

Bachelorarbeit

Zur Erlangung des wissenschaftlichen Grades
Bachelor of Engineering (B. Eng.)
im Studiengang Biotechnologie

**Molekulare Charakterisierung
von Sulfatasen und deren Beitrag zur
Entgiftung von Glucosinolaten in der
Kohlmotte *Plutella xylostella***

vorgelegt von

Josephine Schmalzer

Jena, den 29.08.2012

Matrikelnummer: 632292

Hochschulbetreuer: Prof. Dr. W. Künkel

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
1. Einleitung.....	1
2. Material.....	4
2.1 Medien	4
2.2 Lösungen und Puffer	4
2.3 Chemikalien.....	4
2.4 Reagenzien.....	5
2.5 Vektoren und Bakterien.....	5
2.6 Enzyme	6
2.7 Geräte.....	6
2.8 Reaktions-Kits	7
2.9 Einwegartikel.....	7
3. Methoden.....	8
3.1 PCR-Varianten.....	8
3.1.1 Race-PCR	8
3.1.2 Volllängen-PCR	9
3.1.3 Kolonie-PCR	9
3.2 Agarose- Gelelektrophorese	10
3.3 DNS-Gelaufreinigung.....	11
3.4 Aufreinigung des PCR-Produktes	11
3.5 Klonierung	12
3.6 Plasmidisolation.....	13
3.7 Transfektion.....	13
3.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	15
3.9 Western Blot	16
3.9.1 Pufferansätze	16
3.9.2 Blotten	16
3.10 Restriktionsverdau	18
3.11 Glucosinolat-Sulfatase-Aktivitätstest	19

3.12 Sulfatase-Aktivitätstest	20
3.12.1 Test mit 4-Nitrocatecholsulfat (PNCS)	21
3.12.2 Test mit 4-Methylumbelliferylsulfat (4-MUS)	21
4. Ergebnisse.....	22
4.1 Amplifikation der GSS 2 aus dem Transkriptom von <i>P. xylostella</i>	22
4.2 Klonierung und heterologe Expression der GSS 2	24
4.3 Aktivitätstest der GSS und ASS	26
4.3.1 Test mit pflanzlichen Glucosinolaten.....	26
4.3.2 Test mit Standardsubstraten für Sulfatasen.....	28
4.3.2.1 Substrat: 4-Nitrocatecholsulfat	28
4.3.2.2 Substrat: 4-Methylumbelliferylsulfat.....	29
5. Diskussion.....	31
6. Zusammenfassung	34
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	II
TABELLENVERZEICHNIS.....	III
LITERATURVERZEICHNIS.....	IV
ANHANG.....	V
I. Ansatztabellen	V
II. Sequenzen verwendeter Primer.....	IX
III. Vektorabbildungen und Schnittstellen verwendeter Restriktionsenzyme	X
IV. Aminosäuresequenz der GGS 2.....	XI
V. Symbole der Aminosäuren.....	XII
VI. Bandenabbildungen verwendeter Größenmarker.....	XIII

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3-IM	3-Indolyl-Methyl-Glucosinolat (Glucobrassicin)
4-MSOB	4-Methyl-Sulfinylbutyl-Glucosinolat (Glucoraphanin)
4-MTB	4-Methylthiobutyl-Glucosinolat (Glucoerucin)
4-MUS	4-Methylumbelliferylsulfat
4-Prop	4-Propenyl-Glucosinolat (Sinigrin)
Abb.	Abbildung
ASS	Arylsulfatase
ASS <i>Hpom</i>	Arylsulfatase der <i>Helix pomatia</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dYT-Medium	Hefe-Trypton Medium
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	und andere
F	forward (vorwärts)
FGly	α -Formylglycin
GSL	Glucosinolat
GSP	genspezifischer Primer
GSS	Glucosinolatsulfatase
<i>H.pomatia</i>	<i>Helix pomatia</i>
HPLC	Hochdruck-Flüssigchromatografie
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Lysogeny Broth Medium
MES	2-(N-morpholino)ethansulfon-Säure
MPI CE	Max-Planck-Institut für chemische Ökologie
NK	Negativkontrolle
<i>P.xylostella</i>	<i>Plutella xylostella</i>

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PNCS	p-Nitrocatecholsulfat
pOHB	p-Hydroxybenzyl-Glucosinolat (Sinalbin)
R	reverse (rückwärts)
RACE	schnelle Amplifikation von cDNS-Enden
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S.O.C. Medium	Super Optimal Broth + 20 mM Glukose
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
Tris	Trizma Hydrochlorid
TSB	Tricin-Probenpuffer

1. Einleitung

Im Verlauf der Evolution haben Pflanzen Mechanismen entwickelt, um sich gegen schädliche biotische und abiotische Umweltfaktoren zu schützen und zu verteidigen. Zu den biotischen Faktoren zählen unter anderem Parasitismus, Konkurrenz und Fraßfeinde. Die sessile Lebensweise der Pflanzen erlaubt es ihnen nicht, sich durch Flucht ihren Feinden zu entziehen. Daher haben Pflanzen Strategien zur Fraßabwehr entwickelt. Durch verschiedene pflanzliche Sekundärstoffe können Geruch und Geschmack verändert, Giftstoffe gebildet oder Fraßfeinde der Insekten angelockt werden.

Die Kreuzblütengewächse (*Brassicaceae*), dazu zählen auch wichtige Kulturpflanzen wie Brokkoli, Rosenkohl, Kohl, Chinakohl, Blumenkohl, Grünkohl, Kohlrabi, Senf, Rettich, Rüben und Brunnenkresse, stellen die Hauptnahrungsquelle vieler Insekten dar. Diese *Brassica*-Arten besitzen Senfölglycoside zur Verteidigung. Glucosinolate (GSL) bestehen aus einem N-Hydroximosulfatester, welcher mit einem Thioglucose-Rest und einer variablen Seitenkette verbunden ist. Die GSL können durch die spezifische Struktur der Seitenkette (Aryl-, Alkenyl-, Alkyl- oder Indolylstruktur) unterschieden werden (Wittstock, 2004, Watzl, 2001). Bislang wurden ungefähr 130 verschiedene GSL, lokalisiert in Vakuolen, aus Pflanzen isoliert. Ihre biochemische Aktivität als Fraßgifte erlangen die GSL mit Hilfe des Glucosinolat-Myrosinase- Systems. Die Myrosinase, eine Thioglucosidase, ist in speziellen Myrosinzellen gespeichert und in den Vakuolen angereichert. Das Enzym katalysiert die Glucosinolathydrolyse. Zwischen der Myrosinase und dem Glucosinolat besteht eine räumliche Trennung. Durch mechanische Einwirkungen (z.B. wenn Schädlinge an der Pflanze fressen) kann diese aufgehoben werden, und die Myrosinase spaltet die Thioglucoside in β -D-Glukose und Aglykone (Abb. 1, A) (Watzl, 2001). Bei den Aglykonen handelt es sich um Thiole, die in toxische Produkte umgelagert werden können. Diese sogenannten Senföle sind zum Beispiel Isothiocyanate, Nitrile und Thiocyanate (Ratzka, 2002, Matile, 1980).

Herbivore (pflanzenfressende) Insekten haben sich den chemischen Abwehrstrategien der Pflanzen angepasst. Die Generalisten fressen an Pflanzen mit unterschiedlichen Abwehrsystemen. Sie sind somit variabel bei der Wahl der Fraßpflanze oder können verschiedene chemische Stoffe inaktivieren. Herbivoren, welche ein bestimmtes

pflanzliches Abwehrsystem spezialisiert umgehen können, werden auch Spezialisten genannt. Sie besitzen meist hoch aktive, spezifische Entgiftungsenzyme, um Wirtspflanzen effektiv zu nutzen.

Ein wichtiger Vertreter der Spezialisten ist die Kohlmotte *Plutella xylostella* (*P.xylostella*). Sie stammt vermutlich aus dem Mittelmeerraum und hat sich mittlerweile weltweit verbreitet. *P.xylostella* bevorzugt die Blätter und Blütenstände von Brokkoli, Senf, Chinakohl, Weißkohl, Blumenkohl und Raps als Nahrungsquelle. Vor allem aber beim Kohlanbau richtet sie erheblichen Schaden an, sodass nicht auf den Einsatz von Schädlingsbekämpfungsmitteln verzichtet werden kann. Gegen viele Insektizide sind die Motten jedoch schon resistent. Die Schädigung der Pflanze geht von den Larven aus. Sie besitzen im Darm ein besonderes Enzym, die Glucosinolatsulfatase (GSS), welche die Abspaltung der Sulfatgruppe vom GSL katalysiert. Die Desulfoglucosinolate werden von der Myrosinase nicht mehr als Substrat erkannt und können auch nicht zu toxischen Isothiocyanaten umgesetzt werden (Abb. 1, B) (Ratzka, 2002). Die Desulfoglucosinolate werden dann mit dem Kot ausgeschieden.

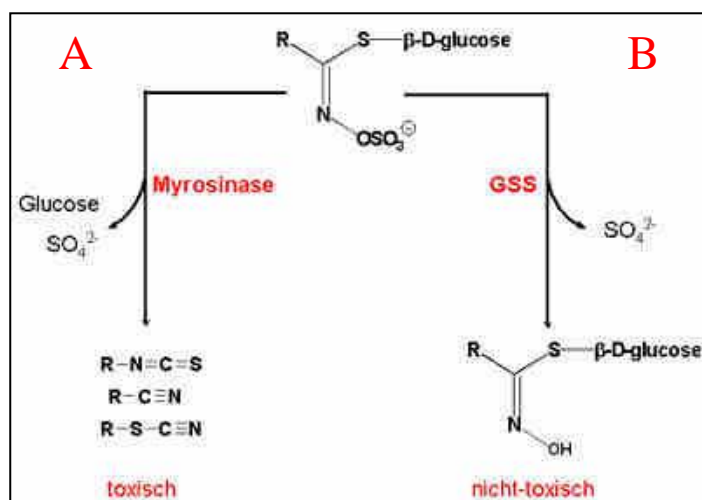


Abb. 1: Entschärfung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems. Wenn die Myrosinase mit dem Glucosinolat nach mechanischer Einwirkung in Verbindung kommt, gibt es zwei mögliche Abläufe: Normalerweise spaltet die Myrosinase den Glucoseresest von dem GSL ab und übrig bleiben toxische Abbauprodukte wie Isothiocyanat, Niril oder Thiocyanat (A). Oder die Larven der GSS 1 von *P. xylostella* spalten die Sulfatgruppe von GSL ab. Es entstehen keine toxischen Produkte und die Abwehr der Pflanze ist gescheitert (B). (Grafik: MPI CE)

Ratzka et al (2002) haben in der Kohlmotte die Gensequenz einer Glucosinolatsulfatase identifiziert und die Entgiftungsfunktion des Enzyms bewiesen. Weitere Forschungen am Max-Planck Institut für chemische Ökologie (MPI CE) haben gezeigt, dass jedoch zwei GSS und eine Arylsulfatase (ASS) im Genom von *P.xylostella* vorhanden sind (Abb. 2). Die Arylsulfatase ist ein Enzym welches im Wesentlichen die Sulfathydrolyse

katalysiert und aktiv am Stoffwechsel von Mucopolysacchariden beteiligt ist. Es ist noch nicht bekannt, ob die zweite GSS, hier GSS 2 genannt, eine ähnliche Aktivität aufweist wie die ursprüngliche GSS, hier GSS 1 genannt. Die GSS 1 und GSS 2 befinden sich in relativer Nähe (7,2 kb) zueinander. Die ASS liegt mindestens 34,6 kb entfernt, kann aber auch auf einem anderen Chromosom liegen.

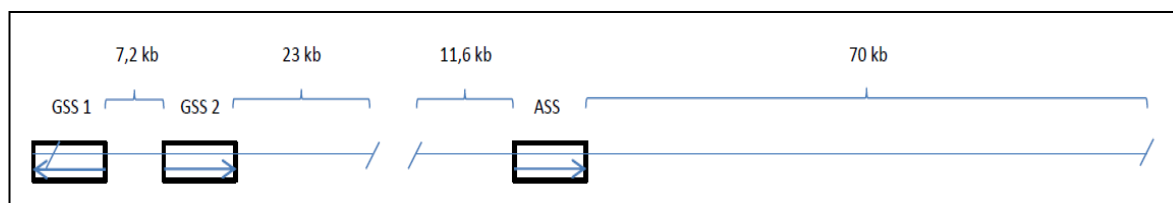


Abb. 2: Schema der Lage von GSS 1, GSS 2 und ASS auf dem Genom. Die schwarzen Kästen repräsentieren die Gene.

Das Ziel der Arbeit war es, aufbauend auf den Ergebnissen von Ratzka et al. (2002) und den weiteren Forschungen am MPI CE, zunächst den kodierenden Bereich der GSS 2 zu sequenzieren und anschließend erfolgreich zu exprimieren. Zur Aufklärung der Desulfoaktivität sollten die Enzyme der GSS 2 und ASS getestet werden. Somit kann auch festgestellt werden, ob sie bei der Detoxifikation von Glucosinolaten eine Rolle spielen. In einem weiteren Test soll die allgemeine Sulfataseaktivität von ASS, GSS 1 und GSS 2 vergleichend untersucht werden.

2. Material

2.1 Medien

LB-Medium (Bacto-Trypton 1% (w/v), Hefeextrakt 0.5% (w/v), NaCl 0.5% (w/v), pH 7)

dYT-Medium (Bacto-Trypton 1.6% (w/v), Hefeextrakt 1% (w/v), NaCl 0.5% (w/v), pH 7)

Gibco[®] Express Five[®] SFM (Invitrogen)

Gibco[®] Sf-900TM II SFM (Invitrogen)

S.O.C.-Medium (Invitrogen)

2.2 Lösungen und Puffer

LiChrosolv - Wasser für Chromatografie (Merck Chemicals)

Nucleasefreies Wasser (Ambion)

Reinstwasser (Millipore)

Ladepuffer 6x Orange (Fermentas)

Rinderserumalbumin 100x (BSA) (New England BioLabs)

O'GeneRulerTM DNA Ladder Mix 0.1 µg/µl (Fermentas)

SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder (BIO-RAD)

Rotiphorese[®] Tris/Acetat/EDTA-Puffer 50x (Carl Roth)

Puffer II 10x (New England BioLabs)

TSB - Tricin Probenpuffer (BIO-RAD)

XT MES Laufpuffer 20x (BIO-RAD)

Tris-Glycin-Puffer 10x (BIO-RAD)

Advantage 2 PCR Puffer 10x (Clontech)

TRIS-gepufferte Saline 10x (TBS) (BIO-RAD)

Page BlueTM Protein staining solution (Fermentas)

2.3 Chemikalien

Ampicillin (50 mg/ml in DMF gelöst)

XGal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Beta-D-Galactopyranosid) (40 mg/ml in DMF gelöst)

Ethidiumbromid 1%, 10 mg/ml (Carl Roth)

Tween[®] 20, Sigma Ultra (SIGMA-ALDRICH)

XT Reducing Agent 20x (BIO-RAD)
Methanol (Carl Roth)
Natriumkarbonat wasserfrei (Carl Roth)
Calciumchlorid Dihydrat (Carl Roth)
Mangan(II)-Chlorid (Carl Roth)
Magnesiumchlorid Hexahydrat (Carl Roth)
Tris (Sigma)
Tris/HCl (Sigma)
MES (Carl Roth)
Natriumchlorid (Carl Roth)
Natriumhydroxid 1M Stock

2.4 Reagenzien

dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP 11 mM ea.) ROTI-MIX PCR3 (Carl Roth)
Agarose LE (Biozym Scientific)
Milchpulver (Blotting Grade) (Carl Roth)
Insekten GeneJuice[®] Transfektionsreagenz (Merck Chemicals)
Goat anti-V5 (BETHYL)
Sinigrin from Horseradish (Sigma Aldrich[®])
Arylsulfatase von *Helix pomatia* Typ H-2 (Sigma Aldrich[®])
Arylsulfatase von *Plutella xylostella*
Glucosinolatsulfatase 1 von *Plutella xylostella*
4-Nitrocatechol Sulfate (Sigma Aldrich[®])
4-Methylumbelliferyl Sulfate (Sigma Aldrich[®])

2.5 Vektoren und Bakterien

pCR[™] 2.1-TOPO[®] Vektor (Invitrogen)
pIB/V5-His-TOPO[®] Vektor (Invitrogen)
Escherichia coli One Shot[™] TOP10-Zellen DH10B[™] (Invitrogen)

2.6 Enzyme

Advantage 2 Polymerase Mix 50x (Clontech)

Restriktionsenzyme:

*Hind*III (BioLabs)

*Sac*II (BioLabs)

2.7 Geräte

Wasserbad Typ E5/51 (Dinkelberg)

Thermomixer Comfort Typ5 355 (Eppendorf)

Zentrifuge 5415 R (Eppendorf)

NanoDrop ND-1000 Spektrometer (peqlab Biotechnologie GmbH)

PCR – Mastercycler EP Gradient S (Eppendorf)

Inkubationsschüttler - Certomat IS (Sartorius)

Gel Doc Systeme - Gene Genius (Syngene)

Dark Reader Transilluminator (Clare Chemical Research)

DNS Analyzer ABI Prism 3730XL (Applied Biosciences)

Blockthermostat digital (VWR)

Flockeneisautomat AF100AS (Scotsman)

Laborschüttler 3D Kreisel, gyro rocker ISSL3 (stuart)

Milli-Q Synthesis A10 Reinstwasser (Millipore)

Freedom Evo 150/8 (Tecan)

DualRange Analysenwaage XS105 (Mettler Toledo)

Infinite M200 (Tecan)

Eppendorf Research 2.5 (Eppendorf)

Eppendorf Research 10 (Eppendorf)

Eppendorf Research 20 (Eppendorf)

Eppendorf Research 200 (Eppendorf)

Eppendorf Research 1000 (Eppendorf)

Eppendorf Research 5000 (Eppendorf)

Eppendorf Research Pro 1200 Easypet[®] (Eppendorf)

2.8 Reaktions-Kits

TOPO[®] TA Cloning[®] mit pCR[™] 2.1-TOPO[®] Vektor (Invitrogen)

pIB/V5-His TOPO[®] TA Expression Kit (Invitrogen)

Zymoclean[™] Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research)

GeneJET[™] Miniprep Kit (Fermentas)

AccuPrime[™] Taq DNA Polymerase System (Invitrogen)

SuperSignal[®] West HisProbe[™] Kit (Thermo Scientific)

Taq PCR Master Mix (QIAGEN)

2.9 Einwegartikel

Parafilm[™]

Amersham Hyperfilm[™] ECL (GE Healthcare)

Criterion XT vorgefertigtes Gel, 4-12 % Bis-Tris (BIO-RAD)

PVDF Membran (BIO-RAD)

96-Deep-Well-Platten (Thermo Scientific)

UV-Star Plate flat bottom (Greiner Bio-One)

96 MicroWell Platten (Thermo Scientific)

24-Deep-Well-Platten (Thermo Scientific)

Serologische Pipetten (Greiner Bio-One)

Pipettenspitzen:

Normale (StarLab, Nerbe Plus)

Sterilfilterspitzen 20, 200, 1000 µl (Nerbe Plus)

10µl (Kisker Biotech)

Reaktionsgefäße:

1.5 und 2 ml (Greiner Bio-One)

15 und 50 ml (Greiner Bio-One)

3. Methoden

3.1 PCR-Varianten

3.1.1 RACE-PCR

Als Template für die PCR lag doppelsträngige cDNS von *P. xylostella* vor. Diese wurde mit dem SMARTTM cDNA Library Construction Kit entsprechend den Vorgaben hergestellt. Dazu wurde jedoch der Ankerprimer CDs III durch CDs-3M (Evrogen) ausgetauscht. Die RACE-PCR wurde angewandt um die unbekanntenen Regionen des 5'- und auch des 3'-Endes der GSS cDNS zu amplifizieren. Dabei wurde während der Erststrangsynthese an die cDNS-Enden eine Ankersequenz gefügt, die als primerbindende Matrize für den Ankerprimer diente. Der Ankerprimer wurde mit einem genspezifischen Primer (GSP), der von einer bereits bekannten Sequenz abgeleitet wurde, in einer PCR gekoppelt.

RACE-PCR Ansatz:

- 0.5 µl Advantage 2 Polymerase Mix
- 1.0 µl Template
- 2.5 µl Advantage 2 PCR Puffer
- 0.5 µl dNTP Mix
- 0.5 µl Ankerprimer
- 0.5 µl GSP
- 19.5 µl dH₂O

Einstellungen am Thermocycler für 3' und 5' RACE:

0.5 min	94 °C	
<hr/>		
0.5 min	94 °C	
2.0 min	72 °C	5 Zyklen
<hr/>		
0.5 min	94 °C	
0.5 min	70 °C	5 Zyklen
2.0 min	72 °C	
<hr/>		
0.5 min	94 °C	
0.5 min	68 °C	25 Zyklen
2.0 min	72 °C	

5'-RACE-PCR:

Ankerprimer: SMART IV

Genspezifische Primer: 303, 506, 1406

3'-RACE-PCR:

Ankerprimer: CDs-3M

Genspezifische Primer: 456

3.1.2 Vollängen-PCR

Um den vollständigen Leserahmen der GSS cDNS zu amplifizieren, wurde eine Vollängen-PCR mit dem AccuPrime™ Taq DNA Polymerase System durchgeführt. Dafür wurde sowohl ein genspezifischer Forward- (P_{xyl}GSS2_pIBF) als auch ein Reverse- (P_{xyl}GSS2_pIBR) Primer benutzt. Es wurde das gleiche Template wie bei der RACE-PCR verwendet.

PCR-Ansatz:

0.5 µl AccuPrime™ Taq DNS Polymerase

2.5 µl AccuPrime™ PCR Puffer I

0.5 µl Forward-Primer

0.5 µl Reverse-Primer

0.5 µl Template

20.5 µl dH₂OEinstellungen am Thermocycler:

2.0 min	94 °C	
<hr/>		
0.5 min	94 °C	
0.5 min	60 °C	30 Zyklen
1.5 min	68 °C	
<hr/>		

3.1.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde genutzt um positive Klone eines Transformationsansatzes nach der Ligation von PCR-Produkten in den pIB/V5-His-TOPO® Vektor zu detektieren. Durch Kombination von GSP und Vektorprimer wurden Klone mit Insert in korrekter Orientierung (insense) selektiert.

Ansatz:

- 10 µl Taq PCR Master Mix
- 0.4 µl GSP
- 0.4 µl Vektorprimer
- 9.2 µl dH₂O

Die Kolonien wurden direkt von der Platte mit einem sterilen Holzstäbchen abgenommen und in den PCR-Ansatz gemischt. Danach wurde jede Kolonie in einer Flüssigkultur angereichert, indem das Holzstäbchen in einem Reagenzglas mit dYT und Ampicillin über Nacht im Schüttler bei 37 °C inkubiert wurde.

Folgende Schritte wurden am Thermocycler eingestellt:

3.0 min	94 °C	
0.5 min	94 °C	
0.5 min	55 °C	30 Zyklen
1.5 min	72 °C	

Anschließend wurden 5 µl PCR-Produkt mit 1 µl Ladepuffer versetzt und zusammen mit dem Ladder Mix auf ein Agarosegel (1 %) aufgetragen. Die Flüssigkulturen der positiven Klone wurden für die Plasmidisolation verwendet.

3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose wird aus den Zellwänden der Rotalge gewonnen und steht in pulveriger Form zur Verfügung. Um ein Gel herzustellen, wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer durch Kochen geschmolzen. Nachdem die Agarose geschmolzen war, wurden 2 µl Ethidiumbromid zu 50 ml Agarose-Puffer-Lösung gegeben, um später die Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen. Beim anschließenden Erkalten in einem Gelschlitten mit Kamm bildete sich eine Gelmatrix mit unterschiedlich großen Poren aus. Die Anzahl der Poren und somit die Trenneigenschaft des Gels konnte durch die entsprechende Agarosekonzentration an die Länge des DNS-Fragmentes angepasst werden. Der verwendete Puffer enthält Tris für die Pufferung des pH-Wertes, Acetat, um die Ionenkonzentration des Puffers zu gewährleisten und EDTA, welches die Aggregation von Nukleinsäuren durch Magnesium-Ionen minimiert.

Folgende Agarosegele wurden verwendet:

Agarosegel (1 %):

50 ml TAE-Puffer

0,5 g Agarose

Agarosegel (1,2 %):

50 ml TAE-Puffer

0,6 g Agarose

Nach dem Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und der Schlitten in die Elektrophoresekammer, die TAE-Puffer enthält, gebracht. Die mit Ladepuffer versetzten PCR-Produkte und 5 µl Ladder Mix wurden in die Geltaschen pipettiert. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wanderten die DNS-Fragmente aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen durch die Gelmatrix zur positiv geladenen Anode. Nach 30 min bei 125 V wurde die Elektrophorese abgebrochen und das Ergebnis unter UV- oder Blaulicht ausgewertet.

3.3 DNS-Gelaufreinigung

Die PCR-Produkte wurden mit dem Dark Reader Transilluminator (blaues Licht) sichtbar gemacht und die gewünschte Bande mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die Isolierung der DNS aus dem Agarosegel erfolgte mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit. Das Gelstück wurde mit dem dreifachen Volumen Agarose-Lösepuffer versetzt und bei 55 °C für 5 min vollständig geschmolzen. Anschließend wurde die Agarose-Lösung in einer Säule mit DNS-bindendem Polymer geladen, für 1 min zentrifugiert und zweimal mit Ethanol gewaschen. Die DNS konnte dann mit destilliertem Wasser von der Säule eluiert werden.

3.4 Aufreinigung des PCR-Produktes

Neben der Gelaufreinigung wurde die DNS auch teilweise direkt aus dem PCR-Produkt eluiert. Dafür wurden zwei Volumen DNS-Bindepuffer mit einem Volumen PCR-Produkt gemischt und in einer Säule mit DNS-bindendem Polymer für 30 s zentrifugiert. Die DNS wurde zweimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit destilliertem Wasser von der Säule gelöst.

3.5 Klonierung

Die nach der Aufreinigung gewonnene DNS mit einem überstehenden Adenin an jedem 3'Ende wurde entweder in einen pCRTM 2.1-TOPO[®] Vektor oder in einen pIB/V5-His-TOPO[®] Vektor, die jeweils ein Thyminende haben, ligiert. Dazu wurde dem jeweiligen Ansatz entsprechend das TOPO[®] TA Cloning[®] oder das pIB/V5-His TOPO[®] TA Expression Kit verwendet.

Ligationsansatz:

0.2 µl Vektor

0.5 µl Salzlösung

1.0 µl Insert

1.3 µl dH₂O

Dieser Ansatz wurde bei RT mit 16 µl chemisch kompetenten TOP10-Zellen 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C und eine erneute Abkühlung auf Eis. Nach der Zugabe von 250 µl S.O.C. Medium wurde der Ansatz für 60 min bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt. Nach der Inkubationszeit wurde der Ansatz auf die LB-Agarplatten mit Amp und XGal ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die über Nacht gewachsenen Kolonien konnten nun für die Sequenzierung vorbereitet werden. Dafür wurden 400 ml dYT mit 800 µl Ampicillin vermischt und 600 µl von diesem Medium in jedes Well einer 96-Deep-Well Platte pipettiert. Die Kolonien auf den Agarplatten wurden mit einem sterilen Holzstäbchen abgenommen und in die Wells gebracht. Es erfolgt eine Inkubation über Nacht im Schüttler bei 37 °C und eine anschließende automatisierte Plasmidisolation.

Um spezielle Teile einer Sequenz zu erhalten, wurden sequenzspezifische Primer bestellt. Diese konnten dann direkt mit den zu untersuchenden Plasmiden für eine Sequenzierungs-PCR angesetzt werden. Dafür musste das Plasmid in einer Konzentration von 140 ng/µl vorliegen.

Sequenzierungs-PCR-Ansatz:

2 µl Plasmid

0.5 µl Primer

3.5 µl dH₂O

Die Sanger-Sequenzierung erfolgte ebenfalls automatisiert mit dem DNS Analyzer.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm „Lasergene SeqMan“ ausgewertet.

3.6 Plasmidisolierung

Zur Isolierung von kleinen Plasmidmengen aus Klonen transformierter *E.coli*-Zellen wurde das GeneJET™ Miniprep Kit verwendet. Dafür wurden je 2 ml der Übernacht-Flüssigkultur zentrifugiert und das Pellet in RNase-Puffer resuspendiert. Durch den Lyse-Puffer wurden die bakteriellen Zellwände aufgebrochen und die Plasmid-DNS freigesetzt. Anschließend wurden mit SDS-haltigem Neutralisierungspuffer Proteine denaturiert. Es folgte eine Zentrifugation, um Zelltrümmer, genomische DNS und Proteine zu sedimentieren. Die Plasmid-DNS blieb in Lösung und wurde auf eine Säule mit DNS-bindendem Polymer gebracht. Die Plasmid-DNS wurde durch den Elutionspuffer vom Säulenmaterial der Säule gelöst und bei -20 °C gelagert.

Die Plasmidkonzentration wurde mit dem NanoDrop gemessen. Als Blindwert wurde der Elutionspuffer verwendet.

3.7 Transfektion

Bei der Transfektion wurde Plasmid-DNS in High Five®- oder Sf-9-Zellen eingebracht. Konfluente High Five®- oder Sf-9-Zellen einer Stammkultur wurden unter sterilen Bedingungen im Verhältnis 1:4 mit serumfreiem Medium verdünnt. In einer 24-Well-Platte wurden Ansätze mit 500 µl je Well vorbereitet. Nach der Inkubation über Nacht bei 27 °C mit ausgewählten Plasmiden, konnten Sf-9- und High Five®-Zellen transfiziert werden. Dazu wurde das Insekten GeneJuice® Transfektionsreagenz benutzt, was die Aufnahme von Plasmiden in Insektenzellen durch Erhöhung der Zellmembranpermeabilität ermöglicht, der sogenannten Lipofektion. Zu Beginn wurde ein Transfektionsansatz für Plasmide, eine Negativkontrolle (ohne Enzym) und eine Positivkontrolle (mit GSS 1) hergestellt.

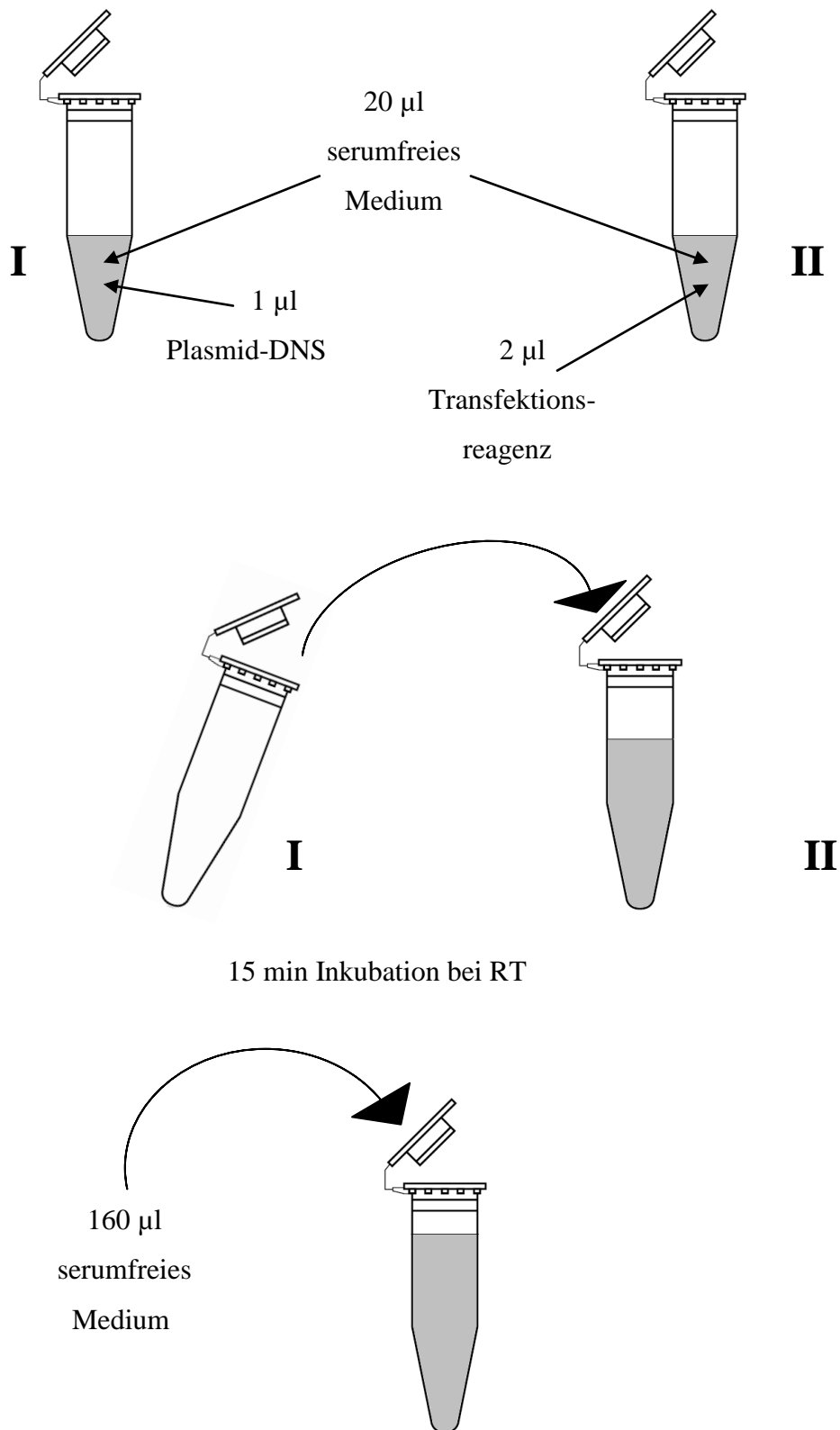


Abb. 3: Schematische Darstellung zur Herstellung des Transfektionsansatzes.

Für den Grundansatz wurden 20 µl serumfreies Medium mit 1µl Plasmid-DNS versetzt (Abb. 3). Der zweite Ansatz wurde aus 20 µl serumfreiem Medium und 2µl Insekten

GeneJuice[®] hergestellt. Nun wurde tröpfchenweise der erste zum zweiten Ansatz gegeben, vorsichtig homogenisiert und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Danach wurde 160 µl serumfreies Medium zugegeben. Das Medium der adhärenen Zellen wurde dann durch 200 µl Transfektionsansatz ersetzt. Die Zellkultur wurde 48 Stunden bei 27 °C inkubiert. Das Medium, das die von den Zellen sekretierten Proteine enthält, wurde danach abgenommen und bei -20 °C gelagert. Die Zellen am Boden des Kulturgefäßes wurden mit PBS (1x) abgetrennt und ebenfalls bei -20 °C aufbewahrt.

3.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Eine SDS-PAGE wurde verwendet, um denaturierte Proteine aus dem Kulturmedium transfizierter Zellen dem Molekulargewicht entsprechend aufzutrennen. Nachdem das Gradientengel in der Elektrophoresekammer befestigt wurde, konnte diese mit XT MES Laufpuffer (1x) befüllt werden. Als Proben wurden das Medium mit den sekretierten Proteinen, eine Positivkontrolle (eine ältere GSS-Sequenz) und eine Negativkontrolle (nur serumfreies Medium) eingesetzt.

1. Probenansatz (High Five-Zellen):

- 5 µl TSB
- 1 µl Reducing Agent
- 10 µl Probe
- 4 µl dH₂O

Die Probenansätze wurden für 5 min bei 99 °C erhitzt, danach sofort auf Eis abkühlt und zentrifugiert. Die Proben und 4 µl Rainbow Marker wurden dann auf das Gel aufgetragen.

2. Probenansatz (Sf-9-Zellen):

- 6.25 µl TSB
- 1.25 µl Reducing Agent
- 20 µl Probe
- 2.5 µl dH₂O

Beim 2. Ansatz fand ebenfalls ein fünf Minuten dauernder Hitzeschock bei 99 °C sowie das sofortige Abkühlen auf Eis statt. Auf das Gel wurden die Ansätze sowie 7 µl Rainbow Marker aufgetragen. Die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine wurde

aufgebrochen und dadurch konnte sich das SDS anlagern. Dies versetzte die Proteine in eine negative Ladung und gewährleistet damit die Laufrichtung zur Anode. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte 90 Minuten bei 120 V.

3.9 Western Blot

3.9.1 Pufferansätze

Blocking-Puffer:

- 40 ml TBS
- 400 µl Tween[®] 20
- 20 g Milchpulver
- 340 ml Reinstwasser

TBS-Puffer:

- 80 ml TBS
- 720 ml Reinstwasser
- 0.8 ml Tween[®] 20

Transfer-Puffer:

- 200 ml Tris/Glycin Puffer
- 200 ml Methanol
- 1600 ml Reinstwasser

3.9.2 Blotten

Ein Western Blot ist das Verfahren um Proteine vom Gel auf eine PVDF Membran zu transferieren. Das Gel aus der Elektrophoresekammer wurde 15 min auf dem Laborschüttler in Transfer-Puffer geschüttelt. Somit konnte ein Pufferaustausch vom Lauf- zum Transfer-Puffer stattfinden. Die Membran musste zunächst kurz in Methanol getränkt werden, um sie aufnahmefähig für den Transfer-Puffer zu machen. Dann wurde sie in den Transfer Puffer gegeben, bis sie mit diesem Puffer gesättigt war. Die Kammer wurde mit gekühltem Transfer-Puffer gefüllt und die vollständig zusammengebaute Kassette (siehe Abb. 4) eingebaut.

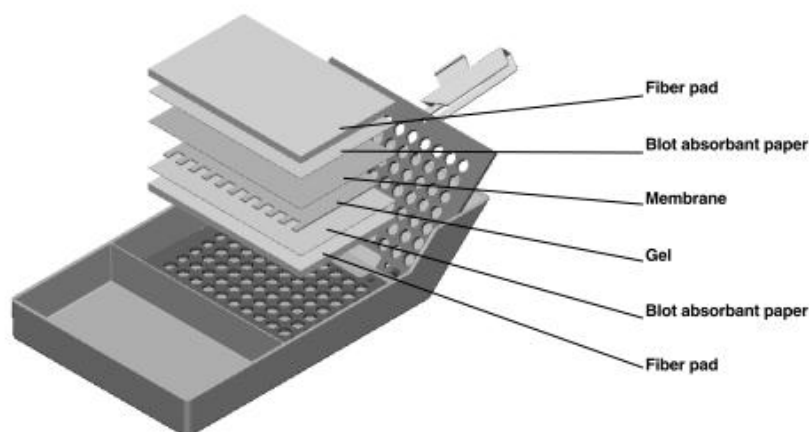


Abb.4: Aufbau der Kassette für den Western Blot. Diese Abbildung wurde aus dem Manual von Bio-Rad entnommen http://www3.bio-rad.com/cmc_upload/Literature/34300/4006190b.pdf.

Ein zusätzlich eingebrachter Kühlblock verhinderte, dass sich der Puffer zu sehr erhitzen konnte. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte innerhalb von 30 min bei 100 V. Nach Beendigung des Blots wurde die Membran über Nacht in Blocking-Puffer geschüttelt. Somit konnten die Proteine des Milchpulvers die freien unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran blockieren. Dies verhinderte, dass der Antikörper die gesamte Membran bedeckte. Der HRP konjugierte V5-Antikörper besitzt eine höhere Affinität zu dem V5-Epitop des exprimierten Proteins und verdrängt die Proteine des Milchpulvers von dieser Stelle. Die Membran wurde 90 min mit dem in Blocking-Puffer verdünnten Antikörper (1:5000) geschüttelt. Um die Reste des Antikörpers zu entfernen, wurde die Membran dreimal 10 min in TBS-Puffer gewaschen.

Zur Detektion der Proteinbanden wurde das SuperSignal[®] West HisProbe[™] Kit verwendet. Die Peroxid- und die Luminol-Lösung wurden für 5 min auf die Membran gegeben. Dabei oxidierte die HRP das Luminol und Licht wurde emittiert. In einem Fotolabor wurden die chemilumineszenten Proteinbanden mit Fotopapier (Amersham Hyperfilm[™]) nachgewiesen. Um die Lage der Proteinbanden auszuwerten, wurde die Membran angefärbt:

4-5 min	50 % Methanol, 0.1 % Coomassie, 7 % Essigsäure
10 min	50 % Methanol, 7 % Essigsäure
1-2 min	90 % Methanol, 10 % Essigsäure

3.10 Restriktionsverdau

Zur Kontrolle des richtigen Einbaus von der GSS2 (Insert) in den pIB-Vektor wurde neben der Kolonie-PCR (siehe 2.1.3) das Plasmid mit Restriktionsenzymen geschnitten. Dafür wurde HindIII, welches eine Schnittstelle auf dem Vektor besitzt und SacII, das sowohl eine Schnittstelle auf dem Vektor als auch auf dem Insert besitzt, ausgewählt. Es wurden drei verschiedene Ansätze getestet und die jeweiligen Auswertungsmöglichkeiten verglichen.

Ansatz I:

- 3 µl HindIII
- 3 µl SacII
- 0.3 µl BSA
- x µl Konstrukt (2 µg)
- 3 µl NEB2-Puffer
- x µl dH₂O (ad 30 µl)

Ansatz II:

- 3 µl HindIII
- 0.3 µl BSA
- x µl Konstrukt (2 µg)
- 3 µl NEB2-Puffer
- x µl dH₂O (ad 30 µl)

Ansatz III:

- 3 µl SacII
- 0.3 µl BSA
- x µl Konstrukt (2 µg)
- 3 µl NEB2-Puffer
- x µl dH₂O (ad 30 µl)

3.11 Glucosinolat-Sulfatase-Aktivitätstest

Mit verschiedenen Glucosinolaten wurde die entgiftende Funktion der Sulfatasen getestet. Für die Ansätze wurde das Medium transfizierter Zellen, welches nachweislich die Arylsulfatase und die Glucosinolatsulfatase 1 und 2 enthält, mit folgenden Glucosinolaten versetzt:

4-Propenyl-Glucosinolat (Sinigrin)	4-Prop
4-Methylthiobutyl-Glucosinolat (Glucoerucin)	4-MTB
4-Methyl-Sulfinylbutyl-Glucosinolat (Glucoraphanin)	4-MSOB
3-Indolyl-Methyl-Glucosinolat (Glucobrassicin)	3-IM
p-Hydroxybenzyl-Glucosinolat (Sinalbin)	pOHB

Die Glucosinolate wurden mit dem Assay-Puffer auf eine Konzentration von 0.5 mM gebracht. Der Assay-Puffer ist eine 100 mM Tris/HCl-Lösung mit einem pH von 7.5. Nach 120 min Inkubation der Ansätze (Tab. 6, Anhang) bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 500 µl Methanol gestoppt und mittels HPLC (Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie) analysiert. Für die HPLC wurden alle Ansätze zentrifugiert und 200 µl des Überstandes mit 400 µl dH₂O verdünnt. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Ob und in welcher Menge Desulfoglucosinolate entstanden, wurde anhand der Peakflächen der Chromatogramme bestimmt.

Einstellungen bei der HPLC:

Volumenfluss: 1 ml/min

Dauer eines Durchlaufes: ca. 30 min

Injektionsvolumen: 50 µl

Detektor: Diodenarraydetektor

Bei diesem Test wurden mehrere Kontrollen durchgeführt. Die GSS 1 konnte als Positivkontrolle eingesetzt werden, da die Aktivität gegenüber einigen Glucosinolaten schon aus früheren Tests bekannt war (Ratzka et al., 2002). Das serumfreie Medium transfizierter Zellen ohne Enzym wurde als Negativkontrolle verwendet, um eine intrinsische GSS-Aktivität auszuschließen. Die Arylsulfatase wurde auch ohne den Zusatz von Glucosinolaten getestet. Um letztendlich abzuklären, ob die Glucosinolate selbst schon Desulfoglucosinolate enthalten, wurde jedes Glucosinolat auch ohne Enzym getestet.

3.12 Sulfatase-Aktivitätstest

Die Sulfataseaktivität kann photometrisch gemessen werden. Dafür wurden die Substrate p-Nitrocatecholsulfat (Abb. 5) und 4-Methylumbelliferylsulfate (Abb. 6) mit konstantem Volumen verwendet. Für die Enzyme wurde das Volumen variiert, weil die jeweiligen Konzentrationen unbekannt sind. Mithilfe der zwei Sulfate wurde die Enzymaktivität von der GSS 1, GSS 2, ASS und ASS der *H. pomatia* bestimmt. Dafür wurde das Medium transfizierter Zellen, welches die jeweiligen Proteine enthält, mit dem Assay-Puffer und dem Sulfat angesetzt. Die ASS der *H. pomatia* ist bei allen Sulfaten sehr aktiv und wurde deshalb als Positivkontrolle getestet (Wittstock et al., 2000; Stawoska et al., 2010). Als Blindwert der Extinktion wurde das Sulfat ohne Zusatz einer Sulfatase gemessen.

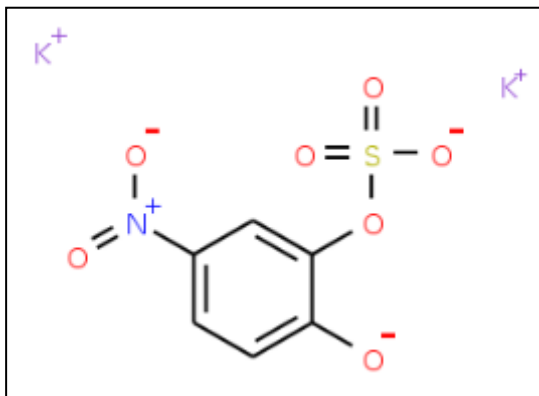


Abb. 5: Strukturformel von p-Nitrocatecholsulfat.

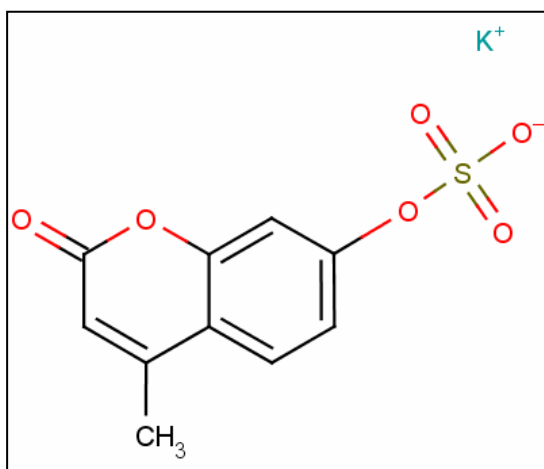


Abb. 6: Strukturformel von 4-Methylumbelliferylsulfat.

3.12.1 Test mit p-Nitrocatecholsulfat (PNCS)

Für den Test wurden folgende Puffer angesetzt:

Assay-Puffer (V = 300 ml, pH 5.5):

50 mM MES

250 mM NaCl

NaOH-Puffer (V = 2 ml):

0,2 M NaOH

Substrat:

2 mM p-Nitrocatecholsulfat

Die Ansätze (Tab. 7,8, Anhang) wurden eine Stunde bei 37 °C inkubiert, und die Reaktion anschließend mit 150 µl NaOH-Puffer abgestoppt. Die Absorptionsmessung bei 510 nm stellte das Ergebnis der Reaktion dar. Es wurde eine Endpunktmessung durchgeführt bei der nur ein Messpunkt ermittelt wird. Diesen erhält man durch photometrische Messung am Ende einer längeren Inkubation.

3.12.2 Test mit 4-Methylumbelliferylsulfat (4-MUS)

Assay-Puffer (V = 500 ml):

50 mM Tris

500 mM NaCl

0,1 mM MgCl₂

0,1 mM MnCl₂

0,1 mM CaCl₂

Na₂CO₃-Puffer (V = 20 ml, pH 10.5):

0,5 M Na₂CO₃

Substrat:

7 mM 4-Methylumbelliferylsulfat

Die Ansätze (Tab. 9, 10, Anhang) wurden für drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit dem vierfachen Volumen Na₂CO₃ gestoppt. Danach wurde die Fluoreszenz der Anregung bei 360 nm und der Emission bei 460 nm gemessen.

4. Ergebnisse

4.1 Amplifikation der GSS 2 aus dem Transkriptom von *P. xylostella*

Die GSS 1 und GSS 2 weisen Sequenzunterschiede auf. Um die kodierende Sequenz der GSS 2 zu entschlüsseln, wurden mehrere PCRs mit der cDNS-Pool als Template durchgeführt.

Bei der 5'- und 3'-RACE-PCR wurden die Enden der cDNS mithilfe verschiedener GSP auf Transkriptebene verifiziert. Die verwendeten Primersequenzen sind im Anhang I zu finden. Die PCR-Produkte wurden entsprechend dem Kapitel 2.2 aufgetrennt (Abb. 7). Es wurde eine Negativkontrolle ohne Template durchgeführt, um mögliche Fehler durch Verunreinigungen auszuschließen. Die Identifikation des richtigen PCR-Produktes gelang durch den Vergleich der Amplifikatgröße. Deutliche Banden sind in Höhe von 400 bp (1), 600 bp (2), 1600 bp (3) und 1300 bp (4) erkennbar.

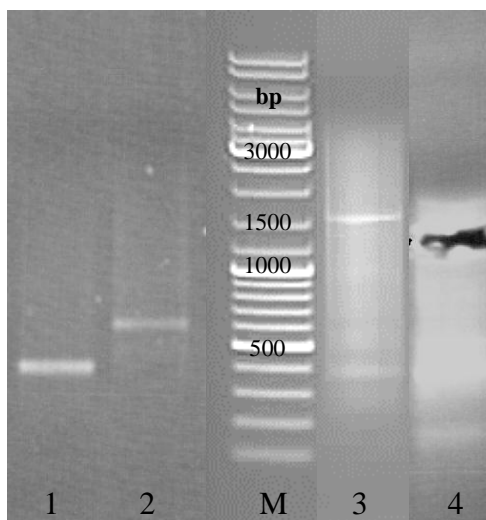


Abb. 7: Gelbild der RACE-PCR-Produkte. In der Mitte befindet sich der Größenmarker (M). Bei der ersten Bande (1) wurde bei einer 5'RACE-PCR der Primer 303, bei der zweiten Bande (2) der Primer 506 und bei der zweiten von rechts (3) der Primer 1406 verwendet. Einzig bei der letzten Bande (4) wurde eine 3'RACE-PCR mit dem Primer 456 durchgeführt.

Als nächstes wurde eine PCR mit einem Forward- (PxylGSS2_pIBF) und einem Reverse- (PxylGSS2_pIBR) Primer durchgeführt. Die beiden Primer wurden aus der bekannten Sequenz abgeleitet. Im Gelbild des PCR-Produktes stellt die Bande die kodierende Sequenz des Gens mit ca. 1700 Basenpaaren dar (Abb. 8). Nach der

Sequenzierung entspricht die Größe der GSS 2 der der GSS 1 mit einem ORF von 1641 Basenpaaren (Ratzka et al., 2002).

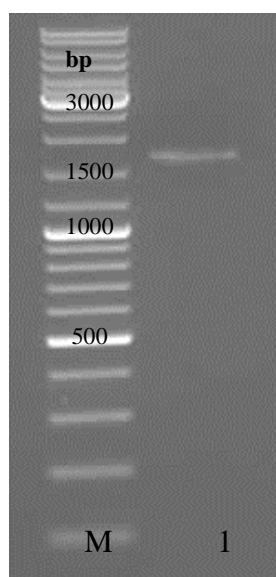


Abb. 8: Gelbild der Vollängen-PCR mit einem Forward- und Reverseprimer. Links befindet sich der Größenmarker (M) und an Position 1 wurde das PCR-Produkt (5 µl) mit Primerpaar P_{xyl}GSS2_pIBF und P_{xyl}GSS2_pIBR aufgetragen.

Die gesamte kodierende Aminosäuresequenz der GSS 2 (Anhang, Abb. 20) mit Signalpeptid bis zum Stopcodon wurde durch ein Alignment (Abb. 9) mit der GSS 1 von *P. xylostella* verglichen. Beide Sequenzen weisen eine 95%ige Aminosäureidentität auf.

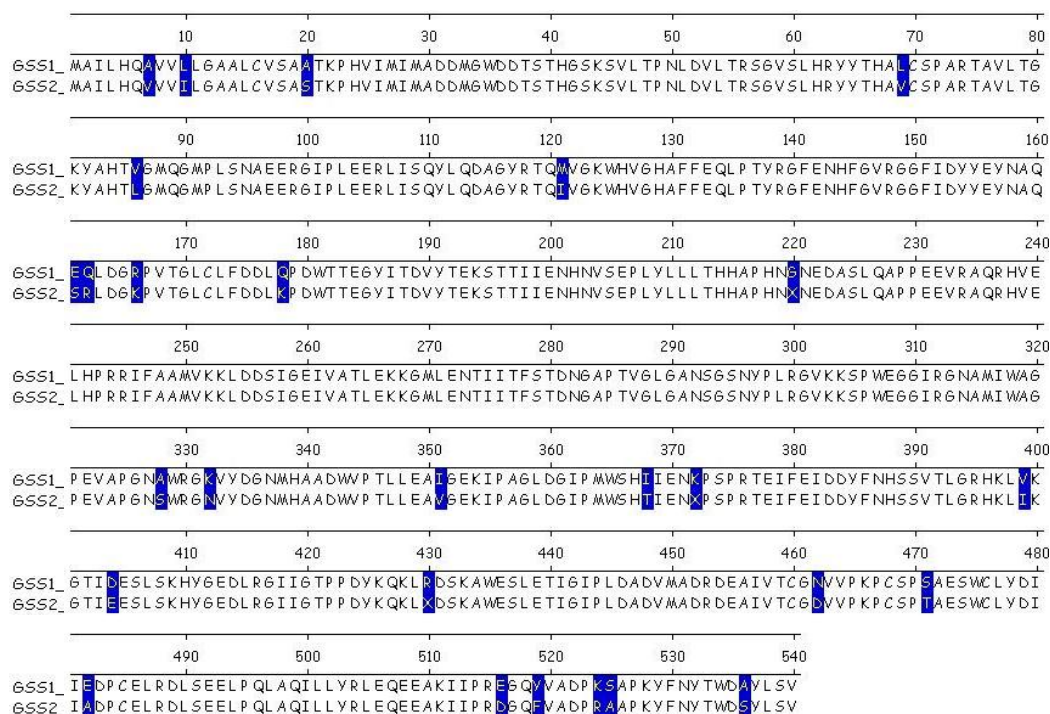


Abb. 9: Alignment der kodierenden Sequenzen der GSS 1 und 2. Die nicht identischen Aminosäuren von GSS 1 und GSS 2 sind blau hinterlegt.

4.2 Klonierung der GSS 2 und heterologe Expression der GSS 2, GSS 1 und ASS

Damit die GSS 2 funktionell charakterisiert werden kann, wurde sie in Insektenzelllinien heterolog exprimiert. Dazu wurde das Gen in einen pIB/V5-Vektor kloniert. Die Klonierung wurde durch die Kolonie-PCR (Kap. 2.1.3) und den Restriktionsverdau (Kap. 2.10) getestet. Die Kolonie-PCR diente der Identifikation erfolgreich transformierter *E.coli*-Zellen sowie zur Kontrolle der Ligation des gewünschten DNS-Fragments in den pIB/V5-Vektor. Die PCR-Ansätze wurden in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gelbild in Abb. 10 zeigt, dass bei fünf der 16 getesteten Klone das Insert (GSS 2) in richtiger Orientierung in den pIB/V5-Vektor eingebaut wurde.

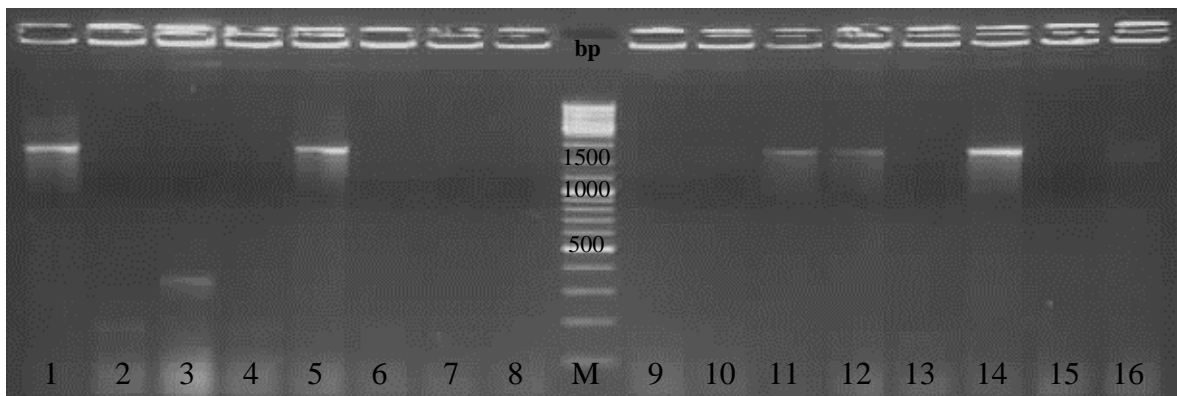


Abb. 10: Gelbild der Kolonie-PCR mit dem Primerpaar P_{xyl}GSS2_pIBF und P_{xyl}GSS2_pIBR. In der Mitte befindet sich der Größenmarker (M). Die Banden 1-16 sind gepickte Kolonien von einer Platte mit LB-Medium, XGal und Ampicillin.

Bei dem Restriktionsverdau gibt die Länge der einzelnen Plasmidabschnitte zwischen den Restriktionschnittstellen eine Aussage über den korrekten Einbau der GSS 2 (insense) in den pIB/V5-Vektor. Des Weiteren kann es zur Analyse von Mutationen, die in Form von Größenveränderungen der einzelnen Abschnitte auftreten, genutzt werden. Die Gelelektrophorese der verdauten Proben ist in Abb. 11 aufgezeigt. Auf dem Vektor befinden sich die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *HindIII* und *SacII*. Auf dem GSS 2 Gen befindet sich auch eine Schnittstelle für *SacII*. Anhand eines erstellten Schemas (Abb. 12) konnte die Größe der einzelnen Abschnitte schon vorher bestimmt werden. Der Vektor hat eine Länge von ca. 3500 bp und das Insert (GSS 2) eine Gesamtlänge von ca. 1740 bp. Das Restriktionsenzym *SacII*, welches auf dem Insert

liegt, teilt die GSS 2 bei 440 bp. Somit bleibt ein letzter Abschnitt mit einer Länge von 1300 bp übrig.

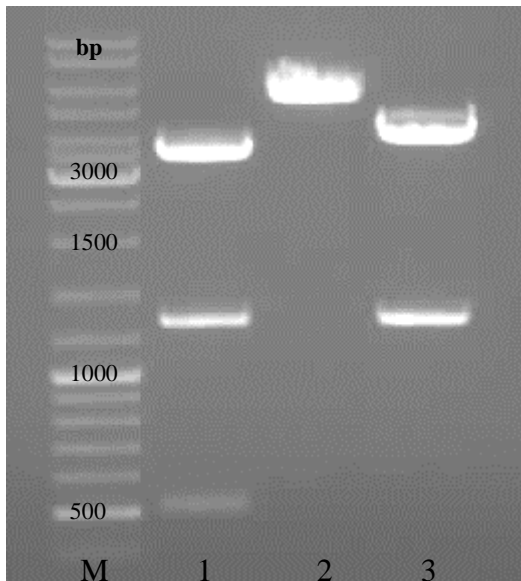


Abb. 11: Gelbild des Restriktionsverdaus mit *HindIII* und *SacII*. Die erste Bande stellt den Größenmarker (M) dar. Bei der zweiten Bande (1) wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen *SacII* und *HindIII* geschnitten. Die dritte Bande (2) ist das mit *HindIII* und die letzte Bande (3) das mit *SacII* verdaute PCR-Produkt.

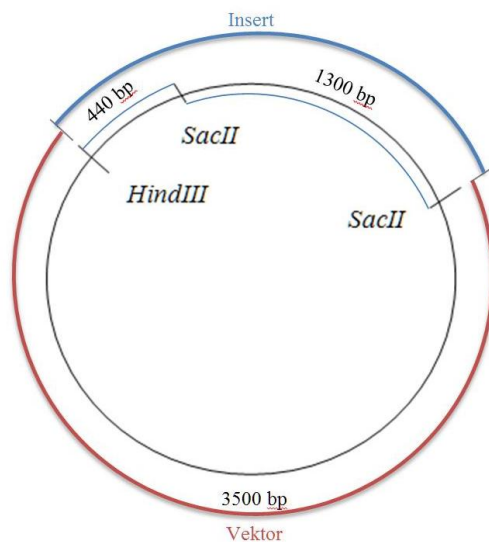


Abb. 12: Plasmid mit pIB/V5-Vektor (braun) und GSS 2-Insert (blau). Dargestellt sind auch die verwendeten Restriktionsschnittstellen *SacII* und *HindIII*.

Die nach der Transfektion entstandenen Proteine mit dem Signalpeptid sollten ins Medium der High Five- bzw. Sf-9-Zellen sekretiert werden. Die Transfektion der High Five-Zellen führte jedoch zu keinem positiven Ergebnis. Deshalb wurden die

Sf-9-Zellen mit den Plasmiden transfiziert. Bei dem Western Blot (Abb. 13) wurde das Medium auf Anwesenheit von ASS, GSS 1 und GSS 2 getestet. Die GSS 1 wurde in vorherigen Versuchen schon erfolgreich exprimiert und konnte bei diesem Test als Positivkontrolle eingesetzt werden. Es wurde auch eine Negativkontrolle mitgeführt, die kein Enzym enthält und wie erwartet auch keine Bande aufweist. Bei dem Klon 28 der GSS 2 ist auch keine Bande aufgetreten. Dies lässt darauf schließen, dass die Expression in dem Fall nicht funktioniert hat. Die restlichen Banden zeigen, dass Proteine vorhanden sind und die Genexpression erfolgreich war. Die Molekülmasse der ASS, GSS 2 (Klon 16) und GSS 1 von ca. 80 kDa, welche noch den His-tag des pIB/V5-Vektors beinhaltet, ist größer als die berechnete Masse. Für die GSS 2 konnte vorher eine Masse von 63,8 kDa ermittelt werden. In Ratzka et al. (2002) ist für die GSS 1 eine Molekülmasse von 66 kDa angegeben. Die Unterschiede lassen auf posttranslationale Modifikation schließen.

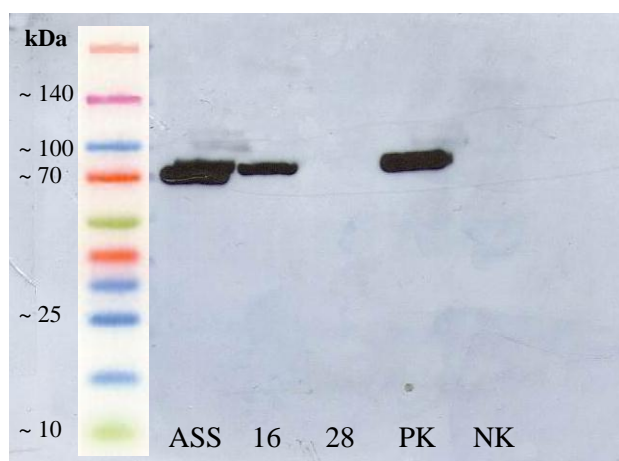


Abb. 13: Western Blot der ASS, GSS 2 (Klon 16 und 28), GSS 1 (PK=Positivkontrolle) und die Negativkontrolle ohne Enzym (NK) mit dem anti-V5 Antikörper.

4.3 Aktivitätstest der GSS und ASS

Die Aktivität wurde bei den heterolog exprimierten Proteinen GSS 1, GSS 2 und ASS, die im Sf-9-Medium nach der Transfektion enthalten sind, getestet.

4.3.1 Test mit pflanzlichen Glucosinolaten

Die Enzyme GSS 1 und GSS 2 wurden mit fünf verschiedenen Glucosinolaten getestet. Aufgrund der erfolgreichen Transfektion der ASS, wurde sie auch auf Glucosinolat-Sulfatase-Aktivität getestet. Die Glucosinolatsulfatase 1 setzt alle getesteten Substrate

um (Tab. 1). Bei der Glucosinolatsulfatase 2 waren keine Desulfoglucosinolate detektierbar. Die Arylsulfatase konnte die Glucosinolate 3-IM und pOHB umsetzen. Der Peak der Desulfoglucosinolate wurde anhand der Retentionszeit identifiziert (Tab. 2).

Tab. 1: Ergebnisse der HPLC. Die Werte entsprechen der Peakfläche der jeweiligen Desulfoglucosinolate. Grün markiert sind die Ergebnisse bei denen ein relevanter (mit Beachtung der Kontrollen) Umsatz stattgefunden hat.

Probe	Volumen (µl)	4-Prop		4-MTB		4-MSOB		3-IM		pOHB	
GSS I	10	247	231	165	176	-	127	466	385	360	357
GSS I	50	269	263	154	162	-	153	446	370	372	360
GSS 2	10	14	7	0	0	-	27	0	0	0	0
GSS 2	50	19	7	0	10	-	31	0	0	0	0
ASS	10	9	0	0	5	-	0	317	301	188	181
ASS	50	9	0	9	4	-	0	589	452	348	266
ASS (ohne Substrat)	50	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0
nur Substrat	50	0	0	0	0	-	0	71	0	19	0
NK	50	15	0	0	2	-	0	81	3	0	3

Tab. 2: Durchschnittliche Retentionszeiten der Desulfoglucosinolate. Diese wurden direkt aus den Chromatogrammen entnommen.

Substrat	Retentionszeit
4-Prop	8,9
4-MTB	18,7
4-MSOB	8,7
3-IM	20,5
pOHB	13,0

4.3.2 Test mit Standardsubstraten für Sulfatasen

Zum Nachweis genereller Sulfataseaktivität wurden die Enzyme mit zwei Standardsubstraten getestet und die Desulfoverbindungen photometrisch durch Absorption (PNCS) oder Fluoreszenz (4-MUS) nachgewiesen. Alle getesteten heterolog exprimierten Proteine können die Sulfate umsetzen.

4.3.2.1 Substrat: p-Nitrocatecholsulfat

Die Konzentration der heterolog exprimierten GSS 1, GSS 2 und ASS ist unbekannt. Um den Umsatz vergleichend einschätzen zu können, wurden verschiedene Volumina der Enzyme für die Messung verwendet. Durch den vorangestellten Western Blot ist es möglich, die Konzentrationen der Enzyme anhand der Stärke der Proteinbanden zu vergleichen (Abb. 15). Die GSS 1 und ASS ist höher konzentriert als die GSS 2. Wenn man die Extinktionswerte (Tab. 3) damit in Beziehung setzt, kann die GSS 2 und die GSS 1 mehr Substrat umsetzen als die ASS. Die GSS 1 weist im Vergleich zur GSS 2 eine stärkere Sulfataseaktivität auf. Schon vor der Absorptionsmessung konnten erste Schlüsse zum Umsatz aus der Farbreaktion (Abb. 14) gezogen werden. Das p-Nitrocatecholsulfat hat im pulverförmigen Zustand eine gelbe Farbe und wurde als Blindwert gemessen.

Tab. 3: Extinktionswerte der Absorption bei 510 nm mit 4-Nitrocatecholsulfat. Der Blindwert, also der Wert des reinen Substrates, ist noch von den anderen Werten abzuziehen (letzte Spalte).

	GSS I		GSS 2		ASS		ASS Hpom		Blindwert
Volumen	2 µl	20 µl	100 µl	150 µl	100 µl	150 µl	5 Units/ml	25 Units/ml	50 µl
Absorption	0,1214	0,2924	0,0846	0,098	0,1428	0,1516	1,1001	2,3427	0,0378

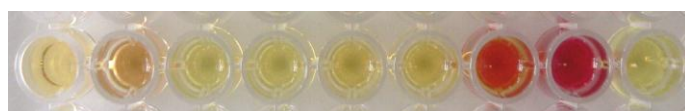


Abb. 14: Farbreaktion nach Abstoppen der Reaktion mit NaOH-Puffer. Aufgetragen wurden (v. li.) 2 und 20 µl der GSS 1, 100 und 150 µl der GSS 2, 100 und 150 µl der ASS, 5 und 25 Units/ml der ASS Hpom und 50 µl des Substrates ohne Enzym.

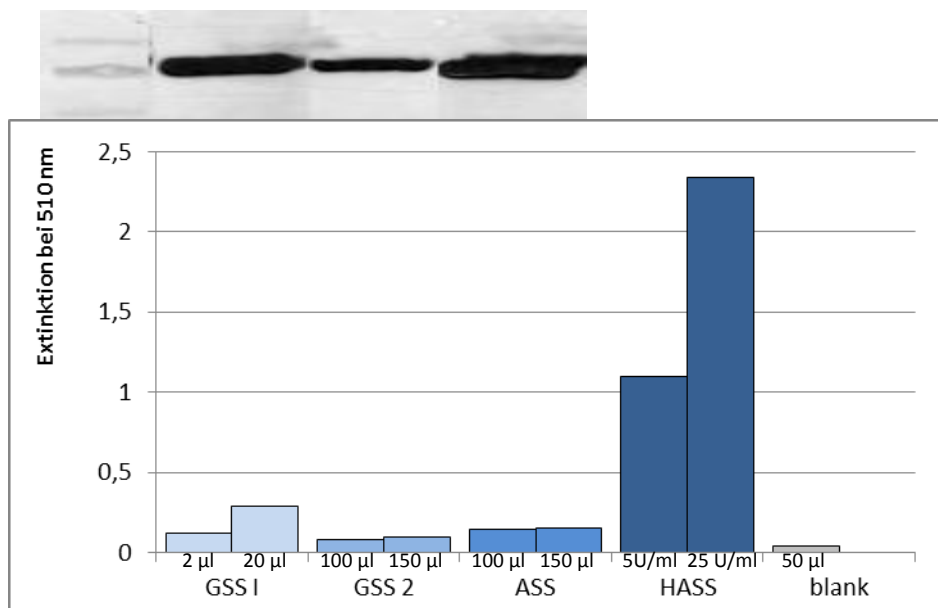


Abb. 15: Extinktionswerte der Absorptionsmessung von GSS 1, GSS 2, ASS, ASS Hpom und dem Blindwert. Der Blindwert wurde mit dem reinen Substrat gemessen und wurde noch nicht von den Messwerten abgezogen. Der Western Blot ist in voller Größe in Abb. 13 dargestellt. Die einzelnen Blöcke sind nicht direkt, sondern nur mithilfe der Proteinbanden des Western Blots (oberhalb) vergleichbar.

4.3.2.2 Substrat: 4-Methylumbelliferylsulfat

Ebenso wie beim ersten Sulfat wurden auch bei 4-MUS verschiedene Volumina der Enzyme eingesetzt, um den Sättigungsbereich der Reaktion eingrenzen zu können. Den Extinktionswerten (Tab. 4) kann man in Bezug auf den Western Blot (Abb. 16) entnehmen, dass 4-MUS von der GSS 2 besser umgesetzt werden kann, als von der ASS oder GSS 1. Die ASS zeigte gegenüber dem 4-MUS im Vergleich zu GSS 1 und GSS 2 die geringste Aktivität. Den höchsten Substratumsatz konnte wie erwartet die ASS der *H.pomatia*, die als Referenz eingesetzt wurde, vorweisen. Das 4-Methylumbelliferylsulfat wurde ohne Zugabe von Enzymen als Blindwert gemessen.

Tab. 4: Extinktionswerte der Fluoreszenzmessung (Anregung bei 360 nm und Emission bei 460 nm) der Reaktion von GSS 1, GSS 2, ASS und ASS Hpom mit 4-MUS. Als Blindwert wurde nur 4-MUS ohne Enzym eingesetzt (letzte Spalte). Der Blindwert ist noch von den anderen Werten abzuziehen.

	GSS I		GSS 2		ASS		ASS Hpom		Blindwert
Volumen	2 µl	20 µl	100 µl	150 µl	100 µl	150 µl	5 Units/ml	25 Units/ml	50 µl
Absorption	1152	2958	2847	2855	898	945	3167	3192	159

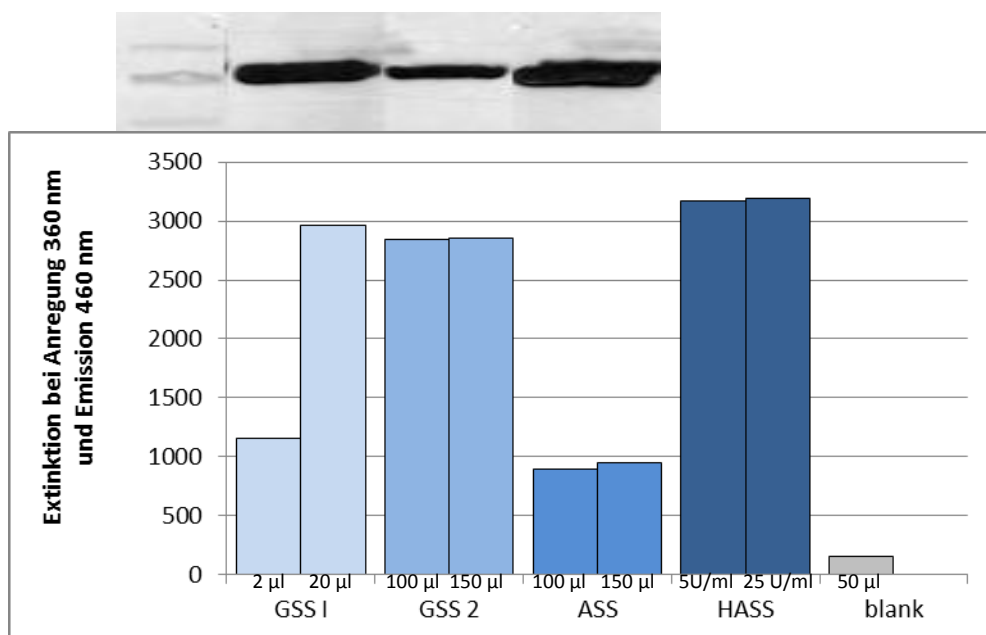


Abb. 16: Extinktionswerte der Fluoreszenzmessung von GSS 1, GSS 2, ASS, ASS Hpom und dem Blindwert. Der Blindwert wurde mit dem reinen Substrat 4-MUS gemessen, wurde jedoch noch nicht von den Messwerten abgezogen. Der Western Blot ist in voller Größe in Abb. 13 dargestellt. Die einzelnen Blöcke sind nicht direkt, sondern nur mithilfe der Proteinbanden des Western Blots (oberhalb) vergleichbar.

Wenn man die Extinktionswerte der Reaktionen mit beiden verwendeten Sulfaten vergleicht, wird ersichtlich, dass die Enzyme unterschiedliche Aktivitäten bei der Umsetzung verschiedener Sulfate (Tab. 5) aufweisen können. So hat die ASS den geringsten Substratumsatz. Die GSS 1 und GSS 2 hingegen besitzen eine ähnliche Aktivität bei der Desulfonierung der Sulfate. Die Arylsulfatase der *H. pomatia* hat eine sehr starke Sulfataseaktivität.

Tab. 5: Vergleich der Enzymaktivitäten bei der Umsetzung von PNCS und 4-MUS. Das „+“ gibt die Umsatzstärke an, d.h. + geringster Umsatz und ++++ stärkster Umsatz.

	PNCS	4-MUS
GSS 1	+++	++
GSS 2	++	+++
ASS	+	+
ASS Hpom	++++	++++

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die kodierende Sequenz der Glucosinolatsulfatase 2 ermittelt werden. Weiterführend wurde die Fähigkeit der GSS 1, GSS 2 und ASS zur Entgiftung von Glucosinolaten getestet. Diese beruht auf dem Vorgang der Abspaltung der Sulfatgruppe von dem Glucosinolat. Zusätzlich wurde mithilfe zweier Standardsubstrate (PNCS und 4-MUS) geprüft, ob die drei Enzyme eine allgemeine Sulfataseaktivität besitzen.

Die GSS 1 und GSS 2 sind vermutlich durch Duplikation aus einem ancestralen Gen mit GSS-Aktivität entstanden. Die ASS befindet sich auch in dem Genom von *P.xylostella* und stammt wahrscheinlich vom gleichen Vorläufergen ab wie die GSS (Abb. 17). Zunächst waren nur genomische Informationen vorhanden, aus denen man eine unterschiedliche Aminosäureidentität zwischen GSS 1, GSS 2 und ASS schließen konnte. Daraus ergaben sich mehrere Fragen, die im Laufe dieser Arbeit mithilfe geeigneter Tests geklärt werden sollten. Kann die GSS 2 exprimiert werden und ist somit ein aktives Gen? Besitzen die drei Enzyme eine allgemeine Sulfataseaktivität? Ist die GSS 2 und die ASS ebenso wie die GSS 1 an der Detoxifikation von Glucosinolaten beteiligt? Können die Genprodukte ein gleiches Substratspektrum umsetzen?

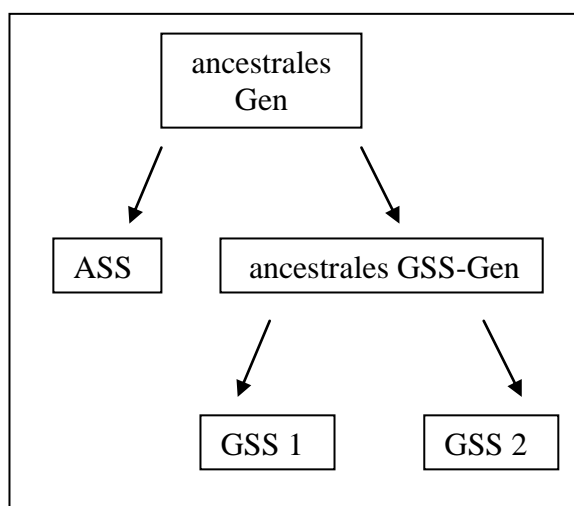


Abb. 17: Schematische Darstellung des Stammbaumes der GSS und ASS.

Die kodierende Sequenz der GSS 1 und die Enzymaktivität zur Entgiftung von Abwehrstoffen der Wirtspflanzen wurden von Ratzka et al. (2002) bereits

veröffentlicht. Durch den Test mit pflanzlichen Glucosinolaten (Griffiths et al., 2001, Brown et al., 2003), der in Kapitel 2.11 beschrieben wurde, konnte die Desulfoaktivität bestätigt und erweitert untersucht werden. Die GSS 1 konnte auch die zuvor noch nicht getesteten GSL umsetzen, das heißt sie hat ein breites Substratspektrum. Die bisher nicht charakterisierte Arylsulfatase konnte sowohl bei 3-Indolylmethyl-GSL als auch bei p-Hydroxybenzyl-GSL die Sulfatgruppe abspalten. Die zwei Glucosinolate besitzen ein Ringsystem als Grundstruktur. Es ist also möglich, dass die ASS spezifisch Glucosinolate mit einem Ringsystem entgiften kann und somit untergeordnet an der Detoxifikation von Glucosinolaten beteiligt ist. Andererseits könnte dies auch nur eine Nebenaktivität der ASS darstellen. Diese Vermutungen konnten durch weitere Tests mit anderen Glucosinolaten oder Sulfaten allgemein untersucht werden. Die Glucosinolatsulfatase 2, konnte in diesem Test keines der verwendeten Glucosinolate umsetzen. Da verschiedene Glucosinolate mit unterschiedlichen Strukturen (Aryl-, Alkyl-, Alkenyl- und Indolyl-GSL) getestet wurden, ist es wahrscheinlich, dass die GSS 2 keine oder nur eine spezialisierte Aktivität bei der Detoxifikation von Glucosinolaten hat. Weiterhin ist es möglich, dass sie eine ganz andere Aufgabe als die ASS und GSS 1 besitzt. Trotzdem die GSS 2 eine größere Identität zur GSS 1 als zu ASS hat, zeigt sie nur Arylsulfataseaktivität und keine Desulfoaktivität wie die GSS 1 und ASS.

Die Aktivität der Sulfatasen beruht in erster Linie auf der Desulfonierung von Sulfateestern (CO-S) und Sulfamaten (CN-S). Sulfatasen besitzen eine hoch konservierte N-terminale Sequenz, in der sich eine Sulfatase-Signatursequenz I und II befindet. Die erste enthält ein Kernmotiv C/S-X-P-X-R, wobei der Argininrest unter anderem die α -Formylglycin (FGly)-Modifizierung steuert und den FGly-Rest stabilisiert (Wong et al., 2004). Die Signatursequenz II dagegen enthält die Sequenz G-Y/V-X-S/T-X-X-X-G-K-X-X-H. Die Lysin- und Histidinreste sind Teil des aktiven Zentrums und wichtig für die Katalyse von Sulfatester (Wong et al., 2004). Der Formylglycinrest, charakteristisch für die Sulfatasen, liegt im aktiven Zentrum und ist besonders wichtig für die katalytische Aktivität. Der Standardsubstrat-Test (Kap. 2.12) gab Aufschluss über die Sulfataseaktivität der Enzyme ASS, GSS 1 und GSS 2. Alle getesteten exprimierten Proteine konnten sowohl das 4-Nitrocatecholsulfat als auch das 4-Methylumbelliferylsulfat desulfonieren und sind somit aktiv. Der Vergleich der Extinktionswerte jeweiliger Enzyme war wegen unbekannter Proteinkonzentrationen nur mithilfe der Proteinbanden des Western Blots vergleichbar (Abb. 13). Jedoch waren

Unterschiede in der Umsatzmenge des jeweiligen Substrates erkennbar (Tab. 5). Die GSS 1 konnte das PNCS am stärksten umsetzen. Bei dem zweiten Substrat 4-MUS wurde photometrisch der stärkste Umsatz bei der GSS 2 gemessen. Die Arylsulfatase wies bei beiden Substraten den geringsten Umsatz auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass man mehrere Standardsubstrate vergleichend verwenden sollte, da die Aktivität zur Abspaltung der Sulfatgruppe nicht bei jedem Substrat gleich ist. Die Arylsulfatase der *Helix pomatia* wurde bei den Aktivitätstests als Positivkontrolle eingesetzt, da sie schon ausführlich charakterisiert wurde und eine hohe Sulfataseaktivität bei fast allen Substraten vorweisen kann (Wittstock et al., 2000; Stawoska et al., 2010).

Eine Entgiftung von GSL durch mehrere Enzyme mit unterschiedlichen Substratspektren im Darm von *P.xylostella* ist demnach möglich aber nicht nachgewiesen. Deshalb sind weitere Experimente nötig, um die Entgiftung in *P.xylostella* umfangreicher zu untersuchen. Zunächst wäre zu klären, ob die GSS 2 und die ASS auch im Darm exprimiert werden wie die GSS 1. Außerdem könnte bei der GSS 2 und ASS eine Testreihe mit weiteren Glucosinolaten erfolgen, um festzustellen, ob vielleicht ein spezielles Glucosinolat umgesetzt werden kann. Dafür könnte anstelle eines extrahierten Glucosinolates unter anderem ein GSL-Gemisch aus einer Wirtspflanze wie zum Beispiel dem Kohl verwendet werden. Ein weiterer wichtiger Schritt wäre die Bestimmung der Proteinkonzentration für den direkten Vergleich der Sulfataseaktivitäten von ASS, GSS 1 und GSS 2 untereinander. Zur Identifikation katalytisch aktiver Aminosäuren von GSS 1 könnten Punktmutagenesen durchgeführt werden.

6. Zusammenfassung

Die Kohlmotte *Plutella xylostella* ist in der Lage, die Fraßabwehr verschiedener *Brassica*-Arten, somit das Glucosinolat-Myrosinase-System, durch das vorhandene Enzym Glucosinolatsulfatase 1 (GSS 1) außer Kraft zu setzen. Das Enzym wurde bereits von Ratzka et al. (2002) charakterisiert und die detoxifizierende Funktion nachgewiesen. Weitere Forschungen am MPI zeigten, dass sich in dem Genom von *P.xylostella* zwei weitere Sulfatasen, Glucosinolatsulfatase 2 (GSS 2) und Arylsulfatase (ASS), befinden. Die GSS 2 wurde im Rahmen dieser Arbeit sequenziert und erfolgreich exprimiert. Anschließend wurden für alle drei Sulfatasen Tests auf Sulfatase- und Desulfoaktivität durchgeführt.

Für die ASS, GSS 1 und GSS 2 konnte ein Substratumsatz sowohl von p-Nitrocatecholsulfat als auch von 4-Methylumbelliferylsulfat in eine desulfonierte Form nachgewiesen werden. Demnach haben die Enzyme eine Sulfataseaktivität. Die Höhe des Umsatzes bei GSS 1 und GSS 2 unterschied sich jedoch zwischen den beiden Substraten. Somit ist die Aktivität beider GSS-Enzyme abhängig vom Substrat. Der Desulfoaktivitätstest zeigte, dass die GSS 1 wie erwartet alle getesteten Glucosinolate in Desulfoglucosinolate abbauen kann. Im Vergleich dazu war die GSS 2 nicht in der Lage, die Glucosinolate umzusetzen. Trotz der hohen Aminosäureidentität der GSS 2 zur GSS 1 scheint das Enzym eine andere oder sehr spezielle GSS-Funktion zu besitzen. Die ASS konnte sowohl das 3-IM als auch das pOHB desulfonieren. Diese Sulfatase besitzt möglicherweise eine spezielle Funktion bei der Detoxifikation von Glucosinolaten.

LITERATURVERZEICHNIS

- BROWN, P.D, TOKUHISA, J. G., REICHEL, M. und GERSHENZON, J. 2003. Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 62:471–481.
- FALK, K. L. und GERSHENZON, J. 2007. The Desert Locust, *Schistocerca gregaria*, Detoxifies the Glucosinolates of *Schouwia purpurea* by Desulfation. *J. Chem. Ecol.* 33:1542-1555.
- GRIFFITHS, D. W., DEIGHTON, N., BIRCH, A. N. E., PATRIAN, B., BAUR, R. und STÄDLER, E. 2001. Identification of glucosinolates on the leaf surface of plants from the Cruciferae and other closely related species. *Phytochemistry* 57:693–700.
- JONGEN W. M. F. 1996. Glucosinolates in Brassica: occurrence and significance as cancer-modulating agents. *Proceedings of the Nutrition Society* 55:433-446.
- MATILE, P., 1980. The mustard oil bomb: compartmentation of the myrosinase. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 175:722-731.
- RATZKA, A., VOGEL, H., KLIEBENSTEIN, D. J., MITCHELL-OLDS, T. und KROYMANN, J. 2002. Disarming the mustard oil bomb. *PNAS* 99:11223-11228.
- STAWOSKA, I., GAWĘDA, S., BIELAK-LAKOMSKA, M., BRINDELL, M., LEWIŃSKI, K., LAIDLER, P. und STOCHEL, G. 2010. Mechanistic studies of the hydrolysis of *p*-nitrophenyl sulfate catalyzed by arylsulfatase from *Helix pomatia*. *J. of Coordination Chemistry* 63:2472-2487.
- WATZL, B. 2001. Basiswissen aktualisiert – Glucosinolate. *Ernährungs-Umschau* 48 8:330-333.
- WITTSTOCK, U., FISCHER, M., SVENDSEN, I. und HALKIER, B. A. 2000. Cloning and Characterization of Two cDNAs Encoding Sulfatases in the Roman Snail, *Helix pomatia*. *IUBMB Life* 49:71-76.
- WONG, C.-H., BEST, M. D. und HANSON, S. R. 2004. Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition and synthetic utility. *Angew. Chem. Int.* 43:5736-5763.

Weitere Quellen:

- MÜLHARDT, C. 2008. Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Spektrum Akademischer Verlag 6. Auflage
- KNIPPERS, R. 2006. Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag 9. Auflage.
- CLARK, D. P. und PAZDERNIK, N. J. 2009. Molekulare Biotechnologie. Spektrum Akademischer Verlag 5. Auflage.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1:** Entschärfung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems.
- Abb. 2:** Schema der Lage von GSS 1, GSS 2 und ASS auf dem Genom.
- Abb. 3:** Schematische Darstellung zur Herstellung des Transfektionsansatzes.
- Abb. 4:** Aufbau der Kassette für den Western Blot.
- Abb. 5:** Strukturformel von 4-Nitrocatecholsulfat.
- Abb. 6:** Strukturformel von 4-Methylumbelliferylsulfat.
- Abb. 7:** Gelbild der RACE-PCR-Produkte.
- Abb. 8:** Gelbild der Vollängen-PCR mit einem Forward- und Reverseprimer.
- Abb. 9:** Alignment der genomischen Sequenzen der GSS 1 und 2.
- Abb. 10:** Gelbild der Kolonie-PCR mit dem Primerpaar P_{xyl}GSS2_pIBF und P_{xyl}GSS2_pIBR.
- Abb. 11:** Gelbild des Restriktionsverdaus mit *HindIII* und *SacII*.
- Abb. 12:** Plasmid mit pIB/V5-Vektor (braun) und GSS 2-Insert (blau).
- Abb. 13:** Western Blot der ASS, GSS 2 (Klon 16 und 28), GSS 1 (PK=Positivkontrolle) und die Negativkontrolle ohne Enzym (NK) mit dem anti-V5 Antikörper.
- Abb. 14:** Farbreaktion der getesteten Enzyme mit PNCS.
- Abb. 15:** Extinktionswerte der Absorptionsmessung von GSS 1, GSS 2, ASS und dem Blindwert.
- Abb. 16:** Extinktionswerte der Fluoreszenzmessung von GSS 1, GSS 2, ASS und dem Blindwert.
- Abb. 17:** Schematische Darstellung des Stammbaumes der GSS und ASS.
- Abb. 18:** Topo TA-Vektor mit den vorhandenen Restriktionsschnittstellen.
- Abb. 19:** pIB/V5Vektor mit den vorhandenen Restriktionsschnittstellen.
- Abb. 20:** Aminosäuresequenz des kodierenden Bereiches der Glucosinolatsulfatase 2 von *Plutella xylostella*.

TABELLENVERZEICHNIS

- Tab. 1:** Ergebnisse der HPLC.
- Tab. 2:** Durchschnittliche Retentionszeiten der Desulfoglucosinolate.
- Tab. 3:** Extinktionswerte der Absorption bei 510 nm mit 4-Nitrocatecholsulfat.
- Tab. 4:** Extinktionswerte der Fluoreszenzmessung (Anregung bei 360 nm und Emission bei 460 nm) der Reaktion von GSS 1, GSS 2, ASS und ASS Hpom mit 4-MUS.
- Tab. 5:** Vergleich der Enzymaktivitäten bei der Umsetzung von PNCS und 4-MUS.
- Tab. 6:** Ansätze für den Test der Enzymaktivität mit pflanzlichen Glucosinolaten.
- Tab. 7:** Reaktionsansatz mit 4-Nitrocatechol als Test ob Sulfat abgespalten werden kann.
- Tab. 8:** Modifizierter Reaktionsansatzes mi PNCS nach der ersten Messung.
- Tab. 9:** Reaktionsansatz mit 4-MUS, um zu testen ob Sulfat abgespalten werden kann.
- Tab. 10:** Modifizierter Reaktionsansatz mit 4-MUS nach der ersten Messung.

ANHANG**I. Ansatz Tabellen****Tab. 6:** Ansätze für den Test der Enzymaktivität mit pflanzlichen Glucosinolaten.

	<i>Probe</i>	<i>Volumen</i>						<i>Puffer</i>
			<i>4-Prop</i>	<i>4-MTB</i>	<i>4-MSOB</i>	<i>3-IM</i>	<i>pOHB</i>	
1	GSS I	10 µl	50 µl	-	-	-	-	40 µl
2	GSS I	10 µl	-	50 µl	-	-	-	40 µl
3	GSS I	10 µl	-	-	50 µl	-	-	40 µl
4	GSS I	10 µl	-	-	-	50 µl	-	40 µl
5	GSS I	10 µl	-	-	-	-	50 µl	40 µl
6	GSS I	50 µl	50 µl	-	-	-	-	-
7	GSS I	50 µl	-	50 µl	-	-	-	-
8	GSS I	50 µl	-	-	50 µl	-	-	-
9	GSS I	50 µl	-	-	-	50 µl	-	-
10	GSS I	50 µl	-	-	-	-	50 µl	-
11	GSS 2	10 µl	50 µl	-	-	-	-	40 µl
12	GSS 2	10 µl	-	50 µl	-	-	-	40 µl
13	GSS 2	10 µl	-	-	50 µl	-	-	40 µl
14	GSS 2	10 µl	-	-	-	50 µl	-	40 µl
15	GSS 2	10 µl	-	-	-	-	50 µl	40 µl
16	GSS 2	50 µl	50 µl	-	-	-	-	-
17	GSS 2	50 µl	-	50 µl	-	-	-	-
18	GSS 2	50 µl	-	-	50 µl	-	-	-
19	GSS 2	50 µl	-	-	-	50 µl	-	-
20	GSS 2	50 µl	-	-	-	-	50 µl	-
21	ASS	10 µl	50 µl	-	-	-	-	40 µl
22	ASS	10 µl	-	50 µl	-	-	-	40 µl
23	ASS	10 µl	-	-	50 µl	-	-	40 µl
24	ASS	10 µl	-	-	-	50 µl	-	40 µl
25	ASS	10 µl	-	-	-	-	50 µl	40 µl
26	ASS	50 µl	50 µl	-	-	-	-	-
27	ASS	50 µl	-	50 µl	-	-	-	-
28	ASS	50 µl	-	-	50 µl	-	-	-
29	ASS	50 µl	-	-	-	50 µl	-	-
30	ASS	50 µl	-	-	-	-	50 µl	-
31	ASS	50 µl	-	-	-	-	-	50 µl
32	nur Substrat	-	50 µl	-	-	-	-	50 µl
33	nur Substrat	-	-	50 µl	-	-	-	50 µl
34	nur Substrat	-	-	-	50 µl	-	-	50 µl
35	nur Substrat	-	-	-	-	50 µl	-	50 µl

36	nur Substrat	-	-	-	-	-	50 µl	50 µl
37	NK	50 µl	50 µl	-	-	-	-	-
38	NK	50 µl	-	50 µl	-	-	-	-
39	NK	50 µl	-	-	50 µl	-	-	-
40	NK	50 µl	-	-	-	50 µl	-	-
41	NK	50 µl	-	-	-	-	50 µl	-
42	ASS Hpom	1U	50 µl	-	-	-	-	-
43	ASS Hpom	1U	-	50 µl	-	-	-	-
44	ASS Hpom	1U	-	-	50 µl	-	-	-
45	ASS Hpom	1U	-	-	-	50 µl	-	-
46	ASS Hpom	1U	-	-	-	-	50 µl	-
47	ASS Hpom	10U	50 µl	-	-	-	-	-
48	ASS Hpom	10U	-	50 µl	-	-	-	-
49	ASS Hpom	10U	-	-	50 µl	-	-	-
50	ASS Hpom	10U	-	-	-	50 µl	-	-
51	ASS Hpom	10U	-	-	-	-	50 µl	-

Tab. 7: Reaktionsansatz mit 4-Nitrocatechol als Test ob Sulfat abgespalten werden kann.

Probennummer	Probe	Volumen Enzyme (µl)	Volumen Assay-Puffer (µl)	Volumen Substrat (µl)
1	GSS I	10	65	75
2	GSS I	50	25	75
3	GSS 2	10	65	75
4	GSS 2	50	25	75
5	ASS	10	65	75
6	ASS	50	25	75
7	HPom ASS	75 (10 Units)	-	75
8	HPom ASS	75 (100 Units)	-	75
9	nur Substrat	-	75	75

Tab. 8: Modifizierter Reaktionsansatzes mi PNCS nach der ersten Messung. Hierbei wurden die Enzyme mit anderen Volumem eingesetzt.

Probennummer	Probe	Enzyme (µl)	Assay-Puffer (µl)	Substrat (µl)
1	GSS I	2	148	150
2	GSS I	20	130	150
3	GSS 2	100	50	150
4	GSS 2	150	-	150
5	ASS	100	50	150
6	ASS	150	-	150
7	<i>HPom</i> ASS	150 (5 Unit)	-	150
8	<i>HPom</i> ASS	150 (25 Units)	-	150
9	nur Substrat	-	150	150

Tab. 9: Reaktionsansatz mit 4-MUS, um zu testen ob Sulfat abgespalten werden kann.

Probennummer	Probe	Enzyme (µl)	Assay-Puffer (µl)	Substrat (µl)
1	GSS I	2	148	150
2	GSS I	20	130	150
3	GSS 2	100	50	150
4	GSS 2	150	-	150
5	ASS	100	50	150
6	ASS	150	-	150
7	<i>HPom</i> ASS	150 (5 Unit)	-	150
8	<i>HPom</i> ASS	150 (25 Units)	-	150
9	nur Substrat	-	150	150

Tab. 10: Modifizierter Reaktionsansatz mit 4-MUS nach der ersten Messung. Die Enzyme wurden in einem anderen Volumen eingesetzt.

Probennummer	Probe	Enzyme (µl)	Assay-Puffer (µl)	Substrat (µl)
1	GSS I	10	65	75
2	GSS I	50	25	75
3	GSS 2	10	65	75
4	GSS 2	50	25	75
5	ASS	10	65	75
6	ASS	50	25	75
7	<i>HPom</i> ASS	75 (10 Units)	-	75
8	<i>HPom</i> ASS	75 (100 Units)	-	75
9	nur Substrat	-	75	75
10	GSS I	1	74	75
11	<i>HPom</i> ASS	75 (0.5 Unit)	-	75
12	<i>HPom</i> ASS	75 (1 Unit)	-	75

II. Sequenzen verwendeter Primer

	Primer	Sequenz (5' – 3')
RACE-PCR (genspezifischer Primer)	Pxyl_GGS2_5_303	GAT ACC ACG CTC CTC AGC ATT GGA TAG G
	Pxyl_GGS2_5_506	GTG ACT GGC TTG CCG TCA AGC CTC GAT
	Pxyl_GGS2_5_1406	GGA CTG CAA GGC TTG GGG ATG ACA TCG
Sequenzierung (genspezifischer Primer)	Pxyl_GGS2_3_456	CGA CTA CTA CGA ATA CAA CGC TCA ATC GAG GC
	GSS2intern_174F	GAG TGT CCC TCC ATC GCT AC
	Pxy_GSS2_1573for	TGC CCC CAA GTA CTT CAA CT
Vollängen-PCR	PxylGSS2_pIBF	AGC ATG GCA ATT CTG CAT CAA GTA GTG GTG ATT CTG
	PxylGSS2_pIBR	TTC AGA GTC AGA GTA GGG TTC AAC AGA G
RACE-PCR (Ankerprimer)	SMART IV	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT ACG GCC GGG
	CDs-3M	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC GAG GCG GCC (T) ₂₀ VN*

III. Vektorenabbildungen und Schnittstellen verwendeter Restriktionsenzyme

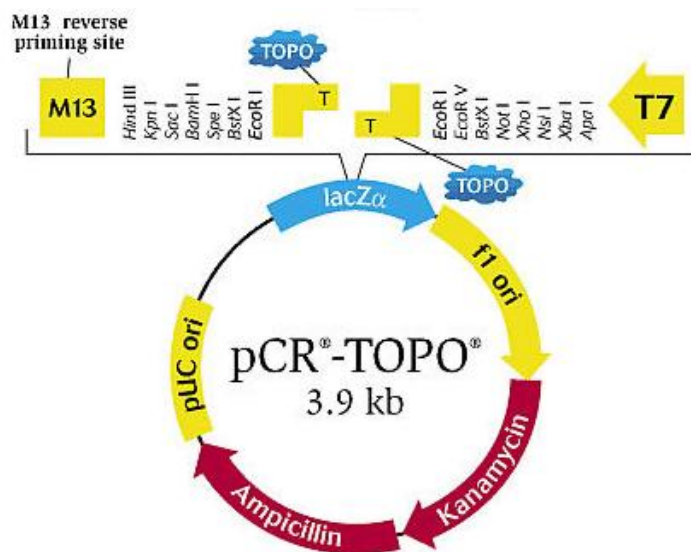


Abb. 18: Topo TA-Vektor mit den vorhandenen Restriktionsschnittstellen. Entnommen wurde diese Abbildung aus Quellen: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/K451020>

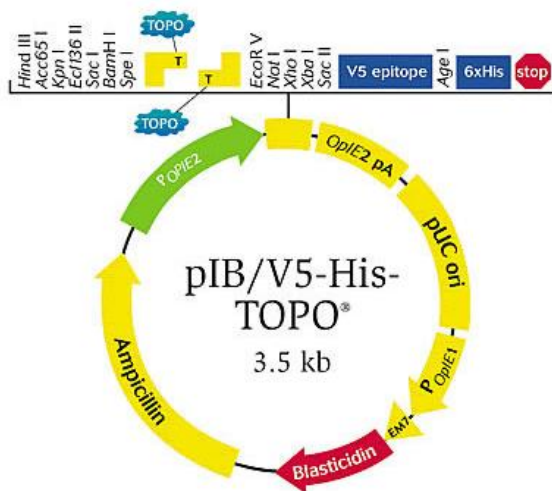


Abb. 19: pIB/V5Vektor mit den vorhandenen Restriktionsschnittstellen. Entnommen wurde diese Abbildung aus <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/V802001>.

Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme:

HindIII 5'...A | A G C T T...3'
 3'...T T C G A | A...5'

SacII 5'...C C G C | G G...3'
 3'...G G | C G C C...5'

IV. Aminosäuresequenz der GSS 2

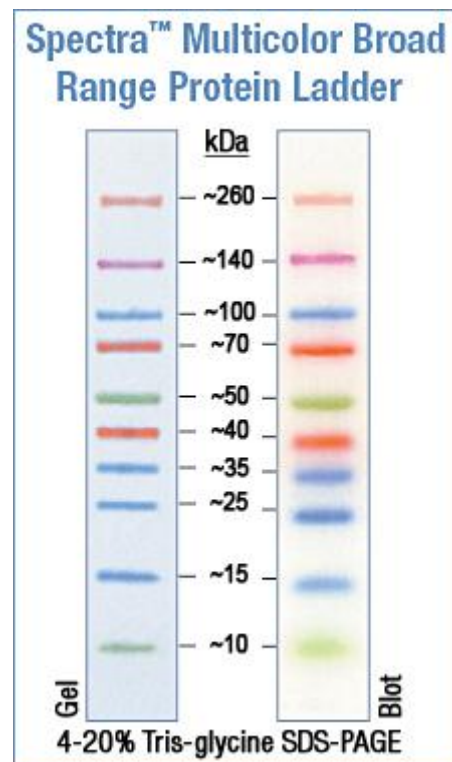
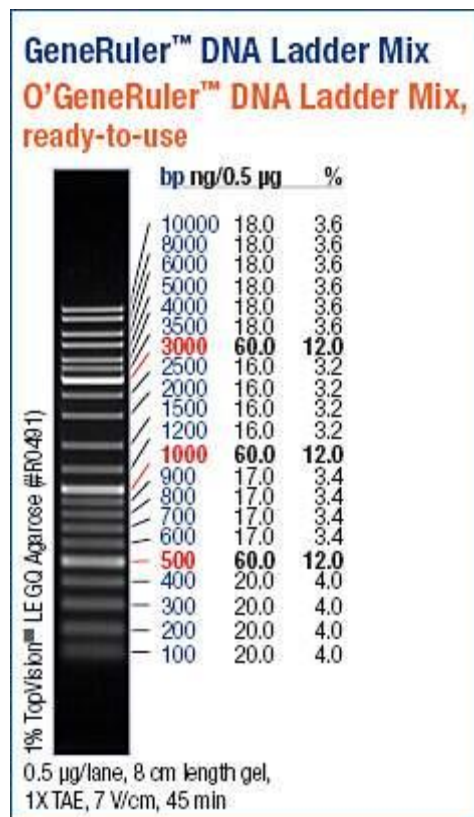
```
MAILHQVVVILGAALCVSASTKPHVIMIMADDMGWDDTSTHGSKSVLTPNLDVLTRSGVS  
LHRYYYTHAVCSPARTAVLTGKYAHTLGMQGMPLSNAEERGIPLEERLISQYLQDAGYRTQI  
VGKWHVGHAFPEQLPTYRGFENHFGVRRGGFIDYYEYNAQSRLDGKPVGTGLCLFDDLKPD  
WTTEGYITDVYTEKSTTIIENHNVSEPLYLLLTHHAPHNXNEDASLQAPPEEVRAQRHVELH  
PRRIFAAMVKKLDDSIGEIVATLEKKGMLENTIITFSTDNGAPT VGLGANS GS NYPLRGVKK  
SPWEGGIRGNAMIWAGPEVAPGNSWRGNVYDGNMHAADWVPTLLEAVGEKIPAGLD  
GIPMWSHTIENXPSRTEIFEIDYFNHSSVTLGRHKLIKGTIEESLSKHYGEDLRGIIGTPPDY  
KQKLXDSKAWESLETIGIPLDADVMADRDEAIVTCGDVVPKPCSPTAESWCLYDIIADPCEL  
RDLSEELPQLAQILLYRLEQEEAKIIPRDGQFVADPRAAPKYFNYSYLSVEPYSDSE*
```

Abb. 21: Aminosäuresequenz des kodierenden Bereiches der Glucosinolatsulfatase 2 von *Plutella xylostella*.

V. Symbole der Aminosäuren

A	Ala	Alanin
B	Asx	Asparagin oder Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
Z	Glx	Glutamin oder Glutaminsäure

VI. Bandenabbildungen verwendeter Größenmarker



Danksagung

Ich danke zunächst Dr. Heiko Vogel für die vielen hilfreichen Ratschläge und die Bereitstellung des interessanten Themas.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Hanna Heidel-Fischer und Dr. Roy Kirsch die mich während der gesamten Zeit mit ihrem Wissen und ihrer Erfahrung bei der Durchführung der Versuche und der Auswertung der vielen Ergebnisse unterstützt haben. Ihre intensive Betreuung, die kritische Auseinandersetzung mit meiner Arbeit und die abwechslungsreichen Gespräche haben mir in dieser Zeit sehr geholfen.

Herrn Prof. Dr. W. Künkel danke ich für die Übernahme der Betreuung sowie der Beantwortung meiner Fragen und der Hilfsbereitschaft beim wissenschaftlichen Schreiben.

Ich danke auch Michael Reichelt für die Durchführung der HPLC und die Hilfestellungen bei der chromatografischen Auswertung und Domenica Schnabelrauch für die zahlreichen Sequenzierungen.

Ich möchte auch meinen Eltern danken, die mir stets den Rücken gestärkt haben und ohne die dieses Studium nie möglich gewesen wäre. Meiner Mama auch einen Dank für die späten Korrektur-Telefongespräche.

Ich danke auch Daniel für die Geduld und Aufmunterung in den stressigen Phasen und der Hilfe beim Lösen von Formatierungsproblemen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die freundliche Atmosphäre im Labor.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich versichere, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbständig verfasst und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt, nur die angegebenen Quellen benutzt und die in den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.“

Jena, den 29. August 2012

Josephine Schmalzer