33
ABBILDUNG 3.10: QUALITATIVER MBOA-GEHALT IN ENZYMASSAYS DER BETA-GLUCOSIDASEN MIT DIMBOA-GLC ALS SUBSTRAT.	33
ABBILDUNG 3.11: QUALITATIVER SALICYLALKOHOLGEHALT IN ENZYMASSAYS DER BETA-GLUCOSIDASEN MIT SALICIN ALS SUBSTRAT.	34

1. Einleitung

Herbivore Insekten machen ein Viertel aller bekannten eukaryotischen Spezies der Erde aus (Scudder, 2009). Um sich gegen diese Fressfeinde zu wehren haben Pflanzen eine Vielzahl sowohl mechanischer als auch chemischer Abwehrmechanismen entwickelt. Morphologische Merkmale wie Wachse, klebrige Pflanzenhaare oder Stachel ermöglichen eine physische Abwehr von Feinden (Mithofer & Boland, 2012). Außerdem können Pflanzen Fraß tolerieren und abgefressene Pflanzenteile nachwachsen lassen um so einen Schädlingsbefall zu überstehen (Rasmann & Agrawal, 2008).

Durch die Bildung einer Vielzahl chemischer Verbindungen, sog. Sekundärmetabolite, sind Pflanzen in der Lage, Fressfeinde abzuwehren, zu töten oder die Feinde dieser herbivoren Insekten anzulocken und sich so zu schützen (Rasmann & Agrawal, 2008). Die Metabolite können ständig in der Pflanze verfügbar sein (sog. Phytoanticipine) oder sie werden - aufgrund des hohen Energieaufwands der zur Herstellung nötig ist - erst durch Insektenfraß induziert (sog. Phytoalexine) (Dale R. Walters 2014). Viele der in der Pflanze gespeicherten Abwehrstoffe liegen in einer nicht aktiven, glycosylierten Form vor um die Pflanze selbst vor ihren Phytoanticipinen zu schützen. Außerdem ist dadurch die Wasserlöslichkeit und die chemische Stabilität des Stoffes erhöht und es liegt eine veränderte biologische Aktivität vor (Furstenberg-Hagg, Zagrobelny & Bak, 2013). Um die so gespeicherten Sekundärmetabolite zu aktivieren verfügt die Pflanze über beta-Glucosidasen, welche die Hydrolyse der glycosidischen Bindung katalysieren. Wird das Gewebe der Pflanzen bei Insektenfraß zerstört, kommen die getrennt voneinander gespeicherten glycosylierten Abwehrstoffe und die beta-Glucosidasen in Kontakt miteinander und das toxische Aglykon wird freigesetzt (siehe Abbildung 1.1) (Pentzold et al., 2014).

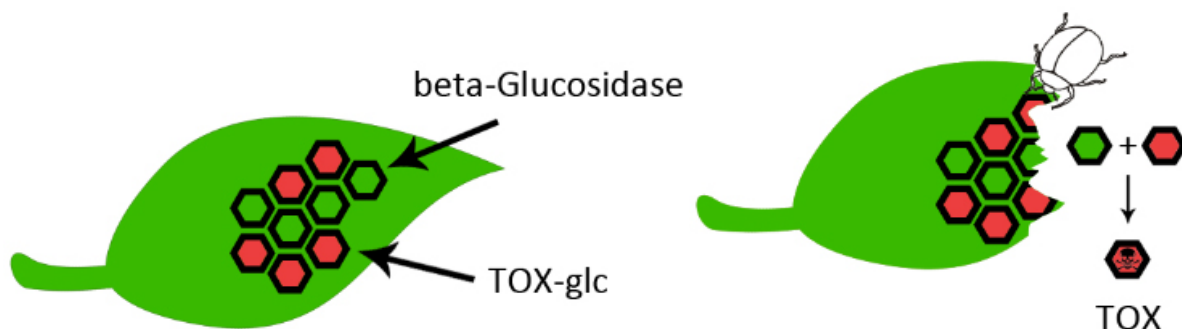


Abbildung 1.1: Nach Insektenfraß kommen die beta-Glucosidase und der glycosylierte Abwehrstoff (TOX-glc) zusammen und es bildet sich ein toxisches Aglykon (TOX)

Um die Pflanze dennoch als Nahrungsquelle nutzen zu können, haben Insekten eine Vielzahl von Strategien entwickelt um sich zu schützen. So werden gezielt Teile der Pflanze gefressen in denen sich eine geringe Konzentration der toxischen Abwehrstoffe befindet (Singer, Bernays & Carriere, 2002) oder durch die Art des Fraßes wird vermieden zu große Bereiche des Pflanzengewebes zu zerstören (Gleadow & Woodrow, 2002). Der alkalische pH Wert im Magen einiger Insektenarten führt dazu, dass beta-Glucosidasen inaktiviert werden. Die pflanzlichen beta-Glucosidasen sind vor allem in saurer Umgebung aktiv und werden so im Insektenmagen inhibiert (Pentzold et al., 2014). Die für die Verdauung des Pflanzenmaterials notwendigen endogenen beta-Glucosidasen können jedoch ebenfalls die pflanzlichen Toxine deglykosilieren und so zur Vergiftung führen. Bei einigen Arten kann eine Reduktion der beta-Glucosidaseaktivität nach Pflanzenfraß festgestellt werden womit effizient die Bildung der toxischen Aglykone im eigenen Magen verhindert wird (Pentzold et al., 2014).

1.1 beta-Glucosidasen

Beta-Glucosidasen (EC 3.2.1.21) der Glycosid Hydrolasen Familie 1 (GH1) katalysieren die Hydrolyse der glycosidischen Bindung zwischen zwei Glucosemolekülen oder zwischen einem Glucosemolekül und einem anderen Aglykon (Cairns & Esen, 2010). Diese Enzyme sind in allen Lebewesen zu finden und spielen eine wichtige Rolle beim Abbau verschiedener Glucoside und Glycolipide in Wirbeltieren sowie im Katabolismus der Zellwand Oligosaccharide, der Absonderung von Duftstoffen und der Aktivierung von chemischen Abwehrstoffen in Pflanzen (Cairns & Esen, 2010). GH1 Enzyme sind in Insekten für die Verdauung von gefressenem Pflanzenmaterial mutmaßlich von Bedeutung. Sie hydrolysieren die Di- und Oligo-beta-Saccharide der pflanzlichen Hemicellulose und Cellulose und stellen so Nahrung für das Insekt in Form von Glucose bereit (Terra & Ferreira, 1994). Außerdem sind beta-Glucosidasen aus Sechsfleck-Widderchen (*Zygaena filipendulae*) und Flohkäfern (*Phyllotreta striolata*) bekannt, die für die Bildung von toxischen Abwehrprodukten in den Insekten dienen (Beran et al., 2014; Zagrobelny & Moller, 2011). In spezialisierten Insekten wie der Kohlblattlaus (*Brevicoryne brassicae*) konnten Myrosinasen die in der Lage sind Senfölglycoside zu spalten nachgewiesen werden. Diese Enzyme sind in

Struktur und Reaktionsmechanismus den beta-Glucosidasen ähnlich, spalten jedoch eine Thioglucosidische Bindung (Cairns & Esen, 2010).

Für die Hydrolyse der glycosidischen Bindung müssen ein Nukleophil und eine Säure/Base zur Verfügung stehen. Beide sind in Form von Glutaminsäure im aktiven Zentrum des Enzyms vorhanden. Im ersten Schritt kommt es zu einem nukleophilen Angriff an das anomere Kohlenstoffatom wodurch es zur Bildung eines Glucose-Enzym-Intermediats kommt. Dabei wird das Aglycon unter Bindung an eine Hydroxygruppe abgespalten. Im zweiten Schritt, der Deglycosylation, dient ein Wassermolekül als Nukleophil für die Hydrolyse der glycosidischen Bindung, wodurch die Glucose freigesetzt wird (siehe Abbildung 1.2) (Davies & Henrissat, 1995).

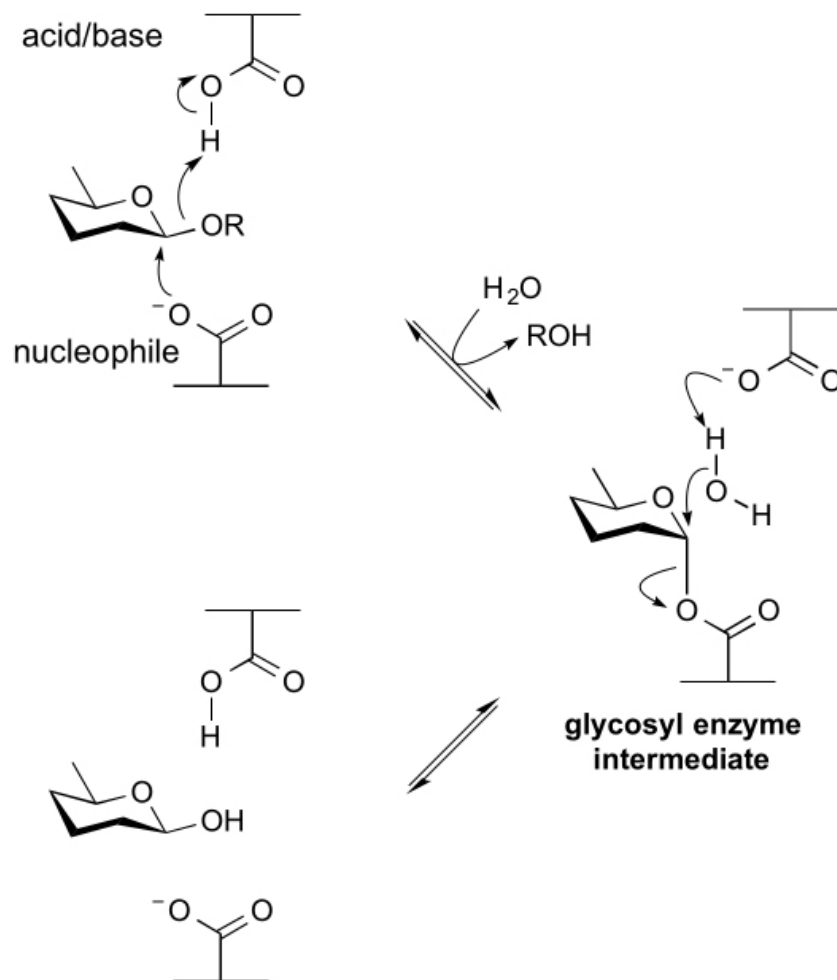


Abbildung 1.2: Reaktionsmechanismus bei GH1 beta-Glucosidasen. Glutaminsäurereste im Enzym dienen als Säure/Base Katalysator und Nukleophil.

Quelle: https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_hydrolases
modifiziert

Zentrum befindet. Die katalytische Domäne der beta-Glucosidasen weist dabei in der Regel ein Länge von 440 bis 550 Aminosäuren auf, abhängig von den Schleifen am C-Terminalen Ende der beta-Stränge der $(\beta/\alpha)_8$ -Fass Domäne (Sanz-Aparicio et al., 1998).

Der Beginn der katalytischen Reaktion wird durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Substrat und der sauren/basischen Glutaminsäure vermittelt. Die nukleophile Glutaminsäure spielt eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung der entstehenden Zwischenprodukte (Jeng et al., 2011).

Neben diesen beiden katalytischen Glutaminsäuren gibt es auch noch weitere Aminosäuren im aktiven Zentrum der beta-Glucosidasen: ein Glutamin- und Glutaminsäurerest, die Wasserstoffbrücken mit dem Substrat bilden, ein Tyrosinrest, der für die Entfernung der gebundenen Zwischenprodukte verantwortlich ist, ein Histidinrest, der an der Substratbindung beteiligt ist und eine konservierte Tryptophangruppe, die an der Aglykonbindung mitwirkt. Diese nicht-katalytisch aktiven Aminosäuren tragen vor allem zu einer günstigen Energetik der Katalyse und zur Substratbindung bei (Jeng et al., 2011).

Der pH Wert der Umgebung hat Einfluss auf die Proteinkonformation und Aktivität von beta-Glucosidasen (Johnson & Felton, 1996). So arbeiten pflanzliche beta-Glucosidasen häufig am besten bei saurem pH Wert, wohingegen einige Insektenpezies einen basischen pH Wert im Magen haben und somit beta-Glucosidasen die im alkalischen Milieu aktiv sind (Pentzold et al., 2014). Dutartre et. al zeigen in einem Experiment, dass die Aktivität der im Mais enthaltenen beta-Glucosidase im Magen von *Spodoptera frugiperda* bei pH Wert 10 um 80 % reduziert wird (Dutartre 2011).

Die Substratspezifität von beta-Glucosidasen wird allein durch das Aglykon bestimmt da als Glycon nur die Glucose in Frage kommt (Czjzek et al., 2000). Die genaue Konformation an der Bindungsstelle der beta-Glucosidasen ist variabel und bestimmt welche Substrate akzeptiert werden (Cairns & Esen, 2010). Dadurch haben sich eine Vielzahl von Glycosid Hydrolasen in Pflanzen, Insekten und anderen Lebewesen entwickelt die in der Lage sind verschiedenste Glycoside zu spalten.

1.2 Taraxinic Acid β -D-Glucopyranosylester: ein Sesquiterpenlactonglucosid aus der *Taraxacum officinale* Wurzel

Sesquiterpenlactone (STL) sind eine der größten Gruppen sekundärer Pflanzenstoffe und bieten Schutzmechanismen für Pflanzen, die diese Stoffe synthetisieren. In Pflanzen der Familie Asteraceae (Korbblütler) kann ein Großteil der 4000 bekannten STL nachgewiesen werden (Schmidt, 1999). Es wird angenommen, dass STL für den evolutionären Erfolg dieser Pflanzen zum Teil verantwortlich ist. Für die Pflanzen dienen sie als Fraßschutz vor Säugetieren auf Grund ihres bitteren Geschmacks (Zheng, 1994). Außerdem haben STL einen Einfluss auf den Stoffwechsel und das Zentralnervensystem von Insekten und wirken toxisch auf sie (Zheng, 1994). Sie zeigen zytotoxische und antimikrobielle Eigenschaften und sind deshalb auch ein Forschungsgegenstand in der Humanmedizin (Zheng, 1994).

Die biologische Aktivität der STL gegen Bakterien, Pilze, Wirbellose und Wirbeltiere wird den ungesättigten α,β -Carbonyl Gruppen zugeschrieben. Diese Gruppen binden durch die Michael-Addition an Makromoleküle und bewirken so die Inaktivierung von Proteinen im Körper der Fressfeinde (Schmidt, 1999). Besonders Enzyme die an der Zellhomöostase und der Detoxifikation einer Zelle beteiligt sind, sowie Transkriptionsfaktoren, werden durch STL inhibiert (Schmidt, 1999). Die Unspezifität der Reaktion ist der Grund, warum diese Stoffe ein breites Wirkspektrum haben. Die Mehrheit der STL-Strukturen lässt sich von den Gruppen der Germacranolide, Eudesmanolide und Guaianolide ableiten (siehe Abbildung 1.3).

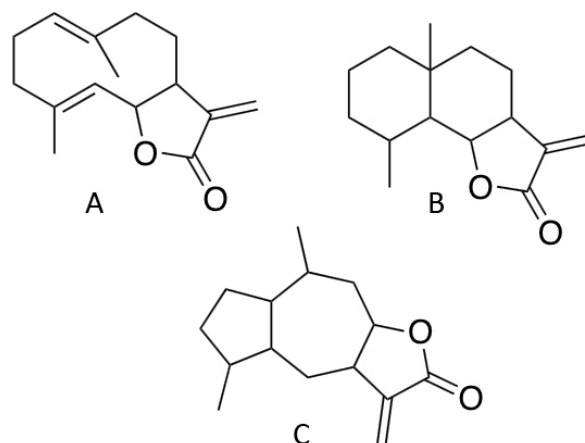


Abbildung 1.3: Grundstrukturen der Sesquiterpenlactone. A: Germacranolide, B: Eudesmanolide, C: Guaianolide

Quelle: Frederick C. Seaman (1982). "Interpreting Botanical Progress: Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the asteraceae". *The Botanical Review* 48 (2): 121-594

Der sekundäre Pflanzenstoff Taraxinic Acid β -D-Glucopyranosylester (TA-G) ist ein glykosyliertes Sesquiterpenlacton und wurde erstmals von Hänsel et al. 1980 in der Wurzel von *T. officinale* nachgewiesen (Hänsel et al., 1980). TA-G ist einer der Hauptabwehrstoffe des Löwenzahns (nicht-publizierte Daten). Auf Grund seiner hohen biologischen Aktivität wird TA-G wie viele andere Sekundärmetabolite in speziellen Milchsafte enthaltenden Zellen, den sogenannten Milchröhren, in hoher Konzentration (7%) im Löwenzahn gespeichert (Huber et al., 2015).

Dieses Sesquiterpenlacton ist ein Derivat aus der Gruppe der Germacranolide und bindet in seine glykosylierten Form über eine glycosidische Esterbindung an Glucose (siehe Abbildung 1.4).

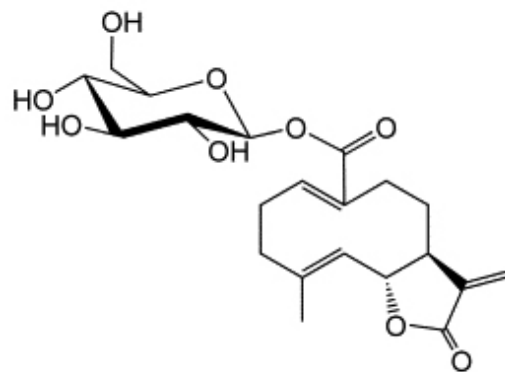


Abbildung 1.4: Taraxinic Acid β -D-Glucopyranosylester. Ein glykosyliertes Germacranolid Sesquiterpenlacton

1.3 TA-G Stoffwechselweg im Magen von *Melolontha melolontha* Engerlingen

Der Feldmaikäfer *M. melolontha* gehört zur Familie der Blatthornkäfer und kommt in Mittel- und Nordeuropa vor. Die Larven des Maikäfers werden auch Engerling genannt und leben drei bis vier Jahre lang im Boden bevor sie sich verpuppen und schlüpfen (Koch, 2000). Die Engerlinge bevorzugen und gedeihen am besten wenn sie die Wurzel des Löwenzahns fressen (R. Hauss, 1976), trotz des Vorhandenseins von toxischen Abwehrstoffen. Wenn die Pflanzenzellen durch Fraß verletzt werden, kommen pflanzeigene beta-Glucosidasen mit TA-G in Kontakt. Diese pflanzlichen Glucosidasen werden jedoch im alkalischen Magen des

Maikäferengerlings inaktiviert (nicht-publizierte Daten). Im Magen von *M. melolontha* lässt sich jedoch nur das deglykosilierte TA und kein TA-G nach Fraß an der Löwenzahnwurzel nachweisen, was darauf hindeutet, dass insekteneigene Enzyme für die Deglycosilierung verantwortlich sind (nicht publizierte-Daten). Um sich vor der giftigen Wirkung der Taraxinic Acid zu schützen wird im Magen der Larve das Tripeptid Glutathion an das deglykosilierte TA Molekül konjugiert, was zur Inaktivierung des Moleküls führt (nicht publizierte-Daten). Es ist noch nicht bekannt, ob die Deglykosylierung von TA-G die Toxizität des Stoffes beeinflusst.

1.4 Ziel dieser Arbeit

Die beta-Glucosidasen welche TA-G im Magen von *M. melolontha* spalten, sind noch nicht charakterisiert. Durch den Abgleich der Aminosäuresequenzen bekannter Insekten beta-Glucosidasen aus *Tenebrio molitor* und *Chrysomela populi* mit dem Transkriptom von *M. melolontha* konnten 13 putative *M. melolontha* beta-Glucosidasegene gefunden werden. In dieser Arbeit sollen diese Gene amplifiziert, kloniert und in HighFive Insektenzellen heterolog exprimiert werden. Mittels Enzymaktivitätsassays soll dann die Substratspezifität und die Aktivität dieser Enzyme ermittelt werden. Es wird untersucht, welche der exprimierten Enzyme in der Lage sind, TA-G zu deglycosylieren. Außerdem wird deren Substratspezifität bezüglich der pflanzlichen Sekundärmetabolite Salicin und glykosylierter Benzoxizinoide getestet, sowie deren Vermögen Cellobiose zu spalten. Die Ergebnisse sollen zur Aufklärung der Bedeutung der gefundenen Enzyme für das Insekt beitragen.

2. Material & Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von der Firma Carl Roth (Deutschland) bezogen.

2.2 Mikrobiologie

2.2.1 Bakterienstämme und Insektenzellen

Die Plasmidkonstrukte wurden in *E. coli* OneShot TOP10 Chemically Competent Cells (Invitrogen) oder NEB 10-beta High Efficiency Competent Cells (New England Biolabs) vermehrt. Beide Stämme wurden auf LB-Agar bei 37 °C kultiviert.

Zur heterologen Expression der *M. melolontha* Glucosidasen Gene wurden High Five Zellen (Invitrogen) genutzt. Mit dem entsprechenden Plasmid transfiziert wurden diese in High Five Serum Free Medium (Invitrogen) bei 27 °C inkubiert. Die adhärent wachsenden Zellen wurden alle drei Tage mit frischem Medium vereinzelt.

2.3 DNA Techniken

Vom Betreuer der Arbeit wurden 10 DNA Sequenzen, welche für putative beta-Glucosidasegene codieren, aus dem Transkriptom von *M. melolontha* identifiziert. 3 beta-Glucosidase Kandidatengene lagen nicht vollständig sequenziert aus dem Transkriptom vor und wurden mit 3' bzw. 5' RACE- und Nested-PCR in voller Länge amplifiziert und sequenziert.

2.3.1 Synthetische Oligonukleotide / Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von Sigma-Aldrich bezogen (Tabelle 2.1, 2.2, 2.3), entsprechend der Herstellerangaben in Aqua dest. gelöst um eine Konzentration von 100 µM zu erreichen und zum Arbeiten 1:10 auf eine Konzentration von 10 µM verdünnt.

Tabelle 2.1: Auflistung aller für diese Arbeit genutzten genspezifischen Primer

Name	Sequenz (5' -> 3')	Zielgen
<i>Primer zur Amplifikation der beta-Glucosidasen</i>		
1-pIB-fwd	GTAATGAAGCATCTACTATTATTTTAAAT	Mm_bGlc_1
1-pIB-rev	CCATTCACAACTTCGAATCCTTC	Mm_bGlc_1
2-pIB-fwd	GTAATGAAACCAATCGGTTAATTGTT	Mm_bGlc_2
2-pIB-rev	CCAATCGCAAGCTTCAAATCCAT	Mm_bGlc_2
3(2)-pIB-fwd	GTAATGAAATCACTAATTTTAATTTAGTT	Mm_bGlc_3
3(2)-pIB-rev	CCATTCGCAGACTTCGAATCCAT	Mm_bGlc_3
5-pIB-fwd	GATATGAAAGCGATTATTATATTGGCT	Mm_bGlc_5
5-pIB-rev	AAAATGCCTAATAAATGTACAAAC	Mm_bGlc_5
6neu-pIB-fwd	GTAATGAGGCGCGTCTTAATATTAATC	Mm_bGlc_6
6neu-pIB-rev	TAGAATACTCAAGCTATGCATCAAG	Mm_bGlc_6
11-pIB-fwd	GATATGAAAGTGCAGTTGTATTAAT	Mm_bGlc_11
11-pIB-rev	AAAATATCTCATAACGAATAAATAATA	Mm_bGlc_11
14-pIB-fwd	GATATGAGACGAATCATTTTCCTTTTG	Mm_bGlc_14
14-pIB-rev	CTCTGGCACTTCGTCTCTGTC	Mm_bGlc_14
15-pIB-fwd	GTA ATGAAGCTCGTAATTTTCGCTCTG	Mm_bGlc_15
15-pIB-rev	TGACCAATCGCACTCTTCGAAACC	Mm_bGlc_15
16-pIB-fwd	GATATGAAGGTTCTAGTTATACTTTG	Mm_bGlc_16
16-pIB-rev	CCATTCACAGTCGCTAAAATTTT	Mm_bGlc_16
17-pIB-fwd	GATATGAAGAGACTAATTCTTATTTTC	Mm_bGlc_17
17-pIB-rev	CCACTCGCAGGCATCAAATCCA	Mm_bGlc_17
18-pIB-fwd	GATATGGGATACTTTGAACCATTAATA	Mm_bGlc_18
18-pIB-rev	CCACCACGAACATGCTTCAAAT	Mm_bGlc_18
19h-pIB-fwd	GTAATGCGAAATATGTTGCGGTTCTTTAATTC	Mm_bGlc_19h
19h-pIB-rev	TACTTCTTCATCTGACTCGGTATCTTC	Mm_bGlc_19h
19v-pIB-fwd	GATATGTCGTCATATGTATACAAAAC	Mm_bGlc_19v
19v-pIB-rev	AACATCTTCATCTGACTCGGTA	Mm_bGlc_19v

Tabelle 2.2 Auflistung der in dieser Arbeit genutzten Vektor Primer

Name	Sequenz (5' -> 3')	Zielvektor
<i>Vektor Primer</i>		
OpIE2 forward	CGCAACGATCTGGTAAACAC	pIB/V5-His-TOPO
OpIE2 reverse	GACAATACAACTAAGATTTAGTCAG	pIB/V5-His-TOPO
M13 forward	GTAAAACGACGGCCAGT	pCR-TOPO Blunt
M13 reverse	AACAGCTATGACCATG	pCR-TOPO Blunt

Tabelle 2.3: Auflistung der in dieser Arbeit genutzten Primer für RACE- und Nested-PCR

Name	Sequenz (5' -> 3')	Zielgen
<i>5' RACE und Nested-PCR Primer</i>		
Mm_6-5'-RACE	CAATTTTCGGCATCAATTTTCGTTACTATCACTA	Mm_bGlc_6
Mm_6-5'-Nest	CACAAATCCTGCGTCCATACTTAATTGATA	Mm_bGlc_6
<i>3' RACE und Nested-PCR Primer</i>		
Mm_19h-3'-RACE	CTGTATTAGAGGCCATTCACGAAGACG	Mm_bGlc_19h
Mm_19h-3'-Nest	CATTCTTAGACAATTTTCGAATGGGGCC	Mm_bGlc_19h
Mm_15-3'-RACE	CTGATACCGGTGAATTAATGATTGTCGAAGAG	Mm_bGlc_15
Mm_15-3'-Nest	CAGTTCTAGAGGCAATCGTAGAAGATG	Mm_bGlc_15
Mm_6-3'-RACE	TTATACTGTCCTTCTAGCTCATGCTAGAAC	Mm_bGlc_6
Mm_6-3'-Nest	TGCAGATGTTAATGCTGAAGATACGGC	Mm_bGlc_6
<i>SMARTer RACE cDNA Amplification Kit Primer</i>		
Long Universal Primer	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTA TCAACGCAGAGT	
Short Universal Primer	CTAATACGACTCACTATAGGGC	
Nested Universal Primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	

2.3.2 Vektoren

Alle in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind der Tabelle 2.4 zu entnehmen.

Tabelle 2.4: Auflistung aller für die Arbeit genutzten Vektoren

Name	Verwendung	Resistenz	Hersteller
pIB/V5-His-TOPO	Genexpression, Sequenzierung	Ampicillin	Invitrogen
pCR/TOPO-Blunt	Subklonierung, Sequenzierung	Kanamycin	Invitrogen

2.3.3 PCR Methoden

DNA-Abschnitte aus cDNA oder aus Vektoren wurden spezifisch mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) in einem peqSTAR 2x Gradient Thermocycler (peqlab) amplifiziert. Die Annealing Temperaturen lagen dabei ungefähr 5 °C unter den Schmelztemperaturen der Primer.

2.3.4 Amplifizierung der *M. melolontha* Glucosidasegene aus TOPO-Plasmiden

10 beta-Glucosidase Kandidatengene (siehe Tabelle 2.1) waren bereits als TOPO-Vector-Konstrukte vorhanden (vom Betreuer zur Verfügung gestellt). Die Plasmide wurden 1:100 verdünnt und nach erfolgreicher Amplifikation mit Phusion High Fidelity DNA Polymerase für 10 min bei 72 °C mit GoTaq DNA Polymerase (Promega) inkubiert um einen 3'-Adenin Überhang an die Sequenz zu binden und sie so kompatibel zum „sticky end“ pIB/V5-His-TOPO Vektor zu machen. Die Zusammensetzung und das Programm der PCR-Reaktion sind in Tabelle 2.5 und Tabelle 2.6 aufgeführt.

Tabelle 2.5: Komponenten eines PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen
Plasmid-Template 1:100	1 µl
5x Phusion HF Buffer	10 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
Phusion High-Fidelity Polymerase	0,5 µl
Forward OpIE2 Primer (10 µM)	2,5 µl
Reverse OpIE2 Primer (10 µM)	2,5 µl
Aqua dest.	32,5 µl

Tabelle 2.6: Temperaturprofil der Phusion-PCR (Programm: „Phusion“)

Phase	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	30 s	98 °C
Denaturierung	10 s	98 °C
Primer Anlagerung	30 s	60 °C
Elongation	60 s	72 °C
Finale Elongation	5 min	72 °C

} 35 Zyklen

2.3.5 5' und 3'-RACE- und Nested-PCR

Da die Glucosidasegene Mm_6, Mm_19h und Mm_15 aus dem erstellten Transkriptom nur unvollständig vorlagen, wurden deren 3' und 5' Enden mit Hilfe einer RACE- und Nested-PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Die benötigte RACE-ready cDNA wurde vom Betreuer mit Hilfe des SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA) aus M. melonantha Darmgewebe hergestellt. Der RACE-ready cDNA hängt das „SMARTer II A“ Oligonukleotid am 5' bzw. 3' Ende an, an welches dann ein passender Ankerprimer (Long Universal Primer und Short Universal Primer) binden kann. Dies ermöglicht die Amplifikation des cDNA Stranges ohne Kenntnis seiner vollständigen Sequenz. Im Ankerprimer finden sich Sequenzen an denen auch der Nested Universal Primer binden kann wodurch die anschließende, spezifischere Nested PCR möglich wird.

In Tabelle 2.7 finden sich die Komponenten des Ansatzes der RACE-PCR, in Tabelle 2.8 die der Nested-PCR. Die Temperaturprofile entsprechen jeweils dem des Programms „Phusion“ (Tabelle 2.6).

Tabelle 2.7: Komponenten eines RACE-PCR Ansatzes

Komponente	Volumen
5x Phusion HF Buffer	5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Phusion High-Fidelity Polymerase	0,25 µl
Universal Primer Mix	2,5 µl
genspezifische Primer	0,5 µl
5' bzw. 3' RACE cDNA	0,125 µl
Aqua dest.	15 µl

Tabelle 2.8: Komponenten eines Nested-PCR Ansatzes

Komponente	Volumen
5x Phusion HF Buffer	5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Phusion High-Fidelity Polymerase	0,25 µl
Nested Universal Primer	2,5 µl
genspezifische Primer	0,5 µl
RACE-DNA	0,125 µl
Aqua dest.	15 µl

2.3.6 Kolonie PCR

Um zu überprüfen ob die transformierten Kolonien einen Insert der korrekten Länge besitzen, wurde eine analytische Kolonie PCR durchgeführt. Es wurden 4-5 Kolonien von einer Agarplatte gepickt und deren Inserts mit Hilfe der GoTaq DNA Polymerase und den entsprechenden Vektorprimern (Tabelle 2.2) amplifiziert. Die 10 minütige Initiale Denaturierung dient dazu, die Zellen aufzuschließen.

Der verwendete Ansatz und das Temperaturprofil finden sich in Tabelle 2.9 und 2.10.

Tabelle 2.9: Komponenten eines Kolonie PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen
5x Green GoTaq Buffer	5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
GoTaq DNA Polymerase	0,125 µl
Forward Primer (10 µM)	0,5 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,5 µl
Aqua dest.	18,375 µl

Tabelle 2.10: Temperaturprofil der Kolonie PCR (Programm: „Kolonie PCR“)

Phase	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	10 min	98 °C
Denaturierung	10 s	98 °C
Primer Anlagerung	30 s	60 °C
Elongation	60 s	72 °C
Finale Elongation	5 min	72 °C

} 35 Zyklen

2.3.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde nach Sanger-Methode mit fluoreszierenden Didesoxynukleotiden durchgeführt. Dazu wurde das BigDye Terminator Cycle Sequencing v2.0 Ready Reaction DNA Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. Die eingesetzten Primer und deren Zielgene/-vektoren sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Gene länger als 1 kbp wurden jeweils in einem forward und einem reverse Ansatz amplifiziert. Die entstandenen Kettenbruchstücke wurden über Kapillargelelektrophorese und Fluoreszenzdetektion in einem ABI Prism-Gen-Analysator 3130xl (Applied Biosystems) sequenziert.

Die Komponenten eines Sequenzierungsansatzes und das Temperaturprofil der PCR finden sich in Tabelle 2.11 und 2.12.

Tabelle 2.11: Komponenten eines Sequenzierungsansatzes

Komponente	Volumen
BigDye	2 µl
BigDye Buffer	2 µl
Plasmid (100 ng/µl)	2 µl
Reverse oder Forward Primer	1 µl
Aqua dest.	3 µl

Tabelle 2.12: Temperaturprofil der Sequenzier-PCR

Phase	Dauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	30 s	98 °C
Denaturierung	10 s	98 °C
Primer Anlagerung	30 s	60 °C
Elongation	120 s	72 °C
Finale Elongation	5 min	72 °C

} 35 Zyklen

2.3.8 Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion

Die Agarosegelelektrophorese erlaubt es, DNA Fragmente nach erfolgreicher PCR entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Im Anschluss ist es möglich, einzelne Fragmente aus einem präparativen Gel durch Extraktion zurückzugewinnen. Für die analytischen und präparativen Gelelektrophoresen wurden 1,5%ige Agarosegele (1,5% (w/v) Agarose, 0,5x TAE-Puffer, 1 µl/µl SYBR Green I) verwendet. Die Laufzeit betrug 20 Minuten bei 135 Volt in 0,5x TAE-Puffer. Die Proben wurden mit 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) versetzt und je Gel wurde eine Tasche mit Generuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) als Größenstandard befüllt. Die analytischen Gele wurden unter 260 nm UV-Licht durch anregen des SYBR Green I Farbstoffes visualisiert und fotografiert. Die präparativen Gele wurden ebenfalls unter UV-Licht angeregt und die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Mit Hilfe des NucleoSpin Gel and PCR Clean up Kit (Qiagen) wurden die DNA Fragmente nach Herstellerprotokoll aus dem Gel extrahiert.

2.3.9 Ligation und Transformation

Die RACE-PCR Fragmente unbekannter Sequenz wurden in den Sequenziervektor pCR/TOPO-Blunt kloniert und die bereits korrekt sequenzierten Gene in den Expressionsvektor pIB/V5-His-TOPO. Beide Vektorenkits arbeiten mit dem TOPO-System bei dem eine Topoisomerase kovalent an den geöffneten Vektor gebunden ist, weshalb man keine weitere Ligase benötigt. Die Ligation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Transformation wurden chemisch kompetente OneShot TOP10-Zellen zusammen mit dem Ligationsansatz für 20 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock bei 42°C für 45 s ermöglicht die Aufnahme der Plasmide in die Zellen. Zur Regeneration wurden die transformierten Zellen 45 min in 100 µl SOC-Medium inkubiert und schließlich auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.10 Plasmidpräparation

Die positiven Transformanten wurden über Nacht in 3,5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37 °C als Schüttelkultur inkubiert. Zur Aufreinigung der Plasmide wurde das NucleoSpin Plasmid-Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.11 Restriktionsverdau

Um zu überprüfen ob die aus den TOP10 Zellen gewonnen Plasmide das gewünschte Gen enthalten, wurden diese durch Restriktionsenzyme verdaut. Je nach Vektor kamen die Enzyme mit den entsprechenden Schnittstellen zum Einsatz (siehe Tabelle 2.13 und 2.14). Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

Tabelle 2.13: Ansatz Kontrollverdau für pIB/V5-His-TOPO

Komponente	Volumen
NEB4-Puffer	1 µl
BSA	0,1µl
<i>Bam</i> -HI (10 U/µl)	0,3 µl
<i>Xba</i> I (10U/µl)	0,3 µl
Plasmid-DNA	5 µl
aqua dest.	3,3 µl

Tabelle 2.14: Ansatz Kontrollverdau für pCR/TOPO-Blunt

Komponente	Volumen
NEB4-Puffer	1 µl
<i>Eco</i> RI (10 U/µl)	0,5 µl
Plasmid-DNA	5 µl
Aqua dest.	3,5

2.3.12 Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration der Proben wurde mit dem NanoDrop 2000c UV-Vis Spektrometer (PEQLAB) bestimmt. Das Gerät berechnet die Nukleinsäurekonzentration mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes durch Messung der Absorption bei 260 nm. Dabei entspricht 1 A_{260} 50 ng/ μ l DNA. Außerdem misst das Gerät die Absorption bei 280 nm und gibt den Quotienten A_{260}/A_{280} aus der eine Aussage über die Reinheit der DNA erlaubt. Weicht dieser Wert stark von 1,8 ab liegt eine Kontamination der DNA mit Proteinen oder RNA vor.

2.3.13 Transfektion der Expressionsvektoren in High-Five Zellen

Vor der Transfektion wurden die Zellen vereinzelt um eine Zelldichte von 80% der Oberfläche pro Zellkulturflasche zu erreichen. Die Plasmide wurden mit dem FuGENE HD Transfection Reagent (Promega) transfiziert. Dazu wurde pro Plasmid ein Ansatz von 400 μ l einer 0.01 μ g/ μ l Plasmid Lösung und 20 μ l FuGENE HD hergestellt. Dieser wurde gevortext und 10 min lang inkubiert. Anschließend wurde der DNA-FuGENE-Komplex auf die HighFive Zellen gegeben und die Zellen bei 27°C inkubiert.

2.4 Genexpression und Proteinbiochemie

2.4.1 Heterologe Expression der β -Glucosidasen in HighFive Zellen

Die Expression der beta-Glucosidasen erfolgte in Insektenzellen der Linie High Five mithilfe des pIB/V5-His-TOPO Vektors. Nach der Transformation der Insektenzellen mit dem Zielplasmid und der Selektion der transfizierten Zellen mit Blasticidin wuchsen die HighFive Zellen bis zur Konfluenz in 5 ml Express Five Medium (Life Technologies) und 75 cm² Zellkulturflaschen bei 27°C. Um möglicherweise vorhandene Proteasen der High Five Zellen abzubauen, wurden 50 μ l Proteaseinhibitor je Zellkultur zugegeben. Da die Zellen das Protein ins Medium sezernieren, wurde dieses als Überstand abgezogen.

2.4.2 Aufkonzentrieren und Umpuffern der Glucosidasen

Das Volumen des Insektenzellmediums, welches das Zielprotein enthält wurde mit Hilfe von 10.000 MWCO Vivaspin 4 Ultrafiltrationseinheiten (Sartorius) von 5 ml auf 200 µl reduziert. Die Lösung wurde anschließend mit Hilfe von illustra NAP-5 Säulen (GE Healthcare) in einen Natriumphosphatpuffer pH 7,4 umpuffert.

2.4.3 SDS-PAGE und Western Blot

Der Erfolg der heterologen Expression wurde durch SDS-PAGE und anschließenden Western Blot überprüft. Die Proteinlösung aus 2.4.2 wurde mit SDS-Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl der Probe in einem Mini-PROTEAN TGX Gel (Bio-Rad) bei 160 V für 40 min elektrophoretisch aufgetrennt. Je Gel wurden zwei Taschen mit PageRuler Prestained Protein Ladder (Life Technologies) als Größenstandard gefüllt. Im Western Blot Verfahren wurden die Proteinbanden des Gels anschließend auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF) transferiert. Die PVDF Membran wurde zunächst in Methanol gewaschen und anschließend zusammen mit blotting Papier (Sigma Aldrich) in STB Puffer gespült. Für den Transfer wurde eine Schicht aus blotting Papier – PVDF Membran – SDS-PAGE Gel – blotting Papier erstellt. Der Transfer erfolgte in einer Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio Rad) für 25 min bei 25 V in STB-Puffer (Pufferzusammensetzung siehe Tab 2.15).

Tabelle 2.15: Pufferzusammensetzung Western Blot

Puffer	Zusammensetzung
STB	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol
TBS	50 mM Tris, 150 mM NaCl
TBSTT	20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05 % Tween, 0.1% Triton-X100

Die Proteinbeladene Membran wurde anschließend je 10 min in TBS-Puffer und TBSTT-Puffer gewaschen und für eine Stunde mit 5 % Caseinlösung geblockt. Nach zwei weiteren Waschrufen für je 10 min in TBS-Puffer und TBSTT-Puffer folgte die Inkubation mit dem His-Tag-HRP Antikörper (Merck Millipore) für eine Stunde bei einer Verdünnung von 1:3333

in 5 % Caseinlösung. Dank der konjugierten Meerrettichperoxidase (HRP) am Antikörper war es möglich, diesen per Chemolumineszenz sichtbar zu machen. Dafür wurde die Membran eine Minute lang mit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Life Technologies) inkubiert und anschließend in der Dunkelkammer für 5 Minuten auf einen CL-Xposure Film (Thermo Scientific) belichtet.

2.4.4 Enzymassays

Um die Aktivität der Glucosidasen zu überprüfen, wurden Assays mit 97 µl umgepufferten Enzym (aus 2.4.2) in Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) und 3 µl Substrat (10mM) angesetzt. Die Assays wurden 24 Stunden lang bei 25°C in Glasvials inkubiert. Zudem wurde für jede Probe eine Negativkontrolle angesetzt bei der die Reaktion sofort mit Methanol abgestoppt wurde. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die 24 Stunden Ansätze mit einer äquivalenten Menge Methanol abgestoppt. Die positiven Assays und Negativkontrollen wurden 10 min bei 11000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert sodass der Überstand mittels LC-MS/MS analysiert werden konnte (siehe „Chromatographie und Massenspektrometrie“). Die Enzyme wurden auf Aktivität gegenüber folgender Substrate untersucht: TA-G, Cellobiose, Salicin und glykosylierte Benzoxazinoide (DIMBOA-Glc). TA-G und Benzoxazinoide wurden vom Betreuer aus Löwenzah, respektive Mais, isoliert. Um eine grundsätzliche Aktivität der Enzyme nach der Expression fest zu stellen wurden diese auf das Substrat 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucopyranosid getestet. Nach Abspaltung des Aglykons fluoresziert 4-Methylumbelliferyl bei Anregung durch UV-Licht der Wellenlänge 360 nm. Dafür wurden Assays mit 97 µl Enzym und 3 µl 4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucopyranosid angesetzt und für 24 h bei 25 °C inkubiert. Durch Feststellung der Fluoreszenz kann also von einem aktiven Enzym ausgegangen werden.

Aus technischen Gründen mussten die Enzymassays mit verschiedenen Substraten in mehreren Chargen stattfinden. Dabei ist nicht gewährleistet, dass dasselbe Protein in allen Chargen in gleichem Maße von den HighFive Zellen exprimiert wird. Um für jedes Enzym in jeder Charge festzustellen ob es exprimiert wurde, sollte es mindestens ein Substrat spalten. Im DIMBOA-Glc-Assay wurden die Enzyme zur Positivkontrolle auf das Substrat Cellobiose

getestet. Für die TA-G Assays wurden keine abgestoppten Negativkontrollen angefertigt.

Zum qualitativen Vergleich des Substratumsatzes aller exprimierten Gene wurde stets die Fläche der Aglykon- bzw. Glucose-Peaks gemessen. Die 24 h lang inkubierten Ansätze sollten dabei mindestens einen doppelt so hohen Glucose bzw. Aglykon Gehalt aufweisen wie die mit Methanol inaktivierten Ansätze, damit das Substrat als akzeptiert und das Enzym als aktiv gilt. Da die Assays für die verschiedenen Substrate nicht alle mit derselben Enzymcharge durchgeführt wurden, war es notwendig zu klären, ob die Enzyme für ein bestimmtes Substrat in der jeweiligen Charge grundsätzlich nicht aktiv waren, ob sie nicht exprimiert wurden oder ob sie das Substrat nicht akzeptiert haben.

2.4.5 Chromatographie und Massenspektrometrie

Die Metabolite der enzymatischen Spaltung wurden mit Hilfe einer Flüssigchromatographie (LC) und gekoppeltem Massenspektrometer (MS/MS) nachgewiesen. Dazu kam das „high performance liquid chromatography“ (HPLC)-System Agilent 1200 (Agilent) gekoppelt mit einem API 3200 Triple Quadrupol Massenspektrometer (SCIEX) zum Einsatz. Um Zucker zu detektieren wurde eine apHera-NH₂ Säule (5 µm Partikeldurchmesser, 4,6 mm x 15 cm; Sigma-Aldrich), welche nach dem hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) Prinzip arbeitet, genutzt. Als mobile Phase wurde Wasser und Acetonitril (ACN) verwendet. Das Injektionsvolumen lag bei 5 µl und die Flussrate betrug 1 ml/min. Das Elutionsprofil ist in Tabelle 2.16 angegeben. Die Retentionszeit der Glucose war bei 6,7 min. Zur Quantifizierung der Glucose wurden entsprechende Standards im Konzentrationsbereich von 0.0001 mM bis 0.05 mM gemessen.

Zur Detektion des Benzoxazinoid Aglykons MBOA wurde eine ZORBAX Eclipse XDB-C18 Säule (5 µm Partikeldurchmesser, 4,6 mm x 25 cm; Agilent) verwendet. Als mobile Phase wurden hier 0,05 % Ameisensäure (A) und Methanol (B) eingesetzt. Injektionsvolumen und Flussrate sind identisch mit der Glucose Analyse. Das Elutionsprofil ist in Tabelle 2.17 zu finden. Die Retentionszeit von MBOA betrug 7 min.

Die Messung im Massenspektrometer fand im MRM (multiple reaction monitoring) Modus

mit negativer Ionisierung statt. Die Detektion der Glucose erfolgte über die Selektion des Mutterions $[M+H]^+$ bei 178,8 m/z und die Analyse des fragmentierten Ions bei 89 m/z. Es lag eine Detektionsspannung von -25 V und eine Kollisionsspannung von 6V an. MBOA wurde über die Selektion des Mutterions bei 164 m/z und die Analyse des Fragments bei 149 m/z detektiert. Es lag eine Detektionsspannung von -24 V und eine Kollisionsspannung von 4V an. Um die Aglykone Taraxinic Acid und Salicylalkohol nachzuweisen wurde eine HPLC (Agilent HP1100) mit UV-Detektion (G1315A DAD, Agilent) durchgeführt. Dabei wurde eine NUCLEODUR® Sphinx RP Säule (6 µm Partikeldurchmesser, 4 mm x 10 cm; Macherey-Nagel) verwendet. Taraxinic Acid weist eine Retentionszeit von 16,8 min auf und wird bei 245 nm gemessen. Salicylalkohol retiniert nach 9,3 min und wird bei 275 nm nachgewiesen. Als Elutionsmittel wurden 0,2 % Ameisensäure und ACN genutzt.

Tabelle 2.16: Elutionsgradient der HPLC für die Zuckeranalyse

t (min)	ACN (%)
0 – 7	80
7 – 8	80 – 67
8 – 8.10	67 – 40
8.10 – 12	40 – 80

Tabelle 2.17: Elutionsgradient der HPLC für die MBOA Analyse

t (min)	Ameisensäure (%)
0 – 9	80
9 – 10	75
10 – 12	50
12 – 13,02	0
13,02 – 16	80

2.5 Computergestützte Analytik

2.5.1 Aminosäuresequenzanalyse und Phylogenetische Analyse

Mittels des MUSCLE-Algorithmus (Edgar, 2004) wurde ein Alignment (1000 Iterationen) der putativen *M. melolontha* beta-Glucosidasen und bereits beschriebener Insekten beta-Glucosidasen erstellt. Das Alignment wurde mit der Software Geneious (Biomatters) erstellt und für dessen Visualisierung wurde BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.htm>) eingesetzt. Die Sequenzen der bekannten Glucosidasen wurden der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) entnommen. Die Herkunft und Zugangsnummern der Proteinsequenzen sind Tabelle 2.18 zu entnehmen. Für die Erstellung des Phylogenetischen Baums wurde die neighbour-joining Methode in Verbindung mit 1000-fach wiederholtem bootstrapping-resampling eingesetzt.

Tabelle 2.18: Zugangsnummer der zur phylogenetischen Analyse verwendeten Sequenzen

Spezies	Zugangsnummer
<i>Tenebrio molitor</i>	AF312017
<i>Chrysomela populi</i>	GBUH01000008
<i>Phyllotreta striolata</i>	KF377833
<i>Brevicoryne brassicae</i>	AF203780

90 100 110 120 130 140 150 160

Mm_bGlc_19v DCNSGDVACDLYHKTEEDVQLLRDLGVSYFRFSISWSRILPTGHAYYINPECKIKYNSLIDPLLENDIPLITMWHWDLPL
Mm_bGlc_19h DESNGDIACDLYHKTEEDVQLLRDLGVDFYFRFSISWSRILPTGHANTVNPPLCVAYYNEIDLELANDIPLVTLFHWDLPL
Mm_bGlc_18 DGSNGDVACDAMHKTEEDVQLMVMDCLDVYFRFSISWTRILPNGYNNYTPDGVRYYNELIDPLLANGLRPLVTMFHWDLPL
Mm_bGlc_17 DNSNGDVACDLYHKTEEDVQLLKNLGVNFYFRFSISWSRILPTGYTNVVEDGIRYYNALIDALLNGITPLVTLFHWDLPL
Mm_bGlc_16 DGSNGDVACDAYSHTAEDVQLLKNLGVDFYFRFSISWSRVLPFGKTDYINPDGIRYYNELIDPLLENNIPEMATMYHEDLPL
Mm_bGlc_15 DGSNGDIACDLYHKTEEDVQLLKLGVDFYFRFSISWSRILPTGYADEINEDGIRYYNELIDLELANDIPLVYTMWHWDLPL
Mm_bGlc_14 DGSNGDVACNSYKVVDDVGLLEIELGVQYFRFSISWSRILPTGHANEVNEAVQVYSSDLIDKLLNGITPLVTLFHWDLPL
Mm_bGlc_11 DSSNGDVASDCYHKLDODIQLMKNVGVDFYFRFSISWSRILPTGHINKVSDDGVRYYDELIDKLLANDIPLVYTMWHWDLPL
Mm_bGlc_6 DGSSGDDACKSYKTEEDVELLKNMGNVYFRFSISWSRILPTGHSYSVNPEGVNYYNDLINRLEVANGLEPMTYTMWHWDLPL
Mm_bGlc_5 NRDNGDDACKAYYKTEEDVQMIKDVGAHFYFRFSISWSRILPTGHINKVSEDGVAYYNDLIDQLLENDIPLVYTMWHWDLPL
Mm_bGlc_3 DNSNGDVACDAMHKTEEDVQLLKLGVDFYFRFSISWSRILPTGYVNEINPDGIRYYNELIDLELANDIPLVTLFHWDLPL
Mm_bGlc_2 DNSNGDVACDLYHKTEEDVQLLNNLGVNFYFRFSISWSRILPTGYVNEINSDGIRYYNELIDLELANDIPLVTLFHWDLPL
Mm_bGlc_1 DMSNGDVACDAMHKTEEDVQLLKNLGVNFYFRFSISWSRILPSSGYVNVINPDGIRYYNELIDLELANDIPLVTLFHWDLPL
Tenebrio molitor NRDNGDDACKAYYKTEEDVQMLKTLGVNFYFRFSISWSRVLPFGKADENVQAQCIDYNNLIDLELANDIPLVYTMWHWDLPL
Phyllotreta striolat NNDTGDIACDYHRYKEDIKMAADLGLQAYFRFSISWPRVLPNGYADTINERKMQFYKDLVDEIVKYGMPVPCNLFHWDLPL
Brevicoryne brassica DGTNGDIACDLYHKTEEDVQIKDLNLFYFRFSISWARTAPSGVMNSLEPKCIAYNNLIDLELANDIPLVTLFHWDLPL
Chrysomela populi NRDNGDVACDSYDLYKEDIRLAAALGVNFYFRFSISWPRVLPNGDITVINRKRCLRYERILNEVRRRDMVPTVTLFHWDLPL

170 180 190 200 210 220 230 240

Mm_bGlc_19v QPLQ-ELGGWPNPVLKYFANYAVLVFENFGDRVKNWITFNEPREFORHGYSTGYLAPGYTQDGGVILCAITVLLAAHAK
Mm_bGlc_19h QPLQ-ELGGWPNPLLVLYADYALVFLVDFGDRVKNWITFNEPEYQIQCEAYSEANKAPAYNQDGGVILCAITVLLAAHAK
Mm_bGlc_18 QVFODDYCGWLGSDMVDLFDVYADVAFSLFDRVKNWITFNEPEYQIQCEAYSEANKAPAYNQDGGVILCAITVLLAAHAK
Mm_bGlc_17 QPLQ-ELGGWPNPLADIFADYADILYREFGDRVKNWITFNEPEYQIQCEAYSEANKAPAYNQDGGVILCAITVLLAAHAK
Mm_bGlc_16 QPLQ-DEGGLNIVLADYFEDYAVLVFLVDFGDRVKNWITFNEPEYQIQCEAYSEANKAPAYNQDGGVILCAITVLLAAHAK
Mm_bGlc_15 QPLQ-EI GGWLNSSLADLFDVYADVLYEQFGDRVKNWITFNEPEYQIQCEAYSEANKAPAYNQDGGVILCAITVLLAAHAK
Mm_bGlc_14 QPLQ-ELGGWTPVLVDFVYADVLFVTFGDRVKNWITFNEPEYQIQCEAYSEANKAPAYNQDGGVILCAITVLLAAHAK
Mm_bGlc_11 QPLQ-ELGGWPNPALADIFADYADILYREFGDRVKNWITFNEPEYQIQCEAYSEANKAPAYNQDGGVILCAITVLLAAHAK
Mm_bGlc_6 QPMQ-ELGGWPNPLAEYFVYADVLFVTFGDRVKNWITFNEPEYQIQCEAYSEANKAPAYNQDGGVILCAITVLLAAHAK
Mm_bGlc_5 QPLQ-ELGGWPNPALADYAAVAVNFVNEFGDRVKNWITFNEPEYQIQCEAYSEANKAPAYNQDGGVILCAITVLLAAHAK
Mm_bGlc_3 QSLQ-DI GGWPNPLISDLFADYADILYREFGDRVKNWITFNEPEYQIQCEAYSEANKAPAYNQDGGVILCAITVLLAAHAK
Mm_bGlc_2 QPLQ-EI GGWTPPLISDLFADYADILYREFGDRVKNWITFNEPEYQIQCEAYSEANKAPAYNQDGGVILCAITVLLAAHAK
Mm_bGlc_1 QPLQ-EI GGWANPLISDLFADYADILYREFGDRVKNWITFNEPEYQIQCEAYSEANKAPAYNQDGGVILCAITVLLAAHAK
Tenebrio molitor QPLQ-DEGGWPNRKLADYFVYADVLFVTFGDRVKNWITFNEPEYQIQCEAYSEANKAPAYNQDGGVILCAITVLLAAHAK
Phyllotreta striolat LKLYENGLDWRNEKLIIDIFVAVSRLMIQNL-PKVGYWSTINEPRVHCLRSYGDGKHPGIAESCTADYQCSYVLLAAHAK
Brevicoryne brassica QYLO-DLGGWPNPIMSDFEKEYARVLFYFVDFGDRVKNWITFNEPEYQIQCEAYSEANKAPAYNQDGGVILCAITVLLAAHAK
Chrysomela populi QALMKRGIDWNPKLNVFVDFARIVIRHL-RHYGYWVITINEPHTFORLGYGLGIFAPGIESSGDEPKCIYTMKKAHAA

250 260 270 280 290 300 310 320

Mm_bGlc_19v AYALYNEQYRSTOGCRIGITLNTFMYEPES-DSVDEKBAATQMMQMNLCMYAHPFSEYCDWPDIMKBERITELSVBQGYGYP
Mm_bGlc_19h AYRLVETTYKEAQQCRVIGITVHGVAWPEET-ETDADIAAABSYQQFHFGIYDHPFSEEGDPPEVVKTRVKQISDVIYGYS
Mm_bGlc_18 TYKLYNEKYRDIQKCRIGITIDGWEKPEAS-TCPEDIETARALQMEFGWIAHPFSESGDPPPMLRSDVLSAEQEGKFA
Mm_bGlc_17 AYRLYNEKYRDTQCRVIGITIDSGWEPAS-ESEEDIQAABSDSVHVKYGMVHPHYSETGDPVPLRSDVLSAEQEGKFA
Mm_bGlc_16 AVHLYNDRYKGSQGRVIGITINNWFYEPY--ADTDSAVELALQVAFGWFTHPYTSKEGDPFPAMKRIARLSEEEGFS
Mm_bGlc_15 TYRLYNEKYRESQGRVIGITIDAGWYEPVS-DSDDIDBAARSMQMNLYGWAHPFSESGDPPPEIMKBERIYQLSDEEGE
Mm_bGlc_14 TYHLYHDDYAGT-DCRIGITVNGVWABEASDESVDDEAAADYIEFHFGEWFFNPIYI--GDVPPIMKDNIAQSRSELECFP
Mm_bGlc_11 AFKTYNDKYREEQGRVIGIVVHGVAWPEES-ESEEDKSAABETWQMMNFGWFTHPHYSESGDPPSIPKBERIEDLSELEGFP
Mm_bGlc_6 TYRMYQENYLEDQGRIGISLNSDWEYEGAD-VNDDTBAAEITSNQMMNFGWFAHPHYHEDGDWPEIMKBERIYQLSDEEGE
Mm_bGlc_5 AYHLYHDDYAGTQCRVIGIVVHGVAWPEES-DSDEDAQAABENFIQMNFGWFTHPHYSDAGGVPMSVAIHALSDEEGFP
Mm_bGlc_3 AYRTYEEKYKDVQGRVIGITVNTRWYEPAS-DSABDAAAABRAIQMITYGIYTHPIYSETGDPVPLRSDVLSAEQEGYA
Mm_bGlc_2 AYQYLYNEKYRDAQQGIVIGITVYTWYEPAS-DSEDDIQAABRAMQMTYGIYVHPHYSETGDPVPLRSDVLSAEQEGYA
Mm_bGlc_1 AYRLYDEERYNAQQCRVIGITIDTSWYEPES-DSSEDLDISRVLQMKYGLYVHPHYSETGDPVPLRSDVLSAEQEGYA
Tenebrio molitor TYRLYSDSDFRAEQNGQIGIADISYWHPEYADRETDQEASVDMQLNYGWFVNPFIN--GNYPEVMIERVKANSLAEGYP
Phyllotreta striolat AYRMYKKEF-PHYKAPFIVIDCQWYVPAT-NSSDIAAABRYEFECQMYFHPISK--GDVPPIMKBERIYQLSDEEGE
Brevicoryne brassica AYRLYDEERYNAQQCRVIGITIDTSWYEPES-DSSEDLDISRVLQMKYGLYVHPHYSETGDPVPLRSDVLSAEQEGYA
Chrysomela populi VYRMYKKEF-PHYKMSLVYDMQWYLPKNASSAKDVEAVRRGLDFDAGLYVHPVFL--GGWPEAPEKRIASERSLANLT

330 340 350 360 370 380 390 400

Mm_bGlc_19v RSRLPEFLMEIEELIKDSADFLGNHYSTELCRFSTDDDEDVASPSHAEDTGYCYVSNGBE-----RLSGWCFRKLIL
Mm_bGlc_19h NDRLPVFTABEIEYIHTSDFLGNHYSTDLCKAA-DDASLVHPSNKGDTGADCGKSDDW-ESAASSWVKVVPWCFRKLIL
Mm_bGlc_18 TSRLPYFTKBEIEELIRGSADFLGNHYSTASLCSSEFKELP-SRPSYTSDTGANCYQPDYW-EPTGVSQFVVPWAFGKLL
Mm_bGlc_17 RSRLPEFLMEIEELIKGSSDFLGNHYSTNLCTPIPEEWGVVPSHYVDSGANCYQDPSW-EGSGSWSLKVVPWGLRRLIL
Mm_bGlc_16 ASRLPEFLMEIEELIKGSSDFLGNHYSTHFCSESGID-SISRPSHNYDMGVTCPDYSY-EVAGSFWLSVTPWGLRKLIL
Mm_bGlc_15 TSRLPSFTQBEIEEFIRGSSDFLGNHYSSSLCTSIPEEWALMCPNQFIDVGLCLFPPSPBW-EVAASSWLYVVPWGLRRLIL
Mm_bGlc_14 DTRLPPEFTETETALLRSSDFLGNHYSTYQCTPLEDVDSLPPSEFKLDSGVDWCSPTBW-EGGASSWLVKVPWGLRRLIL
Mm_bGlc_11 RSRLPVFSQBEIEELIKGSSDFLGNHYSGFLCKPLGESQ--IIPSHENDIGSECYLSDDW-EPSAPWFSVTPWGLRNLIL
Mm_bGlc_6 RSRLPFTSDEIEELIKGSDYDFLGNHYSTLCTCPMDSNSNEIVTSYENDVGTSTCVNENW-DEATANGV-RVNADGLRRLIL
Mm_bGlc_5 RSRLPPEFTETETANLKDTSDFLGNHYGAYLCPRLSETDEVISPSHVKDICTYYLSEDW-DQSASDWFVTPWGLRSLIL
Mm_bGlc_3 RSRLPYFTQBEIEELIRGSSDFLGNHYSTLLCSFS--TYDLSPPSQWADTGAVCYQSDW-EGSGSWSLKVVPWGLRSLIL
Mm_bGlc_2 RSRLPYFTQBEIEELIRGSSDFLGNHYSTLLCSFS--TYDLOPPSQWADTGAAAYQLDDEW-EGSGSWSLKVVPWGLRSLIL
Mm_bGlc_1 SSRLPYFTQBEIEELIRGSSDFLGNHYSTLLCSFS--SYDLLPSPQWADTGAVCYQSDW-ESSSSTWLVKVPWCFRKLIL
Tenebrio molitor QSRLPEFTADQEMMKGTFFDFLGNHYSSDKVYFA-EDGAGDHPSSHADTGIVGYQDASW-PGSASSWLVKVPWGLNKLIL
Phyllotreta striolat SSRLPQIPEDIRLMKGAQDYIANNHYFTLMAANA-EASVDEINXKHVDRVNLNFDNPSW-KISVLGW-AICPFVRELLIL
Brevicoryne brassica WSKLPKFTKDEIKLLKGTADFYALNHYSSRLVTFGSDP---NENFNPDASVTVSDEAWLKPNETPYIIPVPEGLRKLIL
Chrysomela populi TSRLPAFSPBETAFINGTYDFGCVNHYTGLLENVENL-PEYKNSISSEYADVHLELSDFDPNW--TLEAGYFAFAPDAPLHVIL

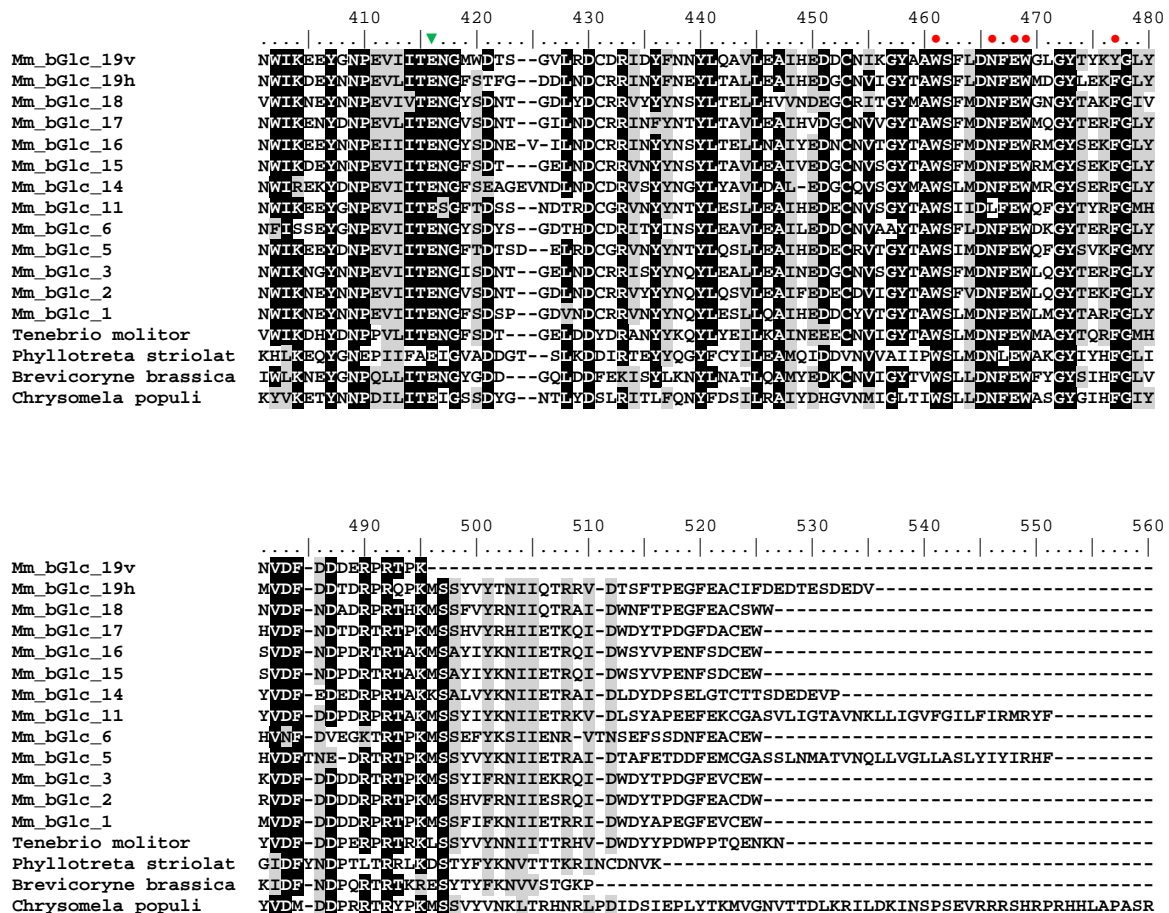


Abbildung 3.1: Proteinsequenzvergleich der putativen beta-Glucosidasen mit bereits charakterisierten beta-Glucosidasen und Myrosinasen. Das multiple Alignment wurde in Programm Geneious 6 mit dem MUSCLE Algorithmus erstellt. Schwarz gefärbte Aminosäuren sind in allen Sequenzen identisch und grau unterlegte in mindestens 2 Sequenzen. Rote Punkte: Glucose Bindungsstelle. Blaue Punkte: Aglykon Bindestellen. Grüne Dreiecke: die beiden katalytisch aktiven Glutaminsäuren.

Eine phylogenetische Analyse der bekannten Insekten beta-Glucosidasen und Myrosinasen mit den putativen *M. melolontha* beta-Glucosidasen ergibt keine engere Verwandtschaft zwischen den bereits beschriebenen und den putativen Enzymen. Es haben sich jedoch zwei größere Cluster unter den *M. melolontha* Glucosidasen herausgebildet. Der erste Cluster beinhaltet die Gene *Mm_bGlc_18*, *Mm_bGlc_17*, *Mm_bGlc_1*, *Mm_bGlc_3*, *Mm_bGlc_2*, *Mm_bGlc_16* und *Mm_bGlc_15*. Der zweite Cluster besteht aus *Mm_bGlc_14*, *Mm_bGlc_11*, *Mm_bGlc_5*, *Mm_bGlc_19v*, *Mm_bGlc_19h* und *Mm_bGlc_6* (siehe Abbildung 3.2).

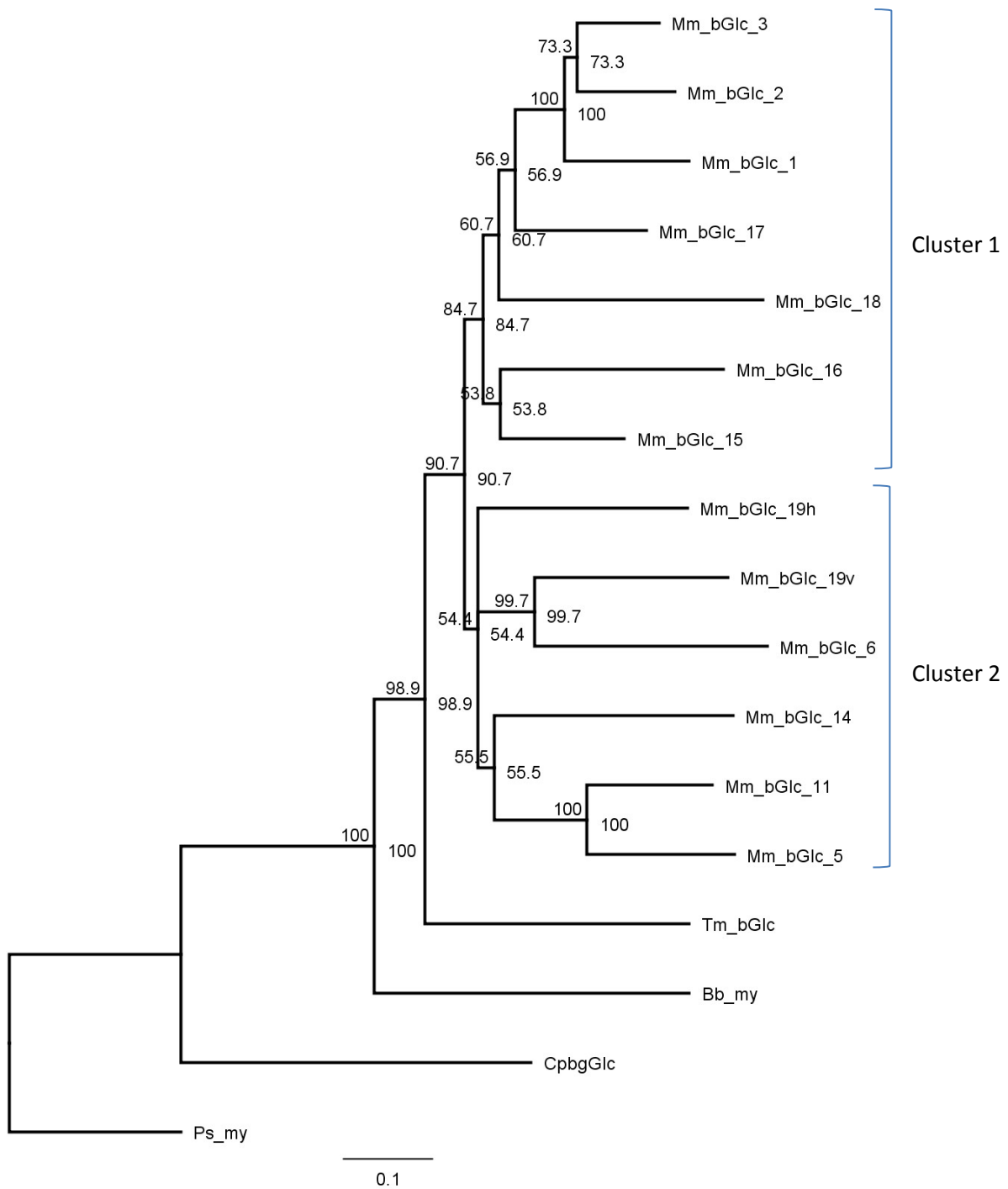


Abbildung 3.2: Phylogenetischer Baum bereits charakterisierter beta-Glucosidasen und putativer *M. melolontha* beta-Glucosidasen. Der phylogenetische Baum wurde durch das Programm Geneious mit dem „Neighbor-Joining“-Algorithmus unter Verwendung eines MUSCLE-Alignments erstellt. Das Bootstrap-Verfahren erfolgte mit 1000 Iterationen. Als *outgroup* wurde eine Myrosinase aus *Phyllotreta striolata* gewählt. CpbGlc: *Chrysomela populi* beta-Glucosidase. Ps_my: *Phyllotreta striolata* Myrosinase. Bb_my: *Brevicoryne brassicae* Myrosinase. Tm_bGlc: *Tenebrio molitor* beta-Glucosidase.

3.2. Klonierung

Bei Versuchsbeginn waren alle untersuchten putativen beta-Glucosidasegene bis auf Mm_bGlc_6, Mm_bGlc_19h und Mm_bGlc_15 bereits vom Betreuer in pCR-Vektoren kloniert. Die beta-Glucosidasegene Mm_bGlc_6, Mm_bGlc_19h und Mm_bGlc_15 lagen zunächst nicht vollständig sequenziert vor. Die 5' und 3' Enden des Gens Mm_bGlc_6 sowie die 3' Enden der Gene Mm_bGlc_19h und Mm_bGlc_15 wurden mit Hilfe einer RACE-PCR und anschließender Nested-PCR amplifiziert (siehe Abbildung 3.3), in einen pIB-Sequenziervektor kloniert und sequenziert. Mit den vollständigen Sequenzinformationen war es möglich Primer anzufertigen die kompletten Gene aus cDNA amplifizieren und so auch Mm_bGlc_6, Mm_bGlc_19h und Mm_bGlc_15 in pIB Vektoren zu klonieren.

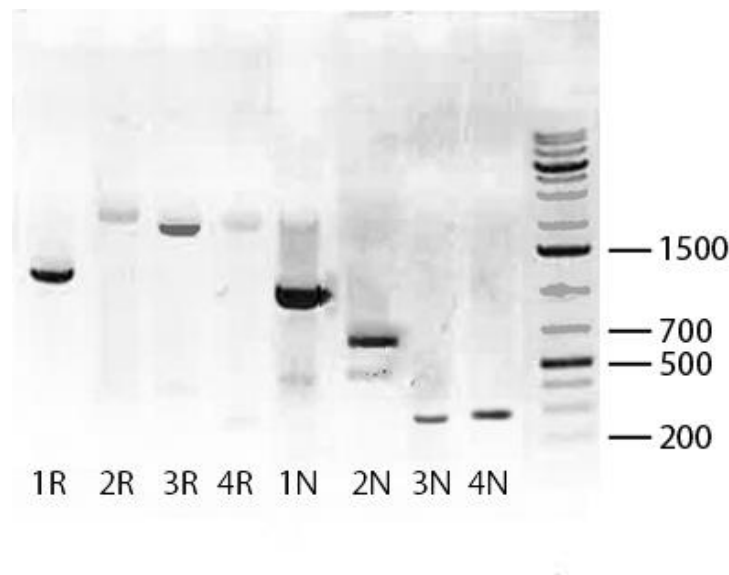


Abbildung 3.3: Gelelektrophoretische Analyse der 5' und 3' RACE (Banden 1R bis 4R) und Nested-PCR Produkte (Banden 1N bis 4N). 1: 5'-Mm_bGlc_6; 2: 3'-Mm_bGlc_6; 3: 3'-Mm_bGlc_19h; 4: 3'-Mm_bGlc_15. Die genspezifischen Primer wurden ausgewählt in Erwartung Sequenzen von 200 bp bis 1000 bp Länge zu amplifizieren. Als Marker kam der „GeneRuler 1kb DNA Ladder“ zum Einsatz.

Aus dem pCR Vektor wurden alle Gene in pIB/V5-His-TOPO Expressionsvektoren kloniert um sie in HighFive Zellen zu exprimieren. Der pIB Vektor trägt ein Blasticidin-Resistenzgen wodurch es möglich ist, die positiv transfizierten HighFive Zellen zu selektieren. Um zu überprüfen ob die Umklonierung in den pIB Vektor erfolgreich war, wurden die Plasmide Kontrollverdaut und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei zeigen sich Banden

im Bereich von 3500 bp die dem pIB/V5-His-TOPO Vektor entsprechen und Genbanden der Länge 1500 bp was der zu erwartenden Länge der beta-Glucosidasegenen entspricht (siehe Abbildung 3.4).

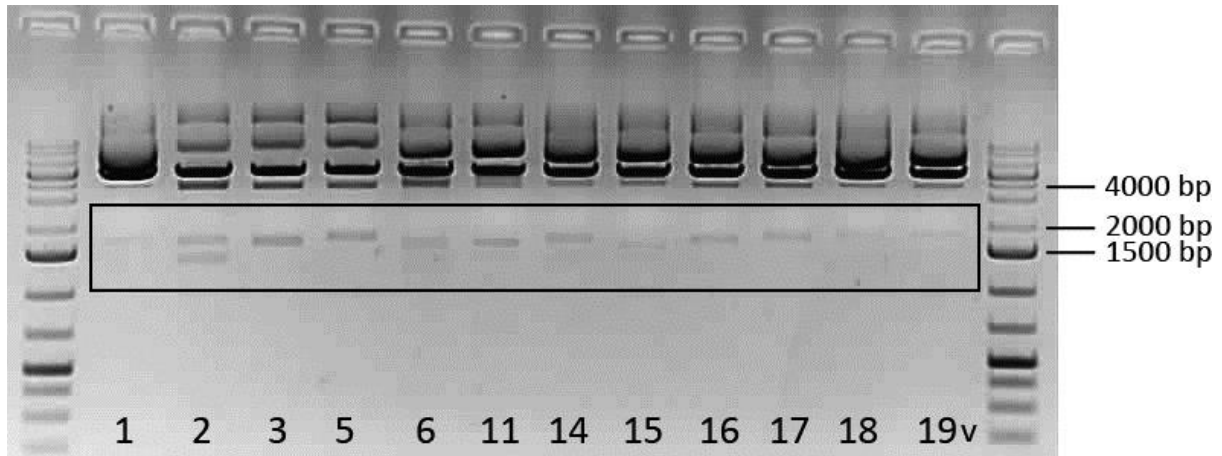


Abbildung 3.4: Gelelektrophoretische Auftrennung der mit BamHI und XbaI Kontrollverdauten Plasmide. Alle Proben zeigen im markierten Bereich Banden von 1500 bp Größe welche den beta-Glucosidasegenen entsprechen. Die Banden knapp unter 4000 bp entsprechen dem pIB-Vektor. Die positiven Plasmide wurden für die Transfektion in die High Five Zellen genutzt. Innerhalb des Gens Mm_bGlc_2 befindet sich wahrscheinlich noch eine Schnittstelle für die eingesetzten Restriktionsenzyme weshalb hier zwei Banden entstanden sind.

Um die klonierten Gensequenzen zu überprüfen wurden Sequenzierungen durchgeführt, die für alle Plasmide die korrekte Sequenz anzeigen (Daten nicht gezeigt). Aus Zeitgründen war es nicht möglich die beta-Glucosidase Mm_bGlc_19h in einen pIB Vektor zu klonieren und zu exprimieren.

3.3. Heterologe Expression

Die amplifizierten Gene wurden heterolog in High Five Zellen exprimiert. Dabei war N-Terminal das Gen-eigene Signalpeptid zur Sekretion des Enzyms in das Medium und C-Terminal ein His₆-Tag konjugiert. Um den Erfolg der heterologen Expression zu überprüfen wurde eine SDS-PAGE mit Western Blot durchgeführt.

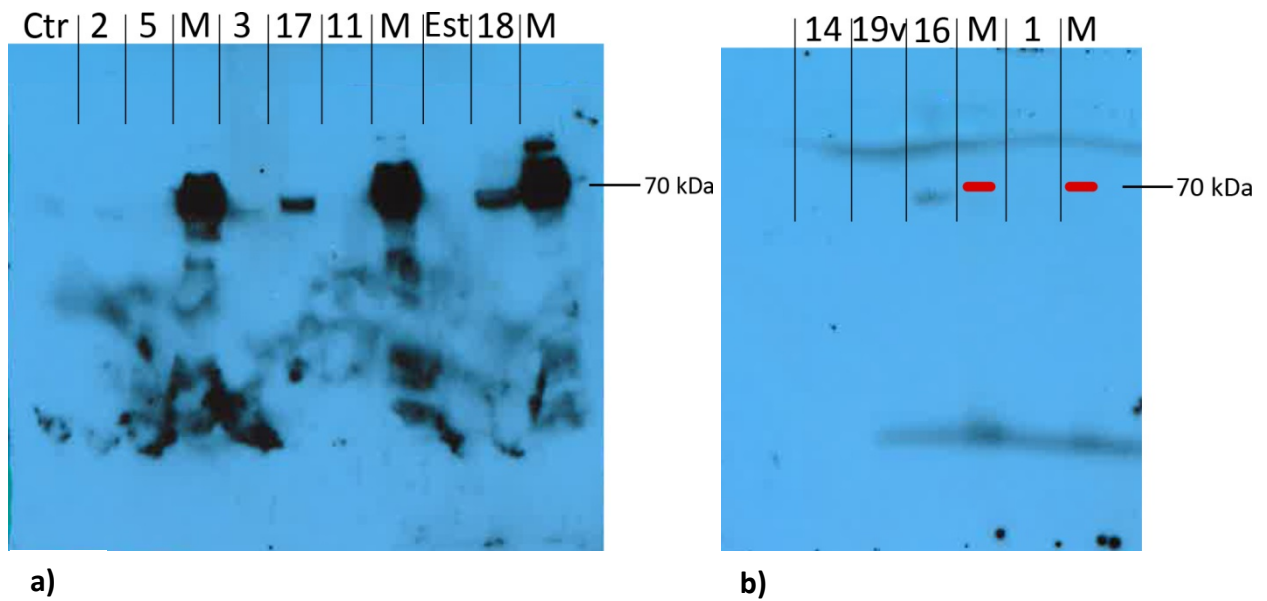


Abbildung 3.5: Auf Fotopapier entwickelter Western Blot mit chemolumineszent angefärbten Proteinbanden. Auf a) sind Proteinbanden der Enzyme Mm_bGlc_3, Mm_bGlc_17 und Mm_bGlc_18 zu sehen. Der PageRuler Prestained Protein Ladder befindet sich in den Taschen M und zeigt eine Bande bei 70 kDa. Auf b) ist die Proteinbande von Mm_bGlc_16 zu sehen. Der Marker war hier nicht chemolumineszent aktiv und wurde deswegen per Hand vom Western Blot auf das Fotopapier übertragen. Ctr: High Five Wildtyp Zellen (Negativkontrolle).

Für die vier Proteine Mm_bGlc_3, Mm_bGlc_17, Mm_bGlc_16 und Mm_bGlc_18 konnten Banden unterhalb von 70 kDa ausgemacht werden (siehe Abbildung 3.5). Auf Grund der ungefähren Übereinstimmung mit dem Molekulargewicht der vier Enzyme (etwa 57 kDa) kann von einer erfolgreichen Expression dieser beta-Glucosidasen ausgegangen werden.

Die beta-Glucosidasen Mm_bGlc_1, Mm_bGlc_2, Mm_bGlc_5, Mm_bGlc_11, Mm_bGlc_14 und Mm_bGlc_19v konnten entweder auf Grund zu geringer Konzentration oder fehlgeschlagener Expression nicht visualisiert werden. Aus Zeitgründen war es nicht möglich die Enzyme Mm_bGlc_15 und Mm_bGlc_6 mittels Western Blot zu untersuchen.

3.4 Charakterisierung der putativen beta-Glucosidasen

Um zu überprüfen welche der beta-Glucosidasen in der Lage sind TA-G zu spalten und welche anderen Glucoside sie als Substrat akzeptieren wurden verschiedene Enzymassays mit TA-G, Salicin, Cellobiose, glykosylierten Benzoxazinoiden und 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucopyranosid durchgeführt.

TA-G wurden von den beta-Glucosidasen Mm_bGlc_3, Mm_bGlc_16 und Mm_bGlc_17 mit hoher Aktivität gespalten. Mm_bGlc_1 und Mm_bGlc_2 zeigen eine geringere Aktivität. Die Enzyme Mm_bGlc_5, Mm_bGlc_11, Mm_bGlc_14, Mm_bGlc_18, Mm_bGlc_19v, Mm_bGlc_6 und Mm_bGlc_15 waren nicht in der Lage, TA-G zu hydrolysieren (siehe Abbildung 3.6, Abbildung 3.7). Ob diese Gene in der jeweiligen Charge nicht exprimiert wurden oder ob sie TA-G als Substrat nicht akzeptiert haben ist unsicher.

Die beta-Glucosidasen Mm_bGlc_1, Mm_bGlc_2, Mm_bGlc_5, Mm_bGlc_6, Mm_bGlc_11, Mm_bGlc_14, Mm_bGlc_15, Mm_bGlc_16 und Mm_bGlc_17 sind in der Lage die β -1,4-glycosidische Bindung der Cellobiose zu hydrolysieren. Die Enzyme Mm_bGlc_3, Mm_bGlc_18 und Mm_bGlc_19v zeigen keine Cellobioseaktivität (siehe Abbildung 3.8). Da sie in dieser Enzymcharge auch anderweitig keine Anzeichen für Aktivität oder dafür exprimiert worden zu sein anzeigen, ist nicht zu klären ob sie nicht exprimiert wurden oder ob sie das Substrat nicht akzeptiert haben.

Das glykosylierte Benzoxazinoid 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-on-2-D-Glucosid (DIMBOA-Glc) wird bei einer hydrolytischen Spaltung der glycosidischen Bindung in die Aglykone DIMBOA oder 6-methoxy-2-benzoxazolinon (MBOA) und Glucose gespalten. Die Enzymassays mit einem Mix aus Benzoxazinoiden als Substrat wurden sowohl auf ihre Glucosebildung (siehe Abbildung 3.9) als auch auf die Bildung von MBOA (siehe Abbildung 3.10) untersucht. Bei der Glucosedetektion zeigt sich, dass DIMBOA-Glc von den *M. melolontha* beta-Glucosidasen Mm_bGlc_1, Mm_bGlc_15 und Mm_bGlc_17 in das Aglykon und Glucose gespalten wird. Die Analyse auf Bildung von MBOA zeigt, dass zusätzlich Mm_bGlc_18 in der Lage ist, DIMBOA-Glc zu spalten. In dieser Charge wurden die beta-Glucosidasen mittels des Cellobioseassays zusätzlich auf Aktivität überprüft. Alle Enzyme bis

auf Mm_bGlc_3 und Mm_bGlc_19v zeigen hier Aktivität (siehe Abbildung 3.8).

Mm_bGlc_17 und Mm_bGlc_18 sind in der Lage, Salicin in Salicylalkohol und Glucose zu spalten (siehe Abbildung 3.11). In dieser Enzymcharge kann für Mm_bGlc_1, Mm_bGlc_2 und Mm_bGlc_5 eine Aktivität für 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucopyranosid nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die drei beta-Glucosidaen Mm_bGlc_1, Mm_bGlc_2 und Mm_bGlc_5 akzeptieren also Salicin tatsächlich als Substrat nicht. Mm_bGlc_6 und Mm_bGlc_15 konnten nicht getestet werden und bleiben damit wie die in dieser Charge weder aktiven noch nachgewiesenen Enzyme Mm_bGlc_3, Mm_bGlc_11, Mm_bGlc_14 Mm_bGlc_16 und Mm_bGlc_19v zweifelhaft.

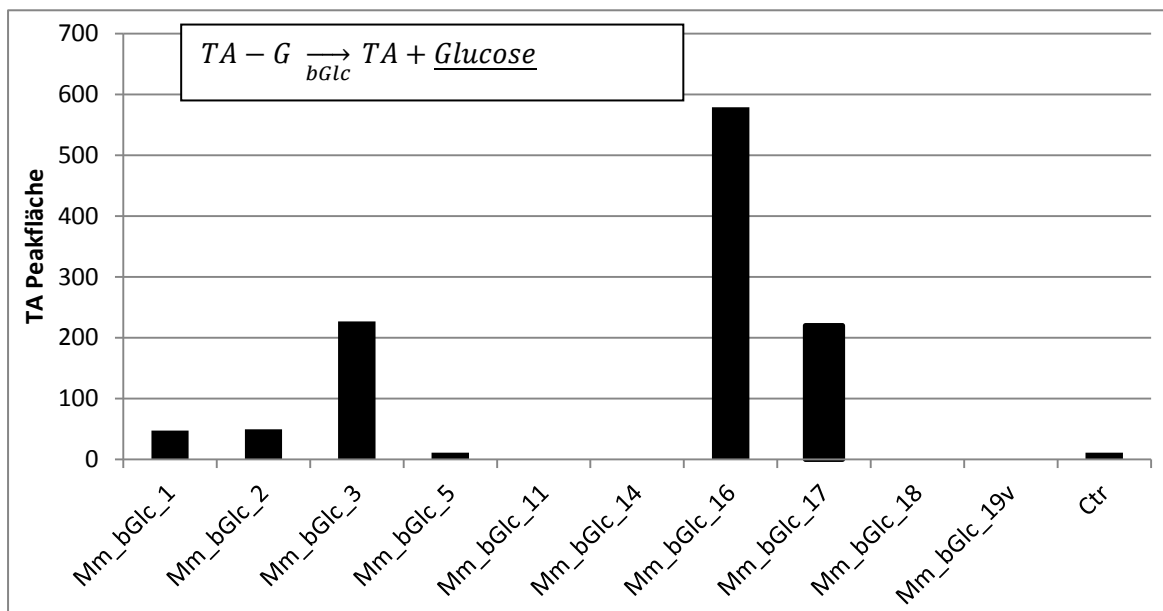


Abbildung 3.6: qualitativer Glucosegehalt in Enzymassays der beta-Glucosidasen mit TA-G als Substrat. Aktive und Cellobiose als Substrat akzeptierende beta-Glucosidasen spalten TA-G in das Aglykon TA und Glucose. Die Detektion der Glucose fand mittels LC-MS/MS statt und wurde durch Messung eines Glucosestandards verifiziert. Zur Qualitativen Analyse wurden die Peakflächen der analysierten Glucose verglichen. HighFive Wildtyp Zellen wurden als Negativkontrolle mitgeführt (Ctr).

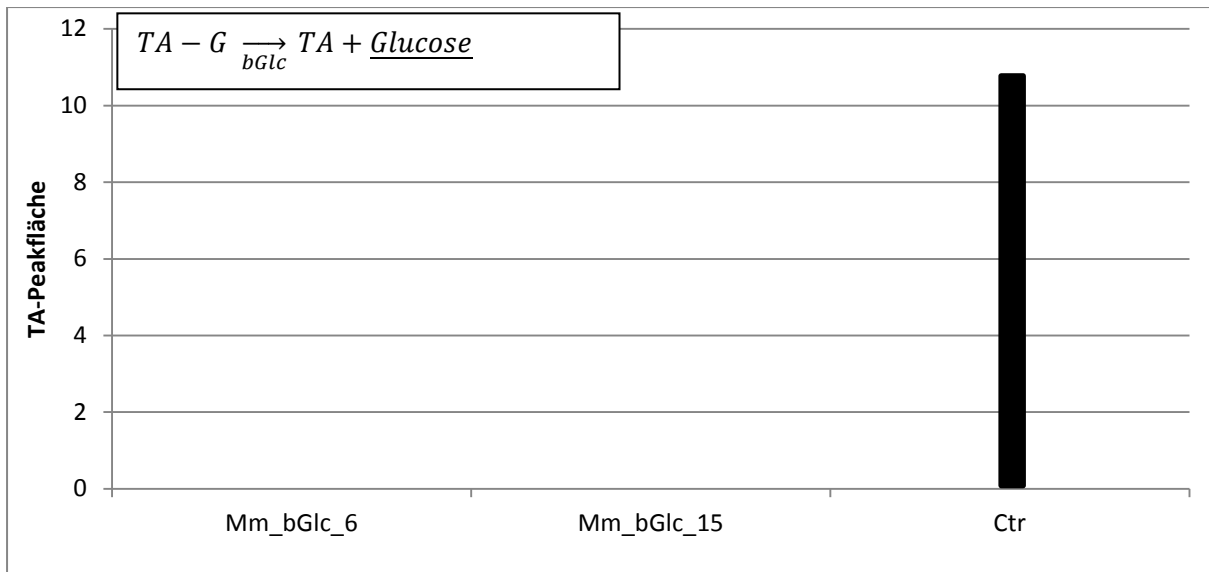


Abbildung 3.7: qualitativer Glucosegehalt in Enzymassays der beta-Glucosidasen Mm_bGlc_6 und Mm_bGlc_15 mit TA-G als Substrat. Aktive und Cellobiose als Substrat akzeptierende beta-Glucosidasen spalten TA-G in das Aglykon TA und Glucose. Der TA-G Enzymassay wurde für diese Gene in einer separaten Charge durchgeführt. HighFive Wildtyp Zellen wurden als Negativkontrolle mitgeführt (Ctr).

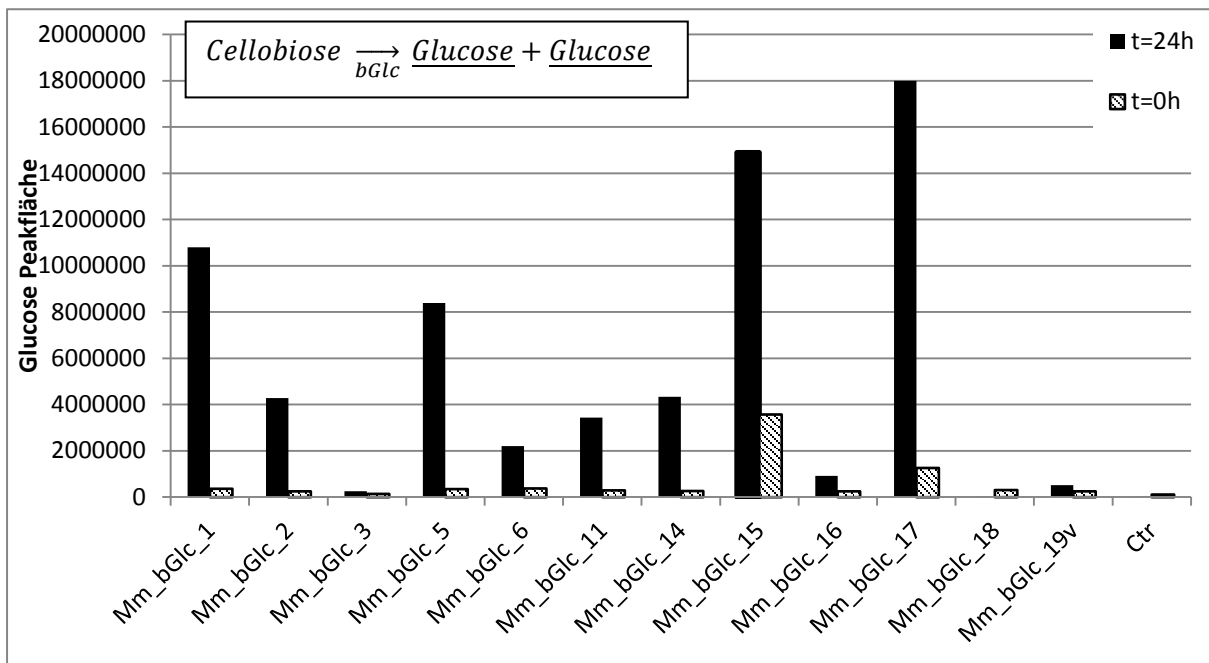


Abbildung 3.8: qualitativer Glucosegehalt in Enzymassays der beta-Glucosidasen mit Cellobiose als Substrat. Aktive und Cellobiose als Substrat akzeptierende beta-Glucosidasen spalten Cellobiose in zwei Glucoseeinheiten. Glucose wurde analysiert und dessen Peakflächen verglichen. HighFive Wildtyp Zellen wurden als Negativkontrolle mitgeführt (Ctr).

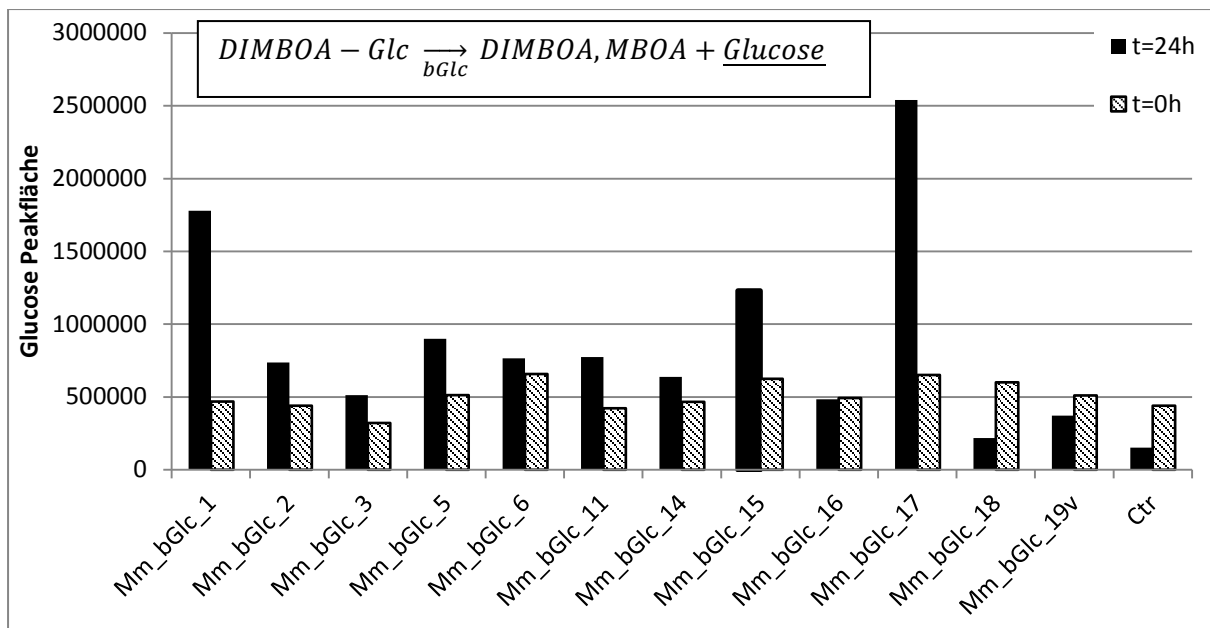


Abbildung 3.9: qualitativer Glucosegehalt in Enzymassays der beta-Glucosidasen mit DIMBOA-Glc als Substrat. Aktive und DIMABOA-Glc als Substrat akzeptierende beta-Glucosidasen spalten DIMBOA-Glc in das DIMBOA bzw MBOA Alygon und Glucose. Die Glucose wurde detektiert und die Peakflächen verglichen. HighFive Wildtyp Zellen wurden als Negativkontrolle mitgeführt (Ctr).

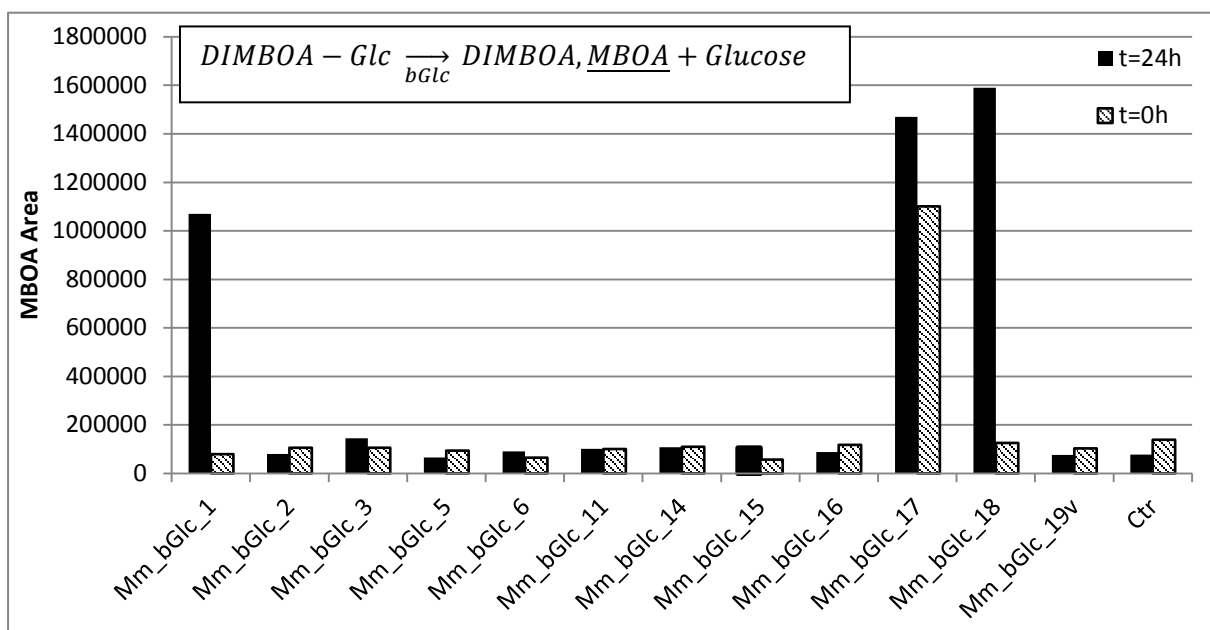


Abbildung 3.10: qualitativer MBOA-gehalt in Enzymassays der beta-Glucosidasen mit DIMBOA-Glc als Substrat. Aktive und DIMABOA-Glc als Substrat akzeptierende beta-Glucosidasen spalten DIMBOA-Glc in das DIMBOA bzw. MBOA Alygon und Glucose. Die Glucose wurde detektiert und die Peakflächen verglichen. HighFive Wildtyp Zellen wurden als Negativkontrolle mitgeführt (Ctr).

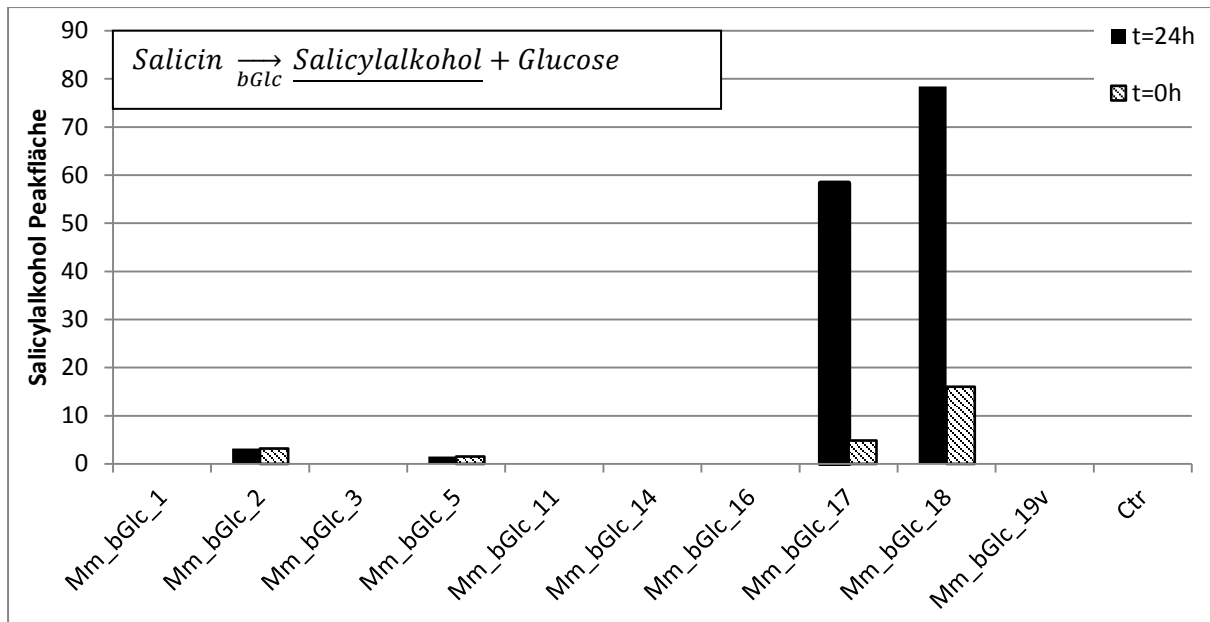


Abbildung 3.11: qualitativer Salicylalkoholgehalt in Enzymassays der beta-Glucosidasen mit Salicin als Substrat. Aktive und Salicin als Substrat akzeptierende beta-Glucosidasen spalten Salicin in Salicylalkohol und Glucose. Salicylalkohol wurde detektiert und dessen Peakflächen verglichen. HighFive Wildtyp Zellen wurden als Negativkontrolle mitgeführt (Ctr).

4. Diskussion

Die beta-Glucosidasen aus *M. melolontha* zeigen typische Sequenzmotive anderer Insekten beta-Glucosidasen

Beta-Glucosidasen, auch Glycosid Hydrolasen Familie 1 (GH1), können in allen Domänen lebender Organismen gefunden werden (Cairns & Esen, 2010). Sie hydrolysieren die beta-1,6-glycosidische Bindung zwischen zwei Glucosemolekülen oder zwischen Glucose und einem Aglykon. Im Gegensatz zum Pflanzengenom, die häufig 40 und mehr beta-Glucosidasegene aufweisen (Opassiri et al., 2006) sind in Insekten weniger GH1 Enzyme zu finden (Beran et al., 2014). In vielen Insekten sind beta-Glucosidasen bekannt, die für die Verdauung von Bedeutung sind und cellulosehaltige Stoffe als Nahrungsquelle erschließen (Pontoh & Low, 2002). In Transkriptom von *M. melolontha* sind Sequenzen mehrerer beta-Glucosidasen identifiziert worden. Zu Beginn der Arbeit waren 10 putative *M. melolontha* beta-Glucosidasen bekannt. 3 weitere beta-Glucosidase Sequenzen konnten durch RACE-PCR vervollständigt werden. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der 13 putativen Sequenzen mit 4 bekannten beta-Glucosidasen aus *Tenebrio molitor*, *Chrysomela populi* und Myrosinase aus *Phyllotreta striolata* und *Brevicoryne brassicae* zeigt, dass alle *M. melolontha* Enzyme über die charakteristischen Motive von beta-Glucosidasen verfügen. Die katalytisch aktive, nukleophile Glutaminsäure befindet sich im charakteristischen YTENG Motiv (Aminosäure E₂₀₂) (Withers, 1990). Die als Säure/Base fungierende Glutaminsäure findet sich in der NEP Sequenz (Aminosäure E₄₁₆) (Wang et al., 1995). Beide konnten in allen untersuchten beta-Glucosidasegenen nachgewiesen werden. Außerdem konnten 10 in der Literatur beschriebene konservierte Glucose Bindungsstellen und 6 variable Aglykon Bindungsstellen identifiziert werden (Abbildung 3.2). Außerdem sind in allen GH1 Enzymen die konservierten Aminosäuren H₁₅₅, die mit der Hydroxylgruppe an C-3 des Glycons interagiert, N₂₀₁, die mit der Hydroxylgruppe an C-2 des Glycons wechselwirkt sowie Q₅₃, die mit der Hydroxylgruppe an C-2 des Glycons eine Bindung eingeht (Sanz-Aparicio et al., 1998), nachweisbar. Das berechnete Molekulargewicht der putativen *M. melolontha* beta-Glucosidasen reicht von 54 kDa bis 57 kDa und liegt damit im Gewichtsbereich der bereits beschriebenen GH1 Enzyme aus Insekten (Ferreira et al., 2001; Rahfeld et al., 2015). Die

Vorhersage über ein möglicherweise vorhandenes N-terminales Signalpeptid zeigt, dass alle *M. melolontha* Enzyme bis auf Mm-bGlc_19h mit hoher Wahrscheinlichkeit über ein sekretorisches Signalpeptid von 16 – 19 Aminosäuren Länge verfügen. Das Signalpeptid sorgt dafür, dass das Protein nach Expression über den Sekretionsweg aus der Zelle ausgeschleust wird (Byeon et al., 2005). Da der Wirkungsort der beta-Glucosidasen in *M. melolontha* der Magen ist, ist das Vorhandensein eines Signalpeptides Voraussetzung für deren Wirksamkeit.

M. melolontha beta-Glucosidasen hydrolysieren TA-G und andere glykosylierte Abwehrstoffe

TA-G ist das im Löwenzahnmilchsaft vorrangig vorkommende Sesquiterpenlacton (Huber et al., 2015). Die *M. melolontha* Larve ist der natürliche Fressfeind des Löwenzahns und Untersuchungen haben gezeigt, dass sich ein hoher TA-G Gehalt im Löwenzahn negativ auf das Wachstum von *M. melolontha* auswirkt (nicht publizierte Daten). Im Magen der Larve wird TA-G hydrolysiert und es kommt zur Bildung von Glucose und des toxischen TA Aglykons (nicht publizierte Daten). Weil pflanzliche beta-Glucosidasen im alkalischen Magenmilieu der Larve keine Aktivität zeigen, wird TA-G mutmaßlich von insekteneigenen beta-Glucosidasen hydrolysiert (Egert et al., 2005). Diese Arbeit hat gezeigt, dass die *M. melolontha* beta-Glucosidasen Mm_bGlc_1, Mm_bGlc_2, Mm_bGlc_3, Mm_bGlc_16 und Mm_bGlc_17 in der Lage sind, TA-G zu spalten. Des Weiteren hydrolysieren Mm_bGlc_15 und Mm_bGlc_18 weitere glykosylierte Abwehrstoffe wie Benzoxazinoide oder Salicin. Da zumindest Benzoxazinoide in den natürlichen Futterpflanzen des Maikäfers vorkommen, ist es wahrscheinlich, dass sich das Insekt durch die Hydrolyse dieser Stoffe selbst vergiftet.

Dieser Mechanismus ist auch bei anderen herbivoren Insekten zu beobachten. Gerade Generalisten, also Insekten die sich beim Fraß nicht auf einige wenige Pflanzenarten beschränken, haben teilweise unspezifische beta-Glucosidasen die pflanzliche Glucoside in Glucose und toxische Aglykone spalten (Pentzold et al., 2014). Die Ackerbohne *Vicia faba* speichert die beiden Alkaloid-Glycoside Vicin als Abwehrstoffe. Wenn der Bohnenkäfer *Callosobruchus maculatus* an *V. faba* frisst, hydrolysieren seine endogenen beta-

Glucosidasen Vicin und das toxischen Aglykone Divicine wird freigesetzt. Dieses Alkaloid inhibiert die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase des Bohnenkäfers und stört damit den Fett- und mitochondrialen Stoffwechsel (Desroches et al., 1997; Marquardt, 1989). Iridoidglycoside sind pflanzliche Sekundärmetabolite und zeigen eine giftige Wirkung auf Insekten (Bernays & De Luca, 1981). Diese Glycoside werden im Magen von Insekten mit entsprechend aktiven beta-Glucosidasen hydrolysiert und damit in eine aktive Form gewandelt (Pankoke, Bowers & Dobler, 2010). Das Aglykon bindet irreversibel an Proteine und inhibiert Enzyme (Kim et al., 2000). Der Bärenspinner *Grammia incorrupta* nimmt bei Fraß am Spitzwegerich *Plantago lanceolata* das Iridoidglycosid Aucubin auf. Im Magen des Insekts wird Aucubin teilweise durch pflanzliche aber auch durch endogene beta-Glucosidasen in Glucose und das aktive Aucubigenin gespalten (Pankoke, Bowers & Dobler, 2012).

Häufig sind Insekten mit endogener beta-Glucosidaseaktivität gegenüber pflanzlichen Glykosiden in der Lage, die Aktivität ihrer beta-Glucosidasen bei Fraß von toxischen Glykosiden zu verringern (Pentzold et al., 2014). So reduziert auch *M. melolontha* die Aktivität ihrer beta-Glucosidasen wenn sie TA-G frisst (nicht publizierte Daten). Da die Larve über eine Vielzahl von beta-Glucosidasen verfügt, ist nicht bekannt, ob sie die Aktivität aller reduziert oder nur derer, die an der Spaltung von TA-G beteiligt sind. Weiterhin wird im Magen von *M. melolontha* Glutathion an freies TA konjugiert und dadurch in eine ungiftige Form umgewandelt. Ob *M. melolontha* einen Vorteil davon hat, TA-G erst zu hydrolysieren und anschließend durch Glutathionkonjugation wieder unschädlich zu machen oder ob dies allein auf Grund unspezifischer beta-Glucosidasen geschieht, ist unklar.

Klassifikation der *M. melolontha* beta-Glucosidasen nach Ferreira und Terra

Terra und Ferreira schlagen vor, beta-Glucosidasen je nach Substratspezifität in drei Klassen zu unterteilen. Klasse 1 enthält alle Enzyme die sowohl Glykosyl-beta-Glucosidase und Aryl-beta-Glucosidase Aktivität zeigen, das heißt sie spalten Cellobiose und mit Arylgruppen substituierte Glucoside (Terra & Ferreira, 1994). Klasse 2 enthält Enzyme die nur Glykosyl-beta-Glucosidase aktiv sind, also nur Cellobiose hydrolysieren können (Terra & Ferreira,

1994). Klasse 3 enthält die Enzyme, die nur Aryl- oder Alkylsubstituierte Glucoside spalten können (Terra & Ferreira, 1994).

Die untersuchten beta-Glucosidasen Mm_bGlc_1, Mm_bGlc_2, Mm_bGlc_15, Mm_bGlc_16 und Mm_bGlc_17 lassen sich in die Klasse 1 der Substratspezifität einordnen, da sie sowohl Cellobiose als auch Arylsubstituierte Glucoside hydrolysieren. Mm_bGlc_5, Mm_bGlc_6, Mm_bGlc_11 und Mm_bGlc_14 gehören zu Klasse 2, da sie nur Cellobiose als Substrat akzeptieren. Die beta-Glucosidasen der Klassen 1 und 2 lassen sich trotz unterschiedlicher Substratspezifitäten zu den typischen beta-Glucosidasen zählen, da sie in der Lage sind, Cellobiose für das Insekt als Nahrungsquelle zu erschließen (Terra & Ferreira, 1994). Damit sind 8 der 13 untersuchten beta-Glucosidasen in der Lage, Cellobiose zu hydrolysieren und damit ein wichtiger Bestandteil des Verdauungssystems von *M. melolontha*. Zur Klasse 3 lassen sich die beta-Glucosidasen Mm_bGlc_3 und Mm_bGlc_18 zählen. Sie hydrolysieren nur Glycoside mit hydrophoben Aglykons und spalten im Versuch TA-G bzw. Salicin. Es ist möglich, dass die natürlichen Substrate für beta-Glucosidasen der Klasse 3 Glycolipide sind, da auch sie aus einem hydrophoben Aglykon verbunden mit einem Monosaccharid bestehen (Terra & Ferreira, 1994). Glycolipide kommen in den Zellwänden von Pflanzen vor und sind somit auch Bestandteil der Nahrung von *M. melolontha* (Beiß, 1963). TA-G wird von den drei Klasse 1 Enzymen Mm_bGlc_1, Mm_bGlc_2, Mm_bGlc_17 sowie von den beiden Klasse 3 Enzymen Mm_bGlc_3 und Mm_bGlc_16 hydrolysiert. Diese beta-Glucosidasen könnten Cellobiose oder Glycolipide als natürliches Substrat haben und überdies auf Grund ihrer Unspezifität TA-G hydrolysieren. Phylogenetisch lassen sich die Klassen 1 und 3 *M. melolontha* beta-Glucosidasen dem Cluster 1 und Klasse 2 dem Cluster 2 der beta-Glucosidasegene zuordnen (siehe Abbildung 3.10). Damit zeigt sich, dass sich eine Gruppe von beta-Glucosidasen entwickelt hat, die in der Lage ist, hydrophobe Substrate zu spalten und eine zweite Gruppe, die diese nicht spalten kann. Möglicherweise verringert *M. melolontha* beim Verdau von TA-G-haltiger Löwenzahnwurzel nur die Aktivität der phylogenetischen Gruppe von beta-Glucosidasen die hydrophobe Substrate spalten um somit einer Vergiftung mit TA zu entgehen aber trotzdem noch Cellobiose spalten zu können. Auf Grund der begrenzten Anzahl von getesteten Substraten sowie auf Grund der Tatsache, dass nicht in jedem Enzymassay alle beta-Glucosidasen aktiv waren, ist die genaue

Zuordnung der Enzyme in die 3 verschiedenen Klassen noch nicht sicher bestätigt. Hier müssen weitere Experimente folgen die, diese Hypothesen bestätigen.

5. Zusammenfassung

Im Transkriptom der Maikäferlarve *M. melolontha* sind 13 Gene zu finden, die für putative beta-Glucosidasen codieren. Die Sequenzen von 3 dieser Gene waren nur unvollständig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, die Sequenz dieser 3 Gene zu vervollständigen und alle 13 beta-Glucosidasogene heterolog in HighFive Zellen zu exprimieren. Die Enzyme wurden aufkonzentriert und mittels Enzymassays auf ihre Aktivität und Substratspezifität getestet.

Es zeigte sich, dass die Enzyme Mm_bGlc_1, Mm_bGlc_2, Mm_bGlc_3, Mm_bGlc_16 und Mm_bGlc_17 in der Lage sind, das glykosylierte Sesquiterpenlacton TA-G zu hydrolysieren.

Weiter zeigte sich, dass Mm_bGlc_1, Mm_bGlc_15, Mm_bGlc_16, Mm_bGlc_17 und Mm_bGlc_18 die Salicin und glykosylierte Benzoxazinoide spalten können. Da zumindest Benzoxazinoide in den Futterpflanzen von *M. melolontha* vorkommen, ist es wahrscheinlich, dass die Larve sich durch die Aktivität ihrer beta-Glucosidasen selbst vergiftet.

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass sich in *M. melolontha* zwei phylogenetische Cluster von Genen gebildet haben, die für beta-Glucosidasen codieren. Durch Enzymassays mit verschiedenen Substraten konnte aufgezeigt werden, dass einer der beiden Gencluster beta-Glucosidasen beherbergt, welche hydrophobe Substrate (TA-G, Salicin, DIMBOA-Glc) akzeptieren, wohingegen im zweiten Cluster beta-Glucosidasen zu finden sind, die hydrophile Substrate (Cellobiose) spalten.

In nachfolgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob sich diese Klassifizierung durch weitere Substratassays verifizieren lässt und ob sich die Hydrolyse der glykosylierten Sekundärstoffe negativ auf die Larve auswirkt.

6. Literaturverzeichnis

BEIß, U. (1963). Phosphatide und Glykolipide. In *Modern Methods of Plant Analysis / Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, vol. 6. *Modern Methods of Plant Analysis / Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, pp. 52-80. Springer Berlin Heidelberg.

BERAN, F., PAUCHET, Y., KUNERT, G., REICHEL, M., WIELSCH, N., VOGEL, H., REINECKE, A., SVATOS, A., MEWIS, I., SCHMID, D., RAMASAMY, S., ULRICH, C., HANSSON, B. S., GERSHENZON, J. & HECKEL, D. G. (2014). Phyllostreta striolata flea beetles use host plant defense compounds to create their own glucosinolate-myrosinase system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 7349-54.

BERNAYS, E. & DE LUCA, C. (1981). Insect antifeedant properties of an iridoid glycoside: ipolamiide. *Experientia* 37, 1289-1290.

BYEON, G. M., LEE, K. S., GUI, Z. Z., KIM, I., KANG, P. D., LEE, S. M., SOHN, H. D. & JIN, B. R. (2005). A digestive beta-glucosidase from the silkworm, Bombyx mori: cDNA cloning, expression and enzymatic characterization. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 141, 418-27.

CAIRNS, J. R. K. & ESEN, A. (2010). beta-Glucosidases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67, 3389-3405.

CZIZEK, M., CICEK, M., ZAMBONI, V., BEVAN, D. R., HENRISSAT, B. & ESEN, A. (2000). The mechanism of substrate (aglycone) specificity in β -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize β -glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13555-13560.

DALE R. WALTERS , A. C. N., GARY D. LYON (2014). *Induced Resistance for Plant Defense: A Sustainable Approach to Crop Protection*.

DAVIES, G. & HENRISSAT, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3, 853-859.

DESROCHES, P., MANDON, N., BAEHR, J. C. & HUGNARD, J. (1997). Mediation of host-plant use by a glucoside in Callosobruchus maculatus F. (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Insect Physiology* 43, 439-446.

DUTARTRE , L., AUDANT-LACOUR ,P., HILLIOU ,F.& FEYEREISEN , R. (2011). Toxicological and transcriptomic effects of DIMBOA and its precursors on the polyphagous insect Spodoptera frugiperda. Ph.D. thesis, Universite de Nice-Sophia Antipolis.

EDGAR, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32, 1792-7.

EGERT, M., STINGL, U., BRUUN, L. D., POMMERENKE, B., BRUNE, A. & FRIEDRICH, M. W. (2005). Structure and topology of microbial communities in the major gut compartments of Melolontha melolontha larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Appl Environ Microbiol* 71, 4556-66.

FERREIRA, A. H., MARANA, S. R., TERRA, W. R. & FERREIRA, C. (2001). Purification, molecular cloning, and

properties of a beta-glycosidase isolated from midgut lumen of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae. *Insect Biochem Mol Biol* 31, 1065-76.

FURSTENBERG-HAGG, J., ZAGROBELNY, M. & BAK, S. (2013). Plant Defense against Insect Herbivores. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 10242-10297.

GLEADOW, R. M. & WOODROW, I. E. (2002). Constraints on effectiveness of cyanogenic glycosides in herbivore defense. *Journal of Chemical Ecology* 28, 1301-1313.

HÄNSEL, R., KARTARAHARDJA, M., HUANG, J.-T. & BOHLMANN, F. (1980). Sesquiterpenlacton- β -d-glucopyranoside sowie ein neues eudesmanolid aus *Taraxacum officinale*. *Phytochemistry* 19, 857-861.

HUBER, M., TRIEBWASSER-FREESE, D., REICHEL, M., HEILING, S., PAETZ, C., CHANDRAN, J. N., BARTRAM, S., SCHNEIDER, B., GERSHENZON, J. & ERB, M. (2015). Identification, quantification, spatiotemporal distribution and genetic variation of major latex secondary metabolites in the common dandelion (*Taraxacum officinale* agg.). *Phytochemistry* 115, 89-98.

JENG, W. Y., WANG, N. C., LIN, M. H., LIN, C. T., LIAW, Y. C., CHANG, W. J., LIU, C. I., LIANG, P. H. & WANG, A. H. (2011). Structural and functional analysis of three beta-glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes koshunensis*. *J Struct Biol* 173, 46-56.

JOHNSON, K. S. & FELTON, G. W. (1996). Potential influence of midgut pH and redox potential on protein utilization in insect herbivores. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 32, 85-105.

JONES, A. M., WINGE, P., BONES, A. M., COLE, R. & ROSSITER, J. T. (2002). Characterization and evolution of a myrosinase from the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae*. *Insect Biochem Mol Biol* 32, 275-84.

KIM, D.-H., KIM, B.-R., KIM, J.-Y. & JEONG, Y.-C. (2000). Mechanism of covalent adduct formation of aucubin to proteins. *Toxicology Letters* 114, 181-188.

KOCH, F. H., K. . (2000). Biologie und Ökologie der Insekten/ein Taschenlexikon. *Zoosystematics and Evolution* 76, 283-283.

MARQUARDT, R. R. (1989). Vicine, convicine and their aglycones-divicine and isouramil. . *Toxicants of Plant Origin* 161-200.

MITHOFER, A. & BOLAND, W. (2012). Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects. *Annual Review of Plant Biology*, Vol 63 63, 431-450.

OPASSIRI, R., POMTHONG, B., ONKOKSOONG, T., AKIYAMA, T., ESEN, A. & KETUDAT CAIRNS, J. R. (2006). Analysis of rice glycosyl hydrolase family 1 and expression of Os4bglu12 beta-glucosidase. *BMC Plant Biol* 6, 33.

PANKOKE, H., BOWERS, M. D. & DOBLER, S. (2010). Influence of iridoid glycoside containing host plants on midgut β -glucosidase activity in a polyphagous caterpillar, *Spilosoma virginica* Fabricius (Arctiidae). *Journal of Insect Physiology* 56, 1907-1912.

- PANKOKE, H., BOWERS, M. D. & DOBLER, S. (2012). The interplay between toxin-releasing β -glucosidase and plant iridoid glycosides impairs larval development in a generalist caterpillar, *Grammia incorrupta* (Arctiidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42, 426-434.
- PENTZOLD, S., ZAGROBELNY, M., ROOK, F. & BAK, S. (2014). How insects overcome two-component plant chemical defence: plant beta-glucosidases as the main target for herbivore adaptation. *Biological Reviews* 89, 531-551.
- PONTOH, J. & LOW, N. H. (2002). Purification and characterization of beta-glucosidase from honey bees (*Apis mellifera*). *Insect Biochem Mol Biol* 32, 679-90.
- R. HAUSS, F. S. (1976). Zur Polyphagie der Engerlinge von *Melolontha melolontha* L. an Pflanzen aus Wiese and Ödland. *Anzeiger für Schadlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz* 49, 129–132.
- RAHFELD, P., HAEGER, W., KIRSCH, R., PAULS, G., BECKER, T., SCHULZE, E., WIELSCH, N., WANG, D., GROTH, M., BRANDT, W., BOLAND, W. & BURSE, A. (2015). Glandular beta-glucosidases in juvenile *Chrysomelina* leaf beetles support the evolution of a host-plant-dependent chemical defense. *Insect Biochem Mol Biol* 58, 28-38.
- RASMANN, S. & AGRAWAL, A. A. (2008). In defense of roots: A research agenda for studying plant resistance to belowground herbivory. *Plant Physiology* 146, 875-880.
- SANZ-APARICIO, J., HERMOSO, J. A., MARTINEZ-RIPOLL, M., LEQUERICA, J. L. & POLAINA, J. (1998). Crystal structure of beta-glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: insights into the catalytic activity in family 1 glycosyl hydrolases. *J Mol Biol* 275, 491-502.
- SCHMIDT, T. J. (1999). Toxic activities of sesquiterpene lactones: Structural and biochemical aspects. *Current Organic Chemistry* 3, 577-608.
- SCUDDER, G. G. E. (2009). *The importance of insects*. Wiley-Blackwell.
- SINGER, M. S., BERNAYS, E. A. & CARRIERE, Y. (2002). The interplay between nutrient balancing and toxin dilution in foraging by a generalist insect herbivore. *Animal Behaviour* 64, 629-643.
- TERRA, W. R. & FERREIRA, C. (1994). Insect digestive enzymes - properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 109, 1-62.
- WANG, Q., TRIMBUR, D., GRAHAM, R., WARREN, R. A. & WITHERS, S. G. (1995). Identification of the acid/base catalyst in *Agrobacterium faecalis* beta-glucosidase by kinetic analysis of mutants. *Biochemistry* 34, 14554-62.
- WITHERS, S. G. W., R. A. J.; STREET, I. P.; RUPITZ, K.; KEMPTON, J. B.; AEBERSOLD, R. (1990). *Journal of the American Chemical Society '1990'* 112, 5887-5889.
- ZAGROBELNY, M. & MOLLER, B. L. (2011). Cyanogenic glucosides in the biological warfare between plants and insects: the Burnet moth-Birdsfoot trefoil model system. *Phytochemistry* 72, 1585-92.
- ZHENG, G. Q. (1994). Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *artemisia-annua*. *Planta Medica* 60, 54-57.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die auf irgendeine Art und Weise zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Besonderer Dank gilt Meret Huber, die mir das Thema zur Verfügung gestellt hat und mich mit vielen Ratschlägen begleitete.

Insbesondere möchte ich Sandra Irmisch danken, die mich in die Welt des molekularbiologischen Arbeitens eingeführt hat und mir die so wichtigen Techniken für diese Arbeit beibrachte.

Danken möchte ich auch Peter Rahfeld, der mich in der Insektenzellkultur maßgeblich unterstützte. Mein Dank gilt ebenfalls Bettina Raguschke für das Sequenzieren etlicher Sequenzen.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit lag in gleicher oder ähnlicher Weise noch keiner Prüfungsbehörde vor und wurde bisher noch nicht veröffentlicht.

Jena, den 10.10.2015

Alexander Riedel