

# **Differentielle Expression und Charakterisierung der Glykosid-Hydrolase Familie 48 in zwei Spezies von phytophagen Käfern.**

## **Bachelorarbeit**

Vorgelegt an der Ernst-Abbe-Hochschule Jena  
Fachbereich Medizintechnik und Biotechnologie  
Biotechnologie

Hochschulbetreuer: Prof. Dr. rer. nat. habil. Thomas Munder  
Betrieblicher Betreuer: Dipl. Biol. André Busch  
Firma/Institut: Max-Planck-Institut für chemische Ökologie  
Hans-Knöll-Straße 8, 07745 Jena  
Bearbeitet von: Sina Marielle Peter  
Matrikelnummer: 638616  
Studiengang: Biotechnologie

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>ii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>iv</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>vi</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Zellulose und Zellulose-degradierende Enzyme .....	1
1.2 Chitin und Chitinasen.....	2
1.3 Glykosid-Hydrolasen (GH).....	3
1.4 Glykosid-Hydrolase Familie 48 .....	3
1.5 Glykosid-Hydrolase Familie 48 in <i>Gastrophysa atrocyanea</i> .....	4
1.6 <i>Gastrophysa viridula</i> und <i>Phaedon cochleariae</i> .....	5
1.7 Zielstellung.....	7
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>8</b>
2.1 Material .....	8
2.2 Methoden.....	13
2.2.1 Käferzucht .....	13
2.2.2 Extraktion von Geweben und Gewebeinhalten aus Larven .....	13
2.2.3 RNA Extraktion und Analyse der RNA Qualität .....	14
2.2.4 Untersuchung der spezifischen GH48 Genexpression .....	14
2.2.4.1 cDNA-Synthese und qPCR.....	14
2.2.4.2 Statistische Verfahren .....	15
2.2.5 Untersuchung der spezifischen GH48 Proteinlokalisierung.....	15
2.2.5.1 Bradford-Assay .....	15
2.2.5.2 Denaturierende SDS-PAGE und kolloidale Coomassie Färbung .....	16
2.2.5.3 Massenspektrometrie .....	16
2.2.6 Klonierung von DNA .....	17
2.2.6.1 Ligation .....	17
2.2.6.2 Transformation.....	18
2.2.6.3 Kolonie-PCR und Präparation der Plasmid DNA.....	18
2.2.6.4 DNA-Sequenzierung.....	19
2.2.7 Transfektion.....	19
2.2.8 Western Blot.....	20
2.2.9 Untersuchung der enzymatischen Aktivität rekombinanter GH48s .....	21

2.2.9.1 Dialyse und Entsalzen der rekombinanten Proteine .....	21
2.2.9.2 Agardiffusionstest .....	21
2.2.9.3 Dünnschichtchromatografie (DSC) .....	22
2.2.9.4 In-Gel-Zymogramm.....	23
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>24</b>
3.1 Untersuchung der spezifischen GH48 Genexpression.....	24
3.1.1 Gewebespezifische Genexpression der GH48 Gene .....	24
3.1.2 Entwicklungsspezifische Genexpression in <i>G. viridula</i> .....	25
3.2 Untersuchung der spezifischen GH48 Proteinlokalisierung in <i>G. viridula</i> .....	28
3.3 Heterologe Expression und Charakterisierung der GH48s .....	30
3.3.1 Proteinexpression und -detektion mittels Western Blot .....	30
3.3.3 Enzymatische Charakterisierung .....	32
3.3.3.1 Agardiffusionstest.....	32
3.3.3.2 Dünnschichtchromatografie.....	33
3.3.3.3 In-Gel-Zymogramm.....	36
<b>4. Diskussion und Ausblick .....</b>	<b>38</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>42</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>43</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>A1</b>
Anhang 1: Zusammensetzung der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien .....	A1
Anhang 3: Ansatz und Einstellungen des Thermocycler für RT-PCR .....	A2
Anhang 5: Verdünnungsreihe für cDNA .....	A3
Anhang 6: Ansatz und Einstellungen des Thermocycler für qPCR.....	A3
Anhang 7: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele für die SDS-PAGE.....	A4
Anhang 8: Ansatz und Einstellungen des Thermocycler für RT-PCR .....	A4
Anhang 8: Ansatz und Einstellungen des Thermocycler für PCR.....	A5
Anhang 9: Ansatz und Einstellungen des Thermocycler für die Kolonie-PCR.....	A5
Anhang 10: Ergebnisse der statistischen Berechnung .....	A6
Anhang 11: LC-MS/MS Daten der Mascot-Suche .....	A7
Anhang 12: Dünnschichtchromatogramme.....	A13
Anhang 13: SDS-Gele der Zymogramme .....	A14
<b>Erklärung .....</b>	

## Abkürzungsverzeichnis

5x	fünffach konzentrierte Lösung
A	Adenin
ACN	Acetonitril
Amp	Ampicillin
APAP	active phase-associated protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaar
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CMC	Carboxymethyl-Cellulose
Da	Dalton
DTT	Dithiothreitol
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSC	Dünnschichtchromatografie
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FWD	Forward Primer
FP	Filterpapier
G	Guanin
GH	Glykosid Hydrolase
<i>G. atrocyanea</i>	<i>Gastrophysa actrocyanea</i>
Gvi / <i>G. viridula</i>	<i>Gastrophysa viridula</i>
HCl	Salzsäure
His	Histidin
HRP	horseradish peroxidase
IAA	Indol-3-Essigsäure
LB	lysogeny broth
LC-MS	Liquid-Chromatografie-Massenspektrometrie
M	Molar
MQ	millipore
MS	Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid

OLR	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pco / <i>P. cochleariae</i>	<i>Phaedon cochleariae</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PP2	Primer Paar 2
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAC	regenerierte amorphe Cellulose
rcf	relative centrifugal force
REV	Reverse Primer
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RT-qPCR	Real Time Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Seq	Sequenzierung
<i>Sf</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SOC	super optimal broth with catabolite repression
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

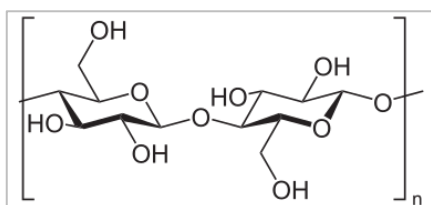
<b>Abb. 1:</b> Strukturformel der Dimer-Einheit von Zellulose.....	1
<b>Abb. 2:</b> Strukturformel der Dimer-Einheit von Chitin.....	2
<b>Abb. 3:</b> Zwei Hauptmechanismen der enzymatischen Hydrolyse einer glykosidischen Bindung.....	4
<b>Abb. 4:</b> <i>Gastrophysa viridula</i> und <i>Phaedon cochleariae</i> .....	6
<b>Abb. 5:</b> <i>G. viridula</i> Eier und Larven in verschiedenen Entwicklungsstadien.....	6
<b>Abb. 6:</b> Gewebespezifische Genexpression der GH48s in Darmgewebe und Restkörper von <i>G. viridula</i> .....	24
<b>Abb. 7:</b> Gewebespezifische Genexpression der GH48s in Darmgewebe und Restkörper von <i>P. cochleariae</i> .....	25
<b>Abb. 8:</b> Entwicklungsspezifische Genexpression von GH48-1 in <i>G. viridula</i> .....	26
<b>Abb. 9:</b> Entwicklungsspezifische Genexpression von GH48-2 in <i>G. viridula</i> .....	26
<b>Abb. 10:</b> Entwicklungsspezifische Genexpression von GH48-3 in <i>G. viridula</i> .....	27
<b>Abb. 11:</b> Proteinauftrennung von Hämolymphe und Darminhalt aus <i>G. viridula</i> Larven.....	28
<b>Abb. 12:</b> Peptidabundanz in Hämolymphe und Darminhalt von <i>G. viridula</i> .....	29
<b>Abb. 13:</b> Heterologe Expression der GH48 Proteine von Gvi und Pco in <i>Sf9</i> -Zellen. ..	30
<b>Abb. 14:</b> Western Blot der drei erfolgreich exprimierten GH48 Proteine nach Dialyse und Entsalzen.....	31
<b>Abb. 15:</b> Agardiffusionstest zur Untersuchung der Zellulase-Aktivität der heterolog exprimierten Proteine auf CMC.....	32
<b>Abb. 16:</b> Dünnschichtchromatogramm der rekombinanten GH48 Proteine, getestet gegen Zellostetraose und Zellostentaose.....	34
<b>Abb. 17:</b> Dünnschichtchromatogramm der rekombinanten GH48 Proteine, getestet gegen Zellohexaose.....	34
<b>Abb. 18:</b> Dünnschichtchromatogramm der rekombinanten GH48 Proteine, getestet gegen CMC und RAC.....	35
<b>Abb. 19:</b> Dünnschichtchromatogramm der rekombinanten GH48 Proteine, getestet gegen Chitotriose und Chitotetraose.....	36

<b>Tab. 1:</b> Verwendete Geräte .....	8
<b>Tab. 2:</b> Verwendetes Verbrauchsmaterial .....	9
<b>Tab. 3:</b> Verwendete Chemikalien .....	9
<b>Tab. 4:</b> Verwendete Kits und biochemische Utensilien.....	11
<b>Tab. 5:</b> Primersequenzen der qPCR-Primer.....	11
<b>Tab. 6:</b> Primersequenzen der Vollängen-Primer.....	12
<b>Tab. 7:</b> Primersequenzen der Sequenzierungs-Primer .....	12

# 1. Einleitung

## 1.1 Zellulose und Zellulose-degradierende Enzyme

Die Zellwand von Pflanzen ist formgebend, sorgt für Stabilität sowie den Schutz der Zelle und hält dem Turgordruck stand. Sie besteht hauptsächlich aus Hemizellulosen, Pektinen und Zellulose. Zellulose ist ein unverzweigtes Polysaccharid aufgebaut aus Glukosemolekülen. Die Monomere sind dabei durch  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindungen verknüpft (Abb. 1) [1, 2]. Nach Synthese der Zellulose am Zellulose-Synthase-Komplex der Pflanze lagern sich die Zellulosefibrillen unter Bildung von Wasserstoffbrücken aneinander an und formen ein robustes kristallines Netzwerk. Allerdings finden sich im Zellulosenetzwerk auch Regionen, die keine Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und die sogenannten amorphen Bereiche bilden. Das Verhältnis von amorpher zu kristalliner Zellulose ist dabei in der primären Zellwand höher als in der sekundären Zellwand [3].



**Abb. 1: Strukturformel der Dimer-Einheit von Zellulose.** Zwei Glukosemoleküle sind über eine  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindung verknüpft.

Damit pflanzenfressende Lebewesen Zellulose abbauen und somit von einer reichhaltigen Energiequelle profitieren können, bedarf es Zellulose-verdauender Enzyme: Zellulasen. Dabei gibt es zwei verschiedene Formen von Zellulasen. Erstens: die sogenannten endo- $\beta$ -1,4-Glukanasen (Endozellulasen) welche an einer beliebigen Stelle am Zellulosemolekül binden und die  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindung hydrolysieren. Dabei entstehen Zellulosefragmente mit variabler Größe. Endozellulasen können jedoch nur amorphe Strukturen, also nicht kristalline Zellulose, spalten. Zweitens: die Exozellulasen, welche Zellulose von den Enden her angreifen. Sie bauen die Kettenenden ab und bilden als Abbau-Produkte Zellobi- und triose (Zellobiosidasen). Exozellulasen sind in der Lage auch kristalline Strukturen abzubauen [1,4].

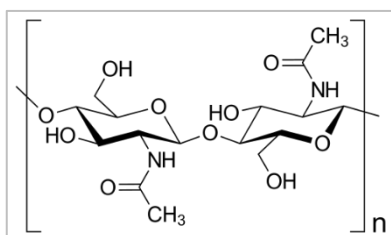
Eine lange Zeit hat man geglaubt, dass Zellulasen nur in Bakterien und Pilzen vorkommen, entweder als Pflanzen-pathogen oder als mutualistische Symbionten in Tieren (z.B. Termiten oder Rinder). Ende der 1990er Jahre wurden dann die ersten endogenen Zellulasen auch in nicht-pflanzlichen Metazoen entdeckt (d.h. in pflanzen-parasitären Nematoden, Termiten und Blattkäfern) [5, 6, 7]. Von da an wurden sukzessiv immer



mehr aktive und putative Zellulasen in verschiedensten Tierarten entdeckt z.B. in Mollusken, holzfressenden Schaben und Bockkäfern [8, 9].

## 1.2 Chitin und Chitinasen

Das neben Zellulose am weitesten in der Natur verbreitete Polysaccharid Chitin besteht aus Ketten von  $\beta$ -1,4-glykosidisch verknüpften N-Acetyl-D-glucosamin-Resten (Abb. 2) [10, 11]. Es fungiert ähnlich wie Zellulose als stützende und formgebende Einheit, ist dabei jedoch hauptsächlich in wirbellosen Tieren zu finden. Sowohl in Skleroproteinen von Mollusken als auch den Außenskeletten von Arthropoden wirkt Chitin stabilisierend. Das Polysaccharid kann in drei polymorphen Formen vorkommen:  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Chitin. Die fibrillären Stränge des  $\alpha$ -Chitins sind antiparallel angeordnet, während die Stränge des  $\beta$ -Chitins eine parallele Anordnung aufweisen. Die dritte Form ist eine Tripletanordnung, wobei zwei Stränge parallel und ein dritter antiparallel angeordnet sind [12].



**Abb. 2: Strukturformel der Dimer-Einheit von Chitin.** Zwei N-Acetylglucosamin-Einheiten sind über eine  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindung verknüpft.

Für den Abbau von Chitin-Polymeren bzw. -Oligomeren sind Chitinasen verantwortlich, welche die Hydrolyse der  $\beta$ -1,4-glykosidischen Bindungen katalysieren. Aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften ist Chitin schwer zu spalten. Analog zu Zellulasen werden Chitinasen dabei in zwei Enzymtypen aufgeteilt. Erstens: Endo-aktive Chitinasen welche als Abbauprodukte verschiedengroße Chitin-Oligomere produzieren, und zweitens: Exo-aktive Chitinasen welche entweder N-Acetylglucosamin-Einheiten ( $\beta$ -N-Acetylglucosaminidasen) oder Chitobiose freisetzen (Chitobiosidasen) [13]. Das letztere Enzym spaltet N-Acetylglucosamin-Einheiten von nicht-reduzierenden Enden ab und bevorzugt kleinere Substrate als Chitinasen [10].

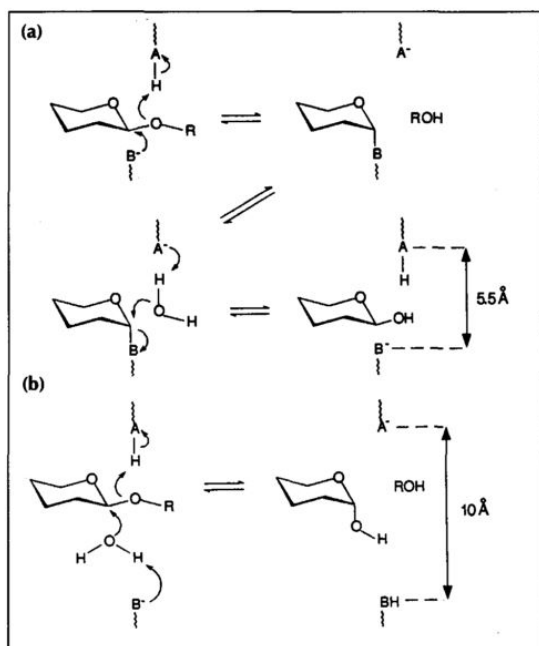
### 1.3 Glykosid-Hydrolasen (GH)

Zellulasen und Chitinasen gehören zu den Glykosid-Hydrolasen, welche basierend auf ihrer Aminosäuresequenz in verschiedene Familien unterteilt werden können. Momentan umfassen die GHs 145 Gruppen aufgeteilt auf 15 Klans [14]. Allgemein katalysieren Glykosid-Hydrolasen reversibel die Hydrolyse einer glykosidischen Bindung zwischen zwei oder mehr Kohlenhydraten bzw. einem Kohlenhydrat und einer Nicht-Kohlenhydrat-Einheit [14]. Chitinasen findet man bei Insekten bisweilen in der GH18 Familie [10], während bis heute in Insekten mehrere aktive sowie putative Zellulasen der Familien GH5 [15, 16], GH9 [17, 18], und GH45 [19, 20] nachgewiesen wurden. In rezenten Transkriptomanalysen diverser Curculionoidea (Rüssel- und Borkenkäfer) und Chrysomeloidea (Blatt- und Bockkäfer) wurden außerdem Gene entdeckt, die für Enzyme der Glykosid-Hydrolase Familie 48 kodieren. Dabei wurden für *Gastrophysa viridula* drei Gene und für *Phaedon cochleariae* zwei Gene gefunden [8].

### 1.4 Glykosid-Hydrolase Familie 48

Die GH Familie 48 ist bekannt dafür Zellulose zu spalten, wurde aber bis heute fast ausschließlich in Bakterien untersucht und funktional charakterisiert [14]. Strukturell besitzen die GH48s ein  $(\alpha/\alpha)_6$ -Helix-barrel mit langen Schleifen auf der N-terminalen Seite der Helices, welche einen Tunnel formen. Ein offener Spaltbereich bedeckt eine Seite des barrels. Das aktive Zentrum befindet sich in einer Vertiefung an der Kreuzung von Spalt- und Tunnelregion [21]. Die katalytisch aktiven Aminosäurereste des aktiven Zentrum bestehen aus Glutaminsäure (Glu) und Asparaginsäure (Asp) [21, 22] und bilden eine katalytische Diade. Als Protonendonator dient Glutaminsäure, als Protonenakzeptor Aspartat. Die Hydrolyse resultiert entweder in einer umkehrenden (inverse) oder gleichbleibenden (retaining) anomeren Konformation, abhängig von der räumlichen Lage des katalytischen Restes (Abb. 3) [23].

Bei dem „retaining“-Mechanismus protoniert der Säurekatalysator den glykosidischen Sauerstoff. Die Base greift nukleophil am anomeren Zentrum an, wodurch die OH-Gruppe mit dem Rest freigesetzt wird. Es folgt eine Hydrolyse durch ein Wassermolekül. Durch diese zweite nukleophile Substitution entsteht ein Produkt mit der gleichen Stereochemie. Bei GH48s erfolgt die Hydrolyse über den „inverse“-Mechanismus. Hier protoniert ebenfalls ein Säurekatalysator den glykosidischen Sauerstoff, begleitet von einem gleichzeitigen Angriff eines Wassermoleküls, welches von dem Basenrest aktiviert wird. Diese einzelne nukleophile Substitution ergibt ein Produkt mit umgekehrter Stereochemie [23].



**Abb. 3: Zwei Hauptmechanismen der enzymatischen Hydrolyse einer glykosidischen Bindung.** (a) gleichbleibende Konformation (retaining), (b) umkehrende Konformation (inverse). (Abbildung übernommen von Davies, G., et al., Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases)

Interessanterweise, wurden bis heute kaum GH48s in Metazoa beschrieben und konnten bisher ausschließlich in *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera, Curculionidae) [24] und *Gastrophysa atrocyanea* (Coleoptera, Chrysomelidae) [25] beschrieben werden. Die GH48s beider Käfer wurden weiter charakterisiert und zeigten in *O. sulcatus* nicht-eindeutige Zellobiohydrolase-Aktivität wohingegen in *G. atrocyanea* putative Chitinase-Aktivität (Vgl. 1.5) entdeckt wurde. Aufgrund der Seltenheit von GH48s in Metazoa sowie den widersprüchlichen und unzureichenden Charakterisierungen prädestiniert sich diese Glykosid-Hydrolase Familie dazu eingehender untersucht zu werden.

### 1.5 Glykosid-Hydrolase Familie 48 in *Gastrophysa atrocyanea*

Im Jahr 2006 wurden die Proteine APAP (active phase-associated protein) I und II aus *Gastrophysa atrocyanea* beschrieben [25]. Beide Proteine wurden aus adulten Tieren aufgereinigt sowie deren korrespondierende cDNA isoliert. Es stellte sich heraus, dass diese Proteine eine starke Homologie zu GH48s in Pilzen, Bakterien sowie der Käferart *O. sulcatus* aufweisen. APAP I und II wurden dementsprechend als GH48s klassifiziert. Im weiteren Verlauf der Forschungsarbeit wurde APAP I genauer charakterisiert. Obwohl GH48s bekannt dafür sind Zellulose zu spalten, konnte für APAP I keine Zellulase-Aktivität entdeckt werden. Interessanterweise geben die Autoren im weiteren Verlauf des Experiments an Chitinase-Aktivität für APAP I nach Analyse mittels kolorimetri-

scher Verfahren nachgewiesen zu haben [25]. Chitinasen waren in Insekten bis dahin nur in den GH Familien 18 und 19 bekannt, wohingegen Mitglieder der GH Familie 48 entweder als Endo- $\beta$ -1,4-Glukanasen oder Zellobiohydrolasen identifiziert wurden [10, 22, 26].

Im Zusammenhang mit der Chitinase-Aktivität wurde ebenfalls erwähnt, dass APAP I hauptsächlich in der Hämolymphe lokalisiert ist. Experimente, die diese Aussage belegen, wurden jedoch nicht veröffentlicht. Neben der Enzymaktivität und der Proteinlokalisierung wurde auch überprüft, in welchen Entwicklungsstadien der Käfer APAP I am stärksten exprimiert ist. Dabei zeigte sich, dass die Gene vorrangig in den aktiv fressenden Stadien wie Larven und den sich fortpflanzenden Adulten vorhanden waren [25].

Um zu prüfen ob APAP I eine Rolle bei der Diapause der Insekten spielt, wurde das Verhalten von Käfern mit und ohne APAP I geprüft. Nach Herunterregulierung von APAP I mittels RNA Interferenz zeigte sich dabei, dass Käfer denen APAP I fehlte nicht fraßen und sich in der Erde eingruben. Die Kontrolltiere zeigten weiterhin ein normales Verhalten [25]. Fujita et al. stellte daher die Vermutung auf, dass APAP I eine Rolle bei der Verdauung von Nahrung spielt. Zusammenfassend ist es allerdings zweifelhaft, dass anhand der gezeigten Ergebnisse, tatsächlich Aussagen über enzymatische Aktivität, Proteinlokalisierung oder physiologische Bedeutung von APAP I in *G. atrocyanea* getroffen werden können. Eine Überprüfung der Ergebnisse von Fujita et al. anhand *G. atrocyanea* oder einer nahe verwandten Spezies scheint daher angebracht.

## **1.6 *Gastrophysa viridula* und *Phaedon cochleariae***

In der Gruppe der Phytophaga, der pflanzenfressenden Käfer, findet man die Superfamilien der Curculionoidea und der Chrysomeloidea, welche u.a. die Familie der Chrysomelidae (Blattkäfer) beinhaltet. Zwei Beispiele für diese Familie sind der Ampferblattkäfer *Gastrophysa viridula* (Chrysomelidae, Chrysomelinae) und der Meerrettichblattkäfer *Phaedon cochleariae* (Chrysomelidae, Chrysomelinae).

Der Name des Ampferblattkäfers geht zurück auf seine Nahrungsquelle die Ampferpflanzen (*Rumex spp.*, Familie *Polygonaceae*). Zu erkennen sind die Imagines an ihrem metallisch glänzenden goldgrünen bis bläulichen Körper. Dabei lässt sich das Weibchen anhand ihres, mit Eiern geschwollenen Hinterleibes von dem Männchen unterscheiden [27, 28]. *P. cochleariae* dagegen ernährt sich vorrangig von Kohlpflanzen, Getreide und auch Brunnenkresse. Die adulten Käfer sind rund und glänzen metallisch blau (Abb. 4) [29, 30].



**Abb. 4: *Gastrophysa viridula* und *Phaedon cochleariae*.** Ausgewachsene Käfer von *G. viridula* mit goldgrüner Farbe (links) und *P. cochleariae* in Dunkelblau (rechts).

Die Larven von *G. viridula* durchlaufen drei Phasen bevor sie sich verpuppen und in der Erde unterhalb der Pflanze zu adulten Käfern entwickeln [31]. Die Eier werden von den Weibchen in Gelegen von 20-45 Stück an der Unterseite der Blätter abgelegt. Nachdem die grau-schwarzen Larven aus den Eiern geschlüpft sind bewegen sie sich nur wenige Millimeter, weswegen man das erste Larvenstadium noch als eine Ansammlung vieler einzelner Tiere vorfindet. Während des zweiten Stadiums beginnen sie sich dann zu zerstreuen, um sich auf die adaxialen und abaxialen Blattseiten zu setzen [32]. Die älteren Larven sind in der Lage ein Sekret abzusondern, um sich damit vor Feinden zu schützen (Abb. 5) [33, 34].



**Abb. 5: *G. viridula* Eier und Larven in verschiedenen Entwicklungsstadien.** Larven des ersten Stadiums schlüpfen aus den Eiern an der Unterseite des Blattes (links) und Larve im dritten Stadium (rechts).

## 1.7 Zielstellung

Aufgrund des geringen Wissens über die biologische Funktion von GH48s in Insekten sowie unvollständiger Forschungsarbeit vorangegangener wissenschaftlicher Veröffentlichungen ist es das Ziel dieser Arbeit ein besseres Verständnis von GH48s in Blattkäfern zu erhalten. Am Beispiel von *Gastrophysa viridula* und *Phaedon cochleariae* und in Anlehnung an die Forschungsarbeit von Fujita et al. [25] werden verschiedene Aspekte im Zuge dieser Bachelorarbeit untersucht.

Erstens: wird mittels Proteomanalyse die Lokalisation der GH48 Proteine (Vergleich Darminhalt zu Hämolymphe) untersucht. Zweitens: wird mittels quantitativer PCR-Analyse die gewebespezifische Genexpression der GH48s (Vergleich Darmgewebe zu Restkörper) in *G. viridula* und *P. cochleariae* überprüft. Drittens: wird am Beispiel von *G. viridula* die GH48 Genexpression über unterschiedliche Entwicklungsstadien (d.h. Eier, Puppen, den drei verschiedenen Larvenstadien sowie zwischen adulten weiblichen und männlichen Tieren) verglichen. Viertens: werden GH48s, mittels heterologer Expression der Zielgene näher funktionell charakterisiert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

**Tab. 1: Verwendete Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose-Gelelektrophorese Kammer	Biometra
Big squid Magnetrührer	Ika
2100 Bioanalyzer	Agilent
Certomat® IS	Sartorius
CFX Connect™ Real Time PCR Detection System	BioRad
Criterion-Gelkassette	BioRad
Duomax 1030	Heidolph
Heißluftgebläse HL 1810 S	Steinel
Hypercassette™ Autoradiography Cassette	GE Healthcare
Inkubator	Heraeus / Biometra
Kolbenhubpipette	Eppendorf
Laborsprüher aus Glas mit Gummiball	Macherey-Nagel
Mastercycler Eppgradient S Thermocycler	Eppendorf
Mini-Zentrifuge	Carl Roth
MR 1000 Magnetrührer	Heidolph
nanoAcquity UPLC System	Waters
NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer	ThermoFisher
Plate Reader Infinte 200	Tecan
Q-ToF HDMS Massenspektrometer	Waters
Sterilwerkbank HeraSafe®	Heraeus
S40 SevenMulti™ pH Meter	Mettler Toledo
Thermomixer	Eppendorf
TissueLyser LT	Qiagen
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	Dinkelberg Labortechnik
3D-Wippschüttler SSM3	Stuart
Zentrifuge	Eppendorf

**Tab. 2: Verwendetes Verbrauchsmaterial**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
ColiRollers™ Plating Beads	EMD Millipore
Filterpapier Extra thick blot paper	BioRad
Handschuhe	Starlab
Hyperfilm™ ECL™	GE Healthcare
Kanüle Sterican®	B.Braun
Membran Immun-Blot® PVDF	BioRad
PCR 8er Softstrips	Biozym Scientific
Petrischalen	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen	Starlab / Kisker Biotech
Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One
Serologische Pipetten	Greiner Bio-One
Silicagel Platten	Merck
Spritze Omnifix®	B.Braun
96-well hard-shell PCR Platten	BioRad
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One
Zellstofftücher	Carl Roth

**Tab. 3: Verwendete Chemikalien**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 %)	BioRad
Agarose	Lonza
Ammoniumsulfat	Carl Roth
Ampicillin (100 µg/ml)	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	GE Healthcare
Avicel®	Sigma-Aldrich
Butanol	Carl Roth
Carboxymethyl-Cellulose (CMC)	Sigma-Aldrich
Chitin	Sigma-Aldrich
Coomassie G250	Sigma-Aldrich
Cumarsäure	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth
Ethylendiamintetraacetat	Carl Roth
Essigsäure	Merck
Ethanol	Carl Roth



<b>Fortsetzung Tab. 3</b>	<b>Hersteller</b>
FuGene® HD Transfektionsreagenz	Promega
Glukose	Sigma-Aldrich
Glycin	Carl Roth
Hefeextrakt	Duchefa Biochemie
Kaliumchlorid	Carl Roth
Laemmli Puffer, 2x	Bio-Rad
Luminol	Fluka
Magnesiumchlorid	Carl Roth
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich
2-Mercaptoethanol	Carl Roth
Methanol	Carl Roth
4-Methylumbelliferyl $\beta$ -D-cellobiosid	Sigma-Aldrich
4-Methylumbelliferyl $\beta$ -D-glucopyranosid	Sigma-Aldrich
Milchpulver Blotting-Grade	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
O'GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use	ThermoFisher
Orange DNA Loading Dye, 6x	ThermoFisher
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	ThermoFisher
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	ThermoFisher
ortho-Phosphorsäure	Fluka
Protein Dye Reagent, 1x	BioRad
Schweine-Trypsin	Promega
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Sf-900™ II SFM (1x)-Medium	Gibco
Tris-buffered saline (TBS), 10x	BioRad
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Carl Roth
Trypton	Duchefa Biochemie
Tween-20	Sigma-Aldrich
Wasser (Nuklease-frei)	Ambion
Wasser (RNase-frei)	Qiagen
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich
Zitronensäure	Carl Roth

Tab. 4: Verwendete Kits und biochemische Utensilien

Kits und biochemische Utensilien	Hersteller
AccuPrime™ <i>Taq</i> DNA Polymerase, high fidelity Kit	ThermoFisher
Anti-V5-Antikörper HRP	Invitrogen
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	ThermoFisher
innuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena
pIB/V5-His TOPO® TA Expression Kit	ThermoFisher
Proteaseinhibitor Cocktail cOmplete™ EDTA-free	Roche
QPCR SYBR Kit	ThermoFisher
RNA 6000 Nano Kit	Agilent
RNeasy® MinElute® Cleanup Kit	Qiagen
Slide-A-Lyzer® Dialysis Kassten (Volumen 0,5-3 ml)	ThermoFisher
SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix	ThermoFisher
<i>Taq</i> PCR Master Mix Kit	Qiagen
One Shot™ TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	ThermoFisher
TURBO DNA- <i>free</i> ™ Kit	ThermoFisher
Verso cDNA Synthesis Kit	ThermoFisher
20x XT MOPS Running Buffer Kit	Bio-Rad
Zeba™ Spin Desalting Columns (5 ml)	ThermoFisher

Tab. 5: Primersequenzen der qPCR-Primer für GH48 in *G. viridula* und *P. cochleariae* (Metabion International AG)

Oligonukleotidname	DNA-Basensequenz (5'→3')
Gvi_GH48_1_PP2_FWD	ATCCCTGCTACCCTCGAATG
Gvi_GH48_1_PP2_REV	TCCAGATTTAGCGGCGTAGT
Gvi_GH48_2_PP2_FWD	GAAACTGCGTCGGACCTTAC
Gvi_GH48_2_PP2_REV	CACCATCTCCGATCCTCCAG
Gvi_GH48_3_PP2_FWD	CAAGACCGGCGATCAGAATG
Gvi_GH48_3_PP2_REV	CACCGTCTCGTTGAATCTGC
Pco_GH48_1_PP2_FWD	GTTCGGCTCACTTCGGTTAC
Pco_GH48_1_PP2_REV	CTAGCTGTCTGTCGAGGGAG
Pco_GH48_2_PP2_FWD	GGTCGAGAAAGCCGGTAAAC
Pco_GH48_2_PP2_REV	GCTCTCTTTGCCTTGCCAC

**Tab. 6: Primersequenzen der Vollängen-Primer für GH48 einschließlich Kozak-Sequenz\* für GH48 in *G. viridula* und *P. cochleariae* (Metabion International AG)**

<b>Oligonukleotidname</b>	<b>DNA-Basensequenz (5'→3')</b>
Gvi_GH48_1_FWD	GAAATGGGGCCATTGGCACTCAC
Gvi_GH48_1_REV	TTCGTTGAAGAGCATTCCATAAG
Gvi_GH48_2_FWD	GACATGGAGTCCTTAGCGATTGCCAT
Gvi_GH48_2_REV	TTCATTGAATAGAATGCCGTAGG
Gvi_GH48_3_FWD	GAAATGGAGTCCTCGGCAATCGCCCT
Gvi_GH48_3_REV	TTCGTTGAATAGAATACCGTAGGTAC
Pco_GH48_1_FWD	GAAATGGCAAAGCTGGCTTTAACC
Pco_GH48_1_REV	TTCATTGAAAAGCATCCTGTAAGT
Pco_GH48_2_FWD	GAAATGGAGTCCTTAGCAATCATCCT
Pco_GH48_2_REV	TTCATTGAAGAGTACTCCGTAGG

\*Kozak-Sequenz: (G/A)NNATGG

**Tab. 7: Primersequenzen der Sequenzierungs-Primer für GH48 in *G. viridula* und *P. cochleariae* (Metabion International AG)**

<b>Oligonukleotidname</b>	<b>DNA-Basensequenz (5'→3')</b>
Gvi_GH48_1_Seq_FWD	TCGGGCCATGGTCTTGTC AAG
Gvi_GH48_1_Seq_REV	CAAAGTGAGCAGCGCCATCTC
Gvi_GH48_2_Seq_FWD	GAAACTGCGTCGGACCTTAC
Gvi_GH48_2_Seq_REV	CACCATCTCCGATCCTCCAG
Gvi_GH48_3_Seq_FWD	CGGACCTCACA ACTGCC CAG
Gvi_GH48_3_Seq_REV	GGATTCTGGTAGCCGAAAAAAG
Pco_GH48_1_Seq_FWD	CGGACCATCGACTTGCC CAG
Pco_GH48_1_Seq_REV	GGTAACCGAAGTGAGCCGAAC
Pco_GH48_2_Seq_FWD	GGTCGAGAAAGCCGGTAAAC
Pco_GH48_2_Seq_REV	GCTCTCTTTGCCTTGTC CAC

Mit einem Milli-Q Synthesis A10 Reinstwassersystem wurde über einen 0,22 µm Millipak®-Filter Wasser zu Millipore Wasser (MQ H<sub>2</sub>O) aufbereitet. Das Millipore Wasser wurde als Standardlösungsmittel verwendet.

Eine Auflistung der verwendeten Puffer, Medien und Lösungen sowie deren Zusammensetzung (soweit bekannt) ist dem Anhang 1 zu entnehmen.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Käferzucht

Für die Extraktion der GH48s wurden *P. cochleariae* sowie *G. viridula* in den einzelnen Entwicklungsstadien benötigt. Die Tiere wurden auf Wiesen in bzw. um Jena gesammelt und in Boxen mit Netzeinsätzen zur Luftzufuhr gehalten. Diese Boxen wurden in temperierten Schränken bei ca. 18 °C gelagert. *G. viridula* wurde auf Ampferblättern gehalten, während *P. cochleariae* auf Chinakohl gezüchtet wurde. Die zugegebenen Blätter wurden alle 2-3 Tage ausgetauscht. Die geschlüpften Larven wurden getrennt von den adulten Käfern und Eiern gehalten.

### 2.2.2 Extraktion von Geweben und Gewebeinhalten aus Larven

Zur Untersuchung der gewebespezifischen Genexpression und Proteinabundanz von GH48s wurden aktiv fressende *G. viridula* und *P. cochleariae* Larven im dritten Larvenstadium verwendet. Die Hämolymphe von *G. viridula* wurde extrahiert indem dem Tier entweder in das letzte Abdominalsegment (Telson) oder eines der larvalen Beine geschnitten wurde. Die austretende Hämolymphe wurde mit einer Pipette geerntet. Die Hämolymphe von 10 Larven wurde angereichert und in Anticoagulant-Puffer gelagert. Anschließend wurden die Larven in einem Proteaseinhibitor-Cocktail enthaltenden 40 mM Zitrat/Phosphat-Puffer pH 5.0 (Sezierpuffer) von Abdomen bis Kopf aufgeschnitten und der Darm vom Restkörper getrennt. Der Darm wurde aufgeschnitten und dessen Inhalt im Sezierpuffer ausgespült. Zehn Darminhalte wurden in 1 ml Sezierpuffer angereichert und bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert. Darmgewebe und Restkörper von *G. viridula* als auch *P. cochleariae* wurden getrennt voneinander gesammelt und zum Schutz vor RNA Degradierung in Lysis Solution RL bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C aufbewahrt. Es wurden sechs biologische Replikate mit Gewebeproben von jeweils drei Tieren gesammelt. Zusätzlich wurde dieselbe Anzahl an Replikaten von Larven des ersten (7 Larven/Replikat), zweiten (5 Larven/Replikat) und dritten Stadiums (3 Larven/Replikat), Eiern (~25 Eier/Replikat), Puppen (3 Puppen/Replikat) sowie männlichen als auch weiblichen adulten Käfern (3 Käfer/Replikat) vorbereitet. Die Tiere wurden ebenfalls in Lysis Solution RL aufbewahrt. Alle gesammelten Tier- und Gewebeproben wurden anschließend in einem TissueLyser LT abgeschlossen. Um das überflüssige Restgewebe zu entfernen, wurden die Proben bei 16100 rcf für 10 min abzentrifugiert und der resultierende Rückstand verworfen.

### 2.2.3 RNA Extraktion und Analyse der RNA Qualität

Die RNA wurde mittels innuPREP RNA Mini Kit nach Anleitung des Herstellers extrahiert (Protocol 1: RNA extraction from tissue samples) und anschließend in RNase-freiem Wasser eluiert. Zur Beseitigung von DNA Verunreinigungen fand ein DNase-Verdau mit dem TURBO DNA-*free*<sup>TM</sup> Kit nach Anleitung des Herstellers statt, wobei alle Proben bei 37 °C für 30 min inkubiert wurden. Anschließend wurde mit dem RNeasy® MinElute® Cleanup Kit gemäß der Anleitung für Proben ≤ 100 µl gearbeitet und die aufgereinigte RNA mit RNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration der RNA wurde mittels NanoDrop<sup>TM</sup> 1000 Spectrophotometer bestimmt. Um auszuschließen, dass die erhaltene RNA während der bisherigen Behandlung einer Degradierung erlag, wurde deren Qualität gemessen. Dazu wurde die extrahierte RNA auf einem Agilent 2100 Bioanalyser nach Protokoll des Herstellers untersucht.

### 2.2.4 Untersuchung der spezifischen GH48 Genexpression

Für die Analyse der gewebe- sowie der entwicklungspezifischen Genexpression wurde aus der extrahierten RNA von *G. viridula* und *P. cochleariae* cDNA synthetisiert. Diese konnte dann über RT-qPCR mithilfe eines Referenzgens quantifiziert werden.

#### 2.2.4.1 cDNA-Synthese und qPCR

Die aufgereinigte komplette RNA wurde als Vorlage zur cDNA-Synthese mittels Verso cDNA Synthesis Kit verwendet (Anhang 3). Die erhaltenen cDNAs wurden für die qPCR Experimente eingesetzt und anschließend in 96-well hard-shell PCR Platten gekoppelt mit einem CFX Connect Real-Time System analysiert. Alle Reaktionen wurden mit dem QPCR SYBR Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die qPCR-Primer (Tab. 5) wurden mittels Primer3 (Version 0.4.0) entworfen. Die spezifische Amplifikation der Transkripte wurde zum einen mittels PCR und Agarosegel-Analyse bestimmt und zum anderen mittels Schmelzkurvenbestimmung im Anschluss an die qPCR. Unter Verwendung des CFX-Managers (Version 3.1) wurde, basierend auf den C<sub>q</sub>-Werten (Quantifikationszyklen) jeder qPCR, eine Standardkurvenanalyse für jedes Primerpaar mittels cDNA-Verdünnungsreihe erstellt (Anhang 5). Bei der RT-qPCR erfolgt über Fluoreszenz-Messung eine Quantifizierung des Zielgens aus einem cDNA-Pool. Proportional zur Menge des Zielgens erhöht sich die Fluoreszenz, die während eines jedem Zyklus gemessen wird. Für dieses Verfahren wurde dem Reaktionsansatz ein Fluoreszenzfarbstoff, enthalten in dem verwendeten 2x 2-Step QPCR SYBR Mix,

zugegeben (Anhang 6). Dieser Farbstoff lagert sich an die DNA an, wodurch sich das Absorptionsspektrum ändert und die Fluoreszenz zunimmt. Diese Änderung kann gemessen und anschließend zur quantitativen Auswertung verwendet werden [35]. Als Referenzgen wurde das Ribosomale Protein S3 (RPS3), dessen Sequenz aus einer haus-eigenen Transkriptomdatenbank für *G. viridula* und *P. cochleariae* gezogen wurde, verwendet. Da RPS3 zu den Haushaltsgenen/ nicht-regulierten Genen gehört und somit unabhängig von äußeren Einflüssen und dem Zellstadium exprimiert wird, kann es für eine relative Quantifizierung verwendet werden.

#### 2.2.4.2 Statistische Verfahren

Mithilfe der Software SigmaPlot 11.0 wurden die von der qPCR erhaltenen Werte statistisch mittels „Paired t-test“ ausgewertet. Es wurden dabei der t- und p-value für Darmgewebe und Restkörper eines Gens berechnet. Der t-value zeigt dabei die berechnete Differenz vom Standardfehler, während der p-value die Signifikanz der Differenz der untersuchten Proben beschreibt. Bei einem p-value  $< 0,05$  ist die Differenz statistisch signifikant.

#### 2.2.5 Untersuchung der spezifischen GH48 Proteinlokalisierung

Um die Proteinabundanz in Hämolymphe und Darminhalt von *G. viridula* zu untersuchen, wurde ein Bradford-Test zur Bestimmung der Proteinmenge durchgeführt. In einer SDS-PAGE wurden die Proteinfraktionen aufgetrennt und die Banden anschließend mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Das Gel wurde durch Massenspektrometrie analysiert.

##### 2.2.5.1 Bradford-Assay

Für die Quantifizierung des Proteingehaltes von Hämolymphe und Darminhalt aus *G. viridula* wurde ein Farbstoffbindungstest nach Bradford durchgeführt. Hierfür wurde zuvor eine BSA-Standardreihe von  $0-2 \text{ mg ml}^{-1}$  bestimmt. Basierend auf der Standardreihe wurden die Konzentrationen für zwei Werte je Probe ermittelt und anschließend der Mittelwert aus beiden Proben als finale Proteinkonzentration berechnet. Dazu wurden die entsprechenden Probenvolumina für die Hämolymphe und den Darminhalt mit MQ  $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt und jedem Ansatz 1x Protein Dye Reagent zugegeben. Nach einer

Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur, wurde die Absorption in einem Plate Reader Infinite 200 bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

### 2.2.5.2 Denaturierende SDS-PAGE und kolloidale Coomassie Färbung

Um die Proteine aus Darminhalt bzw. Hämolymphe nach ihrer Molekülmasse und unabhängig von ihrer sekundären und tertiären Struktur aufzutrennen, wurde eine denaturierende SDS-PAGE durchgeführt. Dafür wurde ein 12 %iges Criterion Trenngel gegossen (Anhang 7). Der Ansatz wurde in eine Criterion-Gelkassette gefüllt und mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Anschließend wurde ein 5 %iges Sammelgel vorbereitet (Anhang 7) und das polymerisierte Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet. Danach wurden die Proteinproben aus Darm und Hämolymphe vorbereitet. Dafür wurde das Volumen für 15 µg Protein berechnet und mit MQ H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Proteinansätze wurden mit β-Mercaptoethanol und 2x Laemmli-Puffer vermischt und bei 90 °C für 10 min inkubiert. Das β-Mercaptoethanol bewirkt eine Reduzierung der Disulfidbrücken in den Polypeptidketten, was zusätzlich neben der hohen Temperatur zu Streckung und Aufbrechen der Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen der Proteine beiträgt [36]. Durch das im Laemmli-Puffer enthaltene SDS wird die Eigenladung der zu trennenden Proteine kompensiert, sodass negativ geladene Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen [36]. Anschließend wurden die Proben sowie PageRuler™ Unstained Protein Ladder als Referenz auf das Gel geladen. Die Proteine wurden bei 120 V für 2 h aufgetrennt und danach in 40 % Ethanol und 10 % Essigsäure für 1 h fixiert. Das Gel wurde dann dreimal für 10 min gewaschen. Dann wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blau G250 gefärbt um die Proteine im Gel sichtbar zu machen. Im sauren Milieu findet zwischen den Sulfonat-Gruppen des Farbstoffes und den Seitenketten der Aminosäuren eine ionische Interaktion statt. Das Gel wurde mit der Färbelösung über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in 1 % Essigsäure solange gewaschen bis alle Coomassie Partikel entfernt waren [37].

### 2.2.5.3 Massenspektrometrie

Die relevanten Banden wurden aus dem Coomassie-gefärbten Gel ausgeschnitten und in kleine Stücke geteilt. Sie wurden mehrfach mit 25 mM 25 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> gewaschen und mit 50 % ACN/ 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> entfärbt. Die Proteine wurden mit 10 mM DTT bei 50 °C für 1 h reduziert und mit 55 mM IAA bei Raumtemperatur im Dunkeln für 45 min alkyliert. Anschließend wurden die entfärbten, gewaschenen und dehydrierten Gelstücke für 1 h bei 4 °C in einer 12 ng/µl Schweine-Trypsin-Lösung in 25 mM

$\text{NH}_4\text{HCO}_3$  rehydriert und anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die tryptischen Peptide wurden aus den Gelstücken mit 75% ACN/ 5% FA extrahiert und in einem SpeedVac getrocknet. Sie wurden dann in einem nanoAcquity UPLC® System aufgetrennt und in ein Q-ToF HDMS Massenspektrometer injiziert. Die DDA (Data-dependent acquisition) Rohdaten wurden mit einer spezifischen Software gesammelt und prozessiert (MassLynx v1.4 Software ProteinLynx Global Server Browser (PLGS)). Die resultierenden MS/MS Spektren wurden mit der NCBI Inr Datenbank, kombiniert mit einem *in silico* translatierten hauseigenen *G. viridula* Darm-Transkriptom, unter Verwendung von MASCOT Software Version 2.4, abgeglichen.

## 2.2.6 Klonierung von DNA

Die offenen Leserahmen der Zielgene wurden mittels genspezifischer Primer (Tab. 6) von cDNAs amplifiziert. Die Primer wurden, basierend auf bereits beschriebenen GH48 Sequenzen [8], manuell designt. Der FWD-Primer wurde so gestaltet, dass er die Kozak-Sequenz zu Beginn des OLR in die Sequenz einfügt, wodurch die Klonierung in den TOPO® TA-Vektor und dessen Expression ermöglicht wurde. Der REV-Primer wurde so konzipiert das er das Stoppcodon ausschließt, damit die exprimierten Proteine das V5-Epitop sowie den 6x Histidin-tag erhalten konnten. Als Amplifikations-Vorlage wurde initial die mit dem Verso Kit generierte cDNA (Vgl. 2.2.4.1) verwendet. Da sich die Sequenzen bei der DNA-Sequenzierung (Vgl. 2.2.6.4) aber als unbrauchbar erwiesen, wurde neue cDNA mit dem SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix synthetisiert (Anhang 8). Diese wurden dann für die Amplifikation verwendet, wobei alle PCR-Reaktionen mit dem AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase, high fidelity Kit durchgeführt wurden (Anhang 9). Um eine erfolgreiche Amplifikation der Zielgene zu bestätigen wurde eine Agarosegelelektrophorese mit den PCR-Produkten, gemischt mit 6x Orange DNA Loading Dye, durchgeführt. Anschließend wurde der krude PCR-Ansatz direkt für die Vektor-Ligation verwendet.

### 2.2.6.1 Ligation

Die für die Amplifikation der Zielgene verwendete *Taq*-Polymerase erzeugt 3'-A-Überhänge an den Fragmentenden, welche für die folgende Ligationsreaktion benötigt wurden. Diese wurde mit dem pIB/V5-His TOPO® TA Expression Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Hier wird anstelle einer Ligase ein Topoisomerase I aktivierter TA-Vektor verwendet. Die Topoisomerase erkennt die Schnittstelle (C/T)CCTT und schneidet die DNA, sodass beidseitige 3'-T-Überhänge entstehen. Sie bleibt dann



kovalent gebunden, wodurch eine Selbstligation des Vektors verhindert wird und dieser linear vorliegt [35]. Die amplifizierten Gene wurden in diesen pIB/V5-His-TOPO® Vektor „in frame“ mit einem V5-Epitop kloniert. Dieses V5-Epitop ermöglicht die Erkennung des rekombinanten Proteins mittels Anti-V5-Antikörper. Weiterhin enthält der Vektor einen 6x Histidin-tag als Alternative zum V5-Epitop, welcher durch einen Anti-His(C-term)-Antikörper erkannt und zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins genutzt werden kann. Auf dem Plasmid befinden sich außerdem zwei Resistenzgene (Blasticidin und Ampicillin), welche zur Selektion positiver Transformanten genutzt werden können. Ein Replikationsursprung (pUC ori) ermöglicht die Replikation und eine hohe Kopienzahl des Vektors.

### 2.2.6.2 Transformation

TOP10 kompetente *E. coli* Zellen wurden mit dem Ligationsansatz transformiert. Über einen Hitzeschock von 42 °C wurde die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterienzellen gewährleistet. Nach Zugabe von SOC-Medium wurden die Proben 1 h schüttelnd bei 37 °C inkubiert und anschließend auf LB-Agar-Platten (+Amp) ausplattiert. Diese wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.6.3 Kolonie-PCR und Präparation der Plasmid DNA

Durch das in den Agar-Platten enthaltene Ampicillin (100 µg/ml) wurde zwischen erfolgreich transformierten und nicht transformierten *E. coli* Zellen selektiert. Die transformierten Bakterien erhielten durch Einschleusen des Vektors das Ampicillin Resistenz-Gen und konnten so auf der Platte wachsen. Da beide Enden des inserierten Gens mit 3'-A-Überhängen versehen werden und die Enden des linearisierten Vektors jeweils 3'-T-Überhänge besitzen, besteht die Möglichkeit, dass das Insert in der falschen Orientierung in den Vektor eingebaut wird. Um korrekt orientierte GH48 Sequenzen im Plasmid zu finden, wurde eine Kolonie PCR durchgeführt. Einzelne Kolonien wurden gepickt und jeweils in einen Ansatz aus Merck Wasser, 2x *Taq* PCR Master Mix, einem plasmidspezifischen Primer (OpIE2) und einem genspezifischen Primer, welcher für die Vollängen Amplifikation genutzt wurde (Tab. 6), überführt (Anhang 9). Außerdem wurden die gepickten Kolonien in LB-Medium (+Amp) überführt, welches als Sicherung für das spätere Animpfen auf eine LB-Platte (+Amp) gegeben wurde. Über Agarosegelelektrophorese der Kolonie-PCR Ansätze wurde beurteilt, welche Kolonien die richtig orientierten Gene enthielten. Positive Klone wurden weiter in LB-Medium (+Amp) überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bakterienzellen wurden an-

schließlich für 10 min bei 1000 rcf abzentrifugiert und die Plasmide mittels GeneJET Plasmid Miniprep Kit isoliert. Die Konzentration der aufgereinigten Plasmid DNA wurde mit dem NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer gemessen.

#### 2.2.6.4 DNA-Sequenzierung

Ziel der Sequenzierung war es die DNA-Sequenz des Inserts zu bestätigen und zusätzlich zur Kolonie-PCR einen Nachweis für die korrekte Orientierung des Fragments zu erhalten. Außerdem konnten so die Übergänge zwischen Plasmid und Insert-DNA untersucht und die Sequenzen auf den korrekten Leserahmen überprüft werden. Um das gesamte Fragment und seinen Einbau analysieren zu können, wurden zwei plasmidspezifische sowie zwei genspezifische Primer, welche sich auf dem Insert überschneiden, verwendet. Deshalb wurden vier Ansätze der DNA zu je 160 ng angesetzt. Dazu wurden die OpIE2 FWD bzw. OpIE2 REV oder die genspezifischen GH48 Seq FWD bzw. GH48 Seq REV Primer (Tab. 7) gegeben. Die Ansätze wurden dann mit Merck Wasser aufgefüllt. Das Prinzip der Sequenzierung beruht auf der Kettenabbruch-Synthese nach Sanger. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der DNASTAR® Lasergene SeqMan Pro™ Software ausgewertet.

#### 2.2.7 Transfektion

Die aus der Sequenzierung hervorgegangenen positiven Klone wurden als Vorlage zur heterologen Proteinexpression in Insektenzellen weiter verwendet. Bei der Transfektion wird Fremd-DNA bzw. -RNA in eukaryotische Zellen eingebracht. Dadurch können die gewünschten Proteine der Zielgene heterolog exprimiert und für Proteinstudien verwendet werden. Dafür wurden Insektenzellen von *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*) verwendet. Diese Zellen stellen im Vergleich zu den Käfern ein verwandtes Expressionssystem dar, sind robust und lassen sich einfach kultivieren. Vor der Transfektion wurde in eine 6-well-Platte pro Kavität eine 1:3 verdünnte Suspension von konfluenten *Sf9*-Zellen ausgesät und bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurde den Zellen Zeit gegeben zu adhären. Die Zellen wurden bei 70% Konfluenz transfiziert, wobei 2,4 µg Plasmid DNA je GH48-Konstrukt in ein Tube pipettiert und mit frischem Kulturmedium aufgefüllt wurde. Anschließend wurde FuGENE® HD Transfektionsreagenz zugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde je Konstrukt in eine Kavität der Kulturplatte pipettiert. Die Zellen wurden dann, bis zur Konfluenz, zw. 48 h und 72 h inkubiert. Aufgrund des Signalspeptids der untersuchten rekombinanten GH48s sekretieren die *Sf9*-Zellen die Proteine nach außen in das Medium. Das krude

Zellmedium wurde geerntet und bei 1000 rcf für 2 min abzentrifugiert, um überflüssige Restzellen zu beseitigen. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt und dann in 200 µl Fraktion aliquotiert. Ein Aliquot wurde für Folgeexperimente bei 4 °C aufbewahrt und die restlichen Aliquots bei -20 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

### 2.2.8 Western Blot

Die erfolgreiche Expression der Zielgene wurde mittels Western Blot unter Verwendung eines Anti-V5-HRP-gekoppelten Antikörpers verifiziert. Dafür wurden die Proteine zunächst in einem SDS-Gel aufgetrennt. Das geerntete Zellmedium, welches die rekombinanten Proteine enthielt, wurde mit 20x XT Reducing Agent und 4x XT Sample Buffer gemischt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden PageRuler™ Prestained Protein Ladder als Marker und die Probenansätze in die Geltaschen eines 4-12 % Criterion™ XT Precast-Gels gefüllt. Für die Elektrophorese wurde ein 1x XT MOPS Running Buffer verwendet. Die SDS-PAGE lief 2 h bei 120 V. Für die spätere Nachweisreaktion mittels Lumineszenz wurden die Proteine auf eine Trägermembran übertragen. Um die rekombinanten Proteine auf die PVDF-Membran zu transferieren, wurde diese zunächst in 100 % Methanol aktiviert und anschließend mit MQ H<sub>2</sub>O gewaschen. Die einzelnen Bestandteile für den Blot wurden auf der Kathodenseite der Kassette in Transfer-Puffer wie folgt geschichtet: Schwamm – Filterpapier – Gel – PVDF-Membran – Filterpapier – Schwamm. Die Kassette wurde dann für 30 min bei 100 V in eine gekühlte und mit Transfer-Puffer gefüllte Kammer gestellt. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers auf der PVDF Membran zu verhindern, wurde diese anschließend bei Raumtemperatur für 1 h mit Blockierlösung geblockt. Darauf folgend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit einem 1:10000 verdünnten anti-V5-Antikörper in Blockierlösung, inkubiert. Dieser Antikörper ist mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt und ist in der Lage spezifisch an das V5-Epitop der rekombinanten Proteine zu binden. Die Membran wurde dann für jeweils 10 min dreimal mit 1x TBS, 0,1 % Tween-20 und einmal mit 1x TBS gewaschen. Durch Zugabe der ECL<sub>1</sub>- und ECL<sub>2</sub>-Lösungen konnte anschließend eine Chemolumineszenzreaktion hervorgerufen werden. Durch die HRP wird dabei die Oxidation des enthaltenen Luminol katalysiert. Das Produkt befindet sich dadurch in einem angeregten Zustand. Durch Abgabe von Lichtenergie in Form von Photonen fällt es auf ein niedrigeres Energieniveau zurück. Der zur Detektion der emittierten Photonen verwendete Autoradiografie-Film besteht aus einer mit Silberbromidkristallen beschichteten Plastikfolie. Das Licht der Chemolumineszenzreaktion versetzt die Kristalle der Folie in einen aktivierten Zustand. Wird der Film entwickelt, können die Kristalle zu schwarzen Silberkörnern reduziert werden, welche die spezifischen Banden bilden [35].

## 2.2.9 Untersuchung der enzymatischen Aktivität rekombinanter GH48s

In Bezug auf die Charakterisierung eines Proteins der GH48 Familie in *Gastrophysa* als Chitinase und der fehlenden Zellulase-Aktivität [25], wurden die heterolog exprimierte Proteine von *G. viridula* und *P. cochleariae* auf ihre enzymatische Funktion getestet. Mit Agardiffusionstests wurde die Endo-Aktivität der Proteine überprüft. Über Dünnschichtchromatografie sollte die Exo-Aktivität getestet und die Endo-Aktivität der Proteine, welche aus dem Agardiffusionstests hervorging, gegeben Falls bestätigt werden. Zusätzlich fand über ein In-Gel-Zymogramm ein Test auf Zellobiohydrolase-Funktion statt.

### 2.2.9.1 Dialyse und Entsalzen der rekombinanten Proteine

Um die rekombinanten Proteine auf Aktivität zu testen, wurde das krude Zellmedium mit den darin enthaltenen exprimierten Proteinen dialysiert und entsalzt. Bei der Dialyse werden u.a. störende Zucker-Oligomere, welche im Nährmedium enthalten sind und somit zu einer Veränderung der Ergebnisse der DSC führen könnten, entfernt. Die Proben wurden in Slide-A-Lyzer® Dialysis Kassetten (Volumen 0,5-3 ml, MWCO = 10 K) gefüllt und bei 4 °C in 1 l 40mM Zitrat/Phosphat-Puffer pH 5.0 dialysiert. Der Puffer wurde nach 1 h und ein zweites Mal nach ca. 4 h ausgewechselt. Am nächsten Tag wurden die Proben der Kassette entnommen. Um die Proteinlösungen zu entsalzen wurden Zeba™ Spin Desalting Columns (MWCO = 7 K) verwendet und nach Anleitung des Herstellers für 5 ml Säulen gearbeitet. Diese Aufreinigungsschritte sind nötig um Salze und andere kleine Moleküle (< 1000 Da) zu entfernen. Insbesondere Salze des Zitrat/Phosphat-Puffers, welcher während der Dialyse verwendet wurde, können so entfernt werden. Die Entfernung der Salze gewährleistet während der nachfolgenden DSC eine klare Trennung der einzelnen Oligosaccharide. Die Hälfte der Probenvolumina wurde dialysiert und entsalzen, die andere Hälfte nur entsalzen. Nach jedem Schritt wurde dabei ein Aliquot der Proben abgenommen, um mittels Western Blot zu beurteilen, ob ein Verlust der Proteine während dieser Schritte stattgefunden hat.

### 2.2.9.2 Agardiffusionstest

Um die Endo-Aktivität der Proteine gegen CMC, RAC und kolloidales Chitin zu prüfen, wurde zunächst ein Agardiffusionstest durchgeführt. CMC ist ein Zellulose-Derivat, dessen Hydroxygruppen teilweise mit einer Carboxymethyl-Gruppe substituiert sind. Diese Zelluloseform ist im Gegensatz zu herkömmlicher Zellulose wasserlöslich

und spiegelt daher amorphe Zellulose wider. Obwohl CMC ein artifizielles Substrat ist, ist es bekannt dafür von Endoglukanasen erkannt und gespalten zu werden [5, 18]. RAC ist mit Säure behandelte kristalline Zellulose. Die „aufgeschmolzenen“ Zellulosefibrillen versuchen sich wieder aneinander zu lagern, können jedoch nur noch eine amorphe Form ausbilden. RAC ist daher ein natürlicheres Substrat für Endoglukanasen als CMC. Für den Diffusionstest wurden 1 % Agarplatten mit 0.1% Substrat in 40 mM Zitrat/Phosphat-Puffer pH 5.0 gegossen. Anschließend wurden Löcher in den Agar gestanzt. Dazu wurden 10 µl des kruden Zellmediums, nur dialysiertes Medium sowie entsalztes und dialysiertes Medium eines jeden heterolog exprimierten Enzyms gegeben. Nach Inkubation bei 40 °C über Nacht wurden die Platten für 2 h bei Raumtemperatur mit Kongorot gefärbt und im Anschluss mit 1 M NaCl entfärbt, bis durchscheinende Höfe um die Proben sichtbar waren. Diese Höfe entstehen durch Diffusion aktiver Proteine in den Agar. Kongorot kann nur an Polysaccharide, welche größer als Pentamere sind binden, weshalb enzymatisch hydrolysierte Bereiche ungefärbt bleiben.

### 2.2.9.3 Dünnschichtchromatografie (DSC)

Für die DSC wurden 20 µl Ansätze vorbereitet. Vierzehn Mikrolitern des dialysierten und entsalzten oder nur entsalzten Zellmediums eines jeden heterolog exprimierten Enzyms wurden 4 µl einer 1 %igen Substratlösung (w/v) in 20 mM Zitrat/Phosphat Puffer pH 5.0 hinzugefügt. Folgende Substrate wurden getestet um Zellulase-Aktivität nachzuweisen: Glukosetraose, -pentaose und -hexaose sowie RAC, kristalline Cellulose (Avicel®), CMC und Filterpapier. Um Chitinase-Aktivität zu testen wurden Chitotriose, -tetraose und -pentaose, kolloidales und kristallines Chitin verwendet. Jedes der verwendeten Oligomere wurde in einer Endkonzentration von 250 ng/µl getestet. Die Enzymassays wurden bei 40 °C über Nacht inkubiert. Abschließend wurden 20 µl des Reaktionsansatzes schrittweise auf DSC-Platten (Silicagel 60) aufgetragen. Die enzymatischen Abbauprodukte wurden in folgendem Laufmittel aufgetrennt: Butanol, Essigsäure und Wasser im Verhältnis 2:1:1. Um die aufgetrennten Abbauprodukte sichtbar zu machen wurden die DSC-Platten anschließend mit 0.2% Orcinol (w/v) in einer Methanol-Schwefelsäure-Lösung besprüht und erhitzt bis Reaktionsprodukte erkennbar wurden. Der Referenzstandard beinhaltete jeweils 2 µg Glukose, Zellobiose, -triose, -tetraose und -pentaose oder 25 µg N-Acetylglucosamin, Chitobiose, -triose, -tetraose und -pentaose.

#### 2.2.9.4 In-Gel-Zymogramm

Abschließend sollte konkret die Zellobiohydrolase-Aktivität der Proteine im Darmlumen sowie der rekombinanten Proteine getestet werden. Dafür wurden zwei SDS-Gele (Anhang 7) vorbereitet. Es wurden 5 µg Protein der Darminhaltsproben (1-3) bzw. 15 µl rekombinantes Protein (Gvi GH48-1, Gvi GH48-2 und Pco GH48-2) mit 2x Laemmli Sample Buffer gemischt. Da verhindert werden sollte, dass die Proteine ihre enzymatische Funktion verlieren, wurden weder reduzierende Agenzien zugesetzt noch eine irreversible Denaturierung durch Hitze hervorgerufen. Die Ansätze sowie eine Positivkontrolle wurden auf das Gel geladen. Als Marker wurde PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder verwendet. Die semi-denaturierende SDS-PAGE lief mit einem 1x TG-Puffer bei 150 V und 4 °C für 2 h. Anschließend wurde das Gel dreimal für 15 min mit Renaturierungspuffer bei 4 °C gewaschen, um das SDS zu entfernen. Die Proteine konnten sich so zurückfalten. Das Gel wurde dann über Nacht in 40 mM Zitrat/Phosphat-Puffer pH 5.0 inkubiert. Es wurden zwei 1 mM Substrat-Lösung mit 4-Methylumbelliferyl β-D-cellobiosid bzw. 4-Methylumbelliferyl β-D-glucopyranosid in 40mM Zitrat/Phosphat-Puffer pH 5.0 vorbereitet. Die Lösungen wurden über je ein Gel gegeben und alles für 1 h bei 40 °C inkubiert. Die Gele wurden dann unter UV-Licht betrachtet. Anschließend erfolgte eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blau G250 (Vgl. 2.2.5.2).

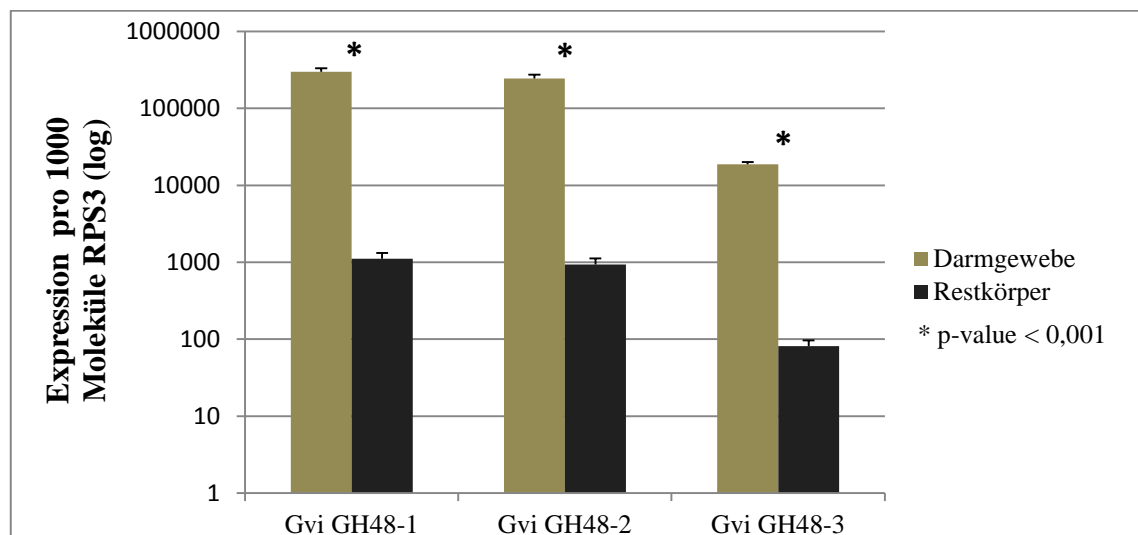
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchung der spezifischen GH48 Genexpression

Die Genexpression der GH48s wurde unter Betrachtung zweier verschiedener Aspekte untersucht: Zum einen wurde die Expression der Gene in zwei Gewebearten (Darm und Restkörper) analysiert und zum anderen die Expression in den einzelnen Entwicklungsstadien von *G. viridula*. Für die Analyse wurde eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt und die erhaltenen Daten verglichen. Die ermittelte Anzahl der GH48 Zielgene für von *G. viridula* bzw. *P. cochleariae* berechnet sich auf 1000 Moleküle des Referenzgens (RPS3).

##### 3.1.1 Gewebespezifische Genexpression der GH48 Gene

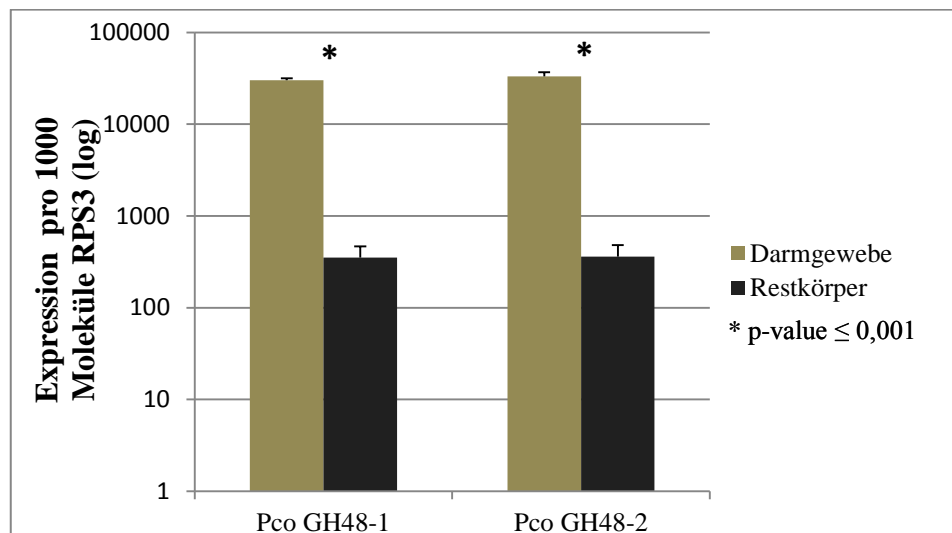
Um zu erfahren in welchem Gewebe GH48 Gene am häufigsten exprimiert sind, wurden der Darm sowie der Restkörper von aktiv fressenden *G. viridula* bzw. *P. cochleariae* Larven mittels qPCR untersucht. Transkripte die für GH48 codieren waren in beiden Spezies signifikant höher im Darmgewebe als im Restkörper exprimiert. In *G. viridula* ist GH48-1 mit 299366 Genen pro 1000 Genen von RPS3 am häufigsten, GH48-3 mit 18668 Genen pro 1000 Genen von RPS3 am niedrigsten im Darmgewebe exprimiert (Abb. 6).



**Abb. 6: Gewebespezifische Genexpression der GH48s in Darmgewebe und Restkörper von *G. viridula*.** Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Gene pro 1000 Molekülen des Referenzgens RPS3 (logarithmiert). An der X-Achse ist das entsprechende Gen (GH48-1, -2 und -3), unterteilt in Darmgewebe und Restkörper, aufgeführt. \* kennzeichnet einen p-value < 0,001.

In *P. cochleariae* finden sich in den Darmgewebeproben für GH48-1 30043 Gene pro 1000 Genen von RPS3 und für GH48-2 mit 33236 Gene pro 1000 Genen von RPS3. (Abb. 7). Anhand der analysierten Daten ist es sehr wahrscheinlich, dass GH48s am Verdauungsprozess beider Käferspezies beteiligt sind.

Die Ergebnisse der statistischen Berechnung (2.2.4.2) sind dem Anhang 10 zu entnehmen.

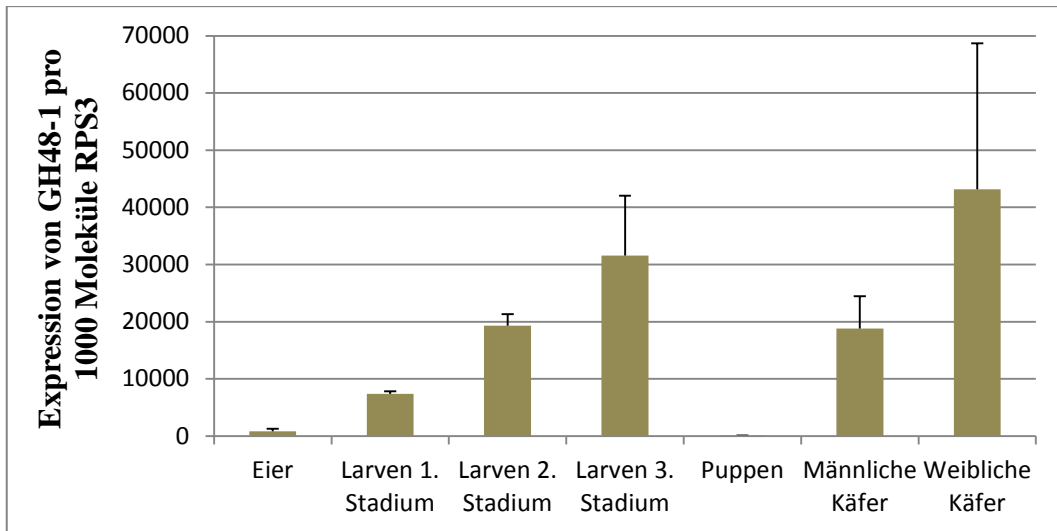


**Abb. 7: Gewebespezifische Genexpression der GH48s in Darmgewebe und Restkörper von *P. cochleariae*.** Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Gene pro 1000 Molekülen des Referenzgens RPS3 (logarithmiert). An der X-Achse ist das entsprechende Gen (GH48-1 und -2) unterteilt in Darmgewebe und Restkörper, aufgeführt. \* kennzeichnet einen p-value < 0,001.

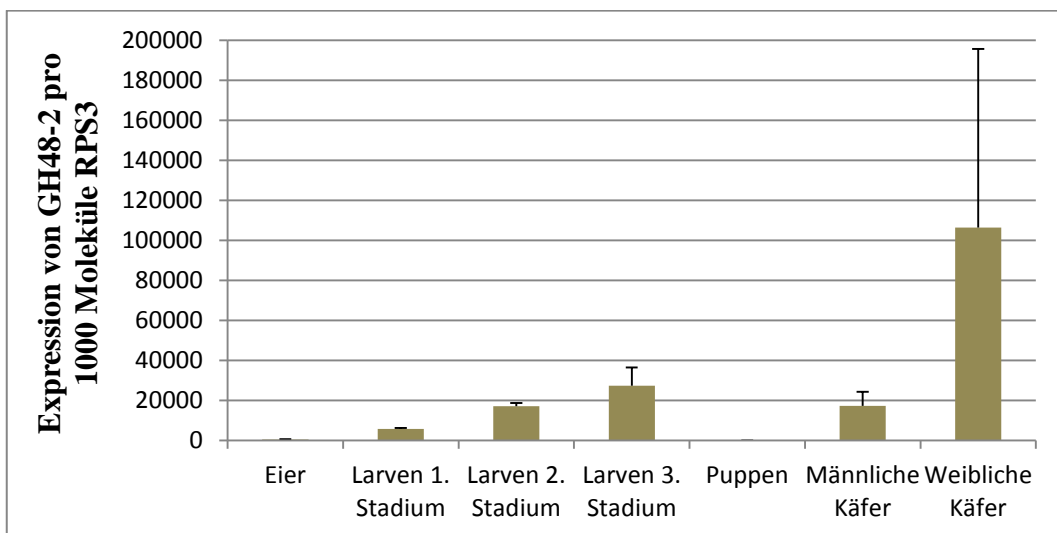
### 3.1.2 Entwicklungsspezifische Genexpression in *G. viridula*

Um weiterhin zu bestätigen, dass GH48s in die Verdauung involviert sind, wurden verschiedene Entwicklungsstadien (Eier, Puppen, die drei larvalen Stadien sowie die adulten männlichen und weiblichen Käfer) von *G. viridula* untersucht und die GH48 Genexpression mittels qPCR analysiert. Zur Auswertung der Daten wurden für jedes GH48 Gen die einzelnen Entwicklungsabschnitte gegenübergestellt (Abb. 8, 9, 10).

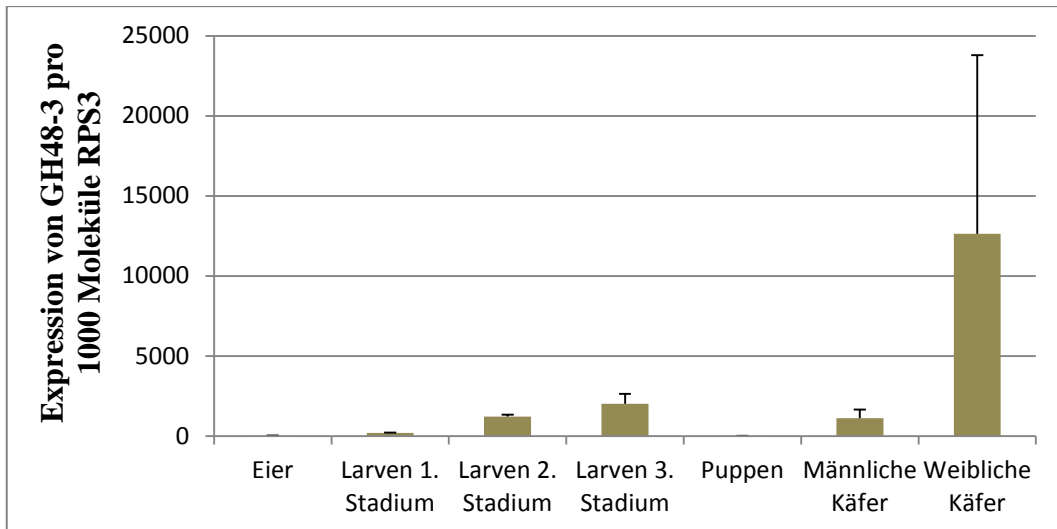




**Abb. 8: Entwicklungsspezifische Genexpression von GH48-1 in *G. viridula*.** Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Gene von GH48-1 pro 1000 Molekülen des Referenzgens RPS3. An der X-Achse sind die untersuchten Entwicklungsstadien aufgeführt.



**Abb. 9: Entwicklungsspezifische Genexpression von GH48-2 in *G. viridula*.** Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Gene von GH48-2 pro 1000 Molekülen des Referenzgens RPS3. An der X-Achse sind die untersuchten Entwicklungsstadien aufgeführt.



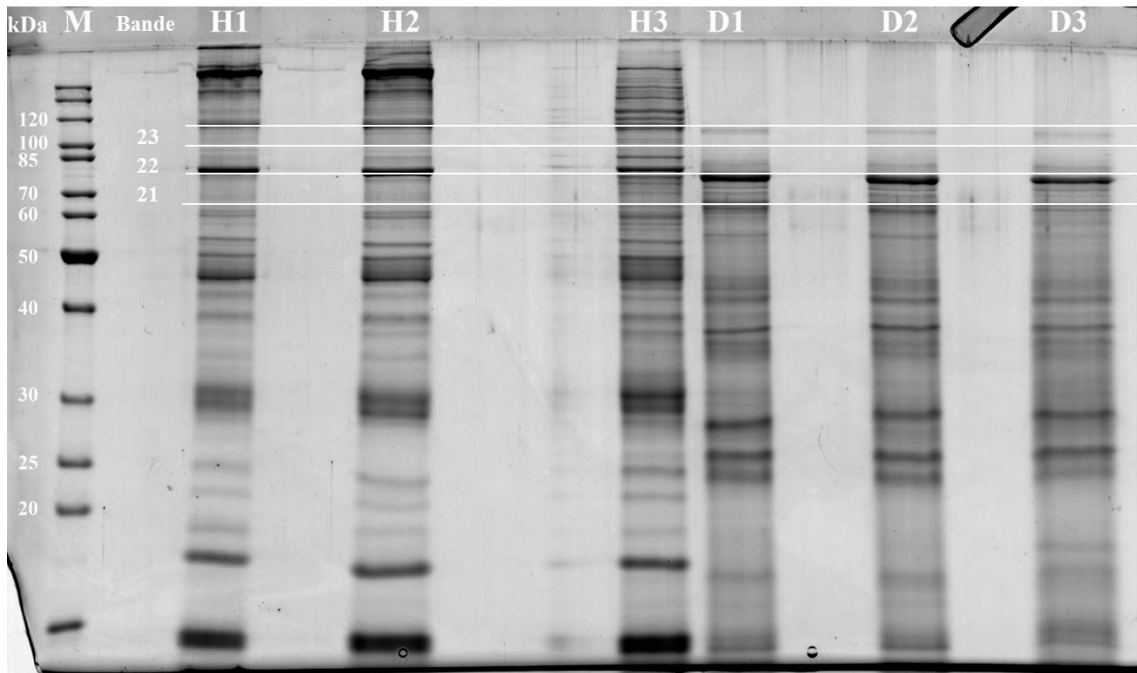
**Abb. 10: Entwicklungsspezifische Genexpression von GH48-3 in *G. viridula*.** Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Gene von GH48-3 pro 1000 Moleküle des Referenzgens RPS3. An der X-Achse sind die untersuchten Entwicklungsstadien aufgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die GH48 Gene in den Eiern und Puppen von *G. viridula* kaum vorhanden sind. Innerhalb der drei Larvenstadien nimmt die Anzahl der Transkriptabundanz zu, wobei die höchste Expression in Larven des dritten Stadiums zu finden ist. Es zeigt sich also eine deutliche Expression in den aktiven Stadien, jedoch nur eine geringe bis keine Expression in den inaktiven Stadien. Es zeichnet sich damit ein Trend ab, dass die Expression in den älteren Tieren (Larven) zunimmt. In Bezug auf die adulten Käfer variiert die GH48 Expression bei den Weibchen viel stärker als bei den Männchen. Die allgemein geringere Expression der GH48-3 Gene im Vergleich zu den anderen zwei untersuchten Genen wird hierbei zusätzlich sichtbar. Diese Ergebnisse korrespondieren mit den Ergebnissen aus einer früheren Studie in *G. atrocyanea* [25] und stärken weiter die Hypothese, dass GH48s eine Verdauungsfunktion einnehmen.

## 3.2 Untersuchung der spezifischen GH48 Proteinlokalisierung in

### *G. viridula*

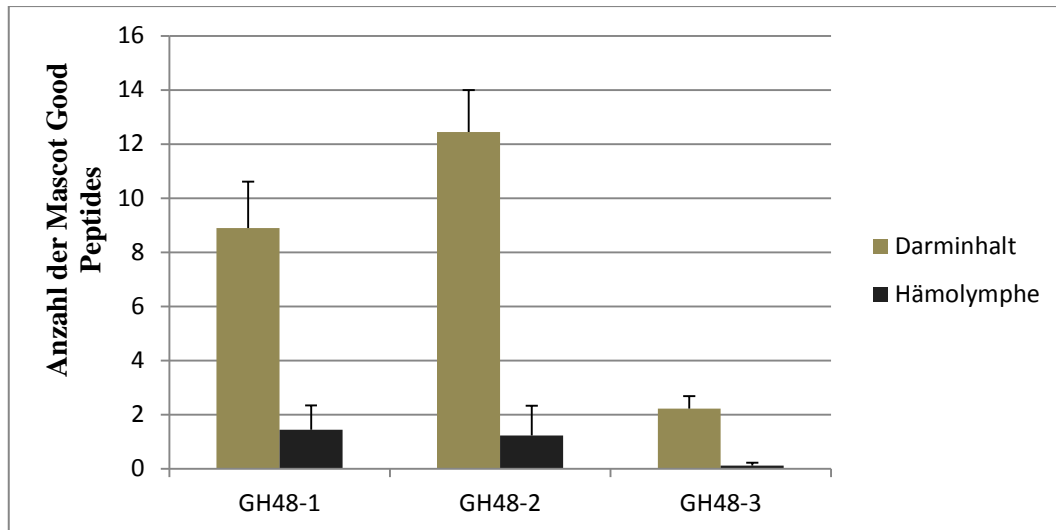
Um zu untersuchen in welcher Körperflüssigkeit sich GH48 Proteine befinden, wurden die Proteine von Darmlumen und Hämolymphe von *G. viridula* Larven in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Massenspektrometrie analysiert. Die erhaltenen Daten wurden mittels Mascot mit zwei Datenbanken abgeglichen.



**Abb. 11: Proteinauftrennung von Hämolymphe und Darminhalt aus *G. viridula* Larven, gefärbt mit kolloidalem Coomassie Blau.** Auf dem Gel sind jeweils 3 biologische Replikate von Hämolymphe (H1-H3) und Darminhalt (D1-D3) zu sehen. Die durch weiße Linien begrenzten Banden kennzeichnen die drei genauer untersuchten Bereiche (21-23). M = Marker; kDa = Kilodalton.

Dafür wurde das SDS-Gel (Abb. 11) in 27 einzelne Banden pro Replikat unterteilt und mittels LC-MS/MS analysiert. Übereinstimmend mit ihrem molekularen Gewicht sollten GH48 Proteine bei einer Masse von ca. 70-70,1 kDa laufen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher entschieden, für die Datenanalyse die Banden 21-23 einer jeden Fraktion näher zu untersuchen (Abb. 11). Proteine in diesem Bereich sollten ein ähnliches Molekulargewicht besitzen wie die Zielproteine. Um zu gewährleisten das es sich bei den Peptidfragmenten der massenspektrometrischen Analyse um sichere Treffer handelt wurden nur Peptide berücksichtigt, welche einen Mascot-Score  $\geq 30$  (Mascot Good Peptides) (Anhang 11) erhielten. Zusätzlich wurden sich doppelnde Peptidsequenzen von der Analyse ausgeschlossen. Die Peptidabundanz in einer Probe ist abhängig von der Proteinabundanz, d.h. je öfter ein Protein in einer Bande des Gels enthalten ist, desto

mehr Peptide treten auf. Folglich lässt sich durch eine Gegenüberstellung der Darm- und Hämolympfproben eine Aussage über die Proteinhäufigkeit treffen (Abb. 12). Trotz des Fokus auf die Banden 21- 23 wurden alle übrigen Banden ebenfalls auf GH48 Peptide überprüft. Wie erwartet fanden sich wenig bis gar keine GH48 Peptidfragmente in diesen Abschnitten und wurden daher von der Analyse ausgeschlossen.



**Abb. 12: Peptidabundanz in Hämolymphe und Darminhalt von *G. viridula*.** Die Y-Achse zeigt den Mittelwert der in den Banden 21-23 gefundenen Mascot Good Peptides aller drei Replikate (D1-D3 bzw. H1-H3). Auf der X-Achse sind die untersuchten GH48s, unterteilt in Darminhalt und Hämolymphe, aufgeführt.

Aus den erhaltenen Daten und dem Diagramm wird deutlich, dass die GH48s hauptsächlich im Darmlumen vertreten sind. In allen drei Replikaten der Darminhaltsprouben sind die Proteine in jeder der genauer untersuchten Banden zu finden. So beläuft sich der Mittelwert für GH48-1 auf acht, für GH48-2 auf zwölf und für GH48-3 auf zwei Peptide. Bei der Hämolymphe konnten nur in Bande 22 des zweiten Replikats alle drei Proteine nachgewiesen werden. In den drei Replikaten befand sich im Durchschnitt für GH48-1 und -2 jeweils ein Peptid. Für GH48-3 geht die Anzahl der Peptide gegen null. GH48-3 weist somit wieder eine deutlich geringere Abundanz auf.

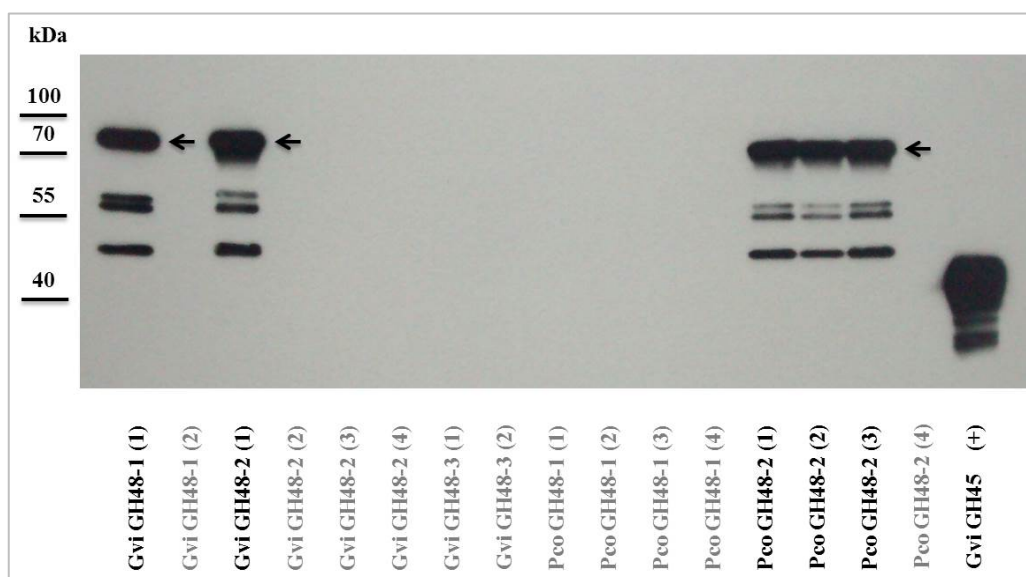
Zusammengefasst, korreliert die Proteinabundanz in Darmlumen und Hämolymphe mit der Transkriptabundanz in Darm und Restkörper. Diese Experimente zeigen, dass GH48 Gene nicht nur in hohem Maße im Darmgewebe exprimiert sondern ihre kodierenden Proteine in der Tat ins Darmlumen sekretiert werden. Folglich stärken diese Ergebnisse weiter die Vermutung, dass GH48s an der Verdauung beteiligt sind.

### 3.3 Heterologe Expression und Charakterisierung der GH48s

#### 3.3.1 Proteinexpression und -detektion mittels Western Blot

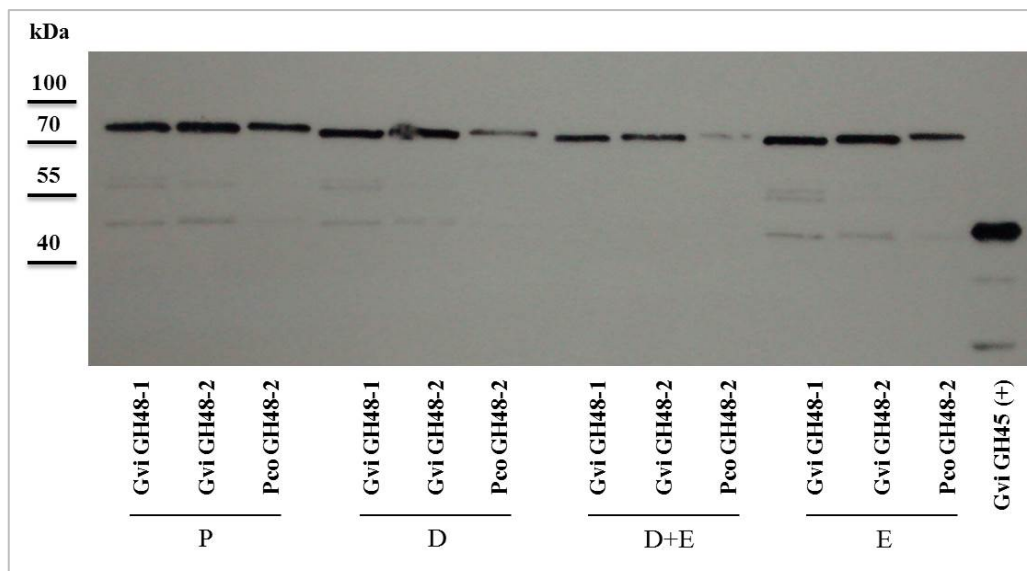
Die Vollängen Amplikons der Zielgene wurden in den pIB/V5-His-TOPO® Vektor kloniert und anschließend in Insektenzellen (*Sf9*) transient exprimiert. Vier Konstrukte je GH48 wurden getestet außer für Gvi GH48-1 und -3, für die jeweils zwei Konstrukte getestet wurden. Über einen Western Blot wurde geprüft ob die rekombinanten GH48 Proteine erfolgreich exprimiert und gemäß ihres Signalpeptids, ins Zellmedium sekretiert wurden.

Die rekombinanten Proteine liefen bei einer Masse von ca. 70 kDa, was in Übereinstimmung mit ihrer errechneten molekularen Masse lag (Abb. 13). Die kleineren Banden darunter sind vermutlich durch Hitzedenaturierung entstandene GH48 Degradationsprodukte. Es konnte jeweils ein Konstrukt für Gvi GH48-1 und -2 sowie drei Konstrukte für Pco GH48-2 exprimiert werden. Die Expression für Gvi GH48-3 und Pco GH48-1 blieb allerdings erfolglos (Abb. 13).



**Abb. 13: Heterologe Expression der GH48 Proteine von Gvi und Pco in *Sf9*-Zellen.** Die GH48 cDNAs wurden „in frame“ mit einem V5/(His)<sub>6</sub>-Epitop in den Expressionsvektor kloniert und in *Sf9*-Zellen transfiziert. Das geerntete Zellmedium wurde mittels Western Blot analysiert. Zur Detektion wurde ein anti-V5-HRP-Antikörper verwendet und der Western Blot mittels Chemolumineszenz entwickelt. Zusammen mit den Proben wurde eine Positivkontrolle (+) aufgetragen. Das molekulare Gewicht ist durch Größenmarker impliziert, kDa = Kilodalton. Die Pfeile kennzeichnen die Banden, welche wahrscheinlich die GH48s repräsentieren.

Da für Pco GH48-2 drei Proteine erfolgreich exprimiert wurden, wurde entschieden nur mit der Sequenz weiterzuarbeiten, die gemäß Sequenzierung die wenigsten Einzelmutationen aufwies (GH48-2 (3)). Für „Downstream“-Analysen wurden die drei exprimierten Proteine (Gvi GH48-1, Gvi GH48-2 und Pco GH48-2) anschließend dialysiert und entsalzen bzw. nur entsalzen um Salze und niedermolekulare Verbindungen zu entfernen. Aufgrund eines Vorläuferexperiments, in dem Protein nach Dialyse und Entsalzung verloren ging, kann anhand der unterschiedlichen Aufreinigungsstufen festgestellt werden, ob Proteine bei den jeweiligen Schritten verloren gingen. Der Western Blot (Abb. 14) zeigt, dass für die GH48s nach jedem Aufreinigungsschritt immer noch Protein vorhanden war. Trotzdem kann man bei den dialysierten und entsalzten Proben einen deutlichen Proteinverlust erkennen. Vor allem die Banden von Pco GH48-2 weisen nach der Dialyse ein wesentlich schwächeres Signal auf.



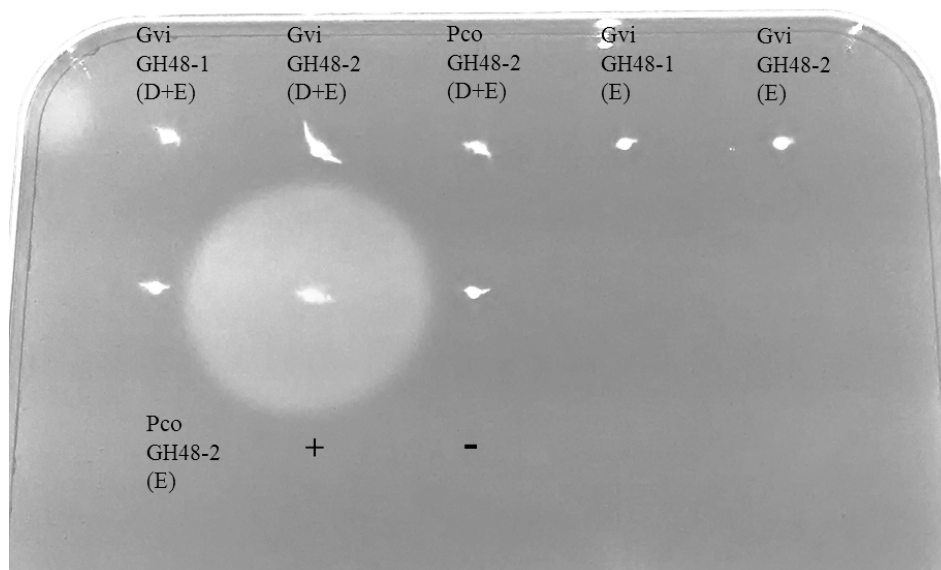
**Abb. 14: Western Blot der drei erfolgreich exprimierten GH48 Proteine nach Dialyse und Entsalzen.** Von jedem Protein (Gvi GH48-1, Gvi GH48-2 und Pco GH48-2) wurde krudes Zellmedium (P), dialysierte (D), dialysierte und entsalzte (D+E) sowie nur entsalzte (E) Probe auf ein SDS-Gel aufgetragen und aufgetrennt. Zusammen mit den Proben wurde eine Positivkontrolle (+) aufgetragen. Die Proteine wurden mittels Western Blot analysiert. Zur Detektion wurde ein anti-V5-HRP-Antikörper verwendet und der Western Blot mittels Chemolumineszenz entwickelt. Das molekulare Gewicht ist durch Größenmarker impliziert, kDa = Kilodalton.

### 3.3.3 Enzymatische Charakterisierung

Innerhalb der GH Familie 48 wurden bisher Zellobiosidase- sowie Endoglukanase-Aktivitäten nachgewiesen [38]. Für das GH48 Protein APAP I aus *G. atrocyanea* wurde eine Chitinase-Aktivität festgestellt, aber keine Exo- oder Endozellulase-Aktivität [25]. Um Aufschluss über potentielle Enzymaktivitäten der hier untersuchten GH48 zu erhalten wurden die folgenden Enzym-Assays unter Berücksichtigung zellulolytischer und chitolytischer Aktivität durchgeführt: Agardiffusionstest, Dünnschichtchromatografie und ein In-Gel-Zymogramm.

#### 3.3.3.1 Agardiffusionstest

Mit dem Agardiffusionstest wurde die spezifische Hydrolyse von CMC, RAC und kolloidalem Chitin durch die heterolog exprimierten Proteine und somit deren Endo-Aktivität getestet. Auf der CMC-Agar-Platte (Abb. 15) ist für die Positivkontrolle deutlich ein durchscheinender Hemmhof zu erkennen, da hier das Substrat in Moleküle, welche kleiner als Pentamere sind, abgebaut wurde. Kongo-Rot ist nicht in der Lage an diese Moleküle zu binden. Die getesteten Enzyme weisen jedoch keinen entfärbten Bereich um die aufgetragenen Proben auf. Dies zeigt, dass die getesteten GH48s keine Endo-Aktivität besitzen. Bei den Tests mit RAC und Chitin war analog zu CMC nur bei der Positivkontrolle Hemmhofbildung zu erkennen (Ergebnisse nicht gezeigt).



**Abb. 15: Agardiffusionstest zur Untersuchung der Zellulase-Aktivität der heterolog exprimierten Proteine auf CMC.** Das dialysierte und entsalzte (D+E) sowie das nur entsalzte (E) Medium der rekombinanten Proteine wurde auf 0.1 % CMC-haltige Agarose-Platten mit pH 5.0 geladen und anschließend für 16 h bei 40 °C inkubiert. Aktivitätszonen wurden mittels Kongo-Rot Färbung sichtbar gemacht. Zum Vergleich wurden eine Positivkontrolle (+) und eine Negativkontrolle (-) aufgetragen.

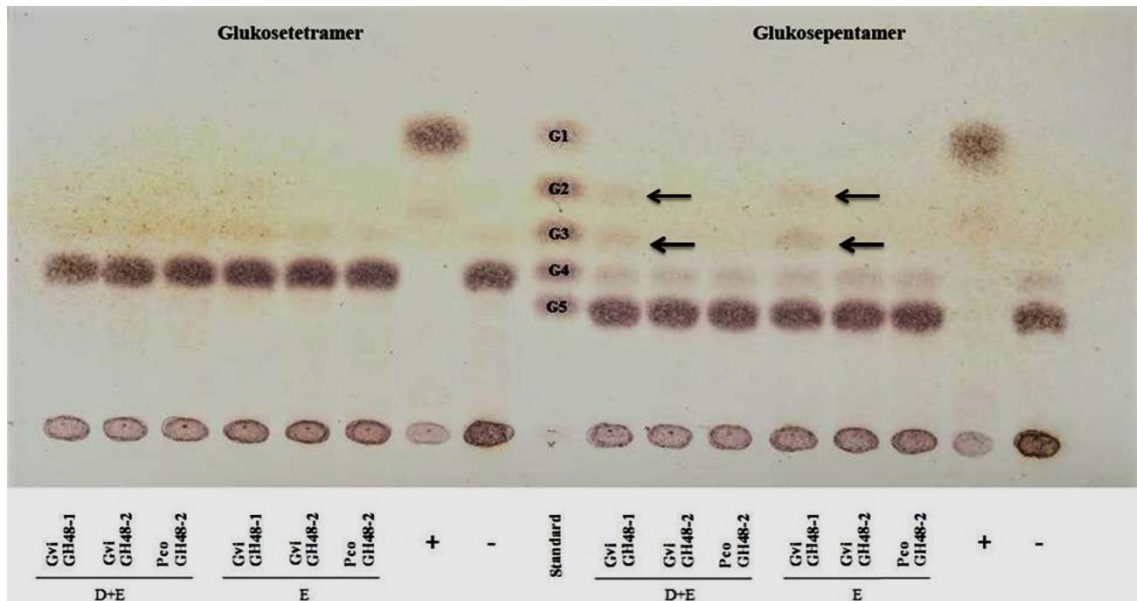
### 3.3.3.2 Dünnschichtchromatografie

Ziel war es die Proteine anhand verschiedener Substrate auf ihre Exo-Aktivität zu untersuchen und auch das Ergebnis der Agardiffusionstests zur Überprüfung der Endo-Aktivität zu bestätigen. Zudem konnte der Abbau von Zello- und Chitooligomeren getestet werden. Dafür wurden „in tube“-Assays der erfolgreich exprimierten Proteine Gvi GH48-1, Gvi GH48-2 und Pco GH48-2 vorbereitet. Es wurden sowohl die dialysierten und entsalzten als auch die nur entsalzten Proben verwendet, um einen möglichen Aktivitätsverlust durch die Aufreinigungsschritte beurteilen zu können.

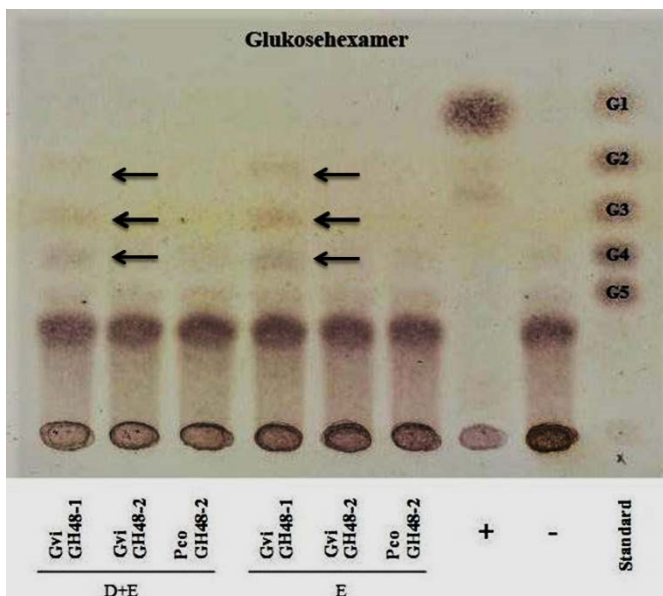
Die Proteine wurden anhand von Zello-tetraose, -pentaose (Abb. 16) und -hexaose (Abb. 17) sowie CMC, RAC (Abb. 18), Avicel und Filterpapier (Anhang 12) auf eine Zellulase-Aktivität getestet. Insbesondere Avicel (mikrokristalline Zellulose) und Filterpapier (natürliche, hochkristalline Zellulose) eignen sich für den Nachweis von Exozellulasen.

Auf den Chromatogrammen sind schwache Signale bei den Zello-pentaosen und -hexaosen sowie RAC zu erkennen. Bei den Proteinen von Gvi GH48-1, welche gegen Zello-pentaosen und -hexaosen getestet wurden, sind Abbauprodukte in Form von Zello-triosen zu erkennen. Außerdem sind bei beiden Zellobiose-Produkte sowie Zello-tetraose-Produkte (nur bei dem Glukosehexamer) zu finden. Bei der Untersuchung der Aktivität auf RAC sind ebenfalls nur Banden bei Gvi GH48-1 zu sehen. Es handelt sich hierbei um Glukosedimere. Dabei sind die Banden der entsalzten Proben etwas intensiver als die der zusätzlich dialysierten Proteine. Dies korreliert mit dem Ergebnis des Western Blot (Abb. 14), bei dem die dialysierten Proteine ein schwächeres Signal aufweisen als die entsalzten.

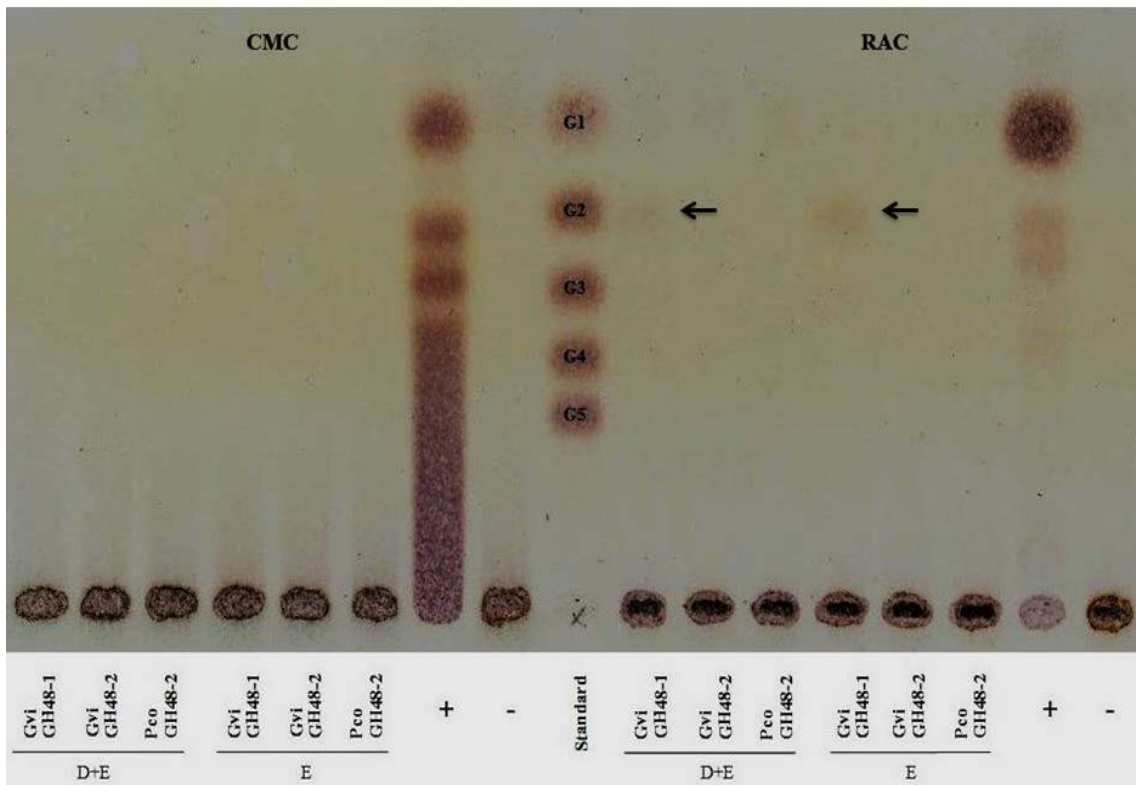




**Abb. 16: Dünnschichtchromatogramm der rekombinanten GH48 Proteine, getestet gegen Zellotetraose und Zellopentaose.** Es wurden die dialysierten und entsalzten (D+E) sowie die nur entsalzten (E) rekombinanten Proteine (Gvi GH48-1, Gvi GH48-2 und Pco GH48-2) mit Zellotetraose und -pentaose bei 40 °C und pH 5.0 für 16 h inkubiert. Zusätzlich wurden für jedes Substrat eine Positivkontrolle (+, Zellulase) und eine Negativkontrolle (-, *Sf9*-Medium) aufgetragen. Der Standard zeigt die Laufweiten der Zellooligomere (G1-G5). Die Pfeile kennzeichnen die Abbauprodukte (Glukosedimere und -trimere), welche auf eine potentielle Zellulase-Aktivität hinweisen könnten.

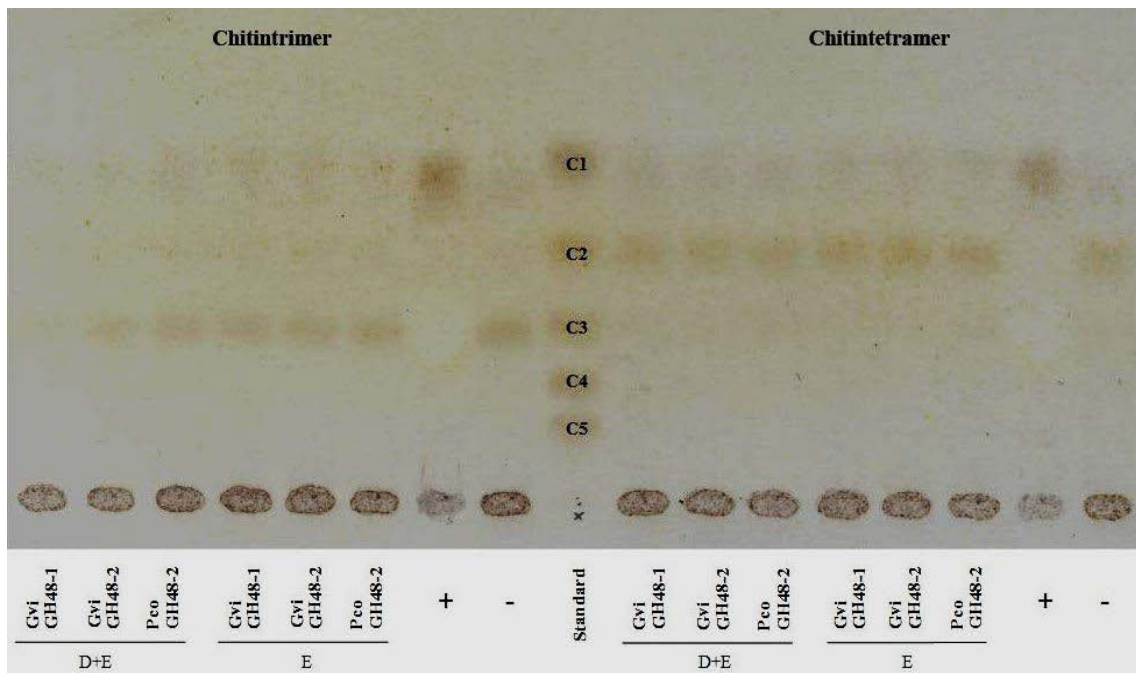


**Abb. 17: Dünnschichtchromatogramm der rekombinanten GH48 Proteine, getestet gegen Zellohexaose.** Es wurden die dialysierten und entsalzten (D+E) sowie die nur entsalzten (E) rekombinanten Proteine (Gvi GH48-1, Gvi GH48-2 und Pco GH48-2) mit Zellohexaose bei 40 °C und pH 5.0 für 16 h inkubiert. Zusätzlich wurden eine Positivkontrolle (+, Zellulase) und eine Negativkontrolle (-, *Sf9*-Medium) aufgetragen. Der Standard zeigt die Laufweiten der Zellooligomere (G1-G5). Die Pfeile kennzeichnen die Abbauprodukte (Glukosedimere, -trimere und -tetramere), welche auf eine potentielle Zellulase-Aktivität hinweisen könnten.



**Abb. 18: Dünnschichtchromatogramm der rekombinanten GH48 Proteine, getestet gegen CMC und RAC.** Es wurden die dialysierten und entsalzten (D+E) sowie die nur entsalzten (E) rekombinanten Proteine (Gvi GH48-1, Gvi GH48-2 und Pco GH48-2) mit CMC und RAC bei 40 °C und pH 5.0 für 16 h inkubiert. Zusätzlich wurden für jedes Substrat eine Positivkontrolle (+, Zellulase) und eine Negativkontrolle (-, *S9*-Medium) aufgetragen. Der Standard zeigt die Laufweiten der Zelloligomere (G1-G5). Die Pfeile kennzeichnen die Abbauprodukte (Glukosidimere), welche auf eine potentielle Zellulase-Aktivität hinweisen könnten.

Fujita et al. [25] gibt an, dass *G. atrocyanea* APAP I (Ortholog zu *G. viridula* GH48-2) Chitinase-Aktivität besitzt. Daher wurde für diese Arbeit entschieden ebenfalls Chitin als Substrat zu verwenden. Folgende Substrate wurden getestet: Chitotriose, -tetraose (Abb. 19) und -pentaose, kolloidales und natives Chitin (Anhang 12). Das kolloidale Chitin stellt die amorphe Form des Polysaccharids dar und kann genutzt werden um Endochitinase-Aktivität nachzuweisen. Das native Chitin, gewonnen aus Garnelenschalen, hat eine kristalline Struktur und wird verwendet um Chitobiosidase/Exochitinase-Aktivität zu untersuchen.



**Abb. 19: Dünnschichtchromatogramm der rekombinanten GH48 Proteine, getestet gegen Chitriose und Chitotetraose.** Es wurden die dialysierten und entsalzten (D+E) sowie die nur entsalzten (E) rekombinanten Proteine (Gvi GH48-1, Gvi GH48-2 und Pco GH48-2) mit Chitriose und -tetraose bei 40 °C und pH 5.0 für 16 h inkubiert. Zusätzlich wurden für jedes Substrat eine Positivkontrolle (+, Chitinase) und eine Negativkontrolle (-, *Sf9*-Medium) aufgetragen. Der Standard zeigt die Laufweiten der Chitinoligomere (C1-C5).

Vergleicht man die Signale der getesteten Chitinsubstrate mit der Negativkontrolle, weist diese die gleichen Bandenmuster auf (Abb. 19 und Anhang 12). Für alle sechs getesteten GH48s kann somit keine Chitinaseaktivität festgestellt werden, was folglich dem Ergebnis von Fujita et al. [25] widerspricht.

### 3.3.2.3 In-Gel-Zymogramm

Da für die GH Familie 48 in Mikroben bereits eine Zellobiohydrolase-Aktivität nachgewiesen wurde [39, 40], wurde beschlossen über eine direktere Methode diese Aktivität zu untersuchen. Ein In-Gel-Zymogramm sollte Klarheit darüber schaffen ob überhaupt Zellobiosidasen im Tier vorhanden sind. Deswegen wurde der Darminhalt von *G. viridula* auf Zellobiosidase-Aktivität überprüft. Dazu wurden drei biologische Replikate des Darmlumens (D1-D3) sowie die heterolog exprimierte GH48s verwendet. Mittels semi-denaturierender SDS-PAGE wurden die Proteine aufgetrennt, renaturiert und auf Aktivität getestet. Zellobiosidasen akzeptieren Zellotriosen als kleinstmögliches Substrat. Um Zellobiosidase-Aktivität „in-Gel“ zu testen, kann das Zellotriose-Äquivalent 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-cellobiosid verwendet werden. Es fungiert als

fluorogenes Zellobiosidase-Substrat, wobei Enzymaktivität nach Abspaltung von 4-Methylumbelliferon unter UV-Licht nachgewiesen werden kann. Vereinzelt können allerdings auch  $\beta$ -Glukosidasen Zellotriosen als Substrat erkennen und somit falsch-positive Ergebnisse erzeugen. Um dies auszuschließen wurde zusätzlich ein zweites Zymogramm mit 4-Methylumbelliferyl  $\beta$ -D-glucopyranosid (Zellobiose-Äquivalent) als Substrat genutzt, welches ausschließlich von  $\beta$ -Glukosidasen erkannt wird. Die  $\beta$ -Glukosidase-Aktivität kann somit präzise ermittelt und anschließend mit dem 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-cellobiosid Gel verglichen werden. Da die GH48s die einzige GH Familie in *G. viridula* sind, für die Zellobiosidase-Aktivität beschrieben wurde, besteht die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei Zellobiosidase-Aktivität um GH48s handelt. Nach der Inkubation des Gels mit 4-Methylumbelliferyl  $\beta$ -D-cellobiosid bzw. 4-Methylumbelliferyl  $\beta$ -D-glucopyranosid ließ sich unter dem UV-Licht jedoch keine Zellobiosidase-Aktivität feststellen (Ergebnis nicht gezeigt). Die anschließende Coomassie Brilliant Blau Färbung der Gele (Anhang 12) zeigt nicht degradierte Proteine im Gel, was schlussfolgern lässt, dass in *G. viridula* keine Zellobiosidasen vorkommen.

## 4. Diskussion und Ausblick

Im Rahmen der differentiellen Expression und funktionellen Charakterisierung der Glykosid-Hydrolase Familie 48 war es das Ziel drei GH48s aus *G. viridula* sowie zwei GH48s aus *P. cochleariae* zu exprimieren und zu untersuchen. Bisher wurden GH48s nur in zwei Spezies von Insekten untersucht. Sowohl die Ergebnisse der Verfahren mit *O. sulcatus* [24] als auch mit *G. atrocyanea* [25] sind jedoch teilweise unklar und nicht schlüssig. Auf Grundlage der Publikation von Fujita et al. [25], sollten einige Resultate dieser Arbeit als Anhaltspunkt für die hier durchgeführten Experimente übernommen werden.

Um vergleichend mit Fujita et al. zu den Untersuchungen zur Expression in den Entwicklungsphasen von *G. atrocyanea* zu arbeiten, wurde die GH48 Genexpression in *G. viridula* untersucht. Dafür wurden Eier, Puppen und die drei Larvenstadien verwendet. Für die adulten Käfer wurde zwischen männlichen und weiblichen Adulten unterschieden. Die Käfer befanden sich dabei nicht in der Diapause, wie ein Teil der untersuchten Tiere von Fujita et al., weswegen dieses Stadium nicht untersucht werden konnte.

Die Analyse der entwicklungspezifischen Genexpression zeigt ein klares Ergebnis: Tiere in den aktiv-fressenden Stadien exprimieren die GH48 Gene, wohingegen bei nicht-fressenden Stadien diese Expression fehlt. Dieses Ergebnis korreliert mit den Daten von Fujita et al. Der Befund für Eier und Puppen entspricht eindeutig den Untersuchungen von APAP I. Für die Larven zeigt sich anhand des Western Blot Ergebnis von Fujita et al. [25], dass die Proteine des ersten Stadiums ebenfalls am geringsten exprimiert sind. Innerhalb der drei larvalen Stadien nimmt die Expression dann jedoch stark zu. Eine sehr hohe Expression findet sich ebenfalls in den weiblichen Adulten. Der große Standardfehler aller drei *G. viridula* GH48s kann möglicherweise damit erklärt werden, dass die Käfer unterschiedlich alt beim Präparieren waren, was sich in einer starken Varianz der GH48 Expression manifestiert. Allgemein lässt die hohe Expression der Gene in den aktiv-fressenden Tieren vermuten, dass GH48s am Verdauungsprozess beteiligt sind.

Ein weiteres Indiz für die Verdauungsfunktion der GH48s sind die Ergebnisse der gewebespezifischen Untersuchung der Genexpression. Hier wurde für beide Käferspezies die Darmhülle vom Restkörper der Larven getrennt und mittels qPCR untersucht. Insbesondere für GH48-1 und -2 zeigt sich eine sehr hohe Expression der Gene in der Darmhülle. Zwar ist die Abundanz für GH48-3 bei *G. viridula* deutlich geringer, trotzdem fällt sie im Darmgewebe signifikant höher aus als im Restkörper.

Zusätzlich zu der Genexpression wurde auch die Lokalisation der Proteine in der Hämolymphe und dem Darminhalt überprüft. Da im Vorfeld eine Zellulase-Aktivität der GH48s in Betracht gezogen wurde, stellte sich die Frage weshalb Zellulose-degradierende Enzyme in der Hämolymphe lokalisiert sein sollten. Laut Fujita et al. befindet sich APAP I hauptsächlich in der Hämolymphe, wofür allerdings kein Nachweis oder eine verwendete Methode genannt wurde [25]. Aus diesem Grund war es interessant zu analysieren, ob die Aussage des Papers bestätigt werden kann.

Wie in 3.2 gezeigt, wurden drei technische Replikate für Hämolymphe (H) bzw. Darmlumen (D) angefertigt. Dabei wurde für H3 die Entnahme-Methode geändert. Die Ergebnisse zeigen, dass die GH48 Proteine die höchste Abundanz im Darmlumen haben. Für die ersten beiden Hämolymphe Replikate findet sich nur eine sehr geringe Anzahl an GH48 korrespondierenden Peptiden. Das dritte Replikat, bei der die Hämolymphe durch eine andere Methode geerntet wurde, weist eine leicht höhere Zahl korrespondierender Peptidfragmente auf. Möglicherweise resultiert die etwas höhere Anzahl in H3 aus der Umstellung auf ein anderes Verfahren zur Gewinnung der Hämolymphe. Es ist denkbar, dass durch Abnahme des Beins auch die Darmhülle des Mitteldarms im Inneren des Käfers beschädigt wurde, wodurch unbewusst Darmflüssigkeit ausgetreten ist und mit aufgenommen wurde. Dies zeigt, dass eine Kontamination der Proben leicht möglich ist. Da die Daten und das Verfahren in dem Paper von Fujita et al. nicht gezeigt wurden, kann nicht beurteilt werden wie die Aussage über die Lokalisation zustande kam. Es ist aber denkbar, dass Verunreinigungen z. B. durch Verletzung des Darmgewebes eine Rolle gespielt haben. Sollte Fujita et al. eine MS-Analyse durchgeführt haben, ist es möglich, dass durch das sehr sensitive Verfahren schon eine geringe Menge an Peptidfragmenten in der Hämolymphe als eine hohe Proteinabundanz gewertet wurde. Ohne einen direkten Vergleich und vorliegende Daten, ist die Aussage von Fujita et al. zur GH48 Proteinlokalisierung allerdings nicht vertretbar.

Die Ergebnisse der im Darm lokalisierten Proteine und Gene kann mit den Ergebnissen des Experiments zur entwicklungspezifischen Genexpression zusammengeführt werden. Die Rolle der GH48s bei der Nahrungsverwertung in den aktiv-fressenden Stadien wurde sowohl durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche, als auch bei der Untersuchung von APAP I [25] bestätigt. Damit kann man davon ausgehen, dass GH48s Verdauungsenzyme darstellen. Diese Hypothese wird durch die Daten der Proteinlokalisierung bekräftigt.

Interessanterweise, und im Widerspruch zu den gewebespezifischen Expressionsstudien, zeigen die Enzymassays nur schwache bis gar keine Aktivitäten. Bis auf eine geringe enzymatische Aktivität von Gvi GH48-1 (Abb. 15, 16, 17) ging aus den Aktivi-

täts-Tests keine Bestätigung hervor, dass es sich um Verdauungsenzyme handeln könnte.

Die Zellulase-Aktivität der GH48s wurde in Bakterien schon genauer untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die GH48s selbst nur eine schwache Aktivität besitzen und oftmals synergistisch mit anderen GHs agieren. Beispielsweise sind Familienmitglieder wie Cel48F und Cel48S Hauptkomponenten von Zellulose-verdauenden Enzymmultikomplexen, den Cellulosomen [21, 41, 42]. Weiterhin findet man GH48s in Multidomänen Proteinen [43, 44, 45, 46]. Dabei zeigte sich bei Tests der Exozellulase Cel48A in *Thermobifida fusca*, dass diese nicht in der Lage ist CMC abzubauen [43]. Auch bei weiteren Versuchen, wie Dünnschichtchromatografien und Zymogrammen, konnte kaum Aktivität nachgewiesen werden. In synergistischen Tests auf Filterpapier war zu erkennen, dass die Aktivität von einem Mix aus Endo- und Exozellulasen des Bakteriums durch Zugabe von Cel48A deutlich gesteigert wurde [43]. Auch in der Publikation von Fujita et al. wird gezeigt, dass GH48s meist Komponenten von komplexen Proteinen mit zusätzlichen funktionellen Domänen sind [25]. Außerdem gibt es Nachweise für putativ inaktive GHs, für die noch kein Substrat gefunden wurde, welches sie in der Lage sind abzubauen. Beispiele finden sich in der GH Familie 5 in *Apriona japonica* [15] und *Callosobruchus maculatus* [47] sowie bei den GH28s in *P. cochleariae* [48]. Des Weiteren ist es möglich, dass die GH48s Sub- oder Neofunktionen entwickelt haben. Beispielsweise könnten sie zum Abbau von Hemicellulose eine Xylanase- oder Mannanase-Aktivität besitzen. Derartige Aktivitäten bleiben aber weiterhin zu testen.

Experimente zur funktionellen Charakterisierung mit der Glykosid-Hydrolase Familie 45 in *G. viridula* (Busch et al., nicht publiziert) zeigt Endoglukanase-Aktivität für diese Proteine. Die Käfer besitzen somit Endoglukanasen, welche amorphe Zellulose spalten können. Das Verhältnis von amorphen zu kristallinen Strukturen in der primären Zellwand von Pflanzen ist sehr hoch, da hier, aufgrund einer höheren Flexibilität der Zellulosemikrofibrillen weniger kristalline Strukturen ausgebildet werden als in der sekundären Zellwand [3]. Durch den geringen Anteil der kristallinen Zellulose ist es möglich, dass die GH48s ihre Zellobiosidase-Aktivität verloren haben. Da in den Chromatogrammen (Abb. 15, 16, 17) für Gvi GH48-1 eine schwache Endoaktivität festgestellt werden konnte, ist es möglich, dass GH48-1 zu einer Endoglukanase evolviert. Das lässt trotzdem die Frage offen, weshalb Gvi GH48-2 und Pco GH48-2 keine Aktivität gezeigt haben. Da mit den GH45s schon endoaktive Enzyme in *G. viridula* beschrieben wurden (Busch et al., nicht publiziert), kann der Bedarf an Endozellulasen in den Käfern bereits abgedeckt sein. Aus diesem Grund sind die GH48s möglicherweise nicht mehr essentiell. Da beide GH Familien aus *G. viridula* exprimiert werden konnten, besteht aber die Möglichkeit, dass Synergien zwischen GH48s und GH45s stattfinden. Durch Proteinaggregation könnten die GH48s die Endoglukanase-Aktivität der GH45s steigern. Dies ist

allerdings nur eine Hypothese und müsste durch Co-Inkubations-Assays bestätigt werden.

Weder auf den Agaraosediffusionstests noch dem In-Gel-Zymogramm war eine Enzymaktivität nachweisbar. Dies widerspricht den bisherigen Eigenschaften von GH48s als Zellobiohydrolasen bzw. Endoglukanasen [38], würde aber das Ergebnis der Publikation von Fujita [25] bestätigen. Im Gegensatz dazu konnte aber ebenfalls keine Chitinase-Aktivität in dem APAP I-Ortholog Gvi GH48-2 gefunden werden. Obwohl es nicht auszuschließen ist, dass APAP I Chitinase-Aktivität im Laufe der Evolution erlangt hat, scheint es doch aufgrund der nahen Verwandtschaft beider *Gastrophysa* Spezies und gemäß der durchgeführten Charakterisierung eher unwahrscheinlich. Es ist möglich, dass während der Aufreinigung von APAP I Verunreinigungen falsch-positive Ergebnis erzeugt haben. Es muss dennoch in Betracht gezogen werden, dass Fujita et al. eine andere Methode zur Enzymaktivitätsbestimmung verwendet hat, welche eventuell sensitiver gegenüber Chitinase-Aktivität ist.

Sowohl durch die Untersuchungen zur Genexpression als auch zur Lokalisation der Proteine, wird ersichtlich, dass die GH48s im Darm exprimiert werden. Dies impliziert eine Verdauungsfunktion, jedoch zeigten die Enzymtests keine eindeutige Aktivität gegen die putativen Substrate Zellulose und Chitin. Darum ist trotz der scheinbaren Verdauungsfunktion unklar ob sie am Abbau der Pflanzenzellwand beteiligt sind. Es scheint aber sehr unwahrscheinlich, dass sie Chitinase-Aktivität entwickelt haben (s. Fujita et al.), da in Insekten bereits die GH Familie 18 mit dieser Funktion bekannt ist [10, 22, 26].

Basierend auf der massenspektrometrischen Analyse von Hämolymphe und Darminhalt von *G. viridula* steht das vollständige larvale Proteom in jeweils drei biologischen Replikaten zur Verfügung. Anhand dieser Daten können nun sämtliche Peptidsequenzen analysiert und z. B. mit korrespondierenden Transkriptomen verglichen werden. Das vorliegende Proteom kann für zukünftige Vergleiche von qPCR Daten anderer im Käfer untersuchter Gene verwendet werden und dabei als Nachweis für die Translation des Proteins dienen. Um dabei sicher zu gehen, dass die GH48s keine Zellulase-Aktivität in den untersuchten Käfern besitzen, sollte die Expression insbesondere für Gvi GH48-3 und Pco GH48-1 wiederholt werden. Dabei wäre die Wahl einer anderen Insektenzelllinie zur Expression eine Verbesserungsmöglichkeit. Für die Aktivitätstests könnten außerdem andere Substrate verwendet werden. Über eine Ausweitung der Enzymtests auf Co-Enzym-Assays z. B. mit GH45s wäre eine umfassendere Charakterisierung möglich.



## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden drei von fünf Proteinen der Glykosid-Hydrolase Familie 48 aus den phytophagen Käfern *Gastrophysa viridula* und *Phaedon cochleariae* erfolgreich in Insektenzellen heterolog exprimiert.

Die rekombinanten GH48s wurden mittels Agarosediffusionstest und Dünnschichtchromatografie auf Aktivität gegen Zellulose und Chitin getestet. Allerdings konnte keine eindeutige Aktivität beobachtet werden. Basierend auf einer früheren Charakterisierung des Gvi GH48-2-Orthologs APAP I aus *G. atrocyanea* konnte eine putative Chitinase-Aktivität für Gvi GH48-2 [25] wiederlegt werden.

Es wurde außerdem die entwicklungsspezifische Genexpression analysiert, welche zeigte, dass alle Gene fast ausschließlich in den aktiv-fressenden Stadien wie Larven und den adulten Käfern exprimiert sind. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass GH48 Transkripte spezifisch im Darmgewebe exprimiert werden und deren translatierte Proteine hauptsächlich im Darmlumen zu finden sind. Die Ergebnisse stehen also entgegen der Hypothese, dass GH48s vorrangig in der Hämolymphe lokalisiert sein sollen [25]. Alle gesammelten Daten deuten darauf hin, dass GH48s, trotz der nicht nachgewiesenen Zellulase-Aktivität, eine Rolle in der Verdauung der Käfer spielen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Dettner, K. und Peters, W. (1999): Lehrbuch der Entomologie. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: Gustav Fischer Verlag, 1. Auflage
2. [https://de.wikipedia.org/wiki/Cellulose#/media/File:Cellulose\\_Sessel.svg](https://de.wikipedia.org/wiki/Cellulose#/media/File:Cellulose_Sessel.svg)  
30.08.2017
3. Cosgrove, D.J., et al., Re-constructing our models of cellulose and primary cell wall assembly. *Current Opinion in Plant Biology*, 2014. **22**: p. 122-131.
4. Henrissat, B., et al., Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 1997. **7**: p. 637-644.
5. Smant, G., et al., Endogenous cellulases in animals: isolation of beta-1, 4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998. **95**: p. 4906-4911.
6. Watanabe, H., et al., A cellulase gene of termite origin. *Nature*, 1998. **394**: p. 330-331.
7. Girard, C., et al., Molecular cloning of cDNAs encoding a range of digestive enzymes from a phytophagous beetle, *Phaedon cochleariae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1999. **29**: p. 1129-1142.
8. Pauchet, Y., et al., Diversity of Beetle Genes Encoding Novel Plant Cell Wall Degrading Enzymes. *Plos One*, 2010. **5**: p. 1-8.
9. Liu, J., et al., Endogenous cellulolytic enzyme systems in the longhorn beetle *Mesosa myops* (Insecta: Coleoptera) studied by transcriptomic analysis. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 2015. **47**: p. 741-748.
10. Merzendorfer, H., et al., Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology*, 2003. **206**: p. 4393-4412.
11. <https://de.wikipedia.org/wiki/Chitin#/media/File:Chitin.svg>  
30.08.2017
12. Fugmann, B. (1997): Römpp-Lexikon Naturstoffe. Stuttgart: Georg Thieme Verlag
13. Tronsmo, A., et al., Detection and Quantification of N-Acetyl-Beta-D-Glucosaminidase, Chitobiosidase, and Endochitinase in Solutions and on Gels. *Analytical Biochemistry*, 1993. **208**: p. 74-79.

14. <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>  
31.05.2017
15. Pauchet, Y., et al., Identification and characterization of plant cell wall degrading enzymes from three glycoside hydrolase families in the cerambycid beetle *Apriona japonica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2014. **49**: p. 1-13.
16. McKenna, D.D., et al., Genome of the Asian longhorned beetle (*Anoplophora glabripennis*), a globally significant invasive species, reveals key functional and evolutionary innovations at the beetle-plant interface. *Genome Biology*, 2016. **17**: p. 1-18
17. Willis, J.D., et al., Identification, cloning, and expression of a GHF9 cellulase from *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Insect Physiology*, 2011. **57**: p. 300-306.
18. Shelomi, M., et al., Endogenous cellulase enzymes in the stick insect (Phasmatodea) gut. *Journal of Insect Physiology*, 2014. **60**: p. 25-30.
19. Lee, S.J., et al., cDNA cloning, expression, and enzymatic activity of a cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*. *Comparative Biochemistry and Physiology- Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2004. **139**: p. 107-116.
20. Xia, D.G., et al., cDNA cloning, expression, and enzymatic activity of a novel endogenous cellulase from the beetle *Batocera horsfieldi*. *Gene*, 2013. **514**: p. 62-68.
21. Parsiegla, G., et al., The crystal structure of the processive endocellulase CelF of *Clostridium cellulolyticum* in complex with a thiooligosaccharide inhibitor at 2.0 Å resolution. *The Embo Journal*, 1998. **17**: p. 5551-5562.
22. Kostylev, M., et al., Determination of the Catalytic Base in Family 48 Glycosyl Hydrolases. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011. **77**: p. 6274-6276.
23. Davies, G., et al., Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 1995. **3**: p. 853-859
24. Edwards, M.G. (2002) Digestive enzymes of vine weevil (*Otiorhynchus sulcatus*) as potential targets for insect control strategies., Durham theses, Durham University.

25. Fujita, K., et al., A chitinase structurally related to the glycoside hydrolase family 48 is indispensable for the hormonally induced diapause termination in a beetle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006. **345**: p. 502-507.
26. Rottloff, S., et al., Functional characterization of a class III acid endochitinase from the traps of the carnivorous pitcher plant genus, *Nepenthes*. *Journal of Experimental Botany*, 2011. **62**: p. 4639-4647.
27. <http://www.eakringbirds.com/eakringbirds4/gastrophysaviridula02.jpg>  
29.08.2017
28. <http://www.insektenbox.de/kaefer/amblat.htm>  
30.05.2017
29. <http://www.koleopterologie.de/gallery/FHL09B/phaedon-cochleariae-foto-koehler.jpg>  
29.08.2017
30. Mahar, A.N., et al., Comparative Effectiveness of Entomopathogenic Nematodes Against the Pupae of Mustard Beetle, *Phaedon cochleariae* F. (Chrysomelidae: Coleoptera). *Pakistan Journal of Zoology*, 2012. **44**: p. 517-523.
31. Zurek, D.B., et al., Changes in tarsal morphology and attachment ability to rough surfaces during ontogenesis in the beetle *Gastrophysa viridula* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Arthropod Structure and Development*, 2017. **46**: p. 130-137.
32. Kleine, R., et al., Biologische Betrachtungen an Gastroidea (*Gastrophysa*) *viridula*. *Internationale Entomologische Zeitschrift*, 1911. **5**: p. 63–72.
33. [https://www.google.de/search?q=gastrophysa+viridula+larve&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjN1Yy12ZLWAhWHJVAKHbr\\_BPwQ\\_AUICigB&biw=1280&bih=845#imgrc=RJFzXY6\\_huc-IM](https://www.google.de/search?q=gastrophysa+viridula+larve&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjN1Yy12ZLWAhWHJVAKHbr_BPwQ_AUICigB&biw=1280&bih=845#imgrc=RJFzXY6_huc-IM):  
07.09.2017
34. [https://www.google.de/search?q=gastrophysa+viridula+larve&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjN1Yy12ZLWAhWHJVAKHbr\\_BPwQ\\_AUICigB&biw=1280&bih=845#imgrc=Rt3J6vf8PMFFCM](https://www.google.de/search?q=gastrophysa+viridula+larve&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjN1Yy12ZLWAhWHJVAKHbr_BPwQ_AUICigB&biw=1280&bih=845#imgrc=Rt3J6vf8PMFFCM):  
07.09.2017
35. Mülhardt, C. (2009): *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 6. Auflage

36. Jahnson, M., Rothhämel, S. (2012): *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 5. Auflage
37. Neuhoff, V., et al., Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie blue dyes in Polyacrylamide gels – a systematic analysis. *Electrophoresis*, 1985. **6**: p. 427-448.
38. [http://www.cazy.org/GH48\\_bacteria.html](http://www.cazy.org/GH48_bacteria.html)  
25.07.2017
39. Sanchez, M.M., F.I.J. Pastor, and P. Diaz, Exo-mode of action of cellobiohydrolase Cel48C from *Paenibacillus* sp BP-23 - A unique type of cellulase among Bacillales. *European Journal of Biochemistry*, 2003. **270**: p. 2913-2919.
40. Avitia, C.I., et al., Temporal secretion of a multicellulolytic system in *Myxobacter* sp AL-1 - Molecular cloning and heterologous expression of cel9 encoding a modular endocellulase clustered in an operon with cel48, an exocellobiohydrolase gene. *European Journal of Biochemistry*, 2000. **267**: p. 7058-7064.
41. Wu, J.H.D., et al., 2 Components of an Extracellular Protein Aggregate of *Clostridium-Thermocellum* Together Degrade Crystalline Cellulose. *Biochemistry*, 1988. **27**: p. 1703-1709.
42. Zverlov, V.V., et al., Functional subgenomics of *Clostridium thermocellum* cellulosomal genes: Identification of the major catalytic components in the extracellular complex and detection of three new enzymes. *Proteomics*, 2005. **5**: p. 3646-3653.
43. Irwin, D.C., et al., Cloning, expression and characterization of a Family 48 exocellulase, Cel48A, from *Thermobifida fusca*. *European Journal of Biochemistry*, 2000. **267**: p. 4988-4997.
44. Olson, D.G., et al., Deletion of the Cel48S cellulase from *Clostridium thermocellum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010. **107**: p. 17727-17732.
45. Berger, E., et al., Two noncellulosomal cellulases of *Clostridium thermocellum*, Cel9I and Cel48Y, hydrolyse crystalline cellulose synergistically. *Fems Microbiology Letters*, 2007. **268**: p. 194-201.

46. [https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside\\_Hydrolase\\_Family\\_48](https://www.cazypedia.org/index.php/Glycoside_Hydrolase_Family_48)  
06.09.2017
47. Busch, A.A., et al., Evolution and functional characterization of CAZymes belonging to subfamily 10 of glycoside hydrolase family 5 (GH5\_10) in two species of phytophagous beetles. *Plos One*, 2017. **12**: p. 1-23.
48. Kirsch, R., et al., Combining proteomics and transcriptome sequencing to identify active plant-cell-wall-degrading enzymes in a leaf beetle. *BMC Genomics*, 2012. **13**: p. 587.

## Anhang

### Anhang 1: Zusammensetzung der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien

<b>Puffer, Lösungen, Medien</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Agarplatten für Enzymaktivitätstest	2 ml Substrat (RAC, Zellulose, CMC) 10 ml 40mM Zitrat/Phosphat-Puffer pH 5.0 8 ml 1 %ige Agarose
Anticoagulant Puffer	62 mM NaCl 100 mM Glukose 10 mM EDTA 30 mM Natriumcitrat 26 mM Zitronensäure
Blockierlösung	5 % (w/v) Milchpulver 0,1 % (v/v) Tween-20 1x TBS pH 7.5
Coomassie Brilliant Blau Arbeitslösung	80 % (v/v) Stammlösung 20 % (v/v) Methanol
Coomassie Brilliant Blau Stammlösung	2 % (w/v) ortho-Phosphorsäure 10 % (w/v) Ammoniumsulfat in 80 ml MQ H <sub>2</sub> O gelöst 0,08 g Coomassie Brilliant Blau G250 mit MQ H <sub>2</sub> O auf 100 ml aufgefüllt
ECL <sub>1</sub> -Lösung	5 ml 100 mM Tris pH 8.5 22 µl Cumarsäure 50 µl Luminol
ECL <sub>2</sub> -Lösung	5 ml 100 mM Tris pH 8.5 3 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Entwickler Dünnschichtchromatografie	0,2 % Orcinol 9 Methanol : 1 Schwefelsäure
Laufmittel für Dünnschichtchromatografie	2 Butanol : 1 Essigsäure : 1MQ H <sub>2</sub> O
LB-Medium (+Amp)	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl 100 µg/ml Ampicillin
Renaturierungspuffer	2,5 % Triton X in MQ H <sub>2</sub> O

<b>Puffer, Lösungen, Medien</b>	<b>Zusammensetzung</b>
SOC-Medium	2 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glukose
TBS-Puffer, 1x pH 7.5	20 mM Tris 500 mM NaCl
TG-Puffer, 1x pH 8.3	25 mM Tris 192 mM Glycin
Transfer-Puffer	1x TG-Puffer pH 8.3 10 % (v/v) Methanol
Tris-Puffer, 1 M pH 6.8	4,8 g Tris in 20 ml MQ H <sub>2</sub> O gelöst HCl dazu bis pH 6.8 erreicht mit MQ H <sub>2</sub> O auf 40 ml aufgefüllt steril filtriert
Tris-Puffer, 1.5 M pH 8.8	14,5 g Tris in 40 ml MQ H <sub>2</sub> O gelöst HCl dazu bis pH 8.8 erreicht mit MQ H <sub>2</sub> O auf 80 ml aufgefüllt steril filtriert

**Anhang 3: Ansatz und Einstellungen des Thermocycler für RT-PCR mit RNA Proben von *G. viridula* für die cDNA-Synthese mit dem Verso cDNA Synthesis Kit**

	<b>Volumen pro Tube [µl]</b>
5x cDNA Synthesis Buffer	4
dNTP Mix (5 mM each)	2
RNA Primer *	1
RT Enhancer	1
Verso Enzyme Mix	1
RNA (Template)	berechnetes Volumen
RNase freies Wasser	Rest Volumen für 11 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>

\* (Random Hexamer (400 ng µl<sup>-1</sup>) 3 : 1 Anchored Oligo dT (500 ng µl<sup>-1</sup>))



Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
cDNA Synthese	42 °C	60 min	1x
	50 °C	30 min	
Inaktivierung/Denaturierung	95 °C	2 min	1x

**Anhang 5: Verdünnungsreihe für cDNA aus Darmgewebe von *G. viridula* zur Bestimmung der Primereffizienz mittels qPCR**

unverdünnte cDNA	1:10	1:100	1:1000	1:10000
6 x 3 µl cDNA = 18 µl	1,5 µl unverdünnte cDNA + 13,5 µl MQ H <sub>2</sub> O	1,5 µl 1:10 verdünnte cDNA + 13,5 µl MQ H <sub>2</sub> O	1,5 µl 1:100 verdünnte cDNA + 13,5 µl MQ H <sub>2</sub> O	1,5 µl 1:1000 verdünnte cDNA + 13,5 µl MQ H <sub>2</sub> O

**Anhang 6: Ansatz und Einstellungen des Thermocycler für qPCR mit cDNA aus *G. viridula***

	Volumen pro Tube [µl]
MQ H <sub>2</sub> O	8
cDNA (Template)	1
2-Step QPCR SYBR Mix 2x (ThermoFisher)	10
GH48 Primermix	1
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
Thermostart Aktivierung	95 °C	15 min	1x
Denaturierung	95 °C	15,00 s	39 x
Anlagerung Primer	56 °C	30,00 s	
Elongation	72 °C	30,00 s	
Denaturierung	95 °C	10,00 s	1x
Starttemperatur	55 °C	00,05 s	1x
Schmelztemperatur	95 °C	00,50 s	1x

**Anhang 7: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele für die SDS-PAGE**

	Criterion Trenngel		Criterion Sammelgel	
	Endkonzentration	Volumen	Endkonzentration	Volumen
H <sub>2</sub> O		5,0 ml		1,4 ml
30% Acrylamid Mix	<b>12 %</b>	6,0 ml	<b>5 %</b>	2,7 ml
1.5 M Tris pH 8.8	0,375 M	3,75 ml	-	-
1.0 M Tris pH 6.8	-	-	0,125 M	0,67 ml
10% SDS	0,1 %	0,15 ml	0,1 %	0,50 ml
10% APS	0,1 %	0,15 ml	0,1 %	0,04 ml
TEMED	0,04 %	0,01 ml	0,1 %	0,004 ml
<b>Gesamtvolumen</b>		<b>15 ml</b>		<b>4 ml</b>

**Anhang 8: Ansatz und Einstellungen des Thermocycler für RT-PCR mit RNA Proben von *G. viridula* und *P. cochleariae* für die cDNA Synthese mit dem SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix**

	Volumen pro Tube [µl]
Nuklease freies Wasser	2
Oligo(dT) <sub>20</sub>	1
Annealing Buffer	1
RNA (Template)	4
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>8</b>

→ Ansatz 5 min bei 65 °C inkubieren, dann sofort auf Eis. Dazu 10 µl 2x Reaction Mix und 2 µl SuperScript® III Enzyme Mix.

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
cDNA Synthese	42 °C	60 min	1x
	50 °C	90 min	
Inaktivierung/Denaturierung	85 °C	5 min	1x

**Anhang 8: Ansatz und Einstellungen des Thermocycler für PCR mit cDNA Proben von *G. viridula* und *P. cochleariae* mit dem AccuPrime™ Taq DNA Polymerase, high fidelity Kit**

	<b>Volumen pro Tube [µl]</b>
Merck Wasser	13,8
10x AccuPrime™ Buffer I	2
GH48 Primermix	2
cDNA (Template)	2
AccuPrime™ Taq Polymerase	0,2
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>8</b>

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Anzahl Zyklen</b>
Thermostart Aktivierung	94 °C	2 min	1x
Denaturierung	94 °C	30 s	35 x
Anlagerung Primer	55 °C	2:30 min	
Elongation	68 °C	30 s	
Terminale Elongation	68 °C	10 s	1x

**Anhang 9: Ansatz und Einstellungen des Thermocycler für die Kolonie-PCR mit dem Taq PCR Master Mix Kit**

	<b>Volumen pro Tube [µl]</b>
Merck Wasser	1,8
OpIE2 Rev	0,5
GH48 Primer Fwd	0,5
2x Taq PCR Master Mix	0,2
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>3</b>

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>	<b>Anzahl Zyklen</b>
Thermostart Aktivierung	98 °C	30 s	1x
Denaturierung	98 °C	30 s	30 x
Anlagerung Primer	55 °C	30 s	
Elongation	72 °C	2:30 min	
Terminale Elongation	72 °C	5 min	1x

**Anhang 10: Ergebnisse der statistischen Berechnung zur gewebespezifischen Genexpression**

Spezies	Gen	t-value	p-value
<i>G. viridula</i>	GH48-1	9.111	<0.001
	GH48-2	8.871	<0.001
	GH48-3	13.314	<0.001
<i>P. cochleariae</i>	GH48-1	18.755	<0.001
	GH48-2	8.825	<0.001

## Anhang 11: LC-MS/MS Daten der Mascot-Suche

## Darminhalt 1

Bande	Protein	Mascot Description	Mascot Good Peptides	Mascot Mass	Mascot Score	Peptid Sequenzen
GH48-1		GVI_GH48_1_fwd frame_1_orf_7	8	72131	556	TLAYYAAK   GSQESVWK   LSTITTLTK   AIQAAFWASK   LAQLYYVSDNSR   GATAVTDWQISLDR   VTAHTNDVGTASATAR   GVSNSEIADTYGQFK
GH48-2		GVI_GH48_2_fwd _frame_0_orf_1	12	73421	826	LGDYLR   FLQYYAK   TLYYYAAK   GPQESVWR   QLDDGVWK   SSEVSDTVAK   YSNAPDADAR   SSDVGTASATAR   GVSVEEVVDSYSR   LAQYYVSGDQK   SATGASDWQASLER   FNEEVYVPYNWK
GH48-3		GVI_GH48_3_fwd _frame_2_orf_15	3	73865	393	SFEISSTIEK   LAQYYVVTGDEK   SATGASDWQASLDR

Bande	Protein	Mascot Description	Mascot Good Peptides	Mascot Mass	Mascot Score	Peptid Sequenzen
GH48-1		GVI_GH48_1_fwd _frame_1_orf_7	17	72131	1242	LGDYLR   DPQWSK   TLAYYAAK   GSQESVWK   YTAAPDADAR   LSTITTLTK   AIQAAFWASK   IHNAASGYFSK   LAQLYYVSDNSR   YGGQNGFLDLFTK   GATAVTDWQISLDR   VTAHTNDVGTASATAR   LLDGMWDL YQTNK   GVSNSEIADTYGQFK   KLLDGMWDL YQTNK   VEQHLNGGPAPEFIFHR   YSIPATLEWSGVPPNVHVK
GH48-2		GVI_GH48_2_fwd _frame_0_orf_1	16	73421	1055	FLQYYAK   TLYYYAAK   GPQESVWR   QLDDGVWK   SSEVSDTVAK   YSNAPDADAR   SSDVGTASATAR   VE AHLNGGEAPK   RSSDVGTASATAR   GVSVEEVVDSYSR   LAQYYVSGDQK   SATGASDWQASLER   FNEEVYVPYNWK   AVQA AFWAHTW ANEEGK   GYYPNGDVIEHGATFIFLR   IGDGA AHFGYQNPLAAYAL SNVDAMKPK
GH48-3		GVI_GH48_3_fwd _frame_2_orf_15	3	73865	370	GPEESTWR   SFEISSTIEK   LAQYYVVTGDEK

Bande	Protein	Mascot Description	Mascot Good Peptides	Mascot Mass	Mascot Score	Peptid Sequenzen
GH48-1		GVI_GH48_1_fwd _frame_1_orf_7	3	72131	120	YTAAPDADAR   LSTITTLTK   LAQLYYVSDNSR
GH48-2		GVI_GH48_2_fwd _frame_0_orf_1	8	73421	538	GPQESVWR   SSEVSDTVAK   YSNAPDADAR   SSDVGTASATAR   GVSVEEVVDSYSR   LAQYYVSGDQK   SATGASDWQASLER   FNEEVYVPYNWK
GH48-3		GVI_GH48_3_fwd _frame_2_orf_15	3	73865	301	SFEISSTIEK   LAQYYVVTGDEK   SATGASDWQASLDR

Bande Protein	Mascot Description	Mascot Good Peptides	Mascot Mass	Mascot Score	Peptid Sequenzen
GH48-1	GVI_GH48_1_fwd_frame_1_orf_7	9	72131	586	FLTQYK   TLAYYAAK   GSQESVWK   YTAAPDADAR   LSTITTLISK   AIQAAFWASK   LAQLYYVSDNSR   VTAHTNDVGTASATAR   GVSNSEIADTYGQFK
GH48-2	GVI_GH48_2_fwd_frame_0_orf_1	13	73421	825	LGDYLR   FLQYAK   TLSYYAAK   GPQESVWR   QLLDGVVWK   VEAHNLNGGEAPK   GVSVEEVVDSYSR   LAQYYVSGDQK   WYGMQPWSLDR   SATGASDWQASLER   FNEEVYVPYNWK   AVQAAFVAHTWANEEGK   YGGQHGLDLFVGDNSYTTQQWK
GH48-3	GVI_GH48_3_fwd_frame_2_orf_15	2	73865	304	LAQYYVVTGDEK   SATGASDWQASLDR

Bande Protein	Mascot Description	Mascot Good Peptides	Mascot Mass	Mascot Score	Peptid Sequenzen
GH48-1	GVI_GH48_1_fwd_frame_1_orf_7	14	72131	1010	FLTQYK   GSQESVWK   YTAAPDADAR   LSTITTLISK   IHNAAAGYFSK   WFGMQPWSVDR   LAQLYYVSDNSR   GATAVTDWQISLDR   VTAHTNDVGTASATAR   LLDGMWDLYQINK   GVSNSEIADTYGQFK   KLLDGMWDLYQINK   VEQHLNNGGPAPEFIFHR   YSIPATLEWSGVPNNVHVK
GH48-2	GVI_GH48_2_fwd_frame_0_orf_1	20	73421	1494	LGDYLR   YAMFDK   TLSYYAAK   GPQESVWR   QLLDGVVWK   YSNAPDADAR   SSDVGTASATAR   VEAHNLNGGEAPK   GVSVEEVVDSYSR   LAQYYVSGDQK   WYGMQPWSLDR   SATGASDWQASLER   FNEEVYVPYNWK   AVQAAFVAHTWANEEGK   GYYFNGDVIEHGATFIFLR   FWAQSDVALAQGYGILFNE   VPEWLEWSGVPPEVHVTVTR   YGGQHGLDLFVGDNSYTTQQWK   QLEFYAWLQSAE GALAGGAINTWNGR   IGDGAAHFGYQNPLAAYALSNVDAMKPK
GH48-3	GVI_GH48_3_fwd_frame_2_orf_15	3	73865	586	GPEESTWR   SPEISSIEK   LAQYYVVTGDEK

Bande 23 Protein	Mascot Description	Mascot Good Peptides	Mascot Mass	Mascot Score	Peptid Sequenzen
GH48-1	GVI_GH48_1_fwd frame 1_orf_7	4	72131	268	YTAAPDADAR   AIQAAFWASK   LAQLYYVSDNSR   GATAVTDWQISLDR
GH48-2	GVI_GH48_2_fwd frame 0_orf_1	6	73421	433	TLSYAAK   QLLDGVWK   SATGASDWQASLER   FNEEYVYPYNWK   AVQAAPFWAHTWANEKG   IGDGAHFQYQNPPLAAYALSNVDAMKPK
GH48-3	GVI_GH48_3_fwd frame 2_orf_15	-	-	-	-

## Darminhalt 3

Bande Protein	Mascot Description	Mascot Good Peptides	Mascot Mass	Mascot Score	Peptid Sequenzen
GH48-1	GVI_GH48_1_fwd _frame_1_orf_7	8	72131	543	TLAYYAAK   GSQESVWK   YTAAPDADAR   LSTITTLTK   AIQAAFWASK   LAQYYVSDNSR   VTAHTNDVGTASATAR   GVSNSEIADTYGQFK
GH48-2	GVI_GH48_2_fwd _frame_0_orf_1	12	73421	781	LGDYLR   FLQYAK   ILSYYAAK   GPQESVWR   QLLDGVWK   SSEVSDTVAK   YSNAPDADAR   SSDVGTASATAR   GVSVEEVVDSYSR   LAQYYVSGDQK   SATGASDWQASLER   FNEEVYVPYNWK
GH48-3	GVI_GH48_3_fwd _frame_2_orf_15	2	73865	334	LAQYYVVTGDEK   SATGASDWQASLDR

Bande Protein	Mascot Description	Mascot Good Peptides	Mascot Mass	Mascot Score	Peptid Sequenzen
GH48-1	GVI_GH48_1_fwd _frame_1_orf_7	14	72131	1098	DPQWSK   TLAYYAAK   GSQESVWK   LSTITTLTK   AIQAAFWASK   IHNAASGYFSK   WFGMQPWSVDR   LAQYYVSDNSR   YGGQNGFLDLFTK   GATAVTDWQISLDR   VTAHTNDVGTASATAR   LLDGMWDL YQTNK   GVSNSEIADTYGQFK   YSIPATILEWSGVPPNVHVK
GH48-2	GVI_GH48_2_fwd _frame_0_orf_1	17	73421	1161	LGDYLR   YAMFDK   FLQYAK   GPQESVWR   QLLDGVWK   SSEVSDTVAK   YSNAPDADAR   SSDVGTASATAR   VEAHNGGEAPK   RSSDVGTSATAR   GVSVEEVVDSYSR   LAQYYVSGDQK   WYGMQPWSLDR   SATGASDWQASLER   FNEEVYVPYNWK   AVQAAFWAHTWANEKG   FWAQSDVLAQQTYGILFNE
GH48-3	GVI_GH48_3_fwd _frame_2_orf_15	4	73865	560	GPEESTWR   SFEISSTIEK   LAQYYVVTGDEK   SATGASDWQASLDR

Bande Protein	Mascot Description	Mascot Good Peptides	Mascot Mass	Mascot Score	Peptid Sequenzen
GH48-1	GVI_GH48_1_fwd _frame_1_orf_7	3	72131	194	AIQAAFWASK   LAQYYVSDNSR   GVSNSEIADTYGQFK
GH48-2	GVI_GH48_2_fwd _frame_0_orf_1	8	73421	512	GPQESVWR   SSEVSDTVAK   YSNAPDADAR   SSDVGTASATAR   GVSVEEVVDSYSR   LAQYYVSGDQK   SATGASDWQASLER   FNEEVYVPYNWK
GH48-3	GVI_GH48_3_fwd _frame_2_orf_15	-	-	-	-



Hämolymphe 1 – keine relevanten Peptide gefunden

Hämolymphe 2

In Bande 21 und 23 des Hämolymphe Replikats 2 wurden keine relevanten Peptide gefunden.

Bande 22 Protein	Mascot Description	Mascot Good Peptides	Mascot Mass	Mascot Score	Peptid Sequenzen
GH48-1	GVI_GH48_1_fwd frame 1_orf 7	3	72131	131	YTAAPDADAR   LAQLYYVSDNSR   VTAHTNDVGTASATAR
GH48-2	GVI_GH48_2_fwd frame 0_orf 1	-	-	-	-
GH48-3	GVI_GH48_3_fwd frame 2_orf 15	-	-	-	-

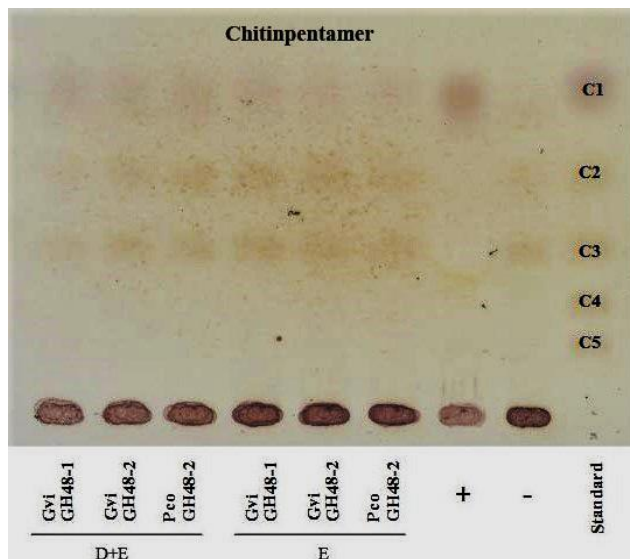
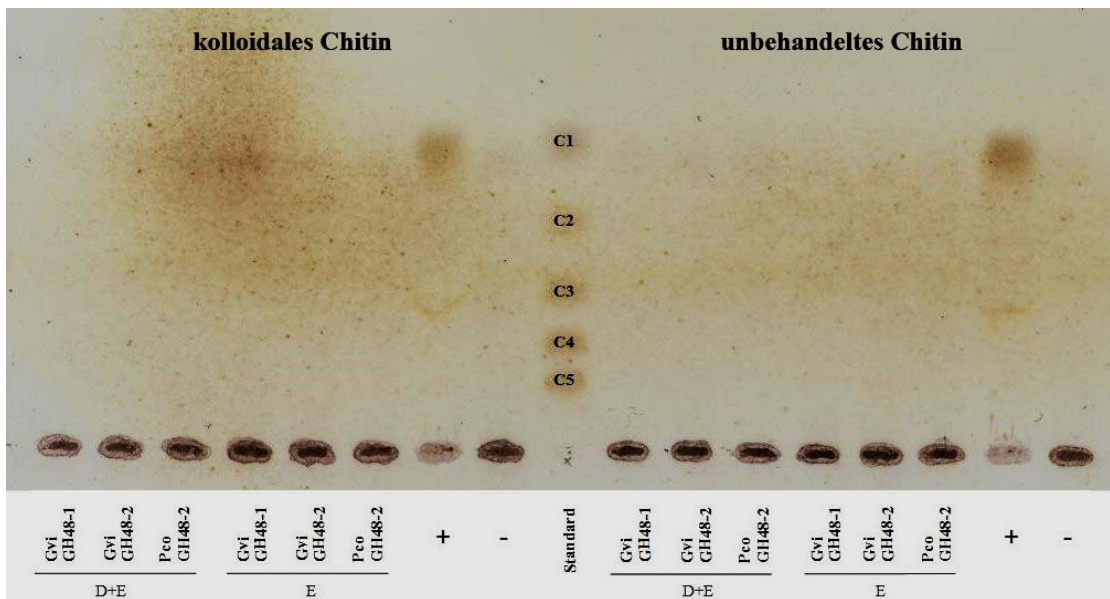
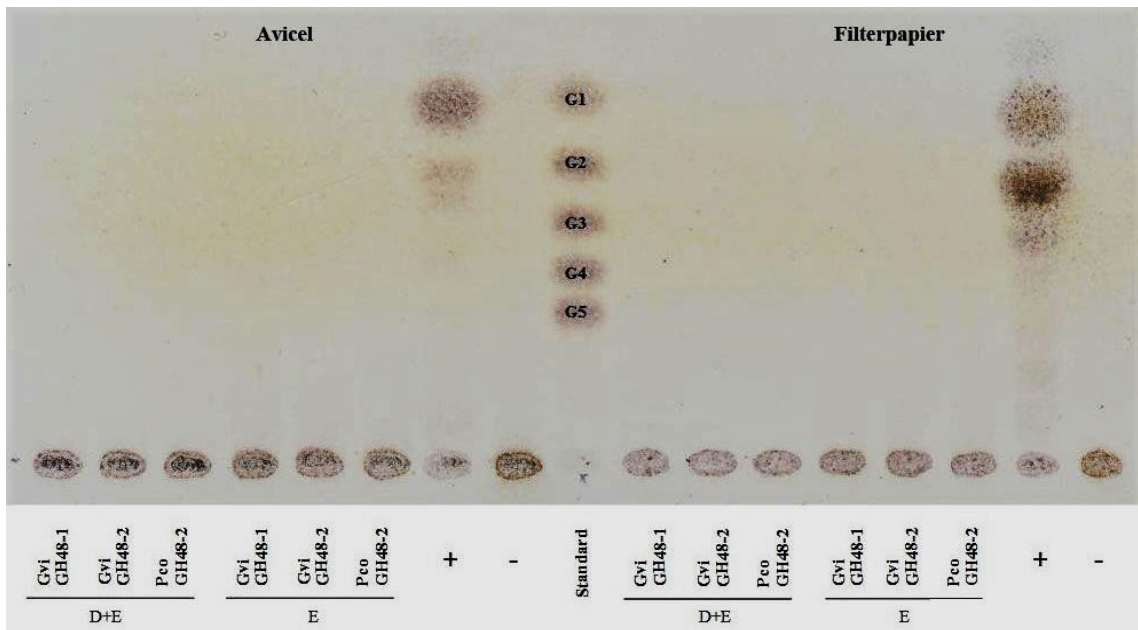
## Hämolymphe 3

In Bande 23 des Hämolymphe Replikats 3 wurden keine relevanten Peptide gefunden.

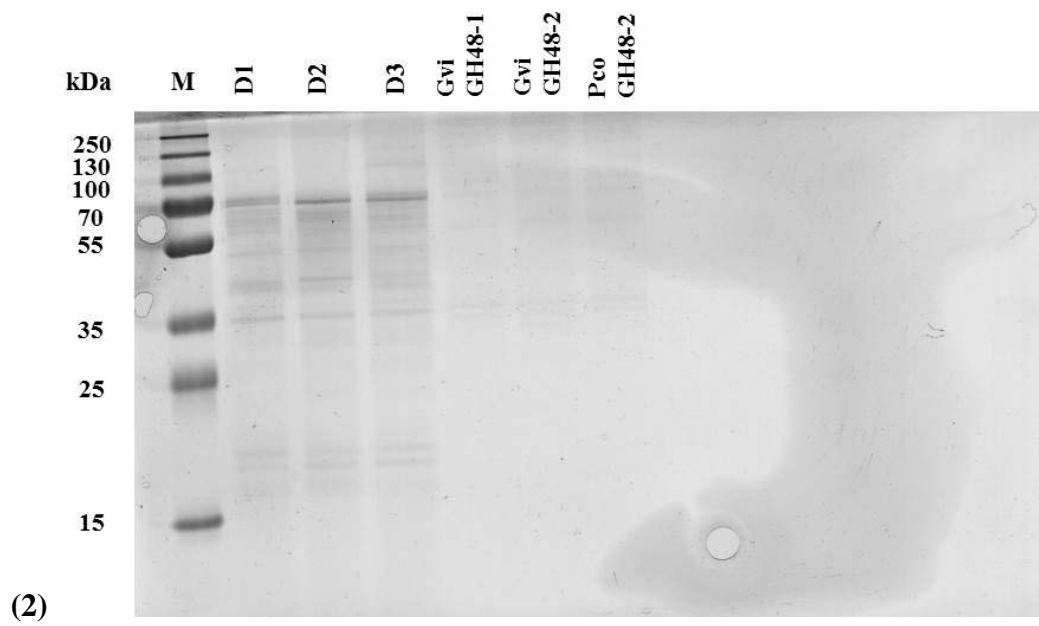
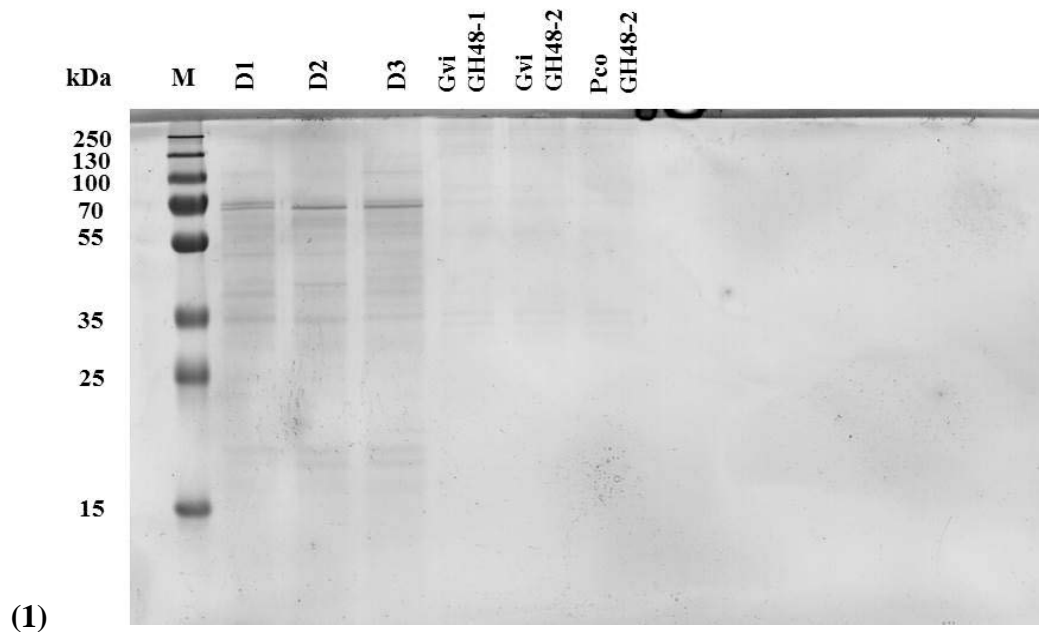
Bande 21 Protein	Mascot Description	Mascot Good Peptides	Mascot Mass	Mascot Score	Peptid Sequenzen
GH48-1	GVI_GH48_1_fwd _frame_1_orf_7	2	72131	96	YTAAPDADAR   VTAHTNDVGTASATAR
GH48-2	GVI_GH48_2_fwd _frame_0_orf_1	1	73421	121	LAQYYVSGDQK
GH48-3	GVI_GH48_3_fwd _frame_2_orf_15	-	-	-	-

Bande 22 Protein	Mascot Description	Mascot Good Peptides	Mascot Mass	Mascot Score	Peptid Sequenzen
GH48-1	GVI_GH48_1_fwd _frame_1_orf_7	8	72131	543	FLTQYK   YTAAPDADAR   LSTITLTK   AIQAAPFWASK   LAQLYYVSDNSR   YGGQNGFLDLFTK   VTAHTNDVGTASATAR   GVSNSEIADTYGQFK
GH48-2	GVI_GH48_2_fwd _frame_0_orf_1	10	73421	637	LGDYLR   TLSYYAAK   GPQESVWR   QLLDGVVWK   YSNAPDADAR   VEAHLNGGEAPK   GVSVEEVVDSYSR   LAQYYVSGDQK   SATGASDWWQASLER   FNEEVVVPYNWK
GH48-3	GVI_GH48_3_fwd _frame_2_orf_15	1	73865	186	LAQYYVVTGDEK

**Anhang 12: Dünnschichtchromatogramme zur Untersuchung der Zellulase-Aktivität der exprimierten GH48 Proteine anhand von Avicel und Filterpapier sowie zur Untersuchung der Chitinase-Aktivität anhand von kolloidalem und unbehandeltem Chitin und Chitinpentameren**



Anhang 13: SDS-Gele der Zymogramme mit Darmlumen (D1-D3) und den heterolog exprimierten Proteinen (Gvi GH48-1, Gvi GH48-2 und Pco GH48-2) zum Test auf Zellobsidase- (1) und Glukosidase-Aktivität (2). M: Marker (Page Ruler PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder)



## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die inhaltlich oder wörtlich aus Veröffentlichungen stammen, sind kenntlich gemacht. Diese Arbeit lag in der gleichen oder ähnlichen Weise noch keiner Prüfungsbehörde vor und wurde bisher noch nicht veröffentlicht.

Hiermit erkläre ich mich mit der Einsichtnahme in meine Abschlussarbeit im Archiv der Bibliothek der EAH Jena einverstanden.

---

26.09.2017, Sina Marielle Peter