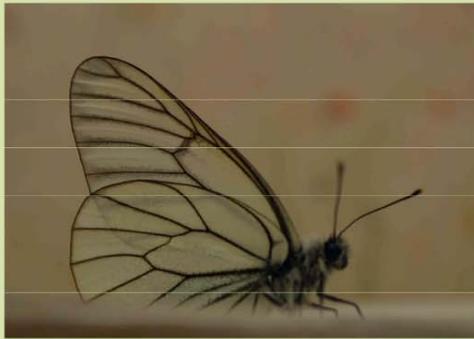




Technische
Universität
Braunschweig



Institut für Pharmazeutische Biologie
Pharmazie in Braunschweig



Anna-Maria Steiner

Evolution der Wirtspflanzenanpassung in Pieridae:

Untersuchungen zur möglichen Rolle
cyanidentgiftender Enzyme



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



Evolution der Wirtspflanzenanpassung in Pieridae:
Untersuchungen zur möglichen Rolle cyanidentgiftender Enzyme





Evolution der Wirtspflanzenanpassung in Pieridae:
Untersuchungen zur möglichen Rolle cyanidentgiftender Enzyme

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Anna-Maria Steiner
aus Bad Gandersheim



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2018
Zugl.: (TU) Braunschweig, Univ., Diss., 2018

1. Referentin: Professorin Dr. Ute Wittstock
2. Referent: Professor Dr. Ludger Beerhues
eingereicht am: 07.02.2018
mündliche Prüfung (Disputation) am: 03.05.2018

Druckjahr 2018

Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig,
Fakultät für Lebenswissenschaften

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2018
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2018

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft

ISBN 978-3-7369-9802-5
eISBN 978-3-7369-8802-6



Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Ohlen, M. v., Herfurth, A.-M., Kerbstadt, H., Wittstock, U. Cyanide detoxification in an insect herbivore: Molecular identification of β -cyanoalanine synthases from *Pieris rapae*. *Insect Biochem Mol Biol* 70:99–110 (2016)

Herfurth, A.-M., Ohlen, M. v., Wittstock, U. β -Cyanoalanine synthases and their possible role in Pierid host plant adaptation. *Insects* 8:62 (2017)

Tagungsbeiträge

Herfurth, A.-M., Ohlen, M. v., Kerbstadt, H., Wittstock, U. Cyanide detoxification by β -cyanoalanine synthase in the glucosinolate specialist *Pieris rapae*. (Poster) 3rd International Glucosinolate Conference, Wageningen (2014).

Herfurth, A.-M., Ohlen, M. v., Wittstock, U. Cyanidentgiftung im Glucosinolatspezialisten *Pieris rapae*. (Vortrag), 4. Young Researcher Meeting, Phytotherapeutika in der aktuellen Forschung: Phytochemie, Pharmakologie und klinische Anwendungen, Münster (2015).

Herfurth, A.-M., Ohlen, M. v., Wittstock, U. Cyanide detoxification by β -cyanoalanine synthase in the glucosinolate specialist *Pieris rapae*. (Poster) 31st Conference of the International Society for Chemical Ecology, Stockholm (2015).

Herfurth, A.-M., Ohlen, M. v., Wittstock, U. β -Cyanoalanine synthases and their role in host plant adaptation of Pierid butterflies. (Poster) 4th International Glucosinolate Conference, Berlin (2017).





Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Mentorin Prof. Dr. Ute Wittstock für die Bereitstellung dieses sehr interessanten Themas, für die Unterstützung während der Promotionszeit und dafür, dass sie mir alle Freiheiten beim Arbeiten gelassen hat und doch jederzeit ein offenes Ohr für Probleme und stets den richtigen Ratschlag parat hatte.

Prof. Dr. Ludger Beerhues danke ich für das Interesse an dieser Arbeit und die Anfertigung des Zweitgutachtens. Prof. Dr. Stephan Scherneck möchte ich für das Interesse an meinem Forschungsthema und die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Ich danke den Mitgliedern des Instituts für Pharmazeutische Biologie, die während der Jahre in Braunschweig so viel mehr als nur Kollegen waren.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meinen beiden Büromädels Anita Backenköhler und Dr. Eline Biedermann (inkl. Paul). Vielen Dank für unzählige Gespräche, Umarmungen, Ratschläge und lustige Momente!

Ein großer Dank geht an Dr. Rainer Lindigkeit für die beste Praktikumsleitung, die man sich als Assistent wünschen kann und viele ehrliche Gespräche und Ratschläge.

Vielen Dank der „alten“ Donnerstagsgruppe, die mir das Einleben in Braunschweig am Anfang der Doktorandenzeit sehr erleichtert hat: Dr. Maike van Ohlen, Dr. Frauke Gumz, Dr. Malte Gumz, Dr. Marion Wiggermann, Dr. Tobias Fiesel und Nico Langer. Den „neuen“ Doktoranden und Institutsmitgliedern danke ich für das Fortführen dieser Tradition und viele schöne Unternehmungen: Dr. Eline Biedermann, Elena Kurzbach, Svenja Patz, Nicola Schneegans, Christian Bunzel, Anna Tödtemann und Poonam Singh.

Dr. Tobias Fiesel, Dr. Mina Awadallah, Nicola Schneegans und Christian Bunzel danke ich für viele lustige Phyto-Momente. Ein großer Dank gilt auch Loretta Heise und Kathrin Müller für die Pflege der Pieris-Kolonie. Dr. Einar Stauber danke ich für viele Ratschläge und wissenschaftliche Diskussionen. Vielen Dank an Dr. Matthias Strieker für die Unterstützung beim Wälder erstellen und an der LC-MS.

Anna Tödtemann, Svenja Patz, Elena Kurzbach, Dr. Eline Biedermann und besonders Elines Mutter danke ich für die Unterstützung beim Sammeln von Schmetterlingseiern und Raupen, auch wenn nicht immer nur die richtigen Arten dabei waren.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und Geschwistern dafür, dass sie mich jederzeit bei allen meinen Plänen unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Johannes, der jedes meiner Probleme mit Fassung und Humor mitgetragen hat, mich jederzeit unterstützt hat und mich auf meinem Weg durch das Leben begleitet. Danke für die verrückte Idee, diese Arbeit in LaTeX zu schreiben und für die tapfere Lösung der unzähligen daraus resultierenden Probleme.





Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 <i>Pieris rapae</i> und das Glucosinolat-Myrosinase-System	1
1.1.1 Das Glucosinolat-Myrosinase-System	1
1.1.2 Pieridae und glucosinolathaltige Pflanzen	2
1.1.3 Cyanidentgiftung in <i>Pieris rapae</i>	2
1.2 RNA-Interferenz (RNAi)	5
1.2.1 Hintergrund	5
1.2.2 Variabilität der RNAi-Effizienz in Insekten	6
1.2.3 RNAi in Lepidoptera	8
1.3 Zielsetzung	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel	13
2.2 Versuchstiere und Futterpflanzen	13
2.2.1 <i>Pieris rapae</i>	13
2.2.2 <i>Anthocharis cardamines</i>	13
2.2.3 <i>Aporia crataegi</i>	13
2.2.4 <i>Gonepteryx rhamni</i>	13
2.2.5 <i>Colias croceus</i>	13
2.2.6 <i>Plutella xylostella</i>	14
2.2.7 <i>Zygaena filipendulae</i>	14
2.2.8 <i>Spodoptera littoralis</i>	14
2.2.9 <i>Brassica oleracea</i>	14
2.2.10 <i>Arabidopsis thaliana</i>	14
2.3 Molekularbiologie	15
2.3.1 RNA-Isolierung	15
2.3.2 Reverse Transkription	15
2.3.3 Oligonukleotide	15
2.3.4 Polymerasekettenreaktion	16
2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung von PCR-Produkten	20
2.3.6 Ligation	20
2.3.7 Transformation	21
2.3.8 Bakterienstämme	22
2.3.9 Kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	22
2.3.10 Komplementierungsassay	22
2.3.11 Plasmidisolierung	23
2.3.12 Isolierung von genomischer DNA	23
2.3.13 Photometrische Bestimmung des DNA- bzw. RNA-Gehalts	24
2.3.14 Restriktionsverdau	24



2.3.15	Sequenzierung	24
2.3.16	Dauerkultur	24
2.3.17	RNAi	25
2.4	Proteinbiochemie	27
2.4.1	Überexpression	27
2.4.2	Zellernte, Zellaufschluss und Aufreinigung rekombinanter Proteine über Strep-Tactin Sepharose	27
2.4.3	Umpuffern der aufgereinigten Proteine	28
2.4.4	Proteinbestimmung	28
2.4.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE)	28
2.4.6	Western Blot	29
2.4.7	Enzymassays	29
3	Ergebnisse	33
3.1	Cyanidentgiftungsenzyme in <i>P. rapae</i>	33
3.1.1	Charakterisierung von β -Cyanoalanin-Synthasen	33
3.1.2	Klonierung und Charakterisierung von Rhodanesen aus <i>P. rapae</i>	38
3.1.3	Hydroxylierung von aromatischen Nitrilen in <i>S. littoralis</i>	43
3.2	Cyanidentgiftungsenzyme in anderen Lepidoptera-Arten	44
3.2.1	Rhodanese- und β -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität in Raupen	44
3.2.2	Klonierung von β -Cyanoalanin-Synthasen	47
3.2.3	Nachweis der β -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität der in Lepidoptera iden- tifizierten Proteine mittels HPLC-MS/MS	49
3.2.4	Phylogenetische Analyse von β -Cyanoalanin-Synthasen aus Lepidoptera	51
3.2.5	Kinetische Charakterisierung der β -Cyanoalanin-Synthasen aus Lepidoptera	53
3.2.6	Expression von β -Cyanoalanin-Synthasen in Raupen	70
3.3	PrNSP-RNAi in <i>P. rapae</i>	72
3.3.1	Verfütterung von dsRNA	72
3.3.2	Pflanzenvermittelte RNAi	73
4	Diskussion	77
4.1	Cyanidentgiftung in <i>P. rapae</i>	77
4.2	Cyanidentgiftung in anderen Lepidoptera	80
4.2.1	Evolutionärer Hintergrund der β -Cyanoalanin-Synthasen	84
4.3	RNAi in Lepidoptera	85
4.4	Ausblick	87
5	Zusammenfassung	89
	Literaturverzeichnis	91
	Anhang	103
	Für die phylogenetische Analyse verwendete Sequenzen	103
	Oligonukleotide	109



Abbildungsverzeichnis

1.1	Cyanidbildung in <i>P. rapae</i>	3
1.2	Cyanidentgiftung durch die Rhodanese	4
1.3	Cyanidentgiftung durch die β -Cyanoalanin-Synthase	5
1.4	Postulierter Mechanismus der RNA-Interferenz	6
3.1	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von PrBSAS1 mit verschiedenen Proteinmengen .	33
3.2	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von PrBSAS1 mit verschiedenen Inkubationszeiten	33
3.3	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von PrBSAS2 mit verschiedenen Proteinmengen .	34
3.4	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von PrBSAS2 mit verschiedenen Inkubationszeiten	34
3.5	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von PrBSAS3 mit verschiedenen Proteinmengen .	34
3.6	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von PrBSAS3 mit verschiedenen Inkubationszeiten	34
3.7	Michaelis-Menten-Plot für PrBSAS1 und Cystein	35
3.8	Michaelis-Menten-Plot für PrBSAS1 und Cyanid	35
3.9	Michaelis-Menten-Plot für PrBSAS2 und Cystein	35
3.10	Michaelis-Menten-Plot für PrBSAS2 und Cyanid	35
3.11	Michaelis-Menten-Plot für PrBSAS3 und Cystein	36
3.12	Expression von <i>PrBSAS1-PrBSAS3</i> in Raupen von <i>P. rapae</i>	37
3.13	Untersuchung der genomischen Sequenzen von <i>PrBSAS1-PrBSAS3</i>	37
3.14	Thiocyanatbildung durch rekombinante Rhodanesen aus <i>P. rapae</i>	38
3.15	Rhodanese-Assay von Rho1 mit verschiedenen Proteinmengen	39
3.16	Rhodanese-Assay von Rho1 mit verschiedenen Inkubationszeiten	39
3.17	Rhodanese-Assay von Rho2 mit verschiedenen Proteinmengen	39
3.18	Rhodanese-Assay von Rho2 mit verschiedenen Inkubationszeiten	39
3.19	Michaelis-Menten-Plot für Rho1 und Cyanid	40
3.20	Michaelis-Menten-Plot für Rho2 und Cyanid	41
3.21	Michaelis-Menten-Plot für Rho2 und Thiosulfat	41
3.22	Expression von <i>Rho1</i> und <i>Rho2</i> in Raupen und Schmetterlingen von <i>P. rapae</i> . .	42
3.23	Hydroxylierung von aromatischen Nitrilen durch Darmmikrosomen von <i>P. rapae</i>	43
3.24	Rhodanese-Aktivität von Proteinextrakten aus verschiedenen Teilen der Raupen von <i>A. crataegi</i>	44
3.25	β -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität von Proteinextrakten aus verschiedenen Teilen der Raupen von <i>A. crataegi</i>	44
3.26	Rhodanese-Aktivität von Proteinextrakten aus verschiedenen Teilen der Raupen von <i>C. croceus</i>	45
3.27	β -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität von Proteinextrakten aus verschiedenen Teilen der Raupen von <i>C. croceus</i>	45
3.28	Rhodanese-Aktivität von Proteinextrakten aus verschiedenen Teilen der Raupen von <i>S. littoralis</i>	46
3.29	β -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität von Proteinextrakten aus verschiedenen Teilen der Raupen von <i>S. littoralis</i>	46
3.30	SDS-Gele der aufgereinigten rekombinanten β -Cyanoalanin-Synthasen	49
3.31	β -Cyanoalaninbildung durch rekombinante BSAS aus Lepidoptera	50
3.32	β -Cyanoalaninbildung durch gereinigtes rekombinantes GrBSAS3	50
3.33	Phylogenetische Analyse von charakterisierten β -Cyanoalanin-Synthasen	52
3.34	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcaBSAS1 mit verschiedenen Proteinmengen	53



3.35	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcaBSAS1 mit verschiedenen Inkubationszeiten	53
3.36	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcaBSAS2 mit verschiedenen Proteinmengen	53
3.37	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcaBSAS2 mit verschiedenen Inkubationszeiten	53
3.38	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcaBSAS3 mit verschiedenen Proteinmengen	54
3.39	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcaBSAS3 mit verschiedenen Inkubationszeiten	54
3.40	Michaelis-Menten-Plot für AcaBSAS1 und Cystein	55
3.41	Michaelis-Menten-Plot für AcaBSAS1 und Cyanid	55
3.42	Michaelis-Menten-Plot für AcaBSAS2 und Cystein	55
3.43	Michaelis-Menten-Plot für AcaBSAS2 und Cyanid	55
3.44	Michaelis-Menten-Plot für AcaBSAS3 und Cystein	56
3.45	Michaelis-Menten-Plot für AcaBSAS3 und Cyanid	56
3.46	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcrBSAS1 mit verschiedenen Proteinmengen	56
3.47	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcrBSAS1 mit verschiedenen Inkubationszeiten	56
3.48	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcrBSAS2 mit verschiedenen Proteinmengen	57
3.49	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcrBSAS2 mit verschiedenen Inkubationszeiten	57
3.50	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcrBSAS3 mit verschiedenen Proteinmengen	57
3.51	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcrBSAS3 mit verschiedenen Inkubationszeiten	57
3.52	Michaelis-Menten-Plot für AcrBSAS1 und Cystein	58
3.53	Michaelis-Menten-Plot für AcrBSAS1 und Cyanid	58
3.54	Michaelis-Menten-Plot für AcrBSAS2 und Cystein	58
3.55	Michaelis-Menten-Plot für AcrBSAS2 und Cyanid	58
3.56	Michaelis-Menten-Plot für AcrBSAS3 und Cystein	59
3.57	Michaelis-Menten-Plot für AcrBSAS3 und Cyanid	59
3.58	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von CcBSAS2 mit verschiedenen Proteinmengen	59
3.59	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von CcBSAS2 mit verschiedenen Inkubationszeiten	59
3.60	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von CcBSAS3 mit verschiedenen Proteinmengen	60
3.61	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von CcBSAS3 mit verschiedenen Inkubationszeiten	60
3.62	Michaelis-Menten-Plot für CcBSAS2 und Cystein	61
3.63	Michaelis-Menten-Plot für CcBSAS2 und Cyanid	61
3.64	Michaelis-Menten-Plot für CcBSAS3 und Cystein	61
3.65	Michaelis-Menten-Plot für CcBSAS3 und Cyanid	61
3.66	Aktivität von GrBSAS3 im β -Cyanoalanin-Synthase-Assay	62
3.67	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von GrBSAS2 mit verschiedenen Proteinmengen	62
3.68	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von GrBSAS2 mit verschiedenen Inkubationszeiten	62
3.69	Michaelis-Menten-Plot für GrBSAS2 und Cystein	63
3.70	Michaelis-Menten-Plot für GrBSAS2 und Cyanid	63
3.71	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von ZfBSAS2 mit verschiedenen Proteinmengen	64
3.72	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von ZfBSAS2 mit verschiedenen Inkubationszeiten	64
3.73	Michaelis-Menten-Plot für ZfBSAS2 und Cystein	65
3.74	Michaelis-Menten-Plot für ZfBSAS2 und Cyanid	65
3.75	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von SIBSAS2a mit verschiedenen Proteinmengen	65
3.76	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von SIBSAS2a mit verschiedenen Inkubationszeiten	65
3.77	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von SIBSAS2b mit verschiedenen Proteinmengen	66
3.78	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von SIBSAS2b mit verschiedenen Inkubationszeiten	66
3.79	Michaelis-Menten-Plot für SIBSAS2a und Cystein	67
3.80	Michaelis-Menten-Plot für SIBSAS2a und Cyanid	67
3.81	Michaelis-Menten-Plot für SIBSAS2b und Cystein	67
3.82	Michaelis-Menten-Plot für SIBSAS2b und Cyanid	67
3.83	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von PxBSAS2 mit verschiedenen Proteinmengen	68
3.84	β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von PxBSAS2 mit verschiedenen Inkubationszeiten	68
3.85	Michaelis-Menten-Plot für PxBSAS2 und Cystein	69



3.86	Michaelis-Menten-Plot für PxBSAS2 und Cyanid	69
3.87	Expression von <i>AcaBSAS1-AcaBSAS3</i> in Raupen von <i>A. cardamines</i>	70
3.88	Expression von <i>SIBSAS2a</i> und <i>SIBSAS2b</i> in Raupen von <i>S. littoralis</i>	71
3.89	Expression von <i>PrNSP</i> in <i>P. rapae</i> nach Verfütterung von <i>PrNSP</i> -dsRNA auf Blattscheiben (Versuch 3)	72
3.90	Gewicht der Raupen von <i>P. rapae</i> nach dem Fressen auf transformierten <i>A. thaliana</i>	73
3.91	Expression von <i>PrNSP</i> in Raupen von <i>P. rapae</i> nach dem Fressen auf transfor- mierten <i>A. thaliana</i>	74
3.92	Gewicht der Raupen von <i>P. rapae</i> nach dem Fressen auf transformierten <i>A. thaliana</i>	74
3.93	Expression von <i>PrNSP</i> in Raupen von <i>P. rapae</i> nach dem Fressen auf transfor- mierten <i>A. thaliana</i>	75
4.1	Phylogenie und Kinetik von charakterisierten β -Cyanoalanin-Synthasen aus Lepidoptera und Milben	83





Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Kombinationen von degenerierten Oligonukleotiden zum Identifizieren von cDNA-Fragmenten möglicher β -Cyanoalanin-Synthasen aus Lepidoptera	16
2.2	Liste der verwendeten Bakterienstämme	22
2.3	Versuchsreihen zur Verfütterung von RNAi	25
2.4	Vorschrift für die Herstellung der Gele für die SDS-PAGE	28
3.1	K_m - und V_{max} -Werte von PrBSAS1-PrBSAS3	35
3.2	Effizienzen der verwendeten Oligonukleotide für die Expressionsanalyse von <i>PrBSAS1-PrBSAS3</i>	36
3.3	K_m - und V_{max} -Werte von Rho1 und Rho2	40
3.4	Effizienzen der verwendeten Oligonukleotide für die Expressionsanalyse von <i>Rho1</i> und <i>Rho2</i>	41
3.5	K_m - und V_{max} -Werte von AcaBSAS1-AcaBSAS3	54
3.6	K_m - und V_{max} -Werte von AcrBSAS1-AcrBSAS3	58
3.7	K_m - und V_{max} -Werte von CcBSAS2-CcBSAS3	60
3.8	K_m - und V_{max} -Werte von GrBSAS2	63
3.9	K_m - und V_{max} -Werte von ZfBSAS2	64
3.10	K_m - und V_{max} -Werte von SIBSAS2a-SIBSAS2b	66
3.11	K_m - und V_{max} -Werte von PxBSAS2	68
3.12	Effizienzen der verwendeten Oligonukleotide für die Expressionsanalyse von <i>AcaBSAS1-AcaBSAS3</i>	70
3.13	Effizienzen der verwendeten Oligonukleotide für die Expressionsanalyse von <i>SIBSAS2a</i> und <i>SIBSAS2b</i>	71
4.1	K_m - und V_{max} -Werte von Cyanidentgiftungsenzymen aus <i>P. rapae</i>	78
4.2	Identifizierte β -Cyanoalanin-Synthasen aus Lepidoptera	81
A.1	Degenerierte Oligonukleotide zur Identifizierung von cDNA-Fragmenten putativer β -Cyanoalanin-Synthasen	109
A.2	Oligonukleotide zur Vervollständigung putativer β -Cyanoalanin-Synthasen und Rhodanesen aus Lepidoptera	109
A.3	Oligonukleotide zur Herstellung der Expressionskonstrukte putativer β -Cyanoalanin-Synthasen und Rhodanesen aus Lepidoptera	112
A.4	Oligonukleotide zur Expressionsanalyse mittels qPCR	113





Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BSAS	(β -substituiertes Alanin)-Synthase
cDNA	komplementäre DNA
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
C_T	<i>cycle threshold</i>
CV	<i>column volume</i>
dNTP	Desoxynukleotid
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1 α	Elongationsfaktor 1 α
ESP	Epithionitrilspezififizierendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HPLC-MS/MS	<i>high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
GOI	<i>gene of interest</i>
MA	<i>major allergen</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NSP	Nitrilspezififizierendes Protein
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PMRi	<i>plant-mediated RNA interference</i>
PTGS	Posttranskriptionelles <i>Gene Silencing</i>
qPCR	quantitative <i>Realtime-PCR</i>
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RdRP	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RT	reverse Transkriptase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SMART	<i>switching mechanism at the 5' end of the RNA transcript</i>
TB	<i>Terrific Broth</i>
TFP	Thiocyanatformendes Protein
TRV	<i>Tobacco Rattle Virus</i>
UTR	untranslatierter Bereich
VIGS	<i>virus-induced gene silencing</i>





1 Einleitung

1.1 *Pieris rapae* und das Glucosinolat-Myrosinase-System

1.1.1 Das Glucosinolat-Myrosinase-System

Pflanzen sind sessile Lebewesen, die zum Schutz vor Fraßfeinden chemische und physikalische Abwehrsysteme entwickelt haben. Ein gut untersuchtes chemisches Abwehrsystem in Pflanzen der Ordnung Brassicales ist das Glucosinolat-Myrosinase-System. Es besteht aus zwei Komponenten, den Glucosinolaten und der Thioglukosidase Myrosinase. Glucosinolate sind aus Aminosäuren abgeleitete anionische Thioglykoside, deren Struktur bereits 1957 aufgeklärt wurde (Ettlinger & Lundeen, 1957). In der intakten Pflanzen liegen Glucosinolate und Myrosinase räumlich getrennt vor. Während Glucosinolate in sogenannten S-Zellen, schwefelreichen Phloem-assoziierten Zellen, akkumulieren, wird die Myrosinase in proteinreichen Idioblasten, den Myrosinzellen, gespeichert (Andréasson et al., 2001; Sarsby et al., 2012). Bei einer Verletzung des Pflanzenmaterials, zum Beispiel durch kauende Herbivoren, wird diese Kompartimentierung aufgehoben und die Myrosinase kommt mit ihrem Substrat in Kontakt. Die thioglykosidische Bindung der Glucosinolate wird gespalten und es entsteht ein instabiles Aglykon, welches sich spontan zum Isothiocyanat umlagert (Ettlinger & Lundeen, 1957). Unter Einfluss von spezifizierenden Proteinen, wie dem Epithionitrilspezifizierenden Protein (ESP), dem Thiocyanatformenden Protein (TFP) oder dem Nitrilspezifizierenden Protein (NSP) können alternative Abbauprodukte, wie Thiocyanate, einfache Nitrile oder Epithionitrile entstehen (Tookey, 1973; Lambrix et al., 2001; Burow et al., 2007, 2009). Die Produkte, deren biologische Wirkung am besten untersucht ist, sind die Isothiocyanate. Isolierte Isothiocyanate wirken antifungal, antibakteriell und insektizid, sowohl bei Aufnahme über die Nahrung als auch bei äußerlichem Kontakt, direkt oder über die Gasphase (Virtanen, 1962; Lichtenstein et al., 1964; Wittstock et al., 2003). Über den Mechanismus der Toxizität ist wenig bekannt, *in vitro* reagieren Isothiocyanate mit Aminogruppen von Proteinen und können Disulfidgruppen spalten (Wittstock et al., 2003). Aber auch andere Abbauprodukte wie Nitrile oder Oxazolidin-2-thione sind giftig, letztere vor allem für Säugetiere, da sie zur Kropfbildung führen (Wittstock et al., 2003).

Trotz der schädlichen Wirkungen von Isothiocyanaten auf viele Insekten gibt es Arten, die sich auf glucosinolathaltige Pflanzen spezialisiert haben. Anpassungsmechanismen sind beispielsweise eine effiziente Entgiftung der entstehenden Isothiocyanate, Sequestrierung intakter Glucosinolate oder die Metabolisierung oder Umleitung der Metabolisierung der Glucosinolate (Winde & Wittstock, 2011). Während hohe Mengen an Glucosinolaten eine effektive Abwehr von Generalisten darstellen, bevorzugen Spezialisten glucosinolatreiche Pflanzen (Li et al., 2000; Müller et al., 2010). In der Abwehr von Spezialisten spielen vermutlich alternative Abbauprodukte eine Rolle. Nitrile sind durch ihre niedrigere Toxizität zwar deutlich weniger effektiv gegen Generalisten (Burow et al., 2006), jedoch könnten sie der indirekten Abwehr von Spezialisten dienen. Bei Experimenten mit *Arabidopsis thaliana* Wildtyp Col-0 und der nitrilbildenden Mutante 35S:ESP wurde gezeigt, dass es auf nitrilbildenden Pflanzen zu einer verminderten Eiablage durch den Spezialisten *Pieris rapae* (Kleiner Kohlweißling, Lepidoptera: Pieridae) kommt und Parasiten des Schädling diese Pflanzen bevorzugen (Mumm et al., 2008).



1.1.2 Pieridae und glucosinolathaltige Pflanzen

Unter den auf glucosinolathaltige Pflanzen spezialisierten Herbivoren ist *P. rapae* aus der Familie Pieridae besonders gut untersucht. Der Kleine Kohlweißling gehört zu der Unterfamilie Pierinae, die vor etwa 80 Millionen Jahren einen Wirtswechsel von den Fabales zu den Brassicales vollzogen hat (Wheat et al., 2007), also nur etwa 10 Millionen Jahre nach der Entstehung der Brassicales (Franzke et al., 2011). *P. rapae* hat sich auf vielfältige Weise an seine Futterpflanzen angepasst. Die adulten Weibchen legen ihre Eier ausschließlich auf glucosinolathaltige Pflanzen. Diese erkennen sie durch Chemorezeptoren an den Fußwurzeln an Abbauprodukten vor allem indolischer Glucosinolate auf der Blattoberfläche (de Vos et al., 2008). Auch die Raupen des kleinen Kohlweißlings haben sich sensorisch an ihre Futterpflanzen angepasst. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Glucosinolate als Fraßstimulanz wirken (Renwick & Lopez, 1999; Miles et al., 2005). Auch für die Raupen des kleinen Kohlweißlings sind Isothiocyanate als Hauptabbauprodukte der Glucosinolate giftig, wie in Fütterungsversuchen gezeigt wurde (Agrawal & Kurashige, 2003). Die Raupen haben sich jedoch auch biochemisch an das Glucosinolat-Myrosinase-System angepasst. Bei Untersuchungen des Kots von Raupen, die auf *Sinapis alba* (Brassicaceae) fraßen, wurde festgestellt, dass dieser große Mengen eines Nitrilsulfats enthielt, welches bei Untersuchungen mit radioaktiv markierten Glucosinolaten als Abbauprodukt des Hauptglucosinolats der Pflanze identifiziert wurde (Wittstock et al., 2004). Als Zwischenprodukt dieses Abbauweges wurde das Nitril nachgewiesen (Agerbirk et al., 2006). Die Nitrilbildung wurde auf die Aktivität eines Enzyms zurückgeführt, welches Nitrilspezifizierendes Protein (NSP) genannt wurde und ausschließlich im Darm der Raupen exprimiert wird (Wittstock et al., 2004). Genau wie bei pflanzlichen spezifizierenden Proteinen handelt es sich beim NSP der Raupen um ein Enzym und keinen Cofaktor der Myrosinase (Burow et al., 2006). Das NSP aus dem Darm von *P. rapae* (PrNSP) führt wie einige pflanzliche spezifizierende Proteine zur Bildung der wesentlich ungiftigeren Nitrile anstelle von Isothiocyanaten, hat jedoch keine Ähnlichkeit zu den pflanzlichen Proteinen (Wittstock et al., 2004). Evolutionär eng verwandt ist das NSP dagegen mit sogenannten *major allergens* (MA), deren Funktion noch ungeklärt ist (Fischer et al., 2008).

Das NSP war vermutlich für den Wirtswechsel der Pierinae auf glucosinolathaltige Pflanzen essentiell und wird heute als koevolutionäre Schlüsselinnovation nach Ehrlich & Raven (1964) angesehen. Bei der Untersuchung von 13 Arten der Pieridae von mehreren Kontinenten wurde gezeigt, dass nur die Arten, die auf glucosinolathaltigen Pflanzen fressen, NSP Aktivität im Darm zeigen. Pieridae mit anderen Wirtspflanzen, auch solche, die einen sekundären Wirtswechsel von den Brassicales zu anderen Futterpflanzen vollzogen haben, besitzen diese Aktivität nicht (Wheat et al., 2007).

1.1.3 Cyanidentgiftung in *Pieris rapae*

1.1.3.1 Cyanidbildung

In frühen Brassicales waren von Phenylalanin oder Tyrosin abgeleitete Glucosinolate weit verbreitet (Mithen et al., 2010). Während Glucosinolate mit aliphatischer Seitenkette nach der Umsetzung zum entsprechenden Nitril mit dem Kot der Raupen ausgeschieden werden (Wittstock et al., 2004), liegt bei aromatischen Nitrilen ein komplexerer Stoffwechselweg vor. Eine der Wirtspflanzen von *P. rapae* ist die Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus*, Tropaeolaceae), welche als Hauptglucosinolat in den Blättern Benzylglucosinolat enthält. Bei Raupen, die auf *T. majus* fraßen, konnte das entsprechende Nitril Phenylacetonitril im Kot nicht nachgewiesen werden, obwohl dieser Metabolit *in vitro* bei Inkubation von Benzylglucosinolat mit NSP und der Myrosinase entstand (Vergara et al., 2006, 2007). Bei Fütterungsexperimenten mit radioaktiv markiertem Benzylglucosinolat wurde als Hauptmetabolit Hippursäure als Produkt der Konjugation von Benzoesäure mit Glycin nachgewiesen, was auf einen C1-Verlust in der Glucosinolat-Seitenkette bei der Verstoffwechslung hindeutet (Vergara et al., 2006, 2007). Als möglicher Abbauweg wurde

eine α -Hydroxylierung zum instabilen α -Hydroxynitril mit nachfolgendem Zerfall in ein Aldehyd und Cyanid postuliert. Der genaue Metabolismus von Benzylglucosinolat in *P. rapae* wurde von Stauber et al. (2012) aufgeklärt. Bei Assays mit der mikrosomalen Fraktion aus Darmextrakten der Raupen und Phenylacetonitril als Substrat wurde nur bei Zugabe von NADPH eine Bildung des entsprechenden Aldehyds nachgewiesen (Stauber et al., 2012). Dies deutet auf eine Beteiligung von Cytochrom P450 Enzymen hin, welche eine α -Hydroxylierung des Nitrils katalysieren. Neben Benzaldehyd wurde Cyanid als Reaktionsprodukt nachgewiesen (Abbildung 1.1).

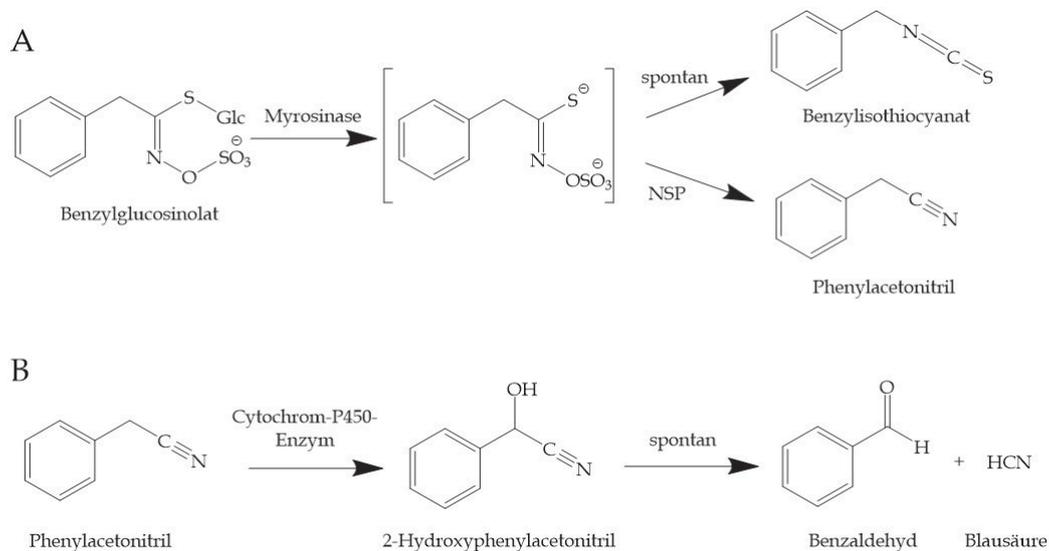


Abbildung 1.1: Cyanidbildung in *P. rapae*. **A** Bei Gewebeverletzung werden Glucosinolate durch die Myrosinase zu instabilen Aglyka umgesetzt, welche sich spontan zu Isothiocyanaten umlagern. In Gegenwart von spezifizierenden Proteinen wie dem NSP aus *P. rapae* kommt es zur Bildung von alternativen Produkten, wie Nitrilen. **B** Das aus Benzylglucosinolat entstehende aromatische Nitril wird zu einem instabilen α -Hydroxynitril verstoffwechselt, welches zu Benzaldehyd und Cyanid zerfällt.

Bei dem Hauptabbauweg von Benzylglucosinolat in *P. rapae* werden somit äquimolare Mengen an Cyanid freigesetzt, was auf eine hohe Cyanidtoleranz der Raupen hindeutet (Stauber et al., 2012). Die bekannten Cyanidentgiftungsenzyme in Insekten sind die Rhodanese und die β -Cyanoalanin-Synthase (Beesley et al., 1985; Meyers & Ahmad, 1991; Zagrobelny et al., 2004). In den Raupen von *P. rapae* wurden bei Begasungsexperimenten mit ^{15}N -HCN sowohl β -Cyanoalanin als auch Thiocyanat, das Produkt der Rhodanese-katalysierten Entgiftungsreaktion, als Produkte gebildet, was auf eine Beteiligung beider Enzyme in der Cyanidentgiftung hinweist (Stauber et al., 2012).

Aromatische Glucosinolate mit längerer Seitenkette, wie 2-Phenylethylglucosinolat, können nach Bildung des entsprechenden aromatischen Nitrils 3-Phenylpropionitril über einen Nebenweg zwar auch zur Cyanidbildung führen, werden aber hauptsächlich über pflanzliche Nitrilasen zu Carbonsäuren metabolisiert, welche anschließend an Glycin konjugiert und ausgeschieden werden (Stauber et al., 2012). Für andere aromatische Glucosinolate, die am Aromaten hydroxyliert sind, zeigte sich in *P. rapae* ebenfalls ein komplexer Metabolismus, bei dem es zur Nitrilbildung, β -Hydroxylierung, O-Demethylierung und Sulfatierung kommt (Agerbirk et al., 2010), jedoch nicht zu einem C1-Verlust. Vermutlich durch das Mitwirken von pflanzlichen Nitrilasen werden aus den Nitrilen Carbonsäuren gebildet, die allerdings nicht an Glycin oder andere Aminosäuren konjugiert, sondern direkt ausgeschieden werden (Agerbirk et al., 2010). Dies lässt vermuten, dass für die Metabolisierung unter C1-Verlust ein unhydroxylierter Aromat vorliegen muss.

1.1.3.2 Cyanidentgiftung durch die Rhodanese

Die Rhodanese (Thiosulfat:Cyanid-Schwefeltransferase) gehört zu den Schwefeltransferasen. Die klassische Rhodanese-katalysierte Reaktion ist die Entgiftung von Cyanid durch die Bildung von Thiocyanat und Sulfid aus Thiosulfat und Cyanid (Cipollone et al., 2007) (Abbildung 1.2).

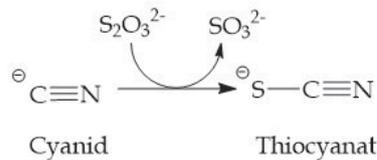


Abbildung 1.2: Cyanidentgiftung durch die Rhodanese

Rhodanesen stellen eine weit verbreitete und auf Sequenzebene sehr heterogene Enzymgruppe dar, deren Funktion *in vivo* noch nicht vollständig geklärt ist (Cipollone et al., 2007). Der am besten untersuchte Vertreter ist die Rhodanese aus der Rinderleber, welche zu den Tandem-Domänen-Rhodanesen gehört. Tandem-Domänen-Rhodanesen besitzen zwei Domänen, welche nur geringe Sequenzidentität besitzen, die katalytisch aktive C-terminale Domäne und eine inaktive N-terminale Domäne (Ploegman et al., 1978). Da die beiden Domänen eine ähnliche Größe und Struktur aufweisen, wird eine evolutionärer Ursprung durch Genduplikation eines ursprünglichen Rhodanesegens vermutet (Ploegman et al., 1978). Diese Hypothese wird unterstützt durch die Identifizierung von Einzel-Domänen-Rhodanesen, wie GIpE aus *E. coli*, welchen keine katalytisch inaktive N-terminale Domäne besitzen (Ray et al., 2000). Rhodanesen aus verschiedenen Organismen besitzen nur eine geringe Ähnlichkeit auf Sequenzebene, die dreidimensionale Struktur der Rhodanese-Domänen ist jedoch hochkonserviert (Spallarossa et al., 2001; Cipollone et al., 2007). Die Cyanidentgiftung wurde lange als Hauptfunktion der Rhodanesen angesehen, da diese Enzyme in der Lage sind, Cyanid zu Thiocyanat umzusetzen. Das Vorkommen von Rhodanesen in Geweben, die Cyanid ausgesetzt sein können, sowie ihre subzelluläre Lokalisation hauptsächlich in den Mitochondrien unterstützt eine Funktion in der Cyanidentgiftung (De Duve et al., 1955; Dudek et al., 1980; Sylvester & Sander, 1990). Das ubiquitäre Vorkommen von Rhodanesen, auch in Organismen, die keinen erhöhten Mengen an Cyanid ausgesetzt sind, und die niedrige physiologische Konzentration des Substrats Thiosulfat sprechen eher dagegen (Beesley et al., 1985; Cipollone et al., 2007). Daher liegt es nahe, dass Rhodanesen als Schwefeltransferasen eine Vielzahl an Funktionen erfüllen. So wurden ihnen z.B. Rollen im Schwefel- und Selenmetabolismus oder der Synthese von Eisen-Schwefel-Proteinen zugeschrieben (Bordo & Bork, 2002). Auch in Insekten scheint Rhodanese-Aktivität weit verbreitet zu sein (Beesley et al., 1985), wobei die einzige charakterisierte Rhodanese aus Insekten aus dem Grashüpfer *Zonocerus variegatus* (Orthoptera: Pyrgomorphidae) aufgereinigt wurde (Bessie & Agboola, 2013). Bisher konnte jedoch noch keine Rhodanesesequenz aus Insekten aufgeklärt werden.

1.1.3.3 Cyanidentgiftung durch β -Cyanoalanin-Synthasen

β -Cyanoalanin-Synthasen katalysieren die Entgiftung von Cyanid durch Bildung der nichtproteinogenen Aminosäure β -Cyanoalanin aus Cystein und Cyanid (Hatzfeld et al., 2000) (Abbildung 1.3).

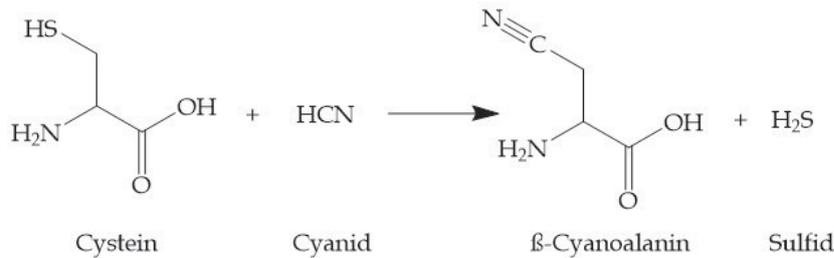


Abbildung 1.3: Cyanidentgiftung durch die β-Cyanoalanin-Synthase

Diese Enzyme gehören neben O-Acetylserin(thiol)lyasen und Cystathionin-β-Synthasen zur Familie der (β-substituiertes Alanin)-Synthasen (BSAS), welche als Cofaktor Pyridoxal-5'-phosphat benötigen (Hatzfeld et al., 2000). Oft besitzen Vertreter der BSAS sowohl β-Cyanoalanin-Synthase- als auch O-Acetylserin(thiol)lyase-Aktivität. Die Zuordnung erfolgt dann über die Affinität zu den jeweiligen Substraten (Hatzfeld et al., 2000; Vozdek et al., 2013). β-Cyanoalanin-Synthasen sind als Cyanidentgiftungsenzyme vor allem in Pflanzen und Bakterien verbreitet (Hatzfeld et al., 2000). Bisher wurde nur in wenigen vielzelligen Tieren β-Cyanoalanin-Synthase-Aktivität nachgewiesen, unter anderem in Arthropoden und Nematoden (Meyers & Ahmad, 1991; Vozdek et al., 2013; Wybouw et al., 2014; van Ohlen et al., 2016). Wie die Funktion in der Cyanidentgiftung nahelegt, sind die meisten bisher identifizierten β-Cyanoalanin-Synthasen in den Mitochondrien lokalisiert (Meyers & Ahmad, 1991; Hatzfeld et al., 2000), aber es wurden auch Vertreter ohne mitochondriale Signalsequenz identifiziert (Vozdek et al., 2013; Wybouw et al., 2014; van Ohlen et al., 2016). Auch das Produkt der katalysierten Engiftungsreaktion, β-Cyanoalanin, kann eine giftige Wirkung besitzen, auf Säugetiere wurde eine neurotoxische Wirkung nachgewiesen (Ressler et al., 1962). In Pflanzen wird β-Cyanoalanin weiter zu proteino-genen Aminosäuren wie Asparagin abgebaut (Blumenthal et al., 1968). Inwiefern β-Cyanoalanin auch für Insekten toxisch ist und ob sie in der Lage sind, es weiter zu verstoffwechseln, ist noch nicht geklärt. Erst kürzlich wurden in Arthropoden Sequenzen von β-Cyanoalanin-Synthasen aufgeklärt (Wybouw et al., 2014; van Ohlen et al., 2016). In *P. rapae* wurden drei β-Cyanoalanin-Synthasen gefunden, deren physiologische Funktion jedoch noch ungeklärt ist (van Ohlen et al., 2016).

1.2 RNA-Interferenz (RNAi)

1.2.1 Hintergrund

Die RNA-Interferenz ist eine Methode zur Eliminierung von Transkripten durch komplementäre doppelsträngige RNA (dsRNA). Sie wurde erstmals 1998 für den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Rhabditida: Rhabditidae) beschrieben (Fire et al., 1998). Die Gruppe um Andrew Fire fand heraus, dass die Injektion von dsRNA, welche komplementär zu der Gensequenz von *unc-22* ist, einem Gen welches für ein Myofilament-Protein codiert, in den Nachkommen zu einem zuckenden Phänotyp führt. Die Injektion von einzelsträngiger RNA dagegen hatte nur einen marginalen Effekt, der vermutlich auf Verunreinigungen mit dsRNA zurückzuführen war. Weitere Untersuchungen ergaben, dass es sich hierbei um einen sehr spezifischen Mechanismus handelt, bei dem es zur Abnahme bzw. Eliminierung der komplementären mRNA-Transkripte kommt. Die zu der dsRNA komplementäre mRNA wird vermutlich schon im Kern abgebaut, da im Cytoplasma keine Transkripte durch *in situ* Hybridisierung nachweisbar waren (Montgomery et al., 1998). Für die Entdeckung der RNAi in *C. elegans* wurden Andrew Fire und Craig Mello 2006 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet. Neben der Injektion von dsRNA führte auch das Verfüttern von dsRNA-produzierenden *Escherichia coli* oder das Tränken der Fadenwürmer in dsRNA-haltigem Medium zu einer Interferenz, auch wenn diese nicht so stark ausgeprägt war wie nach Mikroinjektion von dsRNA (Timmons & Fire, 1998; Tabara et al., 1998). Der Mechanismus der RNAi wurde in den darauffolgenden Jahren aufgeklärt

(Abbildung 1.4 A). Die doppelsträngige RNA wird in den Zellen durch den Dicer, eine Nuklease aus der RNase III-Familie, in 21 bp große dsRNA-Stücke (siRNAs) zerschnitten (Bernstein et al., 2001). Diese siRNAs werden anschließend in einen Ribonukleoproteinkomplex mit Nuklease-Aktivität, den sogenannten RISC (**R**NA-**i**nduced **s**ilencing **c**omplex) integriert (Hammond et al., 2000). Die siRNA bindet an das Argonaut-Protein des RISC, der Leitstrang der RNA verbleibt in dem Komplex, während der Folgestrang entfernt wird. Der RISC Komplex mit dem kurzen einzelsträngigen RNA-Abschnitt kann nun an komplementäre mRNA in der Zelle binden und diese zerstören (Hammond et al., 2001).

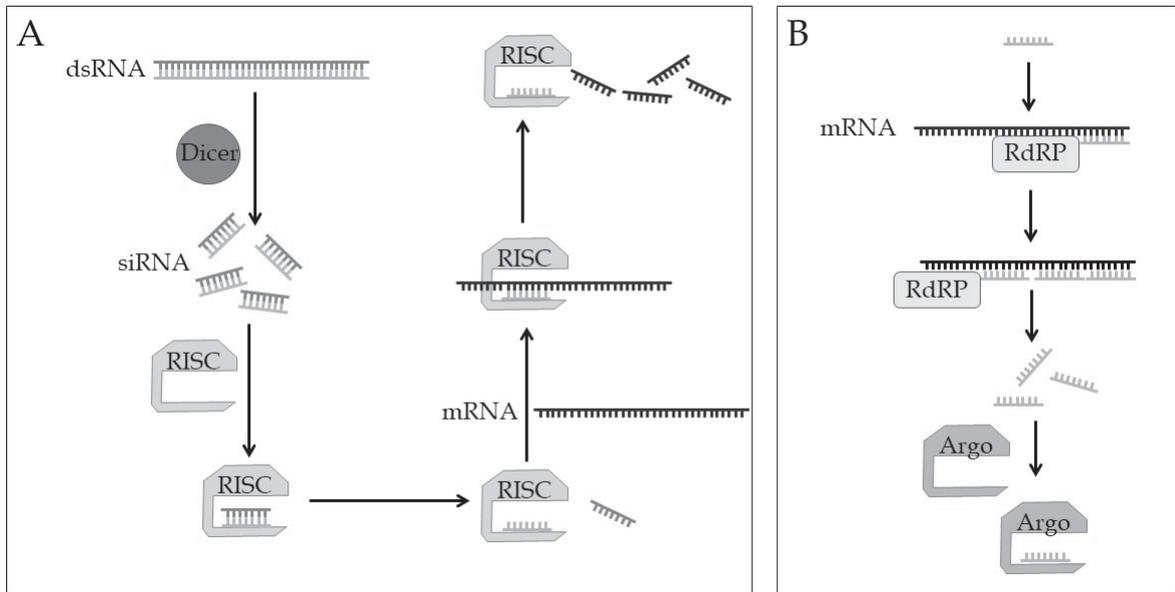


Abbildung 1.4: Postulierter Mechanismus der RNA-Interferenz. **A** Aufgenommene dsRNA wird durch die Nuklease Dicer in kurze, doppelsträngige siRNAs zerschnitten. Diese werden in den RISC integriert, welcher komplementäre mRNAs erkennt und schneidet. **B** In *C. elegans* kommt es durch RNA-abhängige RNA-Polymerasen (RdRP) zu einer Vervielfältigung des RNAi-Signals, indem sie die einzelsträngigen siRNAs als Primer benutzen, um aus der einzelsträngigen komplementären Ziel-RNA sekundäre siRNAs zu generieren. Diese binden an sekundäre Argonauten-Komplexe (Argo), welche wiederum komplementäre mRNA zerstören.

1.2.2 Variabilität der RNAi-Effizienz in Insekten

Das Reduzieren des Transkriptniveaus ("Silencing") von Genen durch RNAi birgt ein großes Potential für die Untersuchung von Genfunktionen, aber auch für die Anwendung zur Schädlingsbekämpfung. Während die RNAi in *C. elegans* eine einfache und effiziente Methode ist, gibt es jedoch in Insekten eine hohe Variabilität der RNAi-Effizienz (Baum & Roberts, 2014). Ein Grund für das schlechtere Ansprechen auf die Verabreichung von dsRNA könnte in einer unterschiedlichen Enzymausstattung liegen. Während Dicer und RISC in Eukaryoten hochkonservierte Proteine sind (Ghildiyal & Zamore, 2009), gibt es Unterschiede in der Ausstattung mit weiteren beteiligten Proteinen. In *C. elegans* ist im Gegensatz zu vielen Insektenarten zusätzlich zur zellautonomen RNAi auch systemische RNAi, also die Ausbreitung des Signals zwischen verschiedenen Zellen und Geweben, möglich (Fire et al., 1998). Zwei Proteine, welche für die Aufnahme von dsRNA aus der Umwelt und die Verbreitung zwischen den Zellen verantwortlich sind, wurden durch Mutanten ohne systemische RNAi (systemic RNA interference deficient, sid) identifiziert (Winston et al., 2002). Der interzelluläre Transport der dsRNA, welcher für eine systemische RNA Interferenz nötig ist, wird in *C. elegans* durch das Transmembranprotein SID-1 ermöglicht, welches vor allem in Zellen mit direktem Umweltkontakt exprimiert wird und vermutlich durch Bildung eines Kanals einen passiven Transport von dsRNA in Zellen ermöglicht (Winston et al., 2002; Feinberg & Hunter, 2003). Das zweite identifizierte Protein SID-2 ist

zusammen mit SID-1 für die Aufnahme von dsRNA aus dem Darmlumen nötig (Winston et al., 2007). Ein Enzym, welches in *C. elegans* vermutlich eine Funktion in der Vervielfältigung des RNAi-Signals hat, ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase (**R**NA-**d**e**p**endent **R**NA **p**olymerase, RdRP) (Sijen et al., 2001). Die RdRP ist offenbar in der Lage, den Leitstrang der gebildeten siRNAs als Primer zu benutzen, um aus der einzelsträngigen komplementären Ziel-RNA sekundäre siRNAs zu generieren. Diese können durch die Bindung an sekundäre Argonauten-Komplexe wiederum die Zerstörung komplementärer mRNA bewirken (Abbildung 1.4 B) (Ghildiyal & Zamore, 2009). Dies könnte ein Grund dafür sein, dass z.B. in *C. elegans* die Injektion von nur wenigen Molekülen dsRNA schon ein effizientes *Gene Silencing* auslöst, obwohl deutlich mehr mRNA-Transkripte in den Zellen vorhanden sind als dsRNA injiziert wurde. Bei einem Vergleich von RNAi-relevanten Genen in Pflanzen und Tieren wurde deutlich, dass *sid-1*-Orthologe mit der Ausnahme von Diptera zwar in allen untersuchten tierischen Genomen vorhanden waren, allerdings liegen kaum Informationen zu deren Expression oder Funktion vor. *RdRP*-Gene dagegen konnten in Insekten nicht nachgewiesen werden (Gordon & Waterhouse, 2007).

Ein alternativer Weg der dsRNA-Aufnahme nach oraler Applikation wurde in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) gezeigt (Ulvila et al., 2006). In einem Experiment wurden 2000 dsRNA Fragmente aus einer cDNA-Bibliothek an *D. melanogaster* S2-Zellen auf ihre Relevanz für die RNAi getestet. Hierzu wurden die Zellen zunächst in der zu testenden dsRNA-Lösung und anschließend mit dsRNA eines für die Zelle überlebenswichtigen Gens getränkt. Die dsRNA der Gene, welche essentiell für RNAi sind, führte durch ein Unterdrücken der RNAi zum Überleben der Zellen. Hierbei wurde neben bekannten RNAi-relevanten Genen ein *Clathrin*-Gen identifiziert, für welches eine Funktion in der Endocytose bekannt ist. In weiteren Untersuchungen wurden außerdem zwei Scavenger-Rezeptoren identifiziert, welche für die Aufnahme von über 90 % der dsRNA verantwortlich waren. Vermutlich findet in *D. melanogaster* also eine Scavenger-Rezeptor-vermittelte Endocytose von dsRNA statt (Ulvila et al., 2006). Interessanterweise führt die Unterdrückung der Expression der orthologen Gene in *C. elegans* dazu, dass keine systemische RNAi mehr stattfindet, was auf ein Zusammenspiel beider Wege hindeutet (Saleh et al., 2006). In einer Studie am Kartoffelkäfer *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae), welcher über eine effiziente RNAi-Antwort verfügt, wurde erstmals gezeigt, dass sowohl SID-Proteine als auch Endocytose an der dsRNA-Aufnahme im Darm des Insekts beteiligt sind (Cappelle et al., 2016).

Bei RNAi-Versuchen in Insekten zeigte sich in der Ordnung Coleoptera die größte Effizienz. Hier können schon kleinste Mengen oral verabreichter dsRNA einen starken Effekt zur Folge haben, während die Erfolgsraten bei Diptera deutlich geringer und bei Lepidoptera sehr variabel sind (Terenius et al., 2011; Baum & Roberts, 2014). Das bessere Ansprechen von Coleoptera gegenüber Lepidoptera auf dsRNA wurde in mehreren Studien untersucht. Bei der Analyse kurzer RNA in den Larven von *Diabrotica virgifera virgifera*, *L. decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae), sowie *Spodoptera frugiperda* und *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) nach dem Fraß auf Pflanzen wurden in den Coleoptera-Arten größere Mengen kurzer RNA pflanzlichen Ursprungs gefunden, in den beiden Lepidoptera dagegen war der Anteil verschwindend gering. Dies deutet auf eine schlechtere Aufnahme oder Instabilität der dsRNA hin (Ivashuta et al., 2015). Bei Untersuchungen an Zelllinien von *L. decemlineata* und *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) wurde zwar in beiden Zelllinien eine erfolgreiche Aufnahme fluoreszenzmarkierter dsRNA nachgewiesen, diese führte in den Zellen der Lepidoptera-Art jedoch nicht zu signifikanten *Silencing*-Effekten und es wurde keine siRNA nachgewiesen. Bei Injektion der dsRNA in Raupen der beiden Arten kam es zu einem starken Abbau der dsRNA in *H. virescens*, nicht jedoch in *L. decemlineata* (Shukla et al., 2016). In einer Zelllinie aus Ovarzellen von *S. frugiperda* akkumulierte fluoreszenzmarkierte dsRNA in den Endosomen, was ein Grund für die schlechte Effizienz von RNAi in dieser Zelllinie sein könnte (Yoon et al., 2017).

1.2.3 RNAi in Lepidoptera

1.2.3.1 Bis 2011 durchgeführte Versuche

In einem ausführlichen Reviewartikel von Terenius et al. (2011) wurden sowohl erfolgreiche als auch erfolglose RNAi Experimente an Lepidoptera zusammengefasst. Erfolgreiche Experimente gab es in einigen Arten, allen voran *Bombyx mori* (Bombycidae) und *Manduca sexta* (Sphingidae), außerdem in Vertretern der Crambidae, Noctuidae, Plutellidae, Pyralidae, Saturniidae und Tortricidae. Unterschiede ergaben sich vor allem in der Applikationsart. Während die Fütterung von dsRNA zwar eine sehr einfache und dadurch attraktive Methode ist, führte sie nur in wenigen Arten zu Erfolg. Dagegen war die Injektion von dsRNA sowie die Transfektion von Zelllinien oder die Verwendung transgener Insekten, welche Hairpin-RNAs exprimieren, generell erfolgreich. Diese Ergebnisse deuteten auf Barrieren in der Aufnahme von dsRNA hin. In dem Review wurden auch die Zielgene nach Gewebeart und Funktion analysiert. Hier zeigten sich besonders Gene und Gewebe, die Teil des Immunsystems waren, empfindlich für RNAi. Epidermale Gewebe und Gene, welche eine Funktion in der Proteinbindung besitzen, waren dagegen eher resistent (Terenius et al., 2011).

1.2.3.2 Injektion von dsRNA

Seit 2011 wurden zahlreiche weitere erfolgreiche RNAi-Experimente in Lepidoptera veröffentlicht, ein Großteil davon in Arten aus der Familie Noctuidae, hier wurde vor allem *Helicoverpa armigera* oft verwendet. Viele der publizierten Ergebnisse wurden, wie schon durch Terenius et al. (2011) beschrieben, mit der Injektion von dsRNA oder siRNA erzielt (Oda et al., 2010; Yao et al., 2010; Xiang et al., 2011; Choi et al., 2012; Du et al., 2012; Hanin et al., 2012; Tang et al., 2012; Wang et al., 2012a,b; Dong et al., 2013; Meng et al., 2013; Ningshen et al., 2013; Wang et al., 2013b; Yokoi et al., 2013; Feng et al., 2014; Han et al., 2014; Li et al., 2014; Qiao et al., 2014; Xu et al., 2015; Zhang et al., 2014; Cao et al., 2015; Li et al., 2015c; Liu et al., 2015; Li et al., 2015b; Lu et al., 2015; Wu et al., 2016; Zhang et al., 2016; Dong et al., 2017; Kim et al., 2017; Meng et al., 2017a). Hierbei wurden im Regelfall Raupen injiziert, was in den meisten Fällen zu Erfolg führte, jedoch in zwei Experimenten keinen Effekt auf die Genexpression oder den Phänotyp hatte (Di Lelio et al., 2014; Yokoi et al., 2013). Die Gruppe um Yokoi untersuchte die Injektion von 3 µg dsRNA für verschiedene Targets in das Hämocoel von Raupen von *Mythimna separata* (Noctuidae). Zielgene waren hierbei Gene mit verschiedenen Funktionen, unter anderem auch im Immunsystem. Allerdings führte keine der applizierten dsRNAs in den untersuchten Geweben zu einer signifikanten Reduktion der Expression des Zielgens (Yokoi et al., 2013). Ein möglicher Grund für die Ineffektivität der Injektion von dsRNA in die Hämolymphe ist die Anwesenheit von dsRNA-abbauenden Enzymen. Garbutt et al. (2013) zeigte in einem Versuch mit *M. sexta* und der Deutschen Schabe *Blattella germanica* (Blattodea: Ectobiidae), dass dsRNA *ex vivo* durch ein Enzym aus dem Plasma der Hämolymphe von *M. sexta* innerhalb kurzer Zeit abgebaut wurde. Dies wurde auf die Anwesenheit von Nucleasen mit dsRNase-Aktivität in der Hämolymphe von Lepidoptera zurückgeführt. Die Inkubation mit Plasma der Hämolymphe von *B. germanica* hatte dagegen selbst nach 24 h keinen Effekt auf die Stabilität der dsRNA (Garbutt et al., 2013). Auch in *H. armigera* wurde der Abbau von dsRNA durch Plasma der Hämolymphe gezeigt (Zhao et al., 2016). Ein weiteres Beispiel für die erfolglose Injektion von dsRNA ist der Vergleich von Verfütterung und Injektion von dsRNA in Raupen von *Spodoptera littoralis* (Noctuidae) zur Unterdrückung eines Zielgens mit einer Funktion in der Immunantwort der Raupen, das hauptsächlich in den Hämocyten exprimiert wird. Der Effekt wurde durch die Rate der Einkapselung injizierter Beads gemessen. Während die Verfütterung von 45 und 450 ng dsRNA die Einkapselungsrate um etwa 90 % reduzierte, führte die Injektion der höheren Menge dsRNA in das Hämocoel der Raupen zu keinem Effekt (Di Lelio et al., 2014). In den

nah verwandten Arten *Spodoptera exigua* und *Spodoptera litura* war die Injektion von dsRNA in Raupen oder Imagos dagegen erfolgreich (Yao et al., 2010; Wang et al., 2012b; Meng et al., 2013; Feng et al., 2014; Li et al., 2014; Lu et al., 2015).

1.2.3.3 Verfüttern von dsRNA

Der Anteil erfolgreicher Verfütterungsexperimente von dsRNA ist seit dem Reviewartikel von Terenius et al. (2011) deutlich gestiegen. Insgesamt wurde die dsRNA in 20 von 57 publizierten und hier ausgewerteten Experimenten oral verabreicht. Ein Grund für die unerwartet hohe Erfolgsrate könnte die gesteigerte Nutzung der pflanzenvermittelten RNAi (PMRi) sein. Hierbei wurden entweder stabile dsRNA-produzierende Pflanzenlinien verwendet (Mao et al., 2011; Poreddy et al., 2015; Reddy et al., 2016; Maligeppagol et al., 2017) oder Pflanzen z.B. durch virus-induced gene silencing, kurz VIGS, transient transformiert (Kumar et al., 2012, 2014; Bao et al., 2016). Die Technik der PMRi findet bereits Anwendung im Pflanzenschutz beim Anbau von Mais. Ein großes Problem, besonders in den USA und Kanada ist hier der Maiswurzelbohrer *D. virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae), gegen den bisher bereits transgene Maispflanzen eingesetzt wurden, welche insektizide Toxine des Bodenbakteriums *Bacillus thuringiensis* produzieren. Da sich Resistenzen gegen Insektizide schnell entwickeln und nicht alle Insekten für *Bt*-Toxine empfindlich sind, wurde die Wirksamkeit von transgenen Pflanzen getestet, welche gegen essenzielle Insektengene gerichtete dsRNAs produzieren (Baum et al., 2007). Als besonders effizient erwiesen sich transgene Pflanzen, welche sowohl das Cry3Bb1 Protein aus *B. thuringiensis* als auch Maiswurzelbohrer-spezifische dsRNAs exprimieren (Baum & Roberts, 2014), diese wurden im Juni 2017 unter dem Namen SmartStax PRO von der US-amerikanischen Umweltbehörde EPA zugelassen. Der Vorteil dieser Methoden liegt in der kontinuierlichen Zuführung großer Mengen dsRNA. Dadurch kann das Fehlen einer RdRP in Insekten ausgeglichen werden, das eine Vervielfältigung des RNAi-Signals für ein erfolgreiches *Silencing* verhindert. Die Nutzung dsRNA-produzierender Pflanzen gegenüber der externen Applikation von dsRNA-haltiger Lösung auf die Pflanzen hat zudem den Vorteil, dass nur die Herbivoren beeinflusst werden, die tatsächlich die Pflanze beschädigen. Eine dsRNA-Lösung müsste zudem vor dem Aufbringen auf die Pflanze vermutlich weiter stabilisiert werden, um ein frühzeitiges Degradieren zu verhindern. Jedoch waren auch einige Experimente erfolgreich, bei denen dsRNA auf Blattscheiben aufgebracht oder in eine künstliche Diät eingearbeitet wurde (Porta et al., 2011; Zhang et al., 2012; Camargo et al., 2015; Wang et al., 2015; Cao et al., 2017; Chaitanya et al., 2017; Meng et al., 2017b). Da hierbei eine Vielzahl verschiedener Gene in verschiedenen Geweben Target war, muss in den untersuchten Arten trotz der Abwesenheit einer RdRP eine effiziente Aufnahme von dsRNA und Transport oder Ausbreitung des Signals in umgebende Gewebe stattfinden.

Viele Untersuchungen zeigten, dass lange dsRNA beim Verfüttern einen besseren *Silencing*-Effekt hervorruft als kürzere dsRNAs (Bolognesi et al., 2012). In zwei Studien, in der pflanzenvermittelte RNAi zur Unterdrückung der Expression von Cytochrom P450-Enzymen in *H. armigera* bzw. *M. sexta* verwendet wurden, führte das gleichzeitige *Silencing* der pflanzlichen Dicer-Gene im Vergleich zu einfach transformierten Pflanzen zu einer stärkeren Wirkung auf die Transkriptlevel der Raupen (Mao et al., 2007; Kumar et al., 2012). Dieses Phänomen wurde auch in der Entwicklung von Chloroplasten-transformierten Pflanzen ausgenutzt. Hierbei wurden transplastomische Kartoffelpflanzen hergestellt, welche lange dsRNAs produzieren, die gegen das β -Actin des Kartoffelkäfers (*L. decemlineata*) gerichtet sind. Da es hier zu einer Produktion und Anreicherung der dsRNA in den Chloroplasten kommt, welche aufgrund ihrer prokaryotischen Herkunft keinen Dicer besitzen, wird die lange produzierte dsRNA nicht schon in der Pflanze sondern erst in den Insekten zu den kurzen siRNAs prozessiert. Nach fünf Tagen lag die Mortalität der Käferlarven bei 100 %, wobei schon nach 24 h kein Fraßschaden mehr auftrat. Bei Kern-transformierten Pflanzen dagegen war kein Effekt auf die Larven des Käfers sichtbar.

(Zhang et al., 2015b). Die postulierte Aufnahme von dsRNA aus dem Darm erfolgt über das Protein SID-1 (siehe Abschnitt 1.2.2). In einer Studie an *D. melanogaster* Zelllinien konnte ein passiver Transport durch Bildung eines Kanals für dsRNA durch SID-1 gezeigt werden. Die Aufnahme von langer dsRNA war hierbei deutlich effizienter als die Aufnahme kürzerer dsRNAs (Feinberg & Hunter, 2003). Eine Beteiligung von SID-1 an der Aufnahme von dsRNA, beispielsweise aus der Nahrung, würde die verminderte Wirkung von kürzeren dsRNAs, wie siRNAs, erklären. Ein interessantes Gegenbeispiel liefert die Studie von Wang et al. (2015). In dieser Studie wurden Raupen von *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) verschiedene Mengen von dsRNA und siRNA verfüttert, welche komplementär zu verschiedenen essentiellen Genen waren. Durch fluoreszenzmarkierte doppelsträngige RNAs wurde gezeigt, dass sowohl längere dsRNA als auch siRNA von den Raupen aufgenommen wurde, die Aufnahme der längeren dsRNA allerdings etwas effizienter war. Die Verfütterung von siRNA führte hier jedoch zu identischen phänotypischen Effekten und hatte die gleiche Reduktion der Expression zur Folge wie die Verfütterung von längerer dsRNA (Wang et al., 2015). Da der genaue Mechanismus der Aufnahme von dsRNA in Insekten nicht bekannt ist und neben den SID-Proteinen in einigen Arten auch Endocytose beteiligt zu sein scheint, könnte dies diese verschiedenen Ergebnisse erklären.

1.2.3.4 Weitere Applikationsarten

Neben dem Verfüttern und der Injektion von dsRNA gab es auch Versuche, in denen die Aufnahme von dsRNA über die Haut gezeigt wurden. Hierzu wurden von Wang et al. (2011) frisch geschlüpfte Raupen von *Ostrinia furnacalis* (Pyralidae) mit einer dsRNA-Lösung (50 ng/ μ l) besprüht. Über fluoreszenzmarkierte dsRNA wurde gezeigt, dass diese über die Epidermis in die Hämolymphe der Raupen aufgenommen wurde. Es kam zu einer erhöhten Mortalität im Vergleich zum Besprühen mit dsRNA des *yellow fluorescent protein* (YFP). Auch die Expression der entsprechenden Gene war reduziert, jedoch korrelierte diese nicht immer mit der Mortalität, was auf unspezifische Effekte der dsRNA schließen lässt (Wang et al., 2011). In einem weiteren Experiment wurden Raupen des ersten Larvenstadiums von *O. furnacalis* und *H. armigera* (Noctuidae) mit dsRNA-Lösung (50 ng/ μ l) besprüht. Diese war komplementär zu der Gensequenz verschiedener Domänen eines Proteins aus *O. furnacalis*. Alle dsRNAs führten in *O. furnacalis* zu systemischer RNAi. Eine der dsRNAs bewirkte auch in der nur entfernt verwandten Art *H. armigera* eine erhöhte Mortalität. Dies wurde auf die relativ ähnliche Sequenz eines VHDL-Rezeptor-Gens zurückgeführt, dessen Expression auch reduziert war. Ebenso wie in der ersten Studie von Wang et al. (2011) waren jedoch unspezifische Effekte beteiligt (Zhang et al., 2015a). Diese Versuche sind ein weiteres Beispiel für systemische RNAi in Lepidoptera trotz der Abwesenheit von RdRP. Offensichtlich gibt es zumindest in einigen Arten einen anderen Mechanismus der Vervielfältigung des RNAi-Signals.

1.2.3.5 Zielgene

Während Terenius et al. (2011) ein besonders gutes Ansprechen von Genen des Immunsystems in der RNAi beobachteten, kann diese Tendenz bei den neueren Publikationen nicht bestätigt werden. Nur in einem kleinen Teil der Artikel waren die untersuchten Gene am Immunsystem beteiligt (Oda et al., 2010; Wang et al., 2012b,a; Di Lelio et al., 2014; Han et al., 2014; Qiao et al., 2014; Li et al., 2015c; Liu et al., 2015; Xu et al., 2015). Am häufigsten wurden Gene mit Beteiligung an Vorgängen in der Häutung und Metamorphose (Yao et al., 2010; Zhang et al., 2012; Camargo et al., 2015; Cao et al., 2015; Bao et al., 2016; Reddy et al., 2016; Wu et al., 2016; Cao et al., 2017; Chaitanya et al., 2017; Ganbaatar et al., 2017), sowie der Fortpflanzung der Lepidoptera-Arten untersucht (Choi et al., 2012; Du et al., 2012; Hanin et al., 2012; Dong et al., 2013; Li et al., 2014; Zhang et al., 2014; Lu et al., 2015; Zhang et al., 2015a, 2016; Dong et al., 2017; Maligeppagol et al., 2017). Auch Gene für Stoffwechsellzyme mit einer Rolle in der Entgiftung, wie Glutathion-S-Transferase (Shabab et al., 2014; Li et al., 2015b) und Cytochrom

P450-Enzyme (Mao et al., 2011; Kumar et al., 2012; Tang et al., 2012; Kumar et al., 2014; Zhao et al., 2016) wurden erfolgreich unterdrückt.

1.2.3.6 Abhängigkeit von der Menge an dsRNA

Während in Nematoden die Applikation kleinster Mengen dsRNA für einen deutlichen Effekt ausreicht, scheinen in Lepidoptera höhere Mengen nötig zu sein. In den meisten Experimenten wurden Mengen von 1-20 µg dsRNA in jedes Individuum injiziert, bei den Fraßversuchen ist die genaue Menge aufgenommener dsRNA schwer zu bestimmen. Es gibt jedoch weiterhin nur wenige Untersuchungen zu der Abhängigkeit des *Silencing* von der Menge verabreichter dsRNA. In den meisten Fällen wird einfach eine Standardmenge an dsRNA injiziert, ohne vorher die nötige Dosis zu ermitteln. Gerade bei der Verwendung hoher Mengen dsRNA ist es wichtig, die richtigen Kontrollen anzuwenden, da spezifische Effekte von unspezifischen Effekten wie einer unspezifischen Immunantwort auf die Gabe von dsRNA schwierig zu unterscheiden sind (Hirai et al., 2004). In fast allen Fällen wurde zur Kontrolle jedoch dsRNA von einem Gen aus einem anderen Organismus, in der Regel des grün fluoreszierenden Proteins (GFP), verwendet, wodurch unspezifische Effekte ausgeschlossen werden können.

In einigen Publikationen wurde jedoch der Effekt verschiedener Mengen und zum Teil auch verschiedener Zeiträume auf die Expression der Zielgene untersucht. Chaitanya et al. (2017) verwendeten fünf verschiedene Mengen dsRNA (1 bis 20 µg/µl), welche sie über Blattscheiben an Raupen der Kohlschabe (*Plutella xylostella*, Plutellidae) verfütterten. Die Zielgene waren eine Epoxidhydroxylase und ein Ecdysteroidrezeptor. Die Unterdrückung der Expression der Zielgene und die Mortalität der Raupen nahmen mit steigender Konzentration der dsRNA zu. Eine leichte Zeitabhängigkeit war ebenfalls zu erkennen (Chaitanya et al., 2017). Auch in der Studie von Wang et al. (2015) wurde beim Verfüttern von dsRNA gezeigt, dass die Expression linear mit der applizierten Konzentration von 50 bis 250 ng/µl abnahm, jedoch wurden hier nur drei verschiedene Konzentrationen untersucht (Wang et al., 2015). Eine andere Gruppe untersuchte den Effekt der Injektion verschiedener Mengen dsRNA in Raupen von *H. armigera* (Tang et al., 2012). In dieser Studie wurden 1 bis 8 µg dsRNA, welche komplementär zu Sequenzen zweier Cytochrom P450-Gene bzw. einer Cytochrom P450-Reduktase waren, in Raupen injiziert und die Genexpression zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. In diesem Fall kam es nicht zu einer stärkeren Reduktion mit erhöhter dsRNA-Dosis, zum Teil stieg die Expression der Gene sogar mit der dsRNA-Dosis an. Bei den meisten Ansätzen war die Expression nach dem längsten untersuchten Zeitraum von 72 h zwar am niedrigsten, jedoch war hier keine Linearität zu erkennen (Tang et al., 2012).

1.2.3.7 Schlussfolgerungen für RNAi-Experimente mit *P. rapae*

Bereits zu Beginn dieser Arbeit zeigte sich, dass RNAi in Lepidoptera kein effizienter Prozess ist (Terenius et al., 2011). Die meisten erfolgreichen Publikationen verwendeten die Injektion von dsRNA. Diese Methode könnte, je nach Zielgen, auch in *P. rapae* zu Erfolg führen. Hierbei wäre es wichtig, die Länge und Menge der zu injizierenden dsRNA in Vorversuchen zu ermitteln. Als alternative und einfache Methode bietet sich das Verfüttern von dsRNA an. Dieses hat generell zwar eine schlechtere Erfolgsrate als die Injektion von dsRNA, führte jedoch in einigen Arten erfolgreich zu einem *Silencing* der Zielgene (Terenius et al., 2011). Auch in *P. rapae* könnte das Verfüttern erfolgreich sein, da es sich bei den in dieser Arbeit zu untersuchenden Entgiftungsenzyme um Darm-exprimierte Enzyme handelt (Wittstock et al., 2004; van Ohlen et al., 2016). Auf Basis der neueren Publikationen erscheint die Zufuhr von dsRNA über transgene Pflanzen als eine wirksame Methode. Da die zugeführte Menge an dsRNA hierbei nicht quantifizierbar ist, ist die Verwendung von Kontrollen sehr wichtig, um unspezifische Effekte auszuschließen. Bei nicht ausreichender Effizienz der pflanzenvermittelten RNAi wäre als weiterer Schritt ein zusätzliches *Silencing* der pflanzlichen *Dicer*-Gene eine Option.

1.3 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war, den Zusammenhang zwischen der Fähigkeit zur Cyanidentgiftung und ihrer Effizienz und der Wirtspflanzennutzung in Pieridae weiter zu untersuchen. Es sollte untersucht werden, welche Rolle die Cyanidentgiftung für den Wirtswechsel auf Brassicales spielte. Zudem sollten Untersuchungen zum Mechanismus der Cyanidentgiftung in Lepidoptera durchgeführt werden.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von Cyanidentgiftungsenzymen in *P. rapae*. Dazu sollten die drei bereits identifizierten β -Cyanoalanin-Synthasen PrBSAS1-PrBSAS3 kinetisch charakterisiert und ihre Expression in den verschiedenen Geweben der Raupen untersucht werden. Da auch Rhodanesen an der Entgiftung von Cyanid in *P. rapae* beteiligt sind, sollten mögliche Rhodanese-cDNAs identifiziert und vollständig kloniert werden. Die Enzyme sollten heterolog exprimiert und ebenfalls kinetisch charakterisiert werden. Ihr Expressionsprofil in den Geweben von *P. rapae* sollte untersucht werden.

Da in *P. rapae* drei verschiedene β -Cyanoalanin-Synthasen gefunden wurden, sollte zur Untersuchung der physiologischen Funktion der Enzyme RNAi als Methode in *P. rapae* etabliert werden. Die dsRNA sollte hierbei verfüttert werden, da die β -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität hauptsächlich im Darm gefunden wurde. Zur Etablierung der Methode sollte zunächst die Expression von *PrNSP* unterdrückt werden.

Um die Rolle von β -Cyanoalanin-Synthasen in der Wirtspflanzenanpassung der Pieridae weiter zu untersuchen, sollten weitere putative β -Cyanoalanin-Synthase cDNAs in anderen Lepidoptera-Arten identifiziert werden. Dazu sollten Arten der Pieridae untersucht werden, die ebenfalls auf glucosinolathaltige Pflanzen spezialisiert sind. Zusätzlich sollten Pieridae untersucht werden, die den primären Wirtspflanzenwechsel nicht mitgemacht haben oder aufgrund eines sekundären Wirtspflanzenwechsels nicht auf glucosinolathaltigen Pflanzen fressen. Außerdem sollten weitere Lepidoptera-Arten aus anderen Familien einbezogen werden. Für die Analyse sollten Raupen der untersuchten Arten zunächst in verschiedene Gewebe seziiert werden und die Aktivität von β -Cyanoalanin-Synthase und Rhodanese bestimmt werden. Anschließend sollten mit degenerierten Primern mögliche β -Cyanoalanin-Synthase-Sequenzen gefunden, vervollständigt und nach heterologer Expression in *E. coli* charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel

Chemikalien und Lösungsmittel wurden, soweit nicht anderes angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) und Merck KGaA (Darmstadt) bezogen. Für die Herstellung von Puffern, Lösungen und Medien wurde Reinstwasser verwendet. Molekularbiologische Reagenzien und Enzyme wurden, soweit nicht anderes angegeben, von Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA) bezogen.

2.2 Versuchstiere und Futterpflanzen

2.2.1 *Pieris rapae*

Die Population des Kleinen Kohlweißlings (*P. rapae*) wurde ursprünglich 2007 von Prof. Dr. Joop van Loon (Universität Wageningen, Niederlande) erhalten und jährlich durch Wildfänge aus dem Raum Braunschweig ergänzt. Die Haltung erfolgte unter kontrollierten Bedingungen bei 16 h Licht, 25°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60 %. Die adulten Schmetterlinge, die nach etwa drei bis sechs Tagen aus den Puppen schlüpften, wurden in Käfigen mit den Maßen 50x50x50 cm gehalten und mit 10 % Sucroslösung ernährt. Nach der Eiablage auf jungen Rosenkohlpflanzen (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*, Brassicaceae) schlüpften nach zwei bis fünf Tagen die Raupen. Diese wurden in Käfigen mit den Maßen 60x60x60 cm auf Rosenkohlpflanzen gehalten. Die Raupen von *P. rapae* durchlaufen 5 Larvenstadien und begannen nach etwa zehn bis zwölf Tagen, sich zu verpuppen. Die Puppen wurden abgesammelt und bis zu zwei Monate im Kühlschrank gelagert. Bei Bedarf wurden sie mit Bastelkleber auf Pappe befestigt, um wieder eine neue Generation Schmetterlinge schlüpfen zu lassen.

2.2.2 *Anthocharis cardamines*

Raupen bzw. Eier des Aurorafalters (*Anthocharis cardamines*, Lepidoptera: Pieridae), wurden im Raum Braunschweig gesammelt und auf gesammelten Pflanzen der Knoblauchsrauke (*Alliaria petiolata*, Brassicaceae) gehalten. Die Haltung erfolgte ebenfalls bei 16 h Licht, 25°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60 %.

2.2.3 *Aporia crataegi*

Raupen des Baumweißlings (*Aporia crataegi*, Lepidoptera: Pieridae) wurden im Frühjahr 2014 von M. Wasilewski (Bialystok, Polen) erhalten. Sie wurden ebenfalls unter kontrollierten Bedingungen auf Zweigen ihrer Futterpflanze (*Sorbus aucuparia*, Rosaceae) gehalten.

2.2.4 *Gonepteryx rhamni*

Raupen des Zitronenfalters (*Gonepteryx rhamni*, Lepidoptera: Pieridae) wurden auf einem Faulbaum (*Frangula alnus*, Rhamnaceae) im Arzneipflanzengarten des Instituts für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig gesammelt.

2.2.5 *Colias croceus*

Puppen des Postillons (*Colias croceus*, Lepidoptera: Pieridae) wurden im Sommer 2015 von G. Geca (Bedzin, Polen) erhalten. Die Schmetterlinge wurden in den unter Abschnitt 2.2.1 genannten Käfigen gehalten und mit 10 % Sucroslösung gefüttert. Die Eiablage erfolgte auf Gewöhnlichem Hornklee (*Lotus corniculatus*) oder Luzernen (*Medicago sativa*, Fabaceae), welche im

Arzneipflanzengarten des Instituts für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig, gesammelt wurden und den Raupen als Futterpflanze dienten.

2.2.6 *Plutella xylostella*

Raupen der Kohlschabe (*Plutella xylostella*, Lepidoptera: Plutellidae) wurden von D. G. Heckel, Max Planck Institut für Chemische Ökologie in Jena erhalten. In dieser Arbeit wurden bei -80°C gelagerte Raupen verwendet.

2.2.7 *Zygaena filipendulae*

Raupen des Sechsfleck-Widderchens (*Zygaena filipendulae*, Lepidoptera: Zygaenidae) wurden von M. Zagrobely, Universität Kopenhagen, zur Verfügung gestellt. In dieser Arbeit wurden bei -80°C gelagerte Raupen verwendet.

2.2.8 *Spodoptera littoralis*

Eier des Afrikanischen Baumwollwurms (*Spodoptera littoralis*, Lepidoptera: Noctuidae) wurden von V. Jeschke, Max Planck Institut für Chemische Ökologie in Jena zur Verfügung gestellt. Die geschlüpften Raupen wurden mit einer künstlichen Bohnendiät ernährt. Dazu wurden 25 g weißes Bohnenmehl, 0,45 g Ascorbinsäure, 0,25 g 4-Ethyl-benzoesäure und 25 ml Leitungswasser gemischt. 2,5 g Agar-Agar wurden in 80 ml kochendem Leitungswasser gelöst und in die Mehlmasse gerührt, bis keine Klumpen mehr sichtbar waren. Anschließend wurden 625 µl α-Tocopherol in Canolaöl (70 mg/ml) und 200 µl Formaldehyd (3.7 % in Wasser) zu der handwarmen Mischung gegeben (Bergomaz & Boppré, 1986; Jeschke et al., 2016).

2.2.9 *Brassica oleracea*

Samen von *Brassica oleracea* var. *gemmifera* (Sorte Rosella) wurden von der Quedlinburger Saatgut GmbH erworben. Die Aussaat erfolgte in Blumenerde, die 2 h bei 101°C gedämpft wurde. Zusätzlich erfolgte eine Behandlung mit Neudomück® (Firma Neudorff), einem Biozid, das *Bacillus thuringiensis israelensis* gegen Mückenlarven enthält. Die Pflanzen wurden in einer Pflanzenzuchtammer von Weiss Technik bei 12 h Licht, 22°C und 60 % Luftfeuchtigkeit angezogen. Nach zwei Wochen wurde wöchentlich der Stickstoffdünger Flory II Mega in einer Konzentration von ca. 1 g/l dem Gießwasser zugegeben. Rosenkohlpflanzen in einem Alter von sechs bis neun Wochen wurden zur Fütterung der Raupen und für die Eiablage von *P. rapae* verwendet.

2.2.10 *Arabidopsis thaliana*

Für die Fraßversuche wurden die T-DNA Mutanten *A. thaliana nsp1-1* (SALK072600 (Bürow et al., 2009)), welche vom Nottingham Arabidopsis Stock Centre bezogen wurde und *A. thaliana cyp79B2 cyp79B3 myb28 myb29* (Sun et al., 2009), welche von Ida Sønderby, Universität Kopenhagen zur Verfügung gestellt wurde, verwendet. Diese wurden auf einer Mischung aus 90 % (v/v) Anzuchterde und 10 % (v/v) Spielsand angezogen, welche mit 0,5 g/l Sierrablen (The Scotts Miracle-Gro Company) und 1 g/l Triabon (Compo GmbH & Co KG) als Düngemittel versetzt und anschließend 2 h bei 101°C im Autoklaven gedämpft wurde. Vor der Aussaat wurde die Erde mit Neudomück® behandelt. Nach dem Aussäen wurden die Pflanzen für drei Tage bei 4°C stratifiziert und anschließend in Pflanzenkammern mit 10 h bzw. 18 h Licht, 60 bis 70 % Luftfeuchtigkeit und 22°C kultiviert. Sobald die Keimlinge das Zweiblattstadium erreichten, wurden sie vereinzelt.



2.3 Molekularbiologie

2.3.1 RNA-Isolierung

2.3.1.1 TRIzol®-Methode

Bei dieser Methode wurden etwa 500 µl in flüssigem Stickstoff gemörstertes Raupenmaterial mit dem TRIzol®-Reagenz versetzt und die RNA nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.3.1.2 Lithiumchlorid-Methode

Die in dieser Arbeit verwendete Lithiumchlorid-Methode beruht auf einer Methode, die von Raha et al. (1990) entwickelt wurde. Die Proben wurden hierzu in flüssigem Stickstoff gemörstert. Etwa 500 µl gemörstertes Raupenmaterial wurden mit 550 µl Extraktionspuffer (s.u.) versetzt und darin durch Vortexen oder mit einem Mikropistill suspendiert. Nach fünfminütiger Inkubationszeit auf Eis wurden 550 µl Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol hinzugegeben, es wurde 15 s gründlich gemischt und anschließend 3 min bei 22000*g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere Phase wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 550 µl Chloroform mit 4 % (v/v) Isoamylalkohol versetzt, gut gemischt und erneut 3 min bei 22000*g und Raumtemperatur zentrifugiert. 400 µl der wässrigen Phase wurden in einem neuen 1,5 ml Eppendorfgefäß mit $\frac{1}{4}$ Volumen (100 µl) 10 M Lithiumchlorid versetzt, invertiert und die RNA wurde 60 min auf Eis gefällt. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 19000*g und 4°C wurde der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 100 µl RNase-freiem Wasser gelöst und anschließend durch Zugabe von 250 µl 100 % Ethanol und 10 µl 3 M Natriumacetat erneut gefällt. Nach 60 min bei -20°C wurde die RNA bei 22000*g für 30 min bei 4°C pelletiert. Nach einem Waschschriff mit 500 µl 75 % (v/v) eiskaltem Ethanol wurde die RNA für mindestens 30 min auf Eis getrocknet und anschließend in 40 µl RNase-freiem Wasser ca. 10 min lang gelöst. Abschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 22000*g und 4°C für 5 min, um Verunreinigungen zu entfernen. Die RNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese auf Intaktheit geprüft, aliquotiert und bei -80°C gelagert bzw. nach Messung der Konzentration für die reverse Transkription eingesetzt.

Extraktionspuffer:

0,2 M	Tris pH 8
0,4 M	LiCl
0,025 M	EDTA
1 % (w/v)	Natriumdodecylsulfat

2.3.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription der RNA wurde in den meisten Fällen mit der RevertAid H Minus RT nach den Angaben des Herstellers mit 5 µg RNA durchgeführt. Für cDNA, die für die 3'RACE verwendet wurde, wurde anstelle des Oligo(dT)₂₀ Oligonukleotids das Anchor-Oligo(dT) Oligonukleotid verwendet. Für die 5'RACE wurde zur cDNA Herstellung anstelle des Oligo(dT)₂₀ Oligonukleotids ein genspezifisches Oligonukleotid verwendet.

In den Fällen, in denen mit dieser Methode keine ausreichenden Ergebnisse in der PCR mit degenerierten Oligonukleotiden zum Finden unbekannter cDNA-Fragmente erzielt wurden, wurde cDNA mit der 55Scriptase RT (Firma Nippon Genetics) hergestellt. Diese hat den Vorteil, dass höhere Temperaturen (bis zu 60°C) für die reverse Transkription eingesetzt werden können, wodurch Sekundärstrukturen der RNA vermindert werden. Die 55Scriptase RT wurde nach den Angaben des Herstellers verwendet und es wurden sowohl Oligo(dT)₂₀ als auch Random Hexamer dem Reaktionsansatz zugegeben. Die generierten cDNAs wurden bei -20°C gelagert.

2.3.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen (Thermo Fisher Scientific) bezogen. Diese wurden lyophilisiert erhalten und mit Wasser oder 10 mM Tris pH 8,5 zu einer Konzentration



von 100 $\mu\text{mol/l}$ gelöst. Diese Stammlösung wurde bei -20°C aufbewahrt und bei Bedarf vor dem Einsatz zu einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ verdünnt. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang in den Tabellen A.1 bis A.4 aufgelistet.

2.3.4 Polymerasekettenreaktion

2.3.4.1 Standard-PCR

Für die Standard-PCR wurde die DreamTaqTM DNA Polymerase verwendet. Diese besitzt eine terminale Transferaseaktivität, wodurch die amplifizierten PCR-Produkte einen 3'-Desoxyadenosin-Überhang erhalten. Dadurch kann im Anschluss einfach eine Ligation in Vektoren mit 3'-Desoxythymidin-Überhang erfolgen, wie z.B. pGem[®]-T Easy (Abschnitt 2.3.6.1). Der PCR-Ansatz (s.u.) enthielt neben der Polymerase und dem dazugehörigen Puffer das Template (cDNA oder Plasmid), genspezifische Oligonukleotide, die das zu amplifizierende Stück flankieren, dNTPs und Wasser. Das Temperaturprogramm ist unten dargestellt. Die DNA wurde zunächst für 3 min bei 95°C denaturiert, danach folgten bis zu 35 Zyklen von Denaturierung bei 95°C , Annealing der Oligonukleotide bei einer spezifischen Temperatur (T_m) und Elongation bei 72°C durch die Polymerase. Abschließend erfolgten ein zehnminütiger Elongationsschritt und Kühlung der Probe auf 16°C .

PCR-Ansatz:

1 μl	cDNA
2,5 μl	10x DreamTaq Puffer
0,5 μl	dNTPs (10 mM)
1 μl	je Oligonukleotid (10 μM)
0,125 μl	DreamTaq TM DNA Polymerase
ad 25 μl	Wasser

PCR-Temperaturprogramm:

95°C	3 min	
95°C	30 s	} $\times 35$
T_m	30 s	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
16°C	∞	

2.3.4.2 Kolonie-PCR

Um zu überprüfen, ob die Ligation der Zielsequenz in den Vektor und anschließende Transformation erfolgreich war, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierzu wurden transformierte Bakterienkolonien in je 20 μl Wasser suspendiert. 10 μl der Bakteriensuspension wurden in eine Kontroll-PCR, z.B. mit Insert-spezifischen Oligonukleotiden eingesetzt, nachdem die Zellen mit einem Temperaturprogramm (s.u.) aufgeschlossen wurden. Die restlichen 10 μl wurden dann ggf. zum Ansetzen einer Übernachtskultur mit anschließender Plasmidisolierung verwendet.

Zellaufschluss:

96°C	5 min	} $\times 2$
50°C	90 s	
96°C	90 s	
45°C	90 s	
96°C	60 s	
40°C	60 s	
16°C	∞	

2.3.4.3 PCR mit degenerierten Oligonukleotiden

Da die Sequenzen der β -Cyanoalanin-Synthasen der verschiedenen Lepidoptera-Arten nicht bekannt waren, wurde zum Finden von cDNA-Fragmenten dieser Sequenzen eine PCR mit verschiedenen Kombinationen degenerierter Oligonukleotiden eingesetzt (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Verwendete Kombinationen von degenerierten Oligonukleotiden zum Identifizieren von cDNA-Fragmenten möglicher β -Cyanoalanin-Synthasen aus Lepidoptera (Tabelle A.1)

Kombination	Primernummern	erwartete Fragmentlänge
1	1 & 5	841 bp
2	1 & 6	724 bp
3	1 & 7	427 bp
4	2 & 5	718 bp
5	2 & 6	601 bp
6	2 & 7	304 bp
7	3 & 5	436 bp
8	3 & 6	319 bp
9	4 & 8	523 bp

Degenerierte Oligonukleotide können zum Beispiel erstellt werden, indem man Aminosäuresequenzen verwandter Proteine wieder in die Basensequenz übersetzt. Da die meisten Aminosäuren von mehreren Basentriplets kodiert werden können, die sich für gewöhnlich in der dritten Position (der sogenannten „Wobble“-Position) unterscheiden, wird eine Mischung aller möglichen Kombinationen als Oligonukleotid verwendet. Diese degenerierten Oligonukleotide können dadurch an viele verschiedene Matrizen binden und man erhöht so die Wahrscheinlichkeit, dass auch die unbekannte cDNA-Sequenz amplifiziert wird und so identifiziert werden kann. Der Degenerierungsgrad liegt bei den verwendeten Oligonukleotiden bei maximal 1024, das heißt es liegen 1024 verschiedenen Oligonukleotide in der Mischung vor. Aus diesem Grund wurden dem PCR-Ansatz höhere Mengen an Oligonukleotiden zugegeben und auch mehr cDNA als Template verwendet. Da die Oligonukleotidmischungen keine genaue Schmelztemperatur besitzen, wurde ein Touchdown-Programm (s.u.) benutzt, bei dem die Annealingtemperatur in jedem Zyklus verringert wird.

PCR-Ansatz:

2 μ l Template cDNA
 5 μ l 10x DreamTaq Puffer
 1 μ l dNTPs (10 mM)
 4 μ l je Oligonukleotid (10 μ M)
 0,25 μ l DreamTaqTM DNA Polymerase
 ad 50 μ l Wasser

Touchdown-Programm:

95°C	3 min	} $\times 16$
95°C	45 s	
63 – 48°C	1 min	
72°C	1 min	
95°C	45 s	} $\times 20$
47°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	10 min	
16°C	∞	

2.3.4.4 RACE

Die durch die PCR mit degenerierten Oligonukleotiden gewonnenen cDNA-Fragmente wurden anschließend mit der sogenannten RACE-PCR (**r**apid **a**mplification of **c**DNA **e**nds) vervollständigt (Frohman et al., 1988). Die RACE-PCR ist eine Variante der RT-PCR, bei der man ausgehend von kurzen bekannten mRNA-Fragmenten die 3'- und 5'-Enden dieser Sequenz ermitteln kann. Während für die 3'RACE der Poly(A)-Schwanz am 3'Ende der mRNA genutzt werden kann, muss bei der 5'RACE eine Adaptersequenz an das 5'Ende ligiert werden. Für die RACE-PCR wurde in dieser Arbeit das SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Firma Clontech) genutzt.



3'RACE:

Die cDNA für die 3'RACE wurde aus 5 µg RNA hergestellt. Für die reverse Transkription wurde anstelle des Oligo(dT)₂₀ Oligonukleotids das Anchor-Oligo(dT) Oligonukleotid eingesetzt. Das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte mit der RevertAid H Minus Reversen Transkriptase. In der anschließenden PCR wurden das Anchor Oligonukleotid sowie ein genspezifisches Oligonukleotid eingesetzt.

5'RACE:

Für die cDNA-Synthese der 5'RACE wurden 0,5 bis 5 µg RNA eingesetzt. Im Gegensatz zur 3'RACE wurden für die reverse Transkription ein genspezifisches Oligonukleotid und das SMARTerTM IIa Oligonukleotid eingesetzt. Die SMARTTM-Technologie (switching mechanism at the 5' end of the RNA transcript) beruht auf der Fähigkeit der SMARTScribe RT, einer Variante der MMLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase), zum Matrizenwechsel (Zhu et al., 2001). Die SMARTScribe RT besitzt eine terminale Transferase-Aktivität: sobald sie das Ende einer mRNA-Matrize erreicht, hängt sie drei bis fünf Basen an das 3' Ende dieser Erststrang-cDNA an. Das SMARTerTM Oligonukleotid besitzt eine Basenabfolge, die an den verlängerten cDNA-Schwanz binden kann. Dadurch kann das Oligonukleotid nun als Matrize dienen; die reverse Transkriptase wechselt die Matrize von der mRNA zum Oligonukleotid und es entsteht eine cDNA mit zusätzlicher SMART Sequenz am Ende. Für die PCR wurden anschließend das RACElong oder das RACEshort Oligonukleotid, welche an die SMART Sequenz binden und ein weiteres genspezifisches Oligonukleotid eingesetzt.

2.3.4.5 Semiquantitative RT-PCR

Die semiquantitative RT-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von DNA. Sie wird vor allem zur Untersuchung der Genexpression genutzt, da man über die quantifizierte cDNA Rückschlüsse auf die in der Probe ursprünglich vorhandene Menge mRNA und dadurch die Expression bestimmter Gene ziehen kann. Die Methode ist semiquantitativ, da die Quantifizierung lediglich über den Vergleich der Bandenstärke von PCR-Produkten im Agarosegel stattfindet. Damit Proben vergleichbar sind, muss sichergestellt sein, dass die gleiche Menge RNA eingesetzt wurde. Hierzu werden Kontrollexperimente durchgeführt, mit denen die Expression von Referenzgenen überprüft wird. Dabei handelt es sich um Gene, deren Expression in verschiedenen Geweben und unter verschiedenen Bedingungen konstant ist.

In dieser Arbeit wurde für die cDNA-Synthese von jeder RNA-Probe 0,25 µg und 0,75 µg eingesetzt. Diese wurde mit DNaseI (Firma Fermentas) nach Angaben des Herstellers behandelt und anschließend mit der Revert Aid H Minus RT (Abschnitt 2.3.2) umgeschrieben. Jede cDNA wurde in einer Standard-PCR mit Zielgen-spezifischen Oligonukleotiden eingesetzt. Zusätzlich wurde in zwei weiteren PCR-Ansätzen die Expression der Referenzgene *Actin* und *EF1α* überprüft. Von jedem Ansatz wurden 2 µl auf ein Agarosegel aufgetragen und die Bandenstärke verglichen. Für eine objektive Beurteilung wurden mit dem Programm ImageJ die Pixel der Banden gemessen und das Verhältnis der Werte des Zielgens einer Probe zu dem Referenzgen gebildet.

2.3.4.6 Quantitative Realtime-PCR

Die quantitative *Realtime*-PCR (qPCR) wird ebenso wie die semiquantitative RT-PCR zur Untersuchung der Genexpression genutzt, wobei sie die genauere Methode darstellt. Die qPCR beruht auf einer Echtzeitmessung der gebildeten PCR-Produkte. Dazu wird dem Reaktionsansatz ein Fluoreszenzfarbstoff zugesetzt, in dieser Arbeit wurde SYBR Green verwendet. SYBR Green ist ein Cyanin-Farbstoff, der eine hohe Affinität zu doppelsträngiger DNA aufweist. Die Fluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen und steigt proportional zu der Menge an gebildeten PCR Produkten an. Zur Quantifizierung wird der C_T -Wert (Cycle Threshold) genutzt. Der C_T -Wert ist der PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz exponentiell ansteigt und einen definierten Schwellenwert überschreitet; je niedriger dieser Wert, desto mehr cDNA-Kopien waren

im Ausgangsmaterial vorhanden. Es ist beim Vergleich der Expression verschiedener Gene jedoch wichtig, die Effizienz, mit der mit einem bestimmten Primerpaar amplifiziert wird, mit einzuberechnen (Bustin et al., 2009). Diese Effizienzen müssen in einem Vorversuch mit einer cDNA-Verdünnungsreihe bestimmt werden, indem man die C_T -Werte gegen den dekadischen Logarithmus der cDNA-Verdünnung aufträgt. Aus der Steigung der Ausgleichsgeraden kann anschließend die Effizienz berechnet werden:

$$E = 10^{\frac{-1}{\text{Steigung}}} - 1 \quad (\text{Formel 1})$$

Für die relative Quantifizierung ist es unerlässlich, Referenzgene zur Normalisierung zu verwenden (Bustin et al., 2009). In dieser Arbeit wurden β -Actin, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Elongationsfaktor 1 α (EF1 α) benutzt.

In den qPCR-Analysen in dieser Arbeit wurde cDNA eingesetzt, die aus 0,75 μ g oder 1 μ g RNA nach einer DNase-Behandlung mit der Revert Aid H Minus RT (Abschnitt 2.3.2) umgeschrieben wurde. Die qPCR wurde in 20 μ l Reaktionsvolumen durchgeführt. Hierzu wurden 10 μ l Bio-Rad iTaq Universal SYBR Green Supermix, 1 μ l der genspezifischen Oligonukleotide und 8 μ l cDNA einer 400-fachen Verdünnung gemischt. Die Reaktionen wurden in einem Bio-Rad CFX Connect Real-Time PCR Detection System nach folgendem Protokoll durchgeführt: 30 s bei 95°C zur initialen Denaturierung gefolgt von 35 Zyklen mit 5 s bei 95°C und 30 s bei 60°C. Jede Reaktion wurde in 3 technischen Replikaten durchgeführt. Zur Überprüfung der amplifizierten Sequenz wurden die Schmelzkurven der Proben verglichen. Zusätzlich wurden die entstandenen PCR-Produkte in pGem[®]-T Easy ligiert (Abschnitt 2.3.6.1), in *E. coli* XL1 blue transformiert und die Plasmide aufgereinigt und sequenziert.

2^{- $\Delta\Delta C_T$} -Methode

Es gibt verschiedene Rechenmodelle zur Auswertung der qPCR-Daten. Die wohl gängigste Methode zur relativen Quantifizierung ist die 2^{- $\Delta\Delta C_T$} -Methode (Livak & Schmittgen, 2001). Sie normalisiert den C_T -Wert des Zielgens (*gene of interest*, GOI) einer Probe sowohl auf eine Kontrolle, zum Beispiel eine unbehandelte Probe, als auch auf ein Referenzgen (Ref).

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T_{GOI}} - C_{T_{Ref}})_{Probe} - (C_{T_{GOI}} - C_{T_{Ref}})_{Kontrolle} \quad (\text{Formel 2})$$

Die relative Expression R berechnet sich dann über:

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (\text{Formel 3})$$

Effizienzkorrigierte Expression

Der Nachteil der 2^{- $\Delta\Delta C_T$} -Methode ist, dass hier die Effizienzen der genutzten Oligonukleotide nicht mit einberechnet werden; es wird von einer Effizienz von 100 % ausgegangen. Außerdem können nicht mehrere Referenzgene auf einmal in die Berechnung mit einbezogen werden. Eine alternative Quantifizierungsmethode, die beide Aspekte berücksichtigt, setzt den C_T -Wert des Zielgens oder Referenzgens einer Probe ins Verhältnis zu dem C_T -Wert einer Kontrolle und bietet im letzten Rechenschritt die Möglichkeit, die gewünschte Anzahl an Referenzgenen in die Berechnung mit einzubeziehen.

$$RQ(\text{Relative Quantity})_{Probe(GOI)} = E_{GOI}^{(C_{TKontrolle} - C_{TProbe})} \quad (\text{Formel 4})$$

$$RQ(\text{Relative Quantity})_{Probe(Ref)} = E_{Ref}^{(C_{TKontrolle} - C_{TProbe})} \quad (\text{Formel 5})$$

$$\text{Normalisierte Expression}_{Probe(GOI)} = \frac{RQ_{Probe(GOI)}}{RQ_{Probe(Ref_1)} * \dots * RQ_{Probe(Ref_n)}^{\frac{1}{n}}} \quad (\text{Formel 6})$$

Berechnung der Expression in verschiedenen Geweben

Da bei der Untersuchung der Expression eines Zielgens in verschiedenen Geweben keine Kontrolle (wie zum Beispiel eine unbehandelte Probe) in die Berechnung einbezogen werden kann, wurde hier eine alternative Quantifizierungsmethode genutzt. Die Expression wurde hier mittels einer Variante der ΔC_T -Methode berechnet, dabei wurde auf ein Referenzgen normalisiert.

$$Expression = \frac{1 + E_{Ref}^{CT_{Ref}}}{1 + E_{GOI}^{CT_{GOI}}} \quad (\text{Formel 7})$$

2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung von PCR-Produkten

Um zu überprüfen, ob PCR-Produkte der gewünschten Größe vorhanden sind, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde eine 1 %ige (w/v), bei sehr kleinen erwarteten Banden eine 1,5 %ige (w/v) Agaroselösung in TBE-Puffer (s.u.) hergestellt. Nach Aufkochen in der Mikrowelle zum Lösen der Agarose und anschließendem Abkühlen auf ca. 60°C wurde Midori Green (Firma Nippon Genetics) zum Anfärben der DNA hinzugegeben und das Gel in einen Gelschlitten gegossen. Die Proben wurden mit Ladepuffer (s.u.) gemischt und zusammen mit einer DNA-Leiter, in der Regel GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 80 bis 100 V durchgeführt.

TBE-Puffer:

890 mM Tris
890 mM Borsäure
20 mM EDTA

Ladepuffer:

460 µM Xylencyanol
373 µM Bromphenolblau
625 µM Ficoll 400
50 mM EDTA
filtrieren und autoklavieren

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurden die Banden zunächst aus dem Agarosegel unter einem LED-Transilluminator (Firma Nippon Genetics) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit dem QIAEX[®] II Gel Extraction Kit oder dem QIAquick Gel Extraction Kit (Firma Qiagen) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt, in 30 bis 40 µl Wasser eluiert und in den gewünschten Vektor ligiert.

2.3.6 Ligation

2.3.6.1 Ligation in pGem[®]-T Easy

Die erhaltenen PCR Produkte wurden zum Sequenzieren in pGem[®]-T Easy ligiert. Der pGem[®]-T Easy-Vektor ist linearisiert und besitzt ein 3'-Desoxythymidin an beiden Enden, wodurch PCR-Produkte mit einem 3'-Desoxyadenosin-Überhang, wie zum Beispiel durch die Dream-Taq[™] DNA Polymerase generiert, einfach ligiert werden können. Der Vektor enthält T7 und SP6 RNA Polymerase Promoter, die eine *Multiple Cloning Site* flankieren. Diese liegt in der kodierenden Region des α -Peptids einer β -Galactosidase. Durch erfolgreiche Ligation wird diese Sequenz unterbrochen und positive Kolonien können im Zuge des sogenannten Blau-Weiß-Screenings anhand der weißen Farbe von den blauen Kolonien, die leeren Vektoren enthalten, unterschieden werden. Dazu müssen die Bakterien nach der Transformation auf LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin, sowie 50 µg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid und 0,5 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) ausplattiert werden.

Der Ligationsansatz (s.u.) wurde gemischt, eine halbe Stunde bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte die Transformation in *E. coli* XL1 blue.



Ligationsansatz:

0,5 µl	T4 DNA Ligase
0,125 µl	pGem [®] -T Easy
1 µl	T4 DNA Ligase Puffer
ad 10 µl	aufgereinigtes PCR-Produkt

2.3.6.2 USER[™]-Klonierung

Zur Generierung von Expressionskonstrukten wurde die USER[™]-Klonierung (uracil-specific excision reagent) verwendet (Nour-Eldin et al., 2006). Diese Klonierungsmethode benötigt keinen Ligationsschritt. Sie beruht darauf, dass sowohl im Vektor als auch in den Oligonukleotiden, welche zur Vervielfältigung der gewünschten Sequenz dienen, Überhänge aus acht Basenpaaren vorhanden sind, welche ein Uracil enthalten. Durch Behandlung mit dem USER Enzymgemisch, welches die Uracil DNA Glycosylase und die DNA Glycosylase-Lyase Endo VIII enthält, werden diese einzelnen Uracilnukleotide entfernt. Es entstehen Überhänge im PCR-Produkt, die komplementär zu denen des Vektors sind und daran binden. In dieser Arbeit wurde der pET52b(+)_{modII} für die Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen mit N-terminalem Strep-Tag genutzt. Dieser Vektor wurde in der Arbeitsgruppe Wittstock aus dem pET52b(+) Vektor (Firma Novagen) für die USER[™]-Klonierung generiert. Er besitzt eine Ampicillin-Resistenz, sowie einen T7-Promoter und T7-Terminator. Da er ein Lactose-Operon besitzt, erfolgt die Induktion der Transkription mittels IPTG-Zusatz.

Reaktionsansatz:

2 µl	geschnittener Vektor
8 µl	PCR Produkt
1 µl	USER Enzymgemisch

USER-Reaktion:

37°C	20 min
25°C	20 min

Der Vektor muss zuvor mit PacI und Nt.BbvCI geschnitten und anschließend aufgereinigt werden (s.u.). Um das gewünschte PCR-Produkt zu erhalten, müssen Polymerasen eingesetzt werden, welche die Replikation nicht beim Vorhandensein eines Uracils abbrechen. In dieser Arbeit wurde die *PfuTurbo[®]Cx* Hotstart DNA Polymerase (Firma Agilent) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Vorbereiten des Vektors:

10 µl	Vektor
5 µl	CutSmart [®] Puffer
1,5 µl	PacI
33,5 µl	Wasser
22h	37°C
50 µl	Restriktionsansatz
0,5 µl	CutSmart [®] Puffer
1 µl	PacI
1 µl	Nt.BbvCI
2,5 µl	Wasser
2h	37°C

PCR-Ansatz:

1 µl	cDNA
2,5 µl	10x PfuTurboCx Puffer
0,5 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	je Oligonukleotid (10 µM)
0,5 µl	<i>PfuTurbo[®]Cx</i> Hotstart DNA Polymerase
ad 25 µl	Wasser

2.3.7 Transformation

Für die Transformation wurden chemisch kompetente Zellen von *E. coli* verwendet. Hierzu wurde ein Aliquot von 100 µl Zellen vorsichtig auf Eis aufgetaut und der komplette Ligationsansatz bzw. ca. 1 µg Plasmid dazupipettiert. Der Ansatz wurde 20 min auf Eis stengelassen und

anschließend einem Hitzeschock für 47 s bei 42°C ausgesetzt. Nach kurzem Abkühlen für 2 min auf Eis wurden 200 bis 400 µl SOC-Medium hinzugegeben und der Transformationsansatz für 1 h bei 37°C geschüttelt. Im Anschluss wurden die transformierten Zellen auf festem Medium mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

SOC-Medium:

2 % (w/v) Trypton/Pepton
 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 pH mit 1 M NaOH auf 7,5 einstellen,
 autoklavieren
 steril dazu:
 10 mM MgSO₄
 10 mM MgCl₂
 22 mM Glucose

LB-Medium:

1 % (w/v) Trypton/Pepton
 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
 0,17 M NaCl
 pH mit 1 M NaOH auf 7,5 einstellen,
 autoklavieren
 für festes Medium mit 1,5 % (w/v)
 Agar versetzen

2.3.8 Bakterienstämme

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> XL1 blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	B F- <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B -m _B -) gal λ(DE3) pLysS [pLysS Cam ^r]	Novagen
<i>E. coli</i> NK3	ΔtrpE5 leu-6 thi hsdR hsdM+ cysK cysM	P. Dijkwel (Massey Universität, Neuseeland)
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	C58 (rif R) Ti pMP90 (pTiC58DT-DNA) (gentR/strepR) Nopaline	S. Pandit (MPI CE Jena)

2.3.9 Kompetente *E. coli*-Zellen

E. coli-Zellen wurden mit einer Methode nach Dagert & Ehrlich (1979) kompetent für die Transformation gemacht. Hierzu wurde ein Auseinzelungsausstrich des entsprechenden *E. coli*-Stamms gemacht und von einer Bakterienkolonie am nächsten Tag eine Übernachtskultur in LB-Medium, ggf. mit Antibiotikum, angesetzt. Am folgenden Tag wurden 50 ml LB-Medium (ggf. mit Antibiotikum) mit 500 µl dieser Vorkultur angeimpft und bei 37° auf dem Schüttler bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,4-0,5 inkubiert. Die Kultur wurde anschließend für 10 min auf Eis inkubiert und die Zellen dann bei 4°C und 1600*g abzentrifugiert. Es folgte ein vorsichtiges Resuspendieren des Zellpellets in 25 ml einer 0,1 M Calciumchlorid-Lösung. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 1600*g wurden die Zellen erneut resuspendiert. Hierzu wurde eine 0,1 M Calciumchlorid-Lösung mit 15 % (v/v) Glycerin verwendet. Die Zellsuspension wurde ca. 24 h im Kühlschrank inkubiert und anschließend in 100 µl-Aliquots abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.10 Komplementierungsassay

Für den Komplementierungsassay wurden *E. coli* NK3 mit dem leeren Vektor pET52b(+)_{modII} als Negativkontrolle, dem Expressionskonstrukt von AtOASTL (OAS-TL A1 aus *A. thaliana*, At4g14880) als Positivkontrolle, sowie den Expressionskonstrukten der zu untersuchenden



Proteine transformiert, auf M9 Minimalmedium (s.u.) ausplattiert und für ein bis fünf Tage bei 37°C inkubiert. Das Minimalmedium enthielt zusätzlich 0.2 g/l Leucin und Tryptophan, 100 µg/ml Ampicillin, 0.5 mM IPTG und ggf. 0.5 mM Cystein.

M9 Minimalmedium:

20 % (v/v) 5xM9 Salze
2 mM MgSO₄
22 mM Glucose
0,1 mM CaCl₂
1,6 % (w/v) Agar-Agar

5xM9 Salze:

0,24 M Na₂HPO₄ * 7 H₂O
0,11 M KH₂PO₄
43 mM NaCl
93 mM NH₄Cl

autoklavieren

2.3.11 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Bimboim & Doly, 1979). Hierzu wurde eine Übernachtskultur einer Bakterienkolonie in 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum angesetzt. Am nächsten Tag wurden 2 ml der Kultur in einem 2 ml Eppendorfgefäß für 5 min bei Raumtemperatur und 2800*^g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und im selben Reaktionsgefäß wurden nochmals 2 ml der Kultur zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde anschließend durch vortexen in 300 µl Puffer 1 resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl Puffer 2 und anschließendem vorsichtigen Invertieren kam es zur Zellyse und zum Denaturieren von Plasmid- und chromosomaler DNA. Nach einer Inkubationszeit von maximal 5 min wurden 300 µl Puffer 3 hinzugegeben, wodurch es zu einer Fällung der chromosomalen DNA und weiteren Zellbestandteilen kam. Der Ansatz wurde für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 22000*^g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde zu gleichen Teilen mit Chloroform gemischt und wiederum 10 min bei 22000*^g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol versetzt, gemischt und 10 bis 30 min bei 22000*^g zentrifugiert, um die Plasmid DNA zu fällen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde ca. 15 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die isolierte Plasmid DNA in 40 µl Puffer (10mM Tris-HCl pH 8,5) gelöst.

Puffer 1:

50 mM Tris
10 mM Natrium-EDTA

pH auf 8 einstellen, autoklavieren

Zugabe von 100 µg/ml RNase A

Puffer 2:

200 mM NaOH
1 % (w/v) SDS

autoklavieren

Puffer 3:

3 M Kaliumacetat

pH mit Eisessig auf 5,5 einstellen,
autoklavieren

2.3.12 Isolierung von genomischer DNA

Für die Isolierung der genomischen DNA wurde die Probe in 500 µl SDS-Puffer (s.u.) homogenisiert. Nach Zugabe von 10 µl RNase A (10 mg/ml) wurde der Ansatz für 15 min bei 37°C inkubiert. Es wurden 75 µl 5 M Kaliumacetatlösung hinzugegeben und für 20 min auf Eis

inkubiert. Anschließend wurden 600 µl Phenol:Chloroform (1:1) hinzugegeben, die Probe wurde gut gemischt und bei 4°C und 16000*g für 10 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Chloroform gemischt und erneut bei 4°C und 16000*g für 10 min zentrifugiert. Aus der wässrigen Phase wurde die DNA mit dem doppelten Volumen Ethanol gefällt und durch Zentrifugation bei 4°C und 16000*g für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde mit 80 % Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die isolierte DNA wurde anschließend in 50 µl sterilem Wasser gelöst.

SDS Puffer:

50 mM Tris
10 mM Natrium-EDTA
100 mM NaCl
1 % SDS

pH auf 8,0 einstellen

2.3.13 Photometrische Bestimmung des DNA- bzw. RNA-Gehalts

Zur photometrischen Bestimmung des DNA- bzw. RNA-Gehalts wurden die Proben 1:100 in Wasser verdünnt und gegen Wasser als Leerwert am Photometer bei 260 nm vermessen. Die Konzentration der DNA ergibt sich aus der Formel $c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260} \cdot V \cdot F$, wobei V der Verdünnung der Probe entspricht und F ein Umrechnungsfaktor ist. Dieser Umrechnungsfaktor ergibt sich aus der Nukleinsäurekonzentration, die eine OD_{260} von 1 ergibt. Diese Konzentration ist für doppelsträngige DNA 50 µg/ml und für RNA 40 µg/ml. Eine Aussage über die Reinheit der DNA bzw. RNA kann über den Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ gemacht werden, da Proteine bei 280 nm ihr Absorptionsmaximum haben. Dieser Quotient liegt für DNA idealerweise bei 1,8 und für RNA bei 2,0.

2.3.14 Restriktionsverdau

Mithilfe eines Verdau mit Restriktionsenzymen wurden die isolierten Plasmide auf das Vorhandensein des gewünschten Inserts im Vektor überprüft. Für pGem[®]-T Easy als Vektor wurde das Restriktionsenzym EcoRI eingesetzt, zum Verdau der modifizierten pET52b(+) Vektoren wurde NcoI verwendet. EcoRI wurde wie unten angegeben eingesetzt, NcoI wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend mittels Agarose Gelelektrophorese untersucht.

Restriktionsansatz EcoRI:

1 µl EcoRI
2 µl Puffer EcoRI
12 µl Wasser
5 µl Plasmid

2.3.15 Sequenzierung

Die Sequenzierung der isolierten Plasmide wurde von der Firma Eurofins Genomics durchgeführt. Hierzu wurden 15 µl Plasmid in einer Konzentration von 50 bis 100 ng/µl eingeschickt und mithilfe vektorspezifischer oder genspezifischer Oligonukleotide sequenziert.

2.3.16 Dauerkultur

Zum Herstellen einer Dauerkultur von gentechnisch veränderten Bakterien wurde eine Übernachtskultur einer Bakterienkolonie in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angesetzt. 750 µl dieser Kultur wurden am nächsten Tag mit 250 µl LB-Glycerin gemischt und bei -80°C gelagert.

LB-Glycerin:

- 1 % (w/v) Trypton/Pepton aus Casein
- 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
- 0,17 M Natriumchlorid
- 60 % (v/v) Glycerol

pH mit 1 M NaOH auf 7,5 einstellen,
autoklavieren

2.3.17 RNAi

2.3.17.1 MEGAScript® RNAi Kit

Zur Herstellung von dsRNA für die RNAi-Versuche wurde das Ambion® MEGAScript® RNAi Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Templates wurden der komplette *open reading frame* (ORF) des nitrilspezifizierenden Proteins der Raupen von *Pieris rapae* (*PrNSP*), sowie eine kürzere Sequenz von 282 Basen verwendet, als Kontrolle diente eine 728 Basen lange Sequenz von *GFP*. Die verwendeten Sequenzen wurden in pGem®-T Easy ligiert. Es wurden jeweils zwei Klone ausgewählt, die dieselbe Zielsequenz in verschiedenen Orientierungen enthielten. Diese wurden vor der Transkription linearisiert, hierzu wurden die Restriktionsenzyme BcuI (für die Konstrukte mit *PrNSP*) und PstI (für das Konstrukt mit *GFP*) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Für die Fütterungsversuche wurden Blattscheiben mit einem Durchmesser von ca. 0,5 cm aus Blättern von *A. thaliana nsp1-1* ausgestanzt, für 10 min in dsRNA-Lösung, welche zur besseren Benetzung mit 10 % Ethanol (v/v) versetzt wurde, eingelegt, kurz getrocknet und verfüttert. In den verschiedenen Versuchsreihen wurden unterschiedliche Konzentrationen der dsRNA-Lösung verwendet (Tabelle 2.3). Die Raupen wurden nach 24 h auf unbehandelte Blätter von *A. thaliana nsp1-1* gesetzt und alle 24 h wurden einzelne Raupen (Versuchsreihen 1, 2) bzw. Raupenpools à 3 Raupen (Versuchsreihe 3) in flüssigem Stickstoff gemörsert und bis zur RNA-Extraktion bei -80°C gelagert. Die Untersuchung der Genexpression von *PrNSP* erfolgte mittels semiquantitativer RT-PCR oder qPCR (Abschnitt 2.3.4.6).

Tabelle 2.3: Versuchsreihen zur Verfütterung von RNAi

Versuchsreihe	1	2	3
PrNSP	ORF	ORF	282bp
Konzentration dsRNA	100 ng/µl	250 ng/µl	250 ng/µl
Anzahl Blattscheiben	2	3	3
anfängliches Larvenstadium	verschieden	L3	L3
Versuchsdauer	7 Tage	7 Tage	3 Tage

2.3.17.2 VIGS

Das sogenannte VIGS ist ebenfalls eine Methode zur Unterdrückung der Expression eines Zielgens mittels doppelsträngiger RNA, welche sich die antivirale Abwehr der Pflanzen, das posttranskriptionelle *Gene Silencing* (PTGS) zunutze macht. Bei dieser Methode werden rekombinante Viren verwendet. Ein Teil des viralen Genoms wird hierzu in einen binären Vektor eingebracht, in diesem Versuch wurde das Tobacco Rattle Virus (TRV) als Vektor verwendet. Der pTRV-Vektor wurde von Liu et al. (2002) modifiziert und besteht aus zwei Teilen (pTRV1 und pTRV2). pTRV1 enthält Gene, die für die Replikation des Virus wichtig sind, während pTRV2 eine *Multiple Cloning Site* besitzt, in die das Zielgen eingebracht werden kann. Die Pflanzen werden über Agrobakterien-Infiltration mit dem viralen Vektor inokuliert. Dies führt

zur Integration der T-DNA und des viralen Genoms in das Wirtsgenom. Die eingebrachte Zielsequenz, aber auch das virale Genom werden transkribiert. Es kommt zur Bildung von dsRNA, welche den antiviralen RNA silencing pathway aktiviert. Dies führt zu der Zerstörung der viralen RNA, aber auch der mRNA des Zielgens. Durch das Einbringen der viralen Vektoren in *A. thaliana* ist also die Unterdrückung der Expression von Pflanzengenen, aber auch Genen von Herbivoren möglich, die die transformierte Pflanze fressen.

Herstellung der Konstrukte:

Das Klonieren sowie die anschließende Transformation des pTRV2-PrNSP-Konstrukts in *A. tumefaciens* GV3101 wurde von Dr. Sagar Pandit (Max Plack Institut für Chemische Ökologie in Jena) durchgeführt. Die hierfür verwendete Teilsequenz von *PrNSP* war 408 Basen groß (Basen 1425 bis 1833 des ORF).

Vorbereiten der Agrobakterien-Suspension:

Die transformierten Agrobakterien, die entweder pTRV1, pTRV2 oder pTRV2-PrNSP enthielten, wurden in 5 ml YEP-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin über Nacht bei 28°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kulturen in je 50 ml YEP-Medium inokuliert, welches Kanamycin, 10 mM MES und 20 µM Acetosyringon enthielt und über Nacht bei 28°C geschüttelt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen bei 1000*g für 15 bis 30 min zentrifugiert und im Infiltrationsmedium resuspendiert, wobei eine OD₆₀₀ von 1,5 eingestellt wurde. Es folgte eine Inkubation von 3 bis 6 h bei Raumtemperatur.

YEP-Medium:

1 % (w/v) Trypton/Pepton
1 % (w/v) Hefeextrakt
85 mM NaCl

Infiltrationsmedium:

10 mM MgCl₂
10 mM MES
200 µM Acetosyringon

Infiltration:

Es wurden *A. thaliana nsp1-1* bzw. die Quadrupelmutante *A. thaliana cyp79B2 cyp79B3 myb28 myb29* in einem Achtblattstadium verwendet und jeweils mit pTRV1/pTRV2 als Vektorkontrolle oder pTRV1/pTRV2-PrNSP infiltriert. Vor der Infiltration wurden die Agrobakterien-Suspensionen von pTRV1 und pTRV2 bzw. pTRV1 und pTRV2-PrNSP 1:1 gemischt. Anschließend wurden die Pflanzen mittels einer 1 ml-Spritze ohne Nadel über die Blattunterseite infiltriert. Hierbei genügte die Infiltration von zwei Blättern pro Pflanze. Die Pflanzen wurden anschließend bei 22°C und 16 h Licht/8 h Dunkelheit kultiviert. Etwa zehn Tage nach der Infiltration wurden die Blätter für die Fütterungsversuche verwendet.

Fütterungsversuche:

Für die Fütterungsversuche wurden Eier von *P. rapae* mit einem Pinsel oder einer Pinzette vorsichtig auf die transformierten Pflanzen übertragen. Nach dem Schlüpfen wurden die Raupen einzeln gehalten und jeden Tag mit frischen Blättern der transformierten Pflanzen gefüttert. Nach acht bis zehn Tagen wurde das Raupengewicht bestimmt und die Raupen wurden seziiert. Aus Gewebe des mittleren Darmabschnitts wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Expression von *PrNSP* mittels qPCR analysiert (Abschnitt 2.3.4.6).



2.4 Proteinbiochemie

2.4.1 Überexpression

Für die Überexpression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* BL21 wurden 100 µl kompetente Zellen mit ca. 1 µg aufgereinigtes Plasmid (pET52b(+)_{modII} mit entsprechender Zielsequenz) transformiert (Abschnitt 2.3.9) und auf LB-Agar mit Chloramphenicol und Ampicillin ausplattiert. Am folgenden Tag wurde eine Vorkultur in 25 ml TB-Medium (**Terrific Broth**, s.u.) und entsprechenden Antibiotika mit einer Kolonie der transformierten Bakterien angeimpft und über 78 h bei 18°C und 220 rpm geschüttelt. Die Hauptkultur von 100 ml LB-Medium mit Antibiotika wurde mit der Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 bis 0,15 eingestellt und bei 18°C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 inkubiert. Es folgte die Induktion mit 1 mM IPTG über ca. 18 h bei 18°C und 220 rpm.

TB-Medium:

1,21 % (w/v) Trypton/Pepton
2,41 % (w/v) Hefeextrakt
0,41 % (v/v) Glycerol

autoklavieren, anschließend dazu:

1,7 mM KH₂PO₄
7,2 mM K₂HPO₄

2.4.2 Zellernte, Zellaufschluss und Aufreinigung rekombinanter Proteine über Strep-Tactin Sepharose

Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 2500**g* und 4°C für 20 min geerntet und in 1,5 ml Puffer W pro *g* Zellen resuspendiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss durch Sonifizieren mit dem Sonifier 250 (Firma Branson, St. Louis, USA) für drei mal 90 s bei einer Output Control von 1,5 und 20 % Duty Cycle. Die Zelltrümmer wurden durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 14000**g* und 4°C entfernt und der sterilfiltrierte Überstand als Rohextrakt weiterverwendet. Für die Aufreinigung der Fusionsproteine mit N-terminalem Strep-Tag wurden Strep-Tactin Sepharose Säulchen mit einem Säulenvolumen (Column volume, CV) von 400 µl benutzt. Vor der ersten Verwendung wurden diese mit 3*2 CV Puffer W äquilibriert. Anschließend wurde der Rohextrakt auf die Säule gegeben. Die Säule wurde mit 5*1 CV Puffer W gewaschen, die Waschfraktionen wurden ggf. aufgefangen, um sie später auf das SDS-Gel aufzutragen. Zur Elution der rekombinanten Proteine wurde die Säule mit 5*0,5 CV Puffer E versetzt. Die Elutionsfraktionen wurden einzeln aufgefangen, auf dem SDS-Gel analysiert und die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt vereinigt. Die Säulen konnten anschließend durch Spülen mit 3*2,5 CV Puffer R regeneriert und in Puffer W gelagert werden.

Puffer W:

0,1 M Tris HCl pH 8
0,15 M NaCl
1mM EDTA

Puffer E:

Puffer W versetzt mit 2,5 mM Desthiobiotin

Puffer R:

Puffer W versetzt mit 1 mM 4-Hydroxyazobenzon-2-carbonsäure

2.4.3 Umpuffern der aufgereinigten Proteine

Das Umpuffern der rekombinanten aufgereinigten Proteine erfolgte bei Bedarf über PD MidiTrap G25-Säulen nach Angaben des Herstellers.

2.4.4 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem PierceTM BCA Protein Assay Kit nach den Angaben des Herstellers für die Microplate Procedure durchgeführt. Zur Kalibrierung wurde eine BSA-Standardreihe in Konzentrationen von 100 µg/ml bis 900 µg/ml benutzt.

2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE)

Zur Überprüfung der Reinheit der rekombinanten Proteine wurden die Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden nach der unten angegebenen Vorschrift (Mengen für 10 Gele) hergestellt und luftdicht verpackt bei 4°C bis zur Verwendung gelagert.

Tabelle 2.4: Vorschrift für die Herstellung der Gele für die SDS-PAGE

	Sammelgel	Trenngel 9 %	Trenngel 12 %
Puffer	6,25 ml	16 ml	16 ml
30 % Acrylamid-, Bisacrylamidlösung 37,5:1	3,75 ml	19,2 ml	25,6 ml
Wasser	15 ml	27,8 ml	21,4 ml
10 % SDS	250 µl	640 µl	640 µl
10 % Ammoniumperoxodisulfat	75 µl	320 µl	320 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	25 µl	32 µl	32 µl

10 µl der Probe wurden mit 5 µl 3x Ladepuffer (s.u.) versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Fokussierung und elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 12 % Gel bei 20 mA je Gel im Sammelgel für etwa 10 min und 30 mA je Gel im Trenngel für etwa 35 min in einer mit SDS-Laufpuffer (s.u.) gefüllten Kammer.

3x Ladepuffer:

187,5 mM	Tris Hcl pH 6,8
30 % (v/v)	Glycerin
60 % (w/v)	SDS
0,12 % (w/v)	Bromphenolblau
150 mM	DTT (frisch dazu)

SDS-Laufpuffer:

0,025 M	Tris
0,19 M	Glycin
3,5 mM	SDS

Anschließend erfolgte die Anfärbung der Proteinbanden mit Coomassie-Brilliant-Blau für 60 min. Nach 30-minütiger Entfärbung mit Entfärber I und einstündiger Entfärbung mit Entfärber II wurde das Gel in Wasser gelagert, dokumentiert und ggf. zwischen Cellophanfolien getrocknet.

Coomassiefärbelösung:

50 % (v/v)	Ethanol
0,5 % (w/v)	Coomassie-Brilliant-Blau R250
10 % (v/v)	Essigsäure

Entfärber I:

50 % (v/v)	Ethanol
10 % (v/v)	Essigsäure

Entfärber II:

16,5 % (v/v)	Ethanol
5 % (v/v)	Essigsäure

2.4.6 Western Blot

Zum spezifischen Nachweis der rekombinanten Fusionsproteine mit Strep-Tag wurde ein Western Blot durchgeführt. In diesem Fall wurde kein Antikörper, sondern ein Strep-Tactin-Enzymkonjugat verwendet, welches den Strep-Tag bindet. Hierzu wurden 10 µl aufgereinigtes Protein bzw. 50 µg Rohextrakt mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend kurz mit Wasser gespült und für 15 min in Tris/CAPS äquilibriert. Die Nitrocellulose-Membran (0,45 µm) und dickes Blotpapier (Firma Biorad) wurden passend zugeschnitten und je zwei Stück Blotpapier mit der Membran in Anodenpuffer, sowie die anderen beiden Blotpapiere in Kathodenpuffer äquilibriert. Für den Blot wurden auf der Anode die beiden Blotpapiere, die in Anodenpuffer getränkt wurden, die im Anodenpuffer äquilibrierte Nitrocellulose-Membran, das Gel und anschließend die beiden in Kathodenpuffer getränkten Blotpapiere geschichtet. Durch das Rollen mit einem Glasstab wurden vorhandene Luftblasen entfernt, die Kathode befestigt und anschließend für 10 min bei 22 V die Proteine auf die Membran übertragen. Nach dem Blotten wurde die Membran kurz mit Wasser und TTBS gespült und anschließend in Blockinglösung (3 % BSA in TTBS) bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach 60 min wurde das Strep-Tactin-Alkalische Phosphatase(AP)-Konjugat (IBA GmbH, Göttingen) in einer 1:4000 Verdünnung hinzugegeben, für 30 min bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal für 10 min mit TTBS und anschließend ebenfalls für 10 min mit TBS gewaschen. Nach fünfminütigem Spülen mit AP-Puffer erfolgte die Detektion der Proteinbanden durch Zugabe von 100 µl Nitroblautetrazoliumchlorid (50 mg/ml in 70 % DMF) und 50 µl 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (Applichem, 50 mg/ml in DMF) in 15 ml AP-Puffer. Nach 3 bis 15 min wurde die Reaktion durch das Waschen mit Wasser gestoppt und der Blot bis zur Dokumentation im Dunkeln aufbewahrt.

Anodenpuffer:

0,06 M Tris
0,04 M CAPS pH 9,6
15 % (v/v) Methanol

Kathodenpuffer:

0,06 M Tris
0,04 M CAPS pH 9,6
0,1 % SDS

TBS:

20 mM Tris pH 7,5
150 mM NaCl

AP-Puffer:

100 mM Tris pH 9,5
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂

Tris/CAPS:

0,06 M Tris
0,04 M CAPS
pH 9,6

TTBS:

100 ml TBS
0,1 % (v/v) Tween 20

2.4.7 Enzymassays

2.4.7.1 β-Cyanoalanin-Synthase-Assay

Für den β-Cyanoalanin-Synthase-Assay nach (Blumenthal et al., 1968) wurden 250 µl 0,025 M Kaliumcyanid und 250 µl 0,025 M Cystein (jeweils in 100 mM Tris pH 8,5) mit 500 µl Enzymextrakt (in 50 mM Tris pH 8,5) im 2 ml Reaktionsgefäß gemischt und für 120 min bei 31°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 µl 20 mM N,N-Dimethyl-p-Phenylendiaminchlorid (DPD, in 7,2 M HCl) und 250 µl 30 mM Eisen(III)chlorid (in 1,2 M HCl) abgestoppt. Nach kurzem Durchmischen der Proben wurden diese für 20 min zur Präzipitation der Proteine im Dunkeln gelagert. Es folgte eine Zentrifugation bei 22000*g für 10 min bei Raumtemperatur und anschließend die Messung der Absorption des Überstandes bei 650 nm in Einwegküvetten. Zur Berechnung der gebildeten Menge an Sulfid wurde eine

Standardreihe aus 500 μl 5 bis 100 μM Na_2S (in 100 mM Tris pH 8,5) mit jeweils 500 μl 50 mM Tris pH 8,5 hergestellt und ebenfalls mit den beiden Detektionsreagenzien versetzt und vermessen. Als Nullwert diente eine Probe aus beiden Puffern.

Assays mit rekombinatem Protein wurden zusätzlich mit 20 μl 1 mM Pyridoxalphosphat (in 50 mM Tris pH 8,5) als Cofaktor versetzt. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurden zunächst die Inkubationszeit und Proteinmenge bestimmt, bei der die Bildung des Reaktionsproduktes Sulfid im linearen Bereich liegt. Anschließend wurde für die Kinetik von Cystein die Cysteinkonzentration variiert, während die Konzentration des Kaliumcyanids bei 6 mM lag. Die Kinetik von Cyanid wurde bei 6 mM Cystein gemessen. Hierbei wurde bei den Ansätzen mit 0 mM Cyanid bei allen rekombinanten Enzymen eine Absorption gemessen, welche auf eine Abspaltung von Sulfid aus dem Substrat Cystein durch die rekombinanten β -Cyanoalanin-Synthasen zurückgeführt wurde. Diese Absorption wurde daher für die Bestimmung der Kinetik des Cyanids bei allen Proben als Hintergrund abgezogen. Die Mittelwerte aus drei technischen Replikaten wurden verwendet, um die kinetischen Parameter mittels des Programms Origin Pro durch nichtlineare Regression zu berechnen. Alle kinetischen Werte wurden in drei unabhängigen biologischen Wiederholungen, d.h. separate Proteinexpression, Reinigung und Vermessung, bestimmt.

Zum Nachweis des gebildeten β -Cyanoalanins wurde die Reaktion mit 100 μl Ameisensäure abgestoppt und nach Zentrifugation bei 22000* g mittels HPLC-MS/MRM analysiert. Für die Analyse wurde ein HP1200 series HPLC Gerät (Agilent Technologies, Waldbronn) genutzt, welches mit einer Hyperclone C18 Säule ausgestattet war (150x2x0,005 mm, Phenomenex) und an ein 3200 QTRAP Massenspektrometer (ABSciex) gekoppelt war. Es wurde ein Gradient aus 0,1 % Ameisensäure in Wasser (Lösemittel A) und 0,1 % Ameisensäure in Methanol (Lösemittel B) verwendet: 5% B (2,2 min), 5–95% B (3 min), Flussrate 0,3 ml/min. Das Massenspektrometer wurde im negativen Modus verwendet mit einer *Source Voltage* von -6 kV und einem *Declustering Potential* von -35 V. Die *Collision Energy* war -13 V. Das betrachtete Ionenpaar war m/z 112,7-95,9 (Stauber et al., 2012).

2.4.7.2 O-Acetylserin(thiol)lyase-Assay

Der O-Acetylserin(thiol)lyase-Assay wurde im 1,5 ml Reaktionsgefäß durchgeführt. Um Cystein selektiv nachweisen zu können, wurde eine Methode nach Gaitonde genutzt (Gaitonde, 1967). Dafür wurden 150 μl Enzymextrakt mit 50 μl 50 mM O-Acetylserin und 25 μl 2,5 mM Natriumsulfid, sowie 20 μl 1 mM Pyridoxalphosphat und 1,25 μl 1 M DTT (alles in 100 mM MOPS pH 7,0) gemischt und 15 min bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μl kalter 20 % (w/v) Trichloressigsäure gestoppt. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation bei 4°C bei 22000* g für 10 min wurden 250 μl des Überstands mit 250 μl Ninyhydrinreagenz versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Nach kurzen Abkühlen wurden 500 μl absoluter Ethanol hinzugegeben und die Absorption bei 560 nm vermessen. Als Standardreihe wurden Cysteinlösungen einer Konzentration von 20 bis 200 μM vermessen.

2.4.7.3 Rhodanese-Assay

Für den Assay zum Nachweis von Rhodanese-Aktivität wurden 125 μl Enzymextrakt (in 50 mM Tris pH 8,5) mit 250 μl 0,125 M Kaliumcyanid und 250 μl 0,125 M Natriumthiosulfat (jeweils in 100 mM Tris pH 8,5) versetzt und für 120 min bei 30°C inkubiert (Sörbo, 1957). Zum Abstoppen der Reaktion wurden 125 μl Formaldehyd 37 % (w/v) und 625 μl Eisen-Nitrat-Reagenz hinzugegeben. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1050* g wurde die Absorption des Überstands bei 460 nm gemessen. Als Standardreihe wurde Kaliumthiocyanat in Konzentrationen von 5 bis 1500 μM vermessen.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurden zunächst die Inkubationszeit und Proteinmenge bestimmt, bei der die Bildung des Reaktionsproduktes Thiocyanat noch im linearen Bereich liegt. Anschließend wurde für die Kinetik von Thiosulfat die Thiosulfatkonzentration variiert, während die Konzentration des Kaliumcyanids bei 50 mM lag. Die Kinetik in Bezug auf Cyanid wurde bei 50 mM Thiosulfat gemessen. Die Mittelwerte aus drei technischen Replikaten wurden verwendet, um die kinetischen Parameter mittels des Programms Origin Pro durch nichtlineare Regression zu berechnen. Alle kinetischen Werte wurden in drei unabhängigen biologischen Wiederholungen, d.h. separate Proteinexpression, Reinigung und Vermessung, bestimmt.

Zum Nachweis des gebildeten Thiocyanats wurde die Reaktion mit 100 µl Formaldehyd abgestoppt und nach Zentrifugation bei 22000**g* mittels HPLC-MS/MRM analysiert. Für die Analyse wurde ein HP1200 series HPLC Gerät (Agilent Technologies, Waldbronn) genutzt, welches mit einer Hypercarb Säule ausgestattet war (50x3 mm, 5 µM Partikelgröße, 250 Å Porengröße; Thermo Scientific, Darmstadt) und an ein 3200 QTRAP Massenspektrometer (ABSciex) gekoppelt war. Es wurde ein Gradient aus 2 mM Ammoniumacetat in Wasser (Lösemittel A) und 95% Acetonitril/ 5% 2 mM Ammoniumacetat in Wasser (Lösemittel B) verwendet: 5% B (1 min), 5–100% B (0,1 min), 100% B (1,9 min), 100–5% B (0,1 min), 5% B (1,9 min), Flussrate 0,5 ml/min. Das Massenspektrometer wurde im negativen Modus verwendet mit einer *Source Voltage* von -4,5 kV und einem *Declustering Potential* von -50 V. Die *Collision Energy* war -5 V. Das betrachtete Ionenpaar war *m/z* 57,9-57,9.

2.4.7.4 Cytochrom-P450-Assay

Zur Überprüfung der Cytochrom-P450-Aktivität von Mikrosomen aus Raupendärmen wurden diese in Glycerolpuffer resuspendiert und 200 µl Mikrosomen mit 0,5 mM Phenylacetoneitril und 1,5 mM NADPH in 250 µl Reaktionsvolumen für 45 min bei 31°C inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Ansätze mit gekochten Mikrosomen, ohne NADPH oder ohne Substrat. Anschließend wurden 50 µl Benzoneitril-Standard in einer 1:10000 (v/v) Verdünnung hinzugegeben. Der Ansatz wurde zweimal mit 750 µl Dichlormethan extrahiert, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und für die GC-MS-Analyse eingeengt.

Glycerolpuffer:

50 mM	KPi pH 7,8
0,5 mM	DTT
1 mM	EDTA
30 % (v/v)	Glycerol
einige Kristalle	Phenylmethylsulfonylfluorid



3 Ergebnisse

3.1 Cyanidengiftungsenzyme in *P. rapae*

3.1.1 Charakterisierung von β -Cyanoalanin-Synthasen

3.1.1.1 Kinetik von PrBSAS1-PrBSAS3

Zur Charakterisierung von PrBSAS1-PrBSAS3 wurden zunächst für jedes Protein nach heterologer Expression in *E. coli* und anschließender Aufreinigung die Inkubationszeit und Proteinmenge ermittelt, bei der der Anstieg des Reaktionsproduktes Sulfid linear war und gleichzeitig die Absorption in einem gut messbaren Bereich lag. Hierzu wurden zunächst die Proteinmengen bei 10 min Inkubationszeit variiert. Für PrBSAS1 waren 250 ng Protein im linearen Bereich und gut detektierbar (Abbildung 3.1), für PrBSAS2 wurden 1 μ g ermittelt (Abbildung 3.3) und für PrBSAS3 5 μ g (Abbildung 3.5). Anschließend wurden diese Proteinmengen in einem Assay mit verschiedenen Inkubationszeiten eingesetzt, für alle drei Proteine waren 10 min Inkubationszeit im linearen Bereich (Abbildungen 3.2, 3.4 und 3.6).

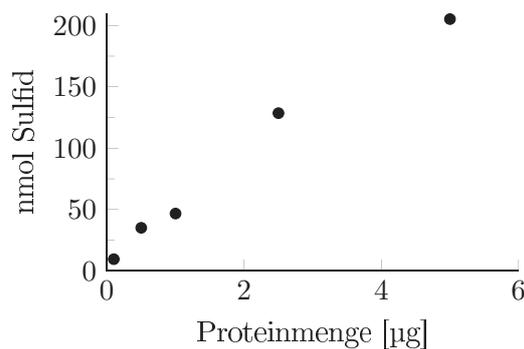


Abbildung 3.1: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von PrBSAS1 mit verschiedenen Proteinmengen und 10 min Inkubationszeit. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

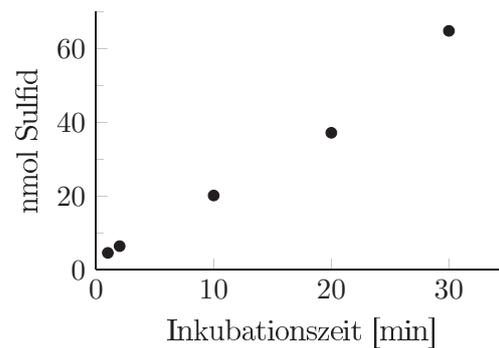


Abbildung 3.2: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von PrBSAS1 mit 250 ng Protein und verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

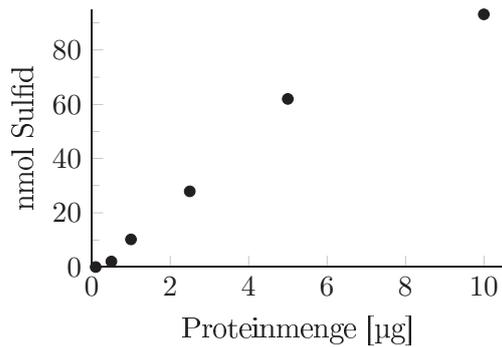


Abbildung 3.3: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von PrBSAS2 mit verschiedenen Proteinmengen und 10 min Inkubationszeit. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

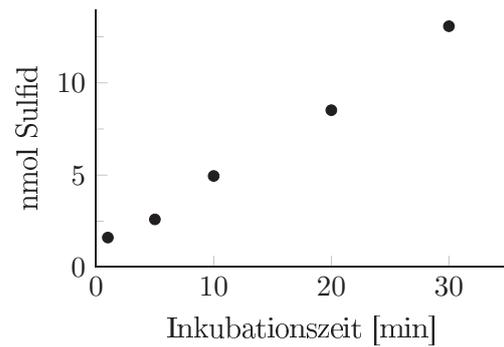


Abbildung 3.4: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von PrBSAS2 mit 1 μ g Protein und verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

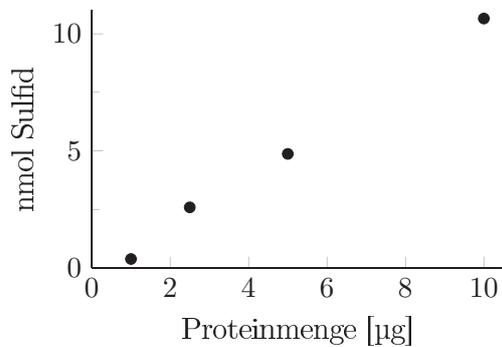


Abbildung 3.5: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von PrBSAS3 mit verschiedenen Proteinmengen und 10 min Inkubationszeit. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

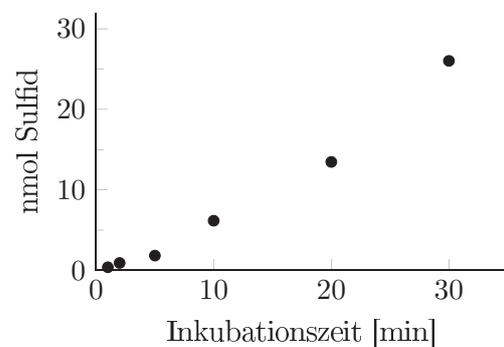


Abbildung 3.6: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von PrBSAS3 mit 5 μ g Protein und verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

Zur Ermittlung der kinetischen Parameter wurden die zuvor ermittelten Proteinmengen und Inkubationszeiten verwendet. Für beide Substrate der von der β -Cyanoalanin-Synthase katalysierten Reaktion wurde die Kinetik separat bestimmt. Für Cystein als Substrat wurde Cyanid in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt und Cystein von 0-4 mM (PrBSAS1 und PrBSAS2) bzw. 0-6 mM (PrBSAS3) variiert (Abbildungen 3.7, 3.9 und 3.11). Für Cyanid als Substrat wurde im Assay 6 mM Cystein eingesetzt und die Cyanidkonzentration von 0-4 mM (PrBSAS1) bzw. 0-0,6 mM (PrBSAS2) variiert (Abbildungen 3.8 und 3.10). Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: K_m - und V_{max} -Werte von PrBSAS1-PrBSAS3. Nach Inkubation der rekombinanten Proteine mit Cystein und Cyanid in der Gegenwart von Pyridoxalphosphat wurde Sulfid colorimetrisch bestimmt. Cyanid wurde in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt, wenn die Konzentration von Cystein variiert wurde und Cystein wurde in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt, wenn die Konzentration von Cyanid variiert wurde. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Wiederholungen \pm Standardfehler. n.d. = nicht detektierbar.

	Cystein		Cyanid	
	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]
PrBSAS1	$12,32 \pm 1,74$	$0,42 \pm 0,04$	$16,86 \pm 2,80$	$7,78 \pm 1,54$
PrBSAS2	$2,81 \pm 0,30$	$0,61 \pm 0,08$	$0,71 \pm 0,05$	$0,28 \pm 0,08$
PrBSAS3	$0,71 \pm 0,03$	$1,27 \pm 0,10$	n.d.	n.d.

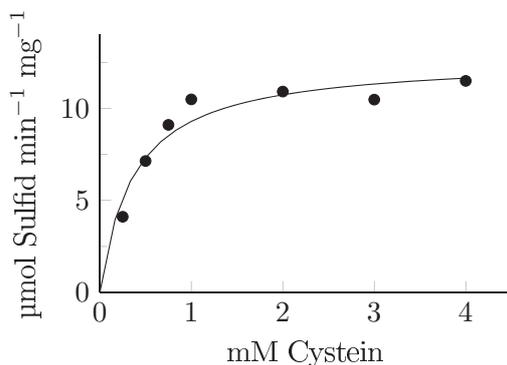


Abbildung 3.7: Michaelis-Menten-Plot für PrBSAS1 und Cystein. PrBSAS1 wurde 10min mit 6 mM Cyanid und variierenden Cysteinkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

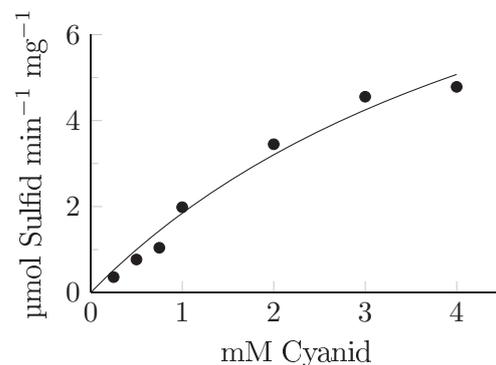


Abbildung 3.8: Michaelis-Menten-Plot für PrBSAS1 und Cyanid. PrBSAS1 wurde 10 min mit 6 mM Cystein und variierenden Cyanidkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

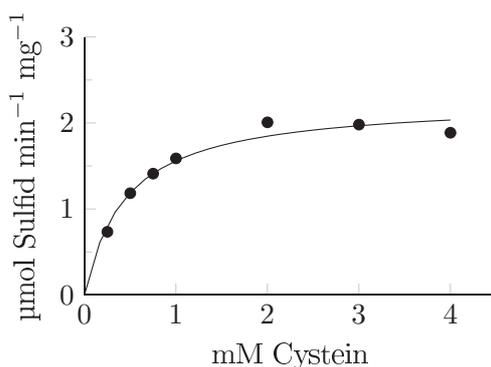


Abbildung 3.9: Michaelis-Menten-Plot für PrBSAS2 und Cystein. PrBSAS2 wurde 10 min mit 6 mM Cyanid und variierenden Cysteinkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

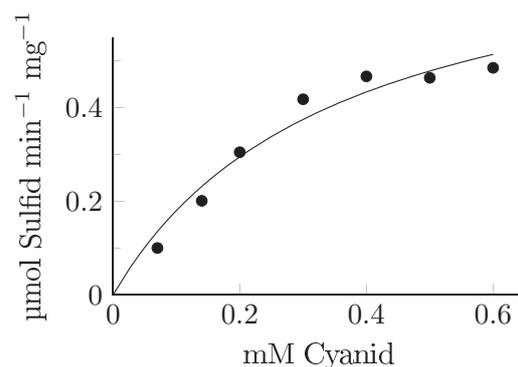


Abbildung 3.10: Michaelis-Menten-Plot für PrBSAS2 und Cyanid. PrBSAS2 wurde 10 min mit 6 mM Cystein und variierenden Cyanidkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

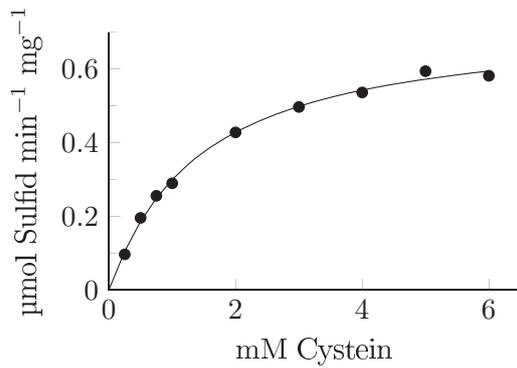


Abbildung 3.11: Michaelis-Menten-Plot für PrBSAS3 und Cystein. PrBSAS3 wurde 10 min mit 6 mM Cyanid und variierenden Cysteinkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

3.1.1.2 Expression von PrBSAS1-PrBSAS3 in *P. rapae*

Zur Untersuchung der Expression von *PrBSAS1-PrBSAS3* wurde ein qPCR-Protokoll entwickelt. Die Primereffizienz wurde unter Verwendung einer Verdünnungsreihe aus gepoolter cDNA des untersuchten Raupenmaterials bestimmt (Tabelle 3.2). Raupen des fünften Larvenstadiums wurden in Kopf, entleerten und gewaschenen Darm und Integument zerteilt. Für ein Replikat wurde das Material von drei bis fünf Raupen gepoolt. Die Berechnung der Expression erfolgte unter Normalisierung auf *EF1α* bzw. *GAPDH* als Referenzgen mit einer Variante der ΔC_T -Methode (Abschnitt 2.3.4.6 Formel 7).

Tabelle 3.2: Effizienzen der verwendeten Oligonukleotide für die Expressionsanalyse von *PrBSAS1-PrBSAS3*. Die Effizienzen wurden mit einer cDNA-Verdünnungsreihe aus gepoolter cDNA von *P. rapae* bestimmt.

Zielgen	Effizienz
<i>GAPDH</i>	91,0%
<i>EF1α</i>	100,4%
<i>PrBSAS1</i>	93,3%
<i>PrBSAS2</i>	88,3%
<i>PrBSAS3</i>	91,7%

Die Expression aller drei Gene war im Darmgewebe der Raupen am höchsten, wobei *PrBSAS2* eine deutlich höhere Expression als *PrBSAS1* und *PrBSAS3* aufwies (Abbildung 3.12). In Kopf und Integument war von allen drei β -Cyanoalanin-Synthase-Genen keine bzw. nur eine geringe Expression detektierbar, welche auch auf Verunreinigung dieser Teile mit Darmzellen durch das Sezieren zurückzuführen sein könnte.

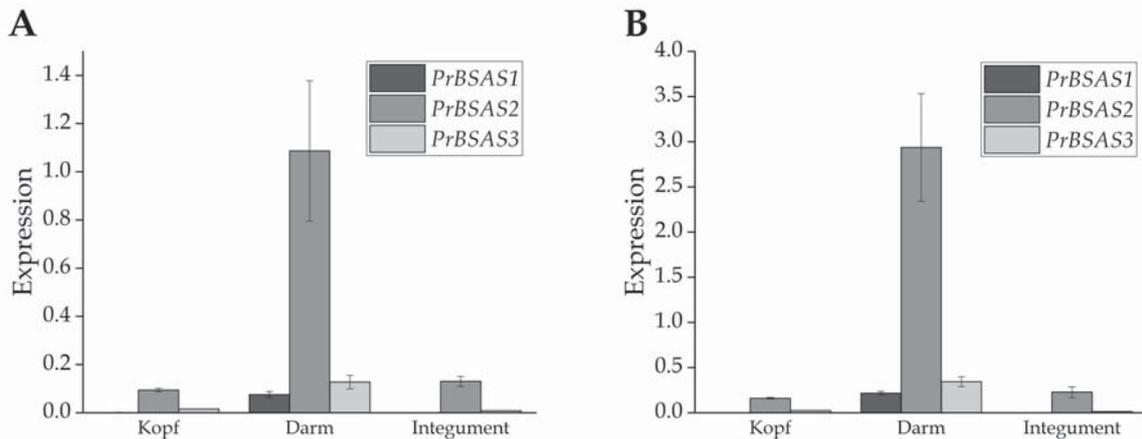


Abbildung 3.12: Expression von *PrBSAS1-PrBSAS3* in Raupen von *P. rapae*. Raupen des fünften Larvenstadiums wurden in Kopf, Darm und Integument seziiert und die RNA isoliert. Die C_T -Werte von *PrBSAS1-PrBSAS3* wurden auf *EF1α* (A) und *GAPDH* (B) als Referenzgene normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Replikaten \pm Standardabweichung

3.1.1.3 O-Acetylserin(thiol)lyase-Aktivität von PrBSAS1-PrBSAS3

Der *E. coli* Stamm NK3 ist durch die Deletion der O-Acetylserin(thiol)lyase-Gene *cysK* und *cysM* Cystein-auxotroph. Um zu untersuchen, ob die drei aus *P. rapae* isolierten β -Cyanoalanin-Synthasen auch O-Acetylserin(thiol)lyase-Aktivität besitzen, wurden die Expressionskonstrukte für PrBSAS1-PrBSAS3 in *E. coli* NK3 transformiert und auf M9 Minimalmedium ohne Cystein-zusatz ausplattiert. Bei den Zellen, die mit den Expressionkonstrukten für PrBSAS1-PrBSAS3 transformiert wurden, waren nach 5 Tagen Inkubation bei 37°C keine Kolonien sichtbar. Bei den Zellen, die als Positivkontrolle mit einer Cysteinsynthase aus *A. thaliana* transformiert wurden, waren dagegen Kolonien sichtbar.

3.1.1.4 Untersuchung auf Introns in der genomischen Sequenz von PrBSAS1-PrBSAS3

Da für *PrBSAS1-PrBSAS3* ein horizontaler Gentransfer als evolutionärer Ursprung vermutet wird, wurde geprüft, ob die Gene für PrBSAS1-PrBSAS3 Introns enthalten. Dazu wurde die genomische DNA aus ganzen Raupen des dritten Larvenstadiums isoliert. DNA wurde in eine PCR mit genspezifischen Primern für *PrBSAS1-PrBSAS3* eingesetzt, die den gesamten ORF amplifizieren. Die Länge der entstandenen PCR-Produkte entsprach der Länge der gefundenen cDNAs von 975-978 bp (Abbildung 3.13) und die Sequenzierung ergab, dass keine Introns in den genomischen Sequenzen vorhanden sind.

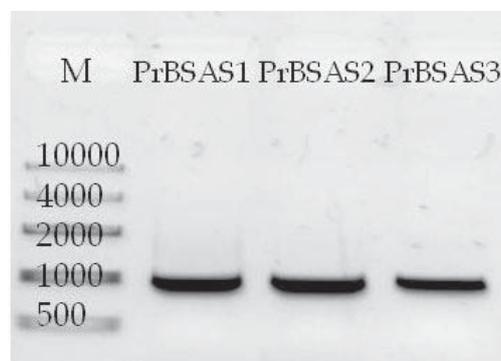


Abbildung 3.13: Untersuchung der genomischen Sequenzen von *PrBSAS1-PrBSAS3*. Genomische DNA wurde in einer PCR mit genspezifischen Primern zur Amplifizierung des gesamten ORF von *PrBSAS1-PrBSAS3* eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch mit einer Leiter (M) analysiert.

3.1.2 Klonierung und Charakterisierung von Rhodanesen aus *P. rapae*

3.1.2.1 Klonierung und heterologe Expression von Rho1 und Rho2

Von Heiko Vogel (Max Planck Institut für chemische Ökologie, Jena) wurden aus einer RNA-Seq-Datenbank zwei Partialsequenzen möglicher Rhodanesen aus *P. rapae* bereitgestellt. Diese wurden mit *Rho1* und *Rho2* benannt. Das 3'- und 5'-Ende von *Rho1*, sowie das 3'-Ende von *Rho2* wurden von Christine Busching im Rahmen ihrer Bachelorarbeit vervollständigt (Busching, 2016).

In dieser Arbeit wurde das 5'-Ende von *Rho2* in einer 5'RACE mit einem genspezifischen Primer über das Startcodon hinaus bis 143 bp in die 5'UTR vervollständigt. Die beiden putativen Rhodanesesequenzen codieren für Proteine mit einer Länge von 171 bzw. 126 Aminosäuren, welche untereinander eine Identität von 47 % auf Aminosäureebene besitzen. Bioinformatische Analysen mit Target P ergaben für Rho1 eine mitochondriale und für Rho2 eine cytosolische Lokalisation (Emanuelsson et al., 2000). Die Sequenzen wurden in den Expressionsvektor pET52b(+)-modIII kloniert und heterolog in *E. coli* BL21 pLysS exprimiert. Für Rho1 wurde bei diesem Ansatz kaum rekombinantes Protein erhalten. Daher wurde die Sequenz mit MitoProt analysiert und ein Signalpeptid für mitochondriale Expression von 50 Aminosäuren identifiziert (Claros, 1995). Die Sequenz von Rho1 ohne Signalpeptid codiert für ein Protein mit einer Länge von 121 Aminosäuren und wurde erfolgreich exprimiert.

3.1.2.2 Nachweis der Rhodanese-Aktivität der in *P. rapae* identifizierten Proteine mittels LC-MS/MS

Zum selektiven Nachweis des Reaktionsproduktes Thiocyanat wurden die aufgereinigten Enzyme für 10 min mit den beiden Substraten Cyanid und Thiosulfat inkubiert und die Reaktionsansätze per HPLC-MS/MRM analysiert. Der für Thiocyanat erwartete Übergang (m/z 57,9– m/z 57,9) wurde für alle untersuchten Enzyme nachgewiesen, nicht jedoch in den Negativkontrollen mit denaturiertem Enzym, nur mit den beiden Substraten oder den vereinigten Elutionsfraktionen der leeren Vektorkontrolle (Abbildung 3.14).

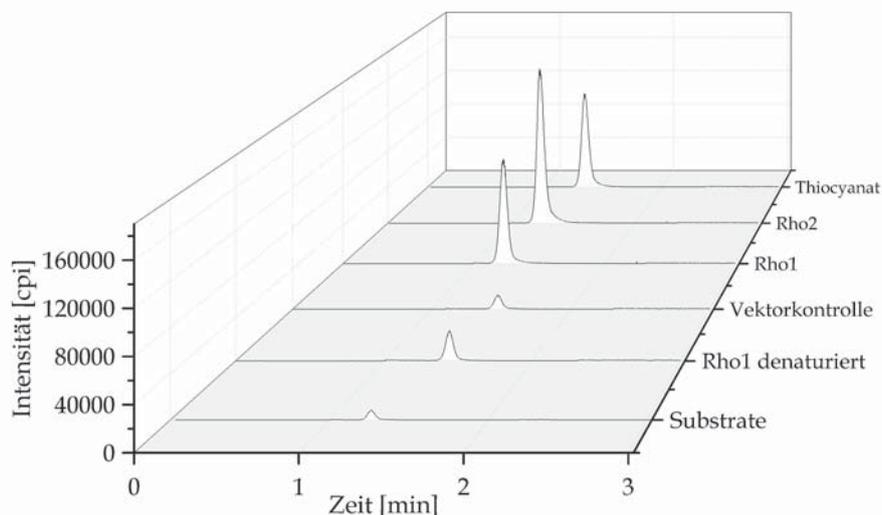


Abbildung 3.14: Thiocyanatbildung durch rekombinante Rhodanesen aus *P. rapae*. Die Messung erfolgte nach Inkubation mit Thiosulfat und Cyanid. Als Negativkontrollen dienten Ansätze mit Vektorkontrolle, denaturierter Rho1 und nur mit Substraten. Die Reaktionsansätze und ein Thiocyanatstandard wurden mittels HPLC-MS/MRM analysiert.

3.1.2.3 Kinetik von Rho1 und Rho2

Zur Charakterisierung der beiden Rhodanesen aus *P. rapae* wurden zunächst für jedes Protein nach heterologer Expression und Aufreinigung die Inkubationszeit und Proteinmenge ermittelt, bei der der Anstieg des Reaktionsproduktes Thiocyanat linear war und gleichzeitig die Absorption in einem gut messbaren Bereich lag. Hierzu wurden zunächst die Proteinmengen bei 10 min Inkubationszeit variiert. Für Rho1 waren 1 μg Protein im linearen Bereich und gut detektierbar (Abbildung 3.15), für Rho2 wurden 0,4 μg ermittelt (Abbildung 3.17). Anschließend wurden diese Proteinmengen in einem Assay mit verschiedenen Inkubationszeiten eingesetzt, für beide Proteine waren 10 min Inkubationszeit im linearen Bereich (Abbildungen 3.16 und 3.18).

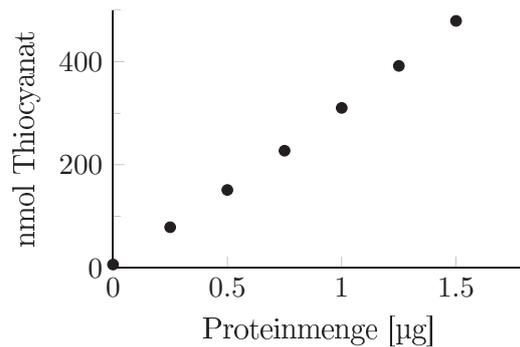


Abbildung 3.15: Rhodanese-Assay von Rho1 mit verschiedenen Proteinmengen und 10 min Inkubationszeit. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

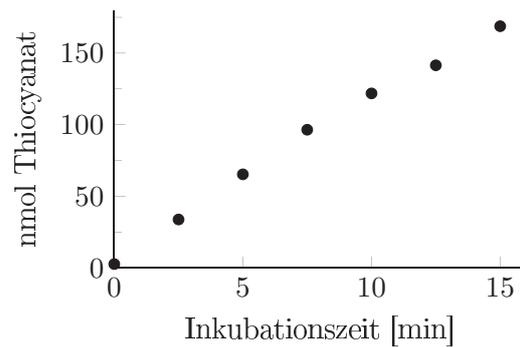


Abbildung 3.16: Rhodanese-Assay von Rho1 mit 0,4 μg Protein und verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

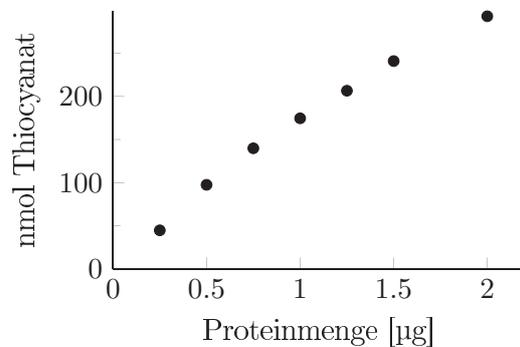


Abbildung 3.17: Rhodanese-Assay von Rho2 mit verschiedenen Proteinmengen und 10 min Inkubationszeit. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

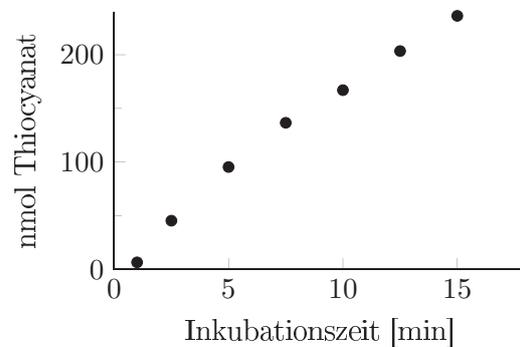


Abbildung 3.18: Rhodanese-Assay von Rho2 mit 1 μg Protein und verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

Zur Ermittlung der kinetischen Parameter wurden die zuvor ermittelten Proteinmengen und Inkubationszeiten verwendet. Für beide Substrate der von der Rhodanese katalysierten Reaktion wurde die Kinetik separat bestimmt. Für Cyanid als Substrat wurde im Assay 50 mM Thiosulfat eingesetzt und die Cyanidkonzentration von 0-70 mM variiert (Abbildungen 3.19 und 3.20). Für Thiosulfat als Substrat wurde Cyanid in einer Konzentration von 70 mM eingesetzt und Thiosulfat von 0-50 mM variiert (Abbildung 3.21). Für Rho1 folgte die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Thiosulfat-Konzentration nicht der Michaelis-Menten-Kinetik.

Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tabelle 3.3: K_m - und V_{max} -Werte von Rho1 und Rho2. Nach Inkubation der rekombinanten Proteine mit Thiosulfat und Cyanid wurde Thiocyanat colorimetrisch bestimmt. Cyanid wurde in einer Konzentration von 70 mM eingesetzt, wenn die Konzentration von Thiosulfat variiert wurde und Thiosulfat wurde in einer Konzentration von 50 mM eingesetzt, wenn die Konzentration von Cyanid variiert wurde. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Wiederholungen \pm Standardfehler. n.d. = nicht detektierbar.

	Thiosulfat		Cyanid	
	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]
Rho1	n.d.	n.d.	$0,03 \pm 0,00$	$3,35 \pm 0,50$
Rho2	$14,17 \pm 1,45$	$0,84 \pm 0,27$	$25,23 \pm 2,60$	$56,16 \pm 10,30$

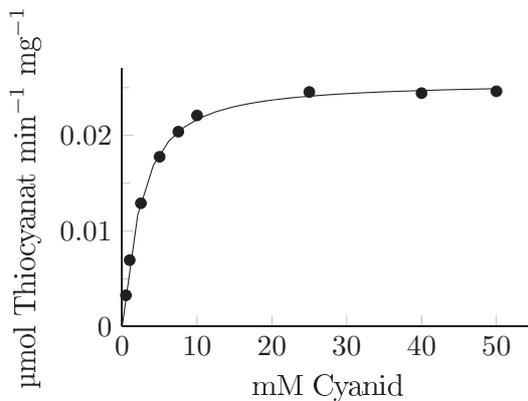


Abbildung 3.19: Michaelis-Menten-Plot für Rho1 und Cyanid. Rho1 wurde 10 min mit 50 mM Thiosulfat und variierenden Cyanidkonzentrationen inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

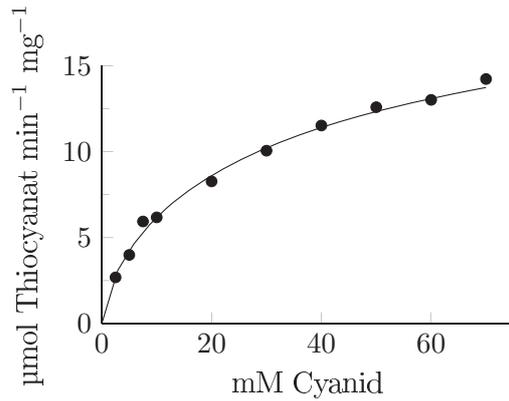


Abbildung 3.20: Michaelis-Menten-Plot für Rho2 und Cyanid. Rho2 wurde 10 min mit 50 mM Thiosulfat und variierenden Cyanidkonzentrationen inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

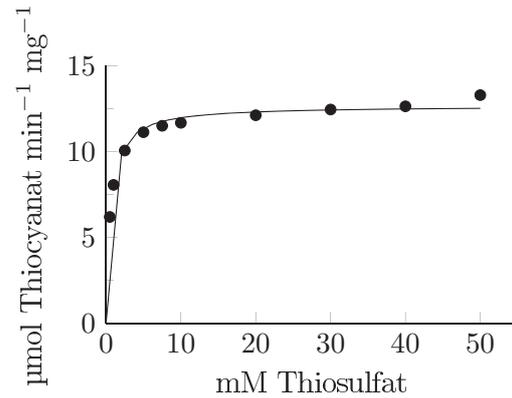


Abbildung 3.21: Michaelis-Menten-Plot für Rho2 und Thiosulfat. Rho2 wurde 10 min mit 70 mM Cyanid und variierenden Thiosulfatkonzentrationen inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

3.1.2.4 Expressionsanalyse von Rho1 und Rho2 in *P. rapae*

Zur Untersuchung der Expression von *Rho1* und *Rho2* wurde ein qPCR-Protokoll entwickelt. Die Primereffizienz wurde unter Verwendung einer Verdünnungsreihe aus gepoolter cDNA des untersuchten Raupenmaterials bestimmt (Tabelle 3.4). Raupen des fünften Larvenstadiums wurden in Kopf, entleerten und gewaschenen Darm und Integument zerteilt. Zusätzlich wurden adulte ganze Schmetterlinge verwendet. Für ein Replikat wurde das Material von drei Raupen bzw. drei Schmetterlingen gepoolt. Die Berechnung der Expression erfolgte unter Normalisierung auf *EF1α* bzw. *GAPDH* als Referenzgen mit einer Variante der ΔC_T -Methode (Abschnitt 2.3.4.6 Formel 7).

Tabelle 3.4: Effizienzen der verwendeten Oligonukleotide für die Expressionsanalyse von *Rho1* und *Rho2*. Die Effizienzen wurden mit einer cDNA-Verdünnungsreihe aus gepoolter cDNA von *P. rapae* bestimmt.

Zielgen	Effizienz
<i>GAPDH</i>	83,7 %
<i>EF1α</i>	92,6 %
<i>Rho1</i>	90,1 %
<i>Rho2</i>	98,5 %

Die Expression beider Gene war im Darmgewebe der Raupen am höchsten, wobei *Rho2* eine deutlich höhere Expression als *Rho1* aufwies. In Kopf und Integument war von den beiden Rhodanese-Genen nur eine geringe Expression detektierbar, welche auch auf Verunreinigung der Gewebe mit Darmzellen durch das Sezieren zurückzuführen sein könnte. In den adulten Schmetterlingen war ebenfalls nur eine geringe Expression von *Rho1* und eine kaum detektierbare Expression von *Rho2* vorhanden (Abbildung 3.22).

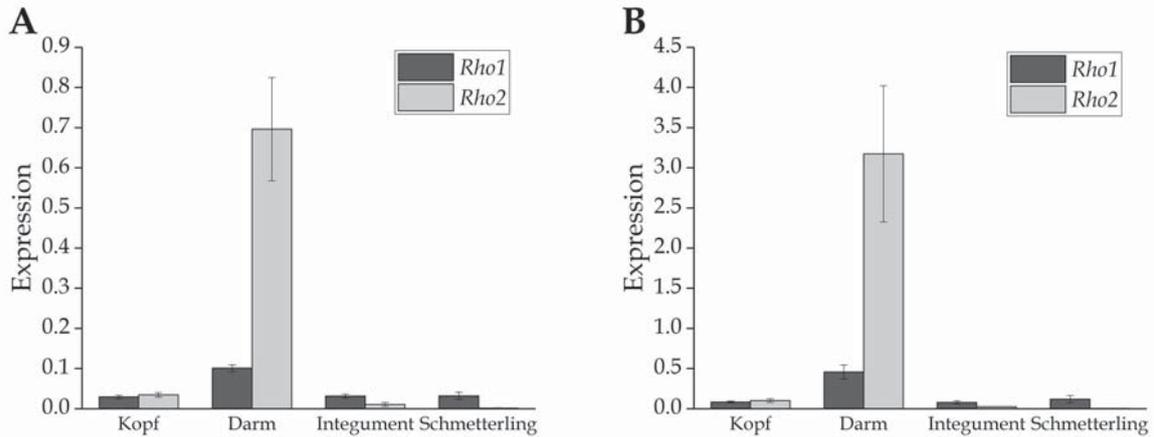


Abbildung 3.22: Expression von *Rho1* und *Rho2* in Raupen und Schmetterlingen von *P. rapae*. Raupen des fünften Larvenstadiums wurden in Kopf, Darm und Integument sezidiert und die RNA isoliert. Zusätzlich wurde RNA aus ganzen Schmetterlingen isoliert. Die C_T -Werte von *Rho1* und *Rho2* wurden auf *EF1 α* (A) und *GAPDH* (B) als Referenzgene normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Replikaten \pm Standardabweichung

3.1.3 Hydroxylierung von aromatischen Nitrilen in *S. littoralis*

Da die α -Hydroxylierung der aromatischen Nitrile in den Raupen von *P. rapae* die Voraussetzung für die Cyanidfreisetzung ist, sollte untersucht werden, ob auch nicht spezialisierte Lepidoptera Enzyme besitzen, die die α -Hydroxylierung katalysieren können (Stauber et al., 2012). Beispielhaft wurde *S. littoralis* untersucht. Darmmikrosomen aus *P. rapae* und *S. littoralis* wurden mit Phenylacetonitril und NADPH inkubiert. Eine α -Hydroxylierung von Phenylacetonitril konnte nur für die Darmmikrosomen aus *P. rapae* durch die Identifizierung des Zerfallsproduktes Benzaldehyd (Schulter bei Minute 9,18) nachgewiesen werden (Abbildung 3.23 A). In den Ansätzen mit *S. littoralis* wurde kein Benzaldehyd gefunden (Abbildung 3.23 B). Die Kontrollansätze mit gekochten Mikrosomen, ohne NADPH und ohne Substrat zeigten für beide Arten keine Bildung von Benzaldehyd. Die Versuche erbrachten also keinen Hinweis auf eine α -Hydroxylase-Aktivität im Darm von *S. littoralis*.

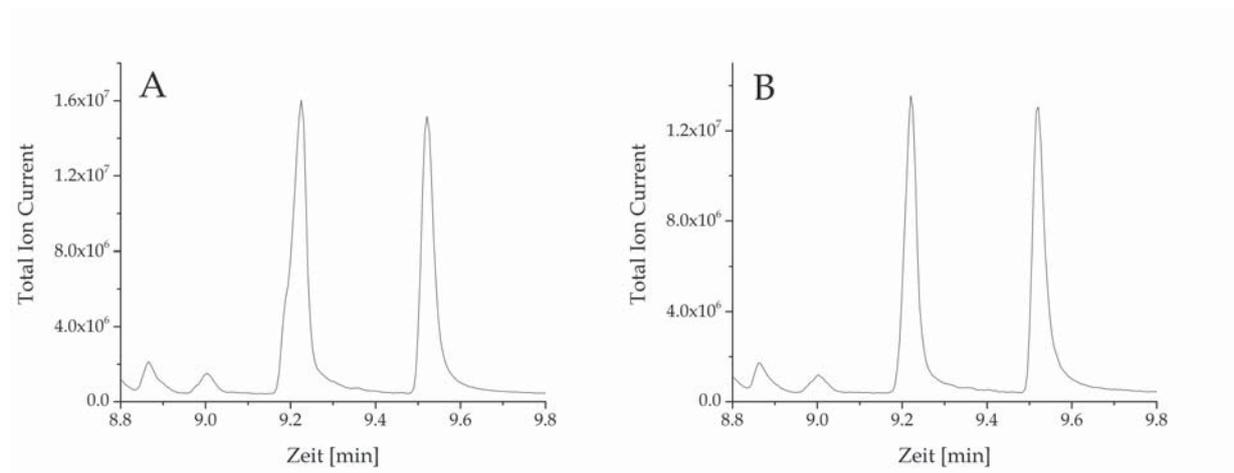


Abbildung 3.23: Hydroxylierung von aromatischen Nitrilen durch Darmmikrosomen von *P. rapae*. Darmmikrosomen aus *P. rapae* (A) und *S. littoralis* (B) wurden mit Phenylacetonitril und NADPH inkubiert und per GC-MS analysiert. Der Peak bei Minute 9,53 entspricht dem internen Standard Benzonitril.

3.2 Cyanidgiftungsenzyme in anderen Lepidoptera-Arten

3.2.1 Rhodanese- und β -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität in Raupen

3.2.1.1 Enzymaktivität in *A. crataegi*

Zur Ermittlung der Aktivität von Rhodanese und β -Cyanoalanin-Synthase wurden acht Raupen von *A. crataegi* im L5-Stadium in Kopf, Darm, Darminhalt und Integument zerteilt und Proteinextrakte aus dem Material hergestellt. In den Proteinextrakten aus *A. crataegi* war Rhodanese-Aktivität nur auf Hintergrundniveau detektierbar (Abbildung 3.24). β -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität war dagegen vorhanden, die höchste Aktivität wurde mit 0,489 nmol Sulfid pro μ g Protein im Proteinextrakt des Darmgewebes gemessen (Abbildung 3.25).

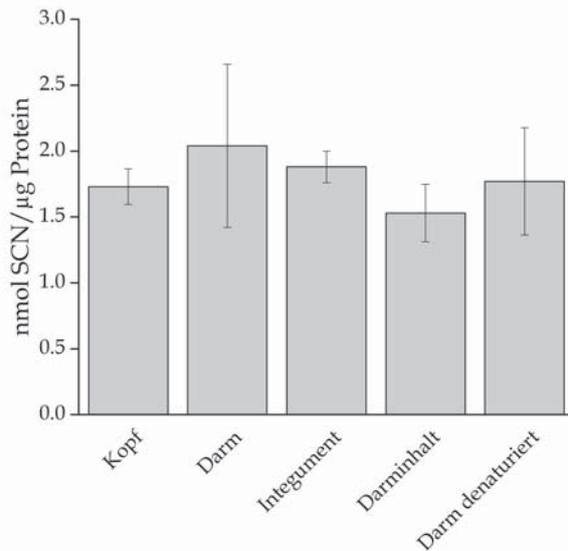


Abbildung 3.24: Rhodanese-Aktivität von Proteinextrakten aus verschiedenen Teilen der Raupen von *A. crataegi*. Proteinextrakte aus Kopf, Darm, Integument und Darminhalt wurden mit Cyanid und Thiosulfat für 120 min inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier bis acht Raupen \pm Standardfehler.

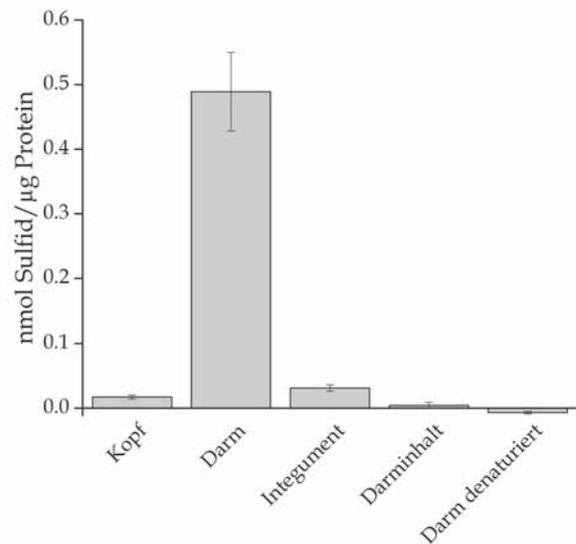


Abbildung 3.25: β -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität von Proteinextrakten aus verschiedenen Teilen der Raupen von *A. crataegi*. Proteinextrakte aus Kopf, Darm, Integument und Darminhalt wurden mit Cyanid und Cystein in Gegenwart von Pyridoxalphosphat für 120 min inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus fünf bis acht Raupen \pm Standardfehler.

3.2.1.2 Enzymaktivität in *C. croceus*

Zur Ermittlung der Aktivität von Rhodanese und β -Cyanoalanin-Synthase wurden vier Raupen von *C. croceus* im L5-Stadium in Kopf, Darm, Darminhalt und Integument zerteilt und Proteinextrakte aus dem Material hergestellt. In den Proteinextrakten aus *C. croceus* war Rhodanese-Aktivität nur auf Hintergrundniveau detektierbar (Abbildung 3.26). β -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität war dagegen vorhanden, die höchste Aktivität wurde auch hier im Proteinextrakt des Darmgewebes gemessen, sie lag mit 0,192 nmol Sulfid pro μg Protein deutlich unter der Aktivität, die in den Raupen von *A. crataegi* gemessen wurde (Abbildungen 3.25 und 3.27).

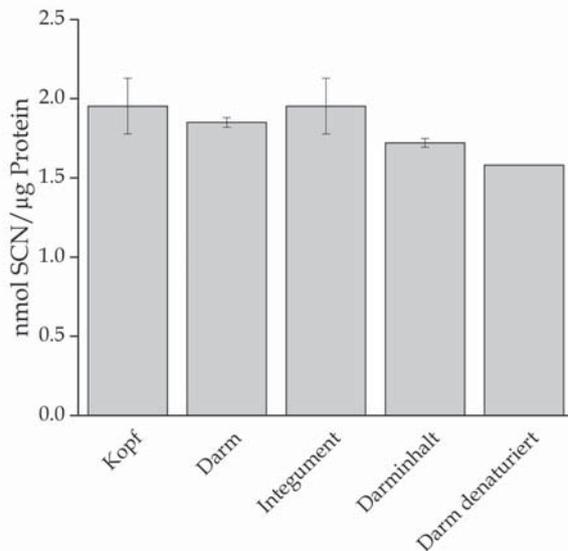


Abbildung 3.26: Rhodanese-Aktivität von Proteinextrakten aus verschiedenen Teilen der Raupen von *C. croceus*. Proteinextrakte aus Kopf, Darm, Integument und Darminhalt wurden mit Cyanid und Thiosulfat für 120 min inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier Raupen \pm Standardfehler.

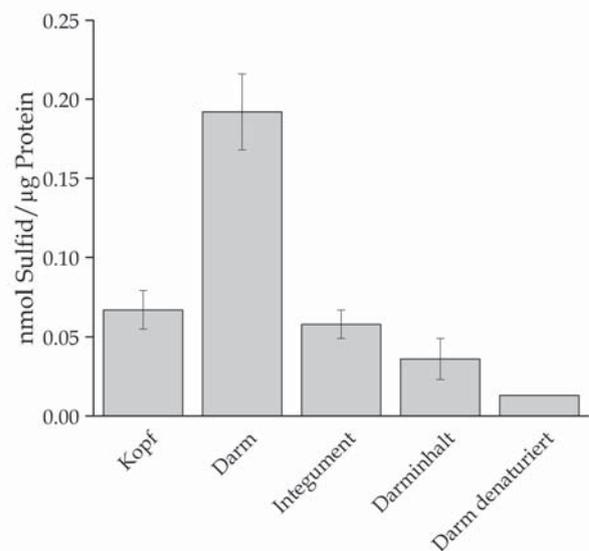


Abbildung 3.27: β -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität von Proteinextrakten aus verschiedenen Teilen der Raupen von *C. croceus*. Proteinextrakte aus Kopf, Darm, Integument und Darminhalt wurden mit Cyanid und Cystein in Gegenwart von Pyridoxalphosphat für 120 min inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier Raupen \pm Standardfehler.

3.2.1.3 Enzymaktivität in *S. littoralis*

Zur Ermittlung der Aktivität von Rhodanese und β -Cyanoalanin-Synthase wurden fünf Raupen von *S. littoralis* im L5-Stadium in Kopf, Darm, Darminhalt und Integument zerteilt und Proteinextrakte aus dem Material hergestellt. In den Proteinextrakten aus *S. littoralis* war sowohl eine Rhodanese-Aktivität (Abbildung 3.28) als auch β -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität (Abbildung 3.29) vorhanden, die höchste Aktivität beider Enzyme wurde im Proteinextrakt des Darmgewebes gemessen. Die Rhodanese-Aktivität lag bei 4,2 nmol Thiocyanat pro μg Protein, die β -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität lag mit 0,182 nmol Sulfid pro μg Protein ungefähr im gleichen Bereich wie im Darmgewebe der Raupen von *C. croceus* (Abbildung 3.27).

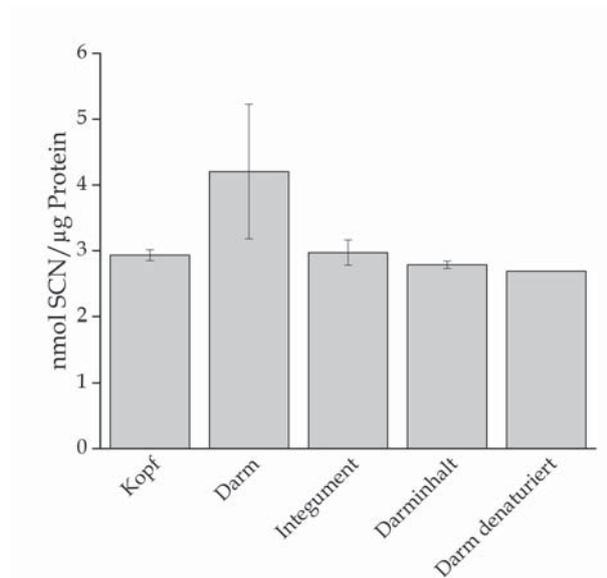


Abbildung 3.28: Rhodanese-Aktivität von Proteinextrakten aus verschiedenen Teilen der Raupen von *S. littoralis*. Proteinextrakte aus Kopf, Darm, Integument und Darminhalt wurden mit Cyanid und Thiosulfat für 120 min inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus fünf Raupen \pm Standardfehler.

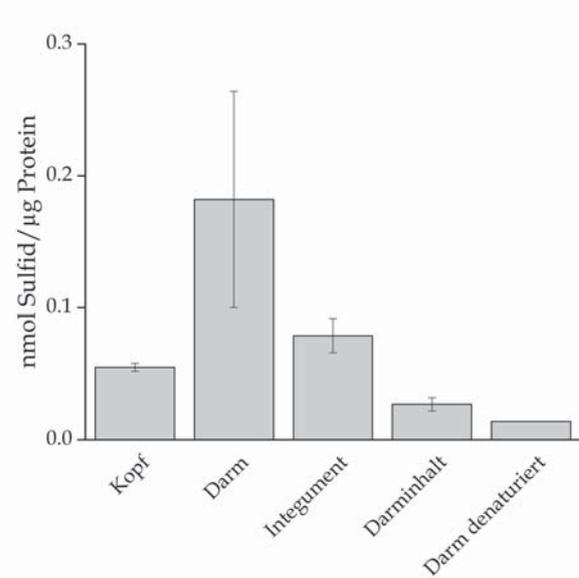


Abbildung 3.29: β -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität von Proteinextrakten aus verschiedenen Teilen der Raupen von *S. littoralis*. Proteinextrakte aus Kopf, Darm, Integument und Darminhalt wurden mit Cyanid und Cystein in Gegenwart von Pyridoxalphosphat für 120 min inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus fünf Raupen \pm Standardfehler.

3.2.2 Klonierung von β -Cyanoalanin-Synthasen

3.2.2.1 Vervollständigung von *AcaBSAS1-AcaBSAS3* aus *A. cardamines*

Die drei partiellen cDNA-Sequenzen putativer β -Cyanoalanin-Synthasen aus *A. cardamines*, welche von Maïke van Ohlen identifiziert und *AcaBSAS1*, *AcaBSAS2* und *AcaBSAS3* benannt wurden, wurden mittels 5'-RACE vervollständigt. Hierbei wurde mit einem genspezifischen Primer der Bereich über das Startcodon hinaus bis 62 bp (*AcaBSAS1*), 54 bp (*AcaBSAS2*) bzw. 49 bp (*AcaBSAS3*) in die 5'UTR vervollständigt. Die drei cDNAs besitzen untereinander eine Identität von 67 bis 69 % auf Nukleotidebene und codieren für Enzyme mit einer Länge von 325 bis 326 Aminosäuren.

3.2.2.2 Klonierung von *AcrBSAS1-AcrBSAS3* aus *A. crataegi*

Zur Identifizierung von β -Cyanoalanin-Synthasen aus *A. crataegi* wurde aus dem Darmgewebe RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde anschließend in eine PCR mit neun verschiedenen Kombinationen aus degenerierten Oligonukleotiden eingesetzt (Tabelle 2.1), wobei bei den Kombinationen 2 bis 9 PCR-Produkte der erwarteten Länge erhalten wurden. Die Sequenzierung dieser PCR-Produkte ergab drei verschiedene cDNA-Fragmente mit einer hohen Identität zu den bekannten β -Cyanoalanin-Synthasen aus *P. rapae*. Dies deutete darauf hin, dass die Fragmente einen Teil des ORF von drei verschiedenen β -Cyanoalanin-Synthasen aus *A. crataegi* darstellen, welche nachfolgend auf Basis der Sequenzidentität mit *PrBSAS1-PrBSAS3*, *AcrBSAS1*, *AcrBSAS2* und *AcrBSAS3* genannt wurden. Das Fragment von *AcrBSAS1* wurde durch die Oligonukleotid-Kombinationen 1, 3 und 7 erhalten, *AcrBSAS2* durch die Kombination 4 und *AcrBSAS3* durch die Kombination 9. Die drei partiellen cDNAs wurden mittels RACE vervollständigt. Die 3'-Enden wurden mit genspezifischen Oligonukleotiden in einer 3'RACE identifiziert. Hierbei wurde der Bereich über das Stoppcodon hinaus bis zum Poly(A)-Schwanz vervielfältigt. Für die 5'-Enden wurde in einer 5'RACE mit einem genspezifischen Primer der Bereich über das Startcodon hinaus bis 59 bp (*AcrBSAS1*), 113 bp (*AcrBSAS2*) bzw. 88 bp (*AcrBSAS3*) in die 5'UTR vervollständigt. Die Gesamtsequenzen wurden noch einmal in einer unabhängigen PCR bestätigt. Die drei cDNAs besitzen untereinander eine Identität von 66 bis 68 % auf Nukleotidebene und codieren für Enzyme mit einer Länge von 324 bis 326 Aminosäuren.

3.2.2.3 Klonierung von *CcBSAS2-CcBSAS3* aus *C. croceus*

Zur Identifizierung von β -Cyanoalanin-Synthasen aus *C. croceus* wurde aus dem Darmgewebe RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde anschließend in eine PCR mit neun verschiedenen Kombinationen aus degenerierten Oligonukleotiden eingesetzt (Tabelle 2.1), wobei bei allen Kombinationen PCR-Produkte der erwarteten Länge erhalten wurden. Die Sequenzierung dieser PCR-Produkte ergab zwei verschiedene cDNA-Fragmente mit einer hohen Identität zu den bekannten β -Cyanoalanin-Synthasen aus *P. rapae*. Dies deutete darauf hin, dass die Fragmente einen Teil des ORF von zwei verschiedenen β -Cyanoalanin-Synthasen aus *C. croceus* darstellen, welche nachfolgend auf Basis der Sequenzidentität mit *PrBSAS2* und *PrBSAS3*, *CcBSAS2* und *CcBSAS3* genannt wurden. Das Fragment von *CcBSAS2* wurde durch die Oligonukleotid-Kombinationen 2 bis 5 sowie 7 bis 9, *CcBSAS3* durch die Kombination 6 erhalten. Die zwei partiellen cDNAs wurden mittels RACE vervollständigt. Die 3'-Enden wurden mit genspezifischen Oligonukleotiden in einer 3'RACE identifiziert. Hierbei wurde der Bereich über das Stoppcodon hinaus bis zum Poly(A)-Schwanz vervielfältigt. Für die 5'-Enden wurde in einer 5'RACE mit einem genspezifischen Primer der Bereich über das Startcodon hinaus bis 49 bp (*CcBSAS2*) bzw. 89 bp (*CcBSAS3*) in die 5'UTR vervollständigt. Die Gesamtsequenzen wurden noch einmal in einer unabhängigen PCR bestätigt. Die beiden cDNAs besitzen untereinander eine Identität von 68 % auf Nukleotidebene und codieren für Enzyme mit einer Länge von 334 bzw. 326 Aminosäuren.

3.2.2.4 Klonierung von *GrBSAS2-GrBSAS3* aus *G. rhamni*

Zur Identifizierung von β -Cyanoalanin-Synthasen aus *G. rhamni* wurde aus dem Darmgewebe RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde anschließend in eine PCR mit neun verschiedenen Kombinationen aus degenerierten Oligonukleotiden eingesetzt (Tabelle 2.1), wobei bei allen Kombinationen PCR-Produkte der erwarteten Länge erhalten wurden. Die Sequenzierung dieser PCR-Produkte ergab zwei verschiedene cDNA-Fragmente mit einer hohen Identität zu den bekannten β -Cyanoalanin-Synthasen aus *P. rapae*. Dies deutete darauf hin, dass die Fragmente einen Teil des ORF von zwei verschiedenen β -Cyanoalanin-Synthasen aus *G. rhamni* darstellen, welche nachfolgend auf Basis der Sequenzidentität mit *PrBSAS2* und *PrBSAS3* *GrBSAS2* und *GrBSAS3* genannt wurden. Das Fragment von *GrBSAS2* wurde durch die Kombinationen 2, 5, 8 und 9, *GrBSAS3* durch die Oligonukleotid-Kombinationen 1 und 4 erhalten. Die zwei partiellen cDNAs wurden mittels RACE vervollständigt. Die 3'-Enden wurden mit genspezifischen Oligonukleotiden in einer 3'RACE identifiziert. Hierbei wurde der Bereich über das Stoppcodon hinaus bis zum Poly(A)-Schwanz vervielfältigt. Für die 5'-Enden wurde in einer 5'RACE mit einem genspezifischen Primer der Bereich über das Startcodon hinaus bis 261 bp (*GrBSAS2*) bzw. 66 bp (*GrBSAS3*) in die 5'UTR vervollständigt. Die Gesamtsequenzen wurden noch einmal in einer unabhängigen PCR bestätigt. Die beiden cDNAs besitzen untereinander eine Identität von 68 % auf Nukleotidebene und codieren für Enzyme mit einer Länge von 325 bzw. 326 Aminosäuren.

3.2.2.5 Vervollständigung von *ZfBSAS2* aus *Z. filipendulae*

Zwei partielle Nukleotidsequenzen putativer β -Cyanoalanin-Synthasen aus *Z. filipendulae* wurden einer EST-Datenbank entnommen (Zagobelny et al., 2009). Es zeigte sich, dass beide Fragmente die gleiche cDNA repräsentieren. Durch 5'RACE wurde das fehlende Zwischenstück sowie der 5'UTR bis 70 bp über das Startcodon hinaus vervollständigt. Die Gesamtsequenz wurde noch einmal in einer unabhängigen PCR bestätigt. Die erhaltene Sequenz wies eine hohe Identität zu *PrBSAS2* auf und wurde *ZfBSAS2* genannt. Sie codiert für ein Enzym mit einer Länge von 329 Aminosäuren.

3.2.2.6 Klonierung von *SIBSAS2a-SIBSAS2b* aus *S. littoralis*

Zur Identifizierung von β -Cyanoalanin-Synthasen aus *S. littoralis* wurde aus dem Darmgewebe RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese wurde anschließend in eine PCR mit neun verschiedenen Kombinationen aus degenerierten Oligonukleotiden eingesetzt (Tabelle 2.1), wobei bei allen Kombinationen PCR-Produkte der erwarteten Länge erhalten wurden. Die Sequenzierung dieser PCR-Produkte ergab zwei verschiedene cDNA-Fragmente mit einer hohen Identität zu den bekannten β -Cyanoalanin-Synthasen aus *P. rapae*. Dies deutete darauf hin, dass die Fragmente einen Teil des ORF von zwei verschiedenen β -Cyanoalanin-Synthasen aus *S. littoralis* darstellen, welche nachfolgend auf Basis der Sequenzidentität mit *PrBSAS2* *SIBSAS2a* und *SIBSAS2b* genannt wurden. Das Fragment von *SIBSAS2a* wurde durch die Oligonukleotid-Kombinationen 5 und 9 erhalten, *SIBSAS2b* durch die Kombinationen 2, 4, 6 und 7. Die zwei partiellen cDNAs wurden mittels RACE vervollständigt. Die 3'-Enden wurden mit genspezifischen Oligonukleotiden in einer 3'RACE identifiziert. Hierbei wurde der Bereich über das Stoppcodon hinaus bis zum Poly(A)-Schwanz vervielfältigt. Für die 5'-Enden wurde in einer 5'RACE mit genspezifischen Primern die Bereiche über das Startcodon hinaus bis 80 bp bzw. 71 bp in die 5'UTR vervollständigt. Die Gesamtsequenzen wurden noch einmal in einer unabhängigen PCR bestätigt. Die beiden cDNAs besitzen untereinander eine Identität von 88,6 % auf Nukleotidebene und codieren für Enzyme mit einer Länge von 332 bzw. 335 Aminosäuren.

3.2.2.7 *PxBSAS2* aus *P. xylostella*

Von Maïke van Ohlen wurde der vollständige ORF einer putativen β -Cyanoalanin-Synthase kloniert, welcher auf Basis der Sequenzidentität mit *PrBSAS2* *PxBSAS2* genannt wurde und für ein Enzym mit einer Länge von 322 Aminosäuren codiert.

3.2.3 Nachweis der β -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität der in Lepidoptera identifizierten Proteine mittels HPLC-MS/MS

Die gefundenen Sequenzen wurden in den Expressionsvektor pET52b(+)-modII kloniert und heterolog in *E. coli* BL21(DE3)pLysS exprimiert. Zur Überprüfung der Reinheit der rekombinanten Proteine wurden diese nach der Aufreinigung mittels SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert (Abbildung 3.30).

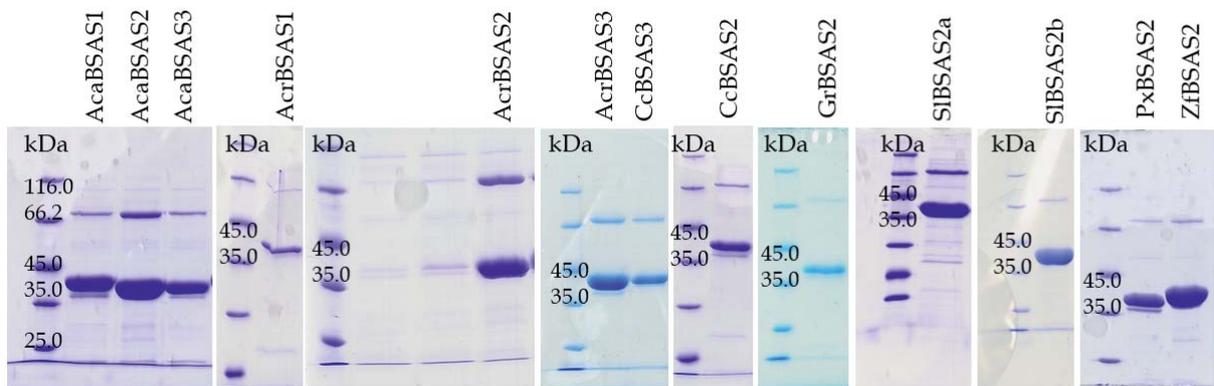


Abbildung 3.30: SDS-Gele der aufgereinigten rekombinanten β -Cyanoalanin-Synthasen. Die Enzyme wurden nach der Expression und Aufreinigung mittels SDS-PAGE aufgetrennt, zur Abschätzung der Größe wurde ein Marker aufgetragen.

Zum selektiven Nachweis des Reaktionsproduktes β -Cyanoalanin wurden die aufgereinigten Enzyme für 10 min mit den beiden Substraten Cyanid und Cystein und dem Cofaktor Pyridoxalphosphat inkubiert und die Reaktionsansätze per HPLC-MS/MRM analysiert. Der für β -Cyanoalanin erwartete Übergang (m/z 112,7– m/z 95,9) wurde für alle untersuchten Enzyme nachgewiesen, nicht jedoch in den Negativkontrollen mit denaturiertem Enzym oder den vereinigten Elutionsfraktionen der leeren Vektorkontrolle (Abbildungen 3.31 und 3.32).

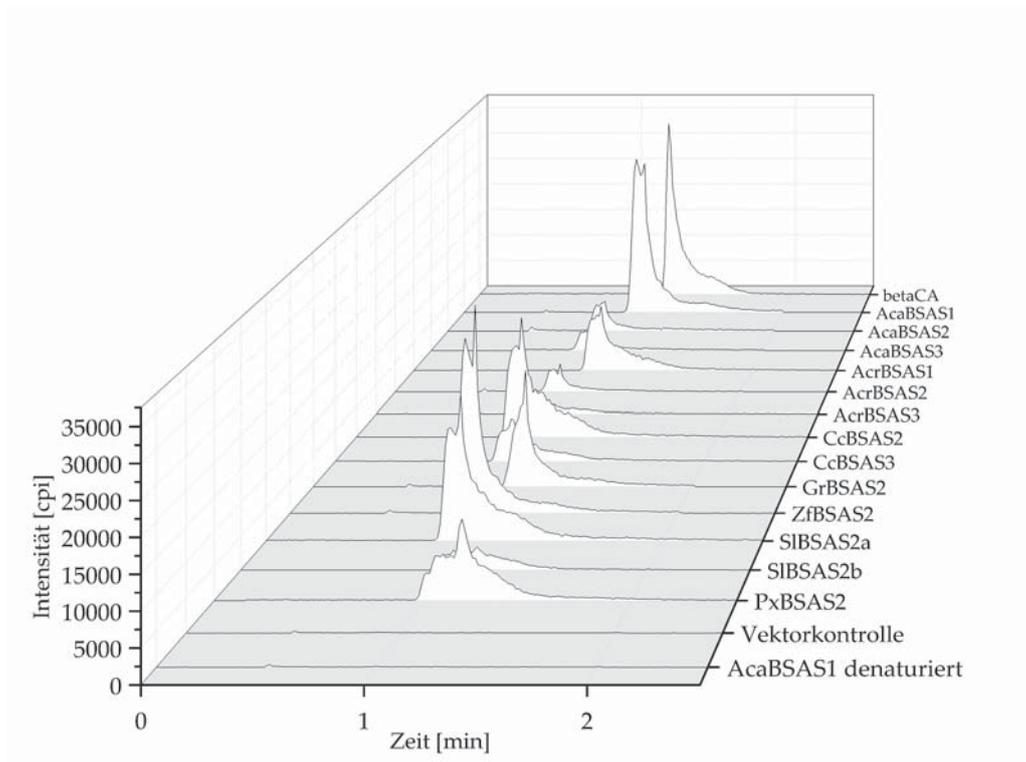


Abbildung 3.31: β -Cyanoalaninbildung durch rekombinante β -Cyanoalanin-Synthetasen aus Lepidoptera. Die Messung erfolgte mit den gereinigten Proteinen nach Inkubation mit Cystein und Cyanid in Gegenwart von Pyridoxalphosphat. Als Negativkontrollen dienten Ansätze mit Vektorkontrolle und denaturiertem AcaBSAS1. Die Reaktionsansätze und ein β -Cyanoalanin-Standard (betaCA) wurden mittels HPLC-MS/MRM analysiert.

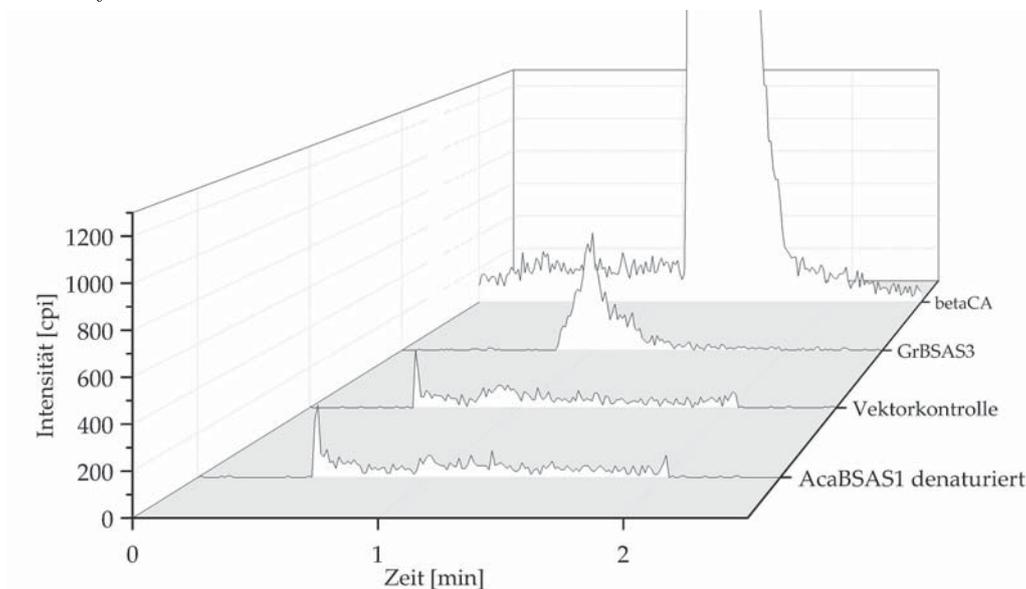


Abbildung 3.32: β -Cyanoalaninbildung durch GrBSAS3. Die Messung erfolgte nach Inkubation mit Cystein und Cyanid in Gegenwart von Pyridoxalphosphat. Als Negativkontrollen dienten Ansätze mit Vektorkontrolle und denaturiertem AcaBSAS1. Die Reaktionsansätze und ein β -Cyanoalanin-Standard (betaCA) wurden mittels HPLC-MS/MRM analysiert.

3.2.4 Phylogenetische Analyse von β -Cyanoalanin-Synthasen aus Lepidoptera

Die erhaltenen Aminosäuresequenzen der β -Cyanoalanin-Synthasen wurden mit dem Programm MEGA7 phylogenetisch analysiert, nachdem mit dem MUSCLE Algorithmus ein Alignment erstellt wurde (Kumar et al., 2016). In die Analyse wurden weitere uncharakterisierte Proteine mit Ähnlichkeit zu β -Cyanoalanin-Synthasen eingeschlossen, welche durch BLASTp-Suchen mit PrBSAS1 in Genomdatenbanken von Lepidoptera gefunden wurden. Außerdem wurden charakterisierte β -Cyanoalanin-Synthasen aus Milben (Wybouw et al., 2014) und uncharakterisierte Proteine aus Bakterien verwendet. Der Maximum-Likelihood-Baum wurde mit 1000 Bootstrap-Replikaten und dem Jones-Taylor-Thornton (JTT) Substitutionsmodell generiert. Die Enzyme aus den analysierten Lepidoptera-Arten bildeten einen von den Milbensequenzen separaten Zweig. Die β -Cyanoalanin-Synthasen aus Lepidoptera gruppieren sich in drei Gruppen (Abbildung 3.33). Die erste Gruppe enthielt PrBSAS2 und Vertreter aus allen untersuchten Arten, die zweite Gruppe mit PrBSAS3 war auf Enzyme aus Vertretern der Pieridae beschränkt. Die dritte Gruppe, welche auch PrBSAS1 enthielt, wurde lediglich von Homologen gebildet, die in Arten der Unterfamilie Pierinae vorkamen.

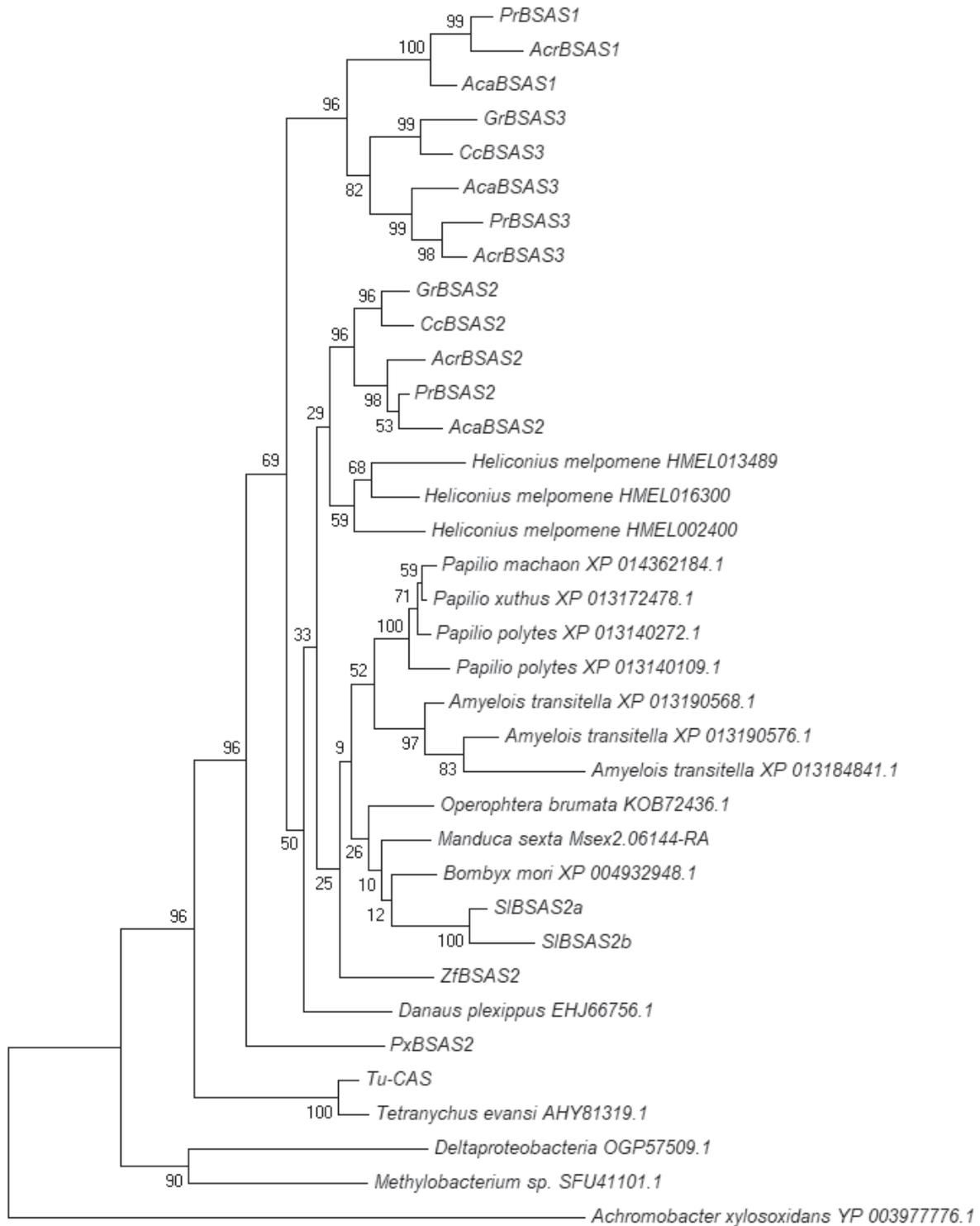


Abbildung 3.33: Phylogenetische Analyse von charakterisierten β -Cyanoalanin-Synthasen aus Lepidoptera und Milben und uncharakterisierten Homologen aus Lepidoptera. Uncharakterisierte bakterielle Proteine wurden als Wurzel verwendet. Der Maximum-Likelihood-Baum wurde mit 1000 Bootstrap-Replikaten generiert. Die Länge der Äste korreliert mit der Anzahl der Substitutionen entsprechend dem gezeigten Maßstab.

3.2.5 Kinetische Charakterisierung der β -Cyanoalanin-Synthasen aus Lepidoptera

3.2.5.1 Kinetik von AcaBSAS1-AcaBSAS3 aus *A. cardamines*

Zur Charakterisierung von AcaBSAS1-AcaBSAS3 wurden zunächst für jedes Protein nach heterologer Expression in *E. coli* und anschließender Aufreinigung die Inkubationszeit und Proteinmenge ermittelt, bei der der Anstieg des Reaktionsproduktes Sulfid linear war und gleichzeitig die Absorption in einem gut messbaren Bereich lag. Hierzu wurden zunächst die Proteinmengen bei 10 min Inkubationszeit variiert. Für AcaBSAS1 waren 0,25 μg Protein im linearen Bereich und gut detektierbar (Abbildung 3.34), für AcaBSAS2 und AcaBSAS3 wurden 2,5 μg Protein ermittelt (Abbildungen 3.36 und 3.38). Anschließend wurden diese Proteinmengen in einem Assay mit verschiedenen Inkubationszeiten eingesetzt, für alle drei Proteine waren 10 min Inkubationszeit im linearen Bereich (Abbildungen 3.35, 3.37 und 3.39).

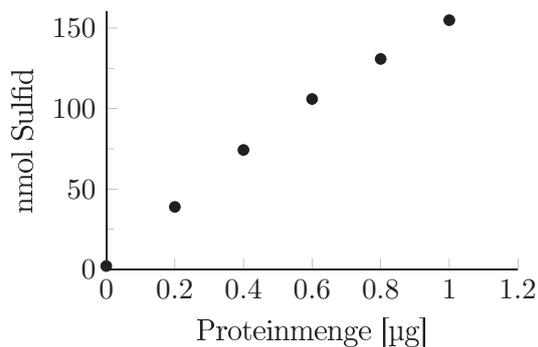


Abbildung 3.34: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcaBSAS1 mit verschiedenen Proteinmengen und 10 min Inkubationszeit. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

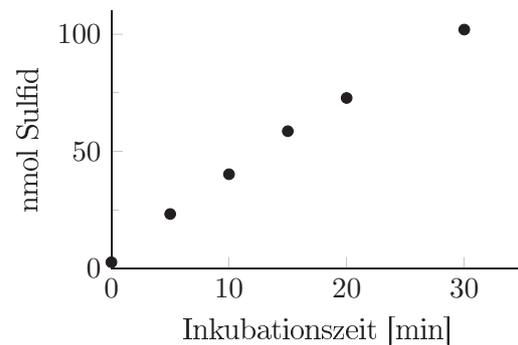


Abbildung 3.35: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcaBSAS1 mit 0,25 μg Protein und verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

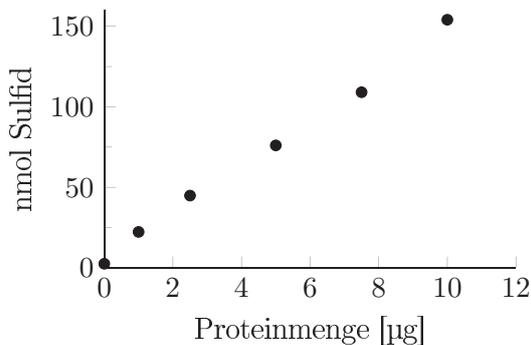


Abbildung 3.36: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcaBSAS2 mit verschiedenen Proteinmengen und 10 min Inkubationszeit. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

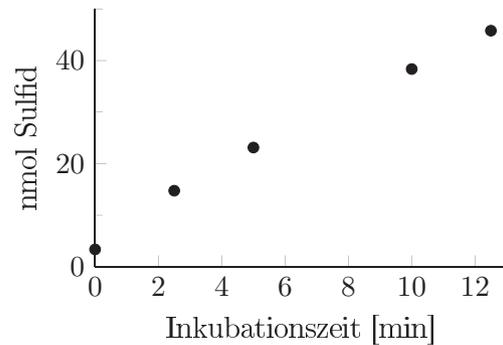


Abbildung 3.37: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcaBSAS2 mit 2,5 μg Protein und verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

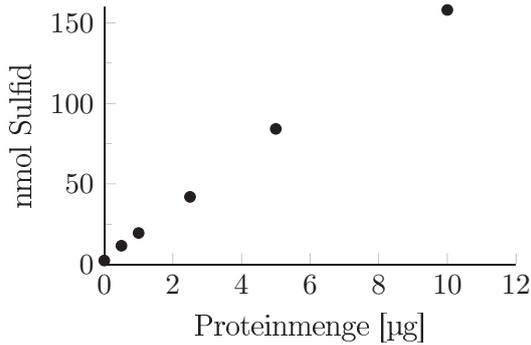


Abbildung 3.38: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcaBSAS3 mit verschiedenen Proteinmengen und 10 min Inkubationszeit. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

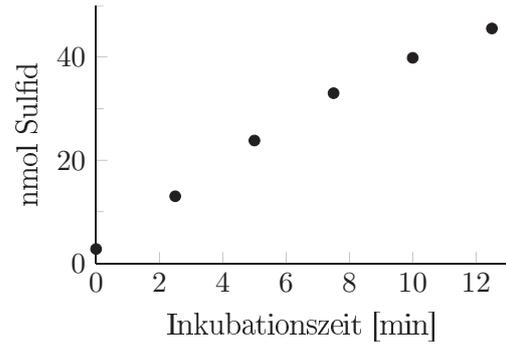


Abbildung 3.39: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcaBSAS3 mit 2,5 μ g Protein und verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

Zur Ermittlung der kinetischen Parameter wurden die zuvor ermittelten Proteinmengen und Inkubationszeiten verwendet. Für beide Substrate der von der β -Cyanoalanin-Synthase katalysierten Reaktion wurde die Kinetik separat bestimmt. Für Cystein als Substrat wurde Cyanid in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt und Cystein von 0-6 mM variiert (Abbildungen 3.40, 3.42 und 3.44). Für Cyanid als Substrat wurde im Assay 6 mM Cystein eingesetzt und die Cyanidkonzentration von 0-6 mM (AcaBSAS1), 0-0,4 mM (AcaBSAS2) bzw. 0-4 mM (AcaBSAS3) variiert (Abbildungen 3.41, 3.43 und 3.45). Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.5: K_m - und V_{max} -Werte von AcaBSAS1-AcaBSAS3. Nach Inkubation der rekombinanten Proteine mit Cystein und Cyanid in der Gegenwart von Pyridoxalphosphat wurde Sulfid colorimetrisch bestimmt. Cyanid wurde in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt, wenn die Konzentration von Cystein variiert wurde und Cystein wurde in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt, wenn die Konzentration von Cyanid variiert wurde. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Wiederholungen \pm Standardfehler.

	Cystein		Cyanid	
	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]
AcaBSAS1	23,77 \pm 1,35	0,41 \pm 0,01	16,18 \pm 1,50	1,95 \pm 0,37
AcaBSAS2	1,76 \pm 0,21	0,44 \pm 0,00	0,58 \pm 0,07	0,03 \pm 0,00
AcaBSAS3	1,41 \pm 0,19	0,96 \pm 0,04	0,22 \pm 0,03	0,61 \pm 0,03

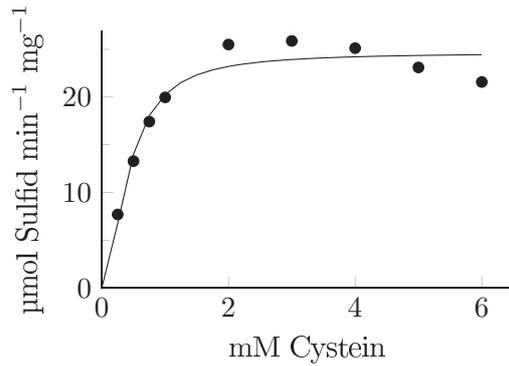


Abbildung 3.40: Michaelis-Menten-Plot für AcaBSAS1 und Cystein. AcaBSAS1 wurde 10 min mit 6 mM Cyanid und variierenden Cysteinkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

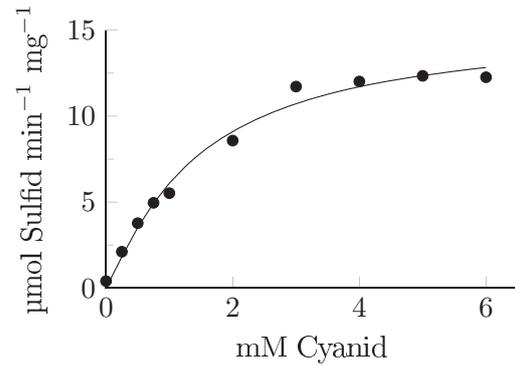


Abbildung 3.41: Michaelis-Menten-Plot für AcaBSAS1 und Cyanid. AcaBSAS1 wurde 10 min mit 6 mM Cystein und variierenden Cyanidkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

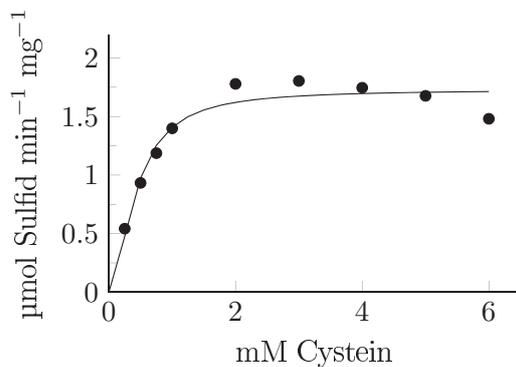


Abbildung 3.42: Michaelis-Menten-Plot für AcaBSAS2 und Cystein. AcaBSAS2 wurde 10 min mit 6 mM Cyanid und variierenden Cysteinkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

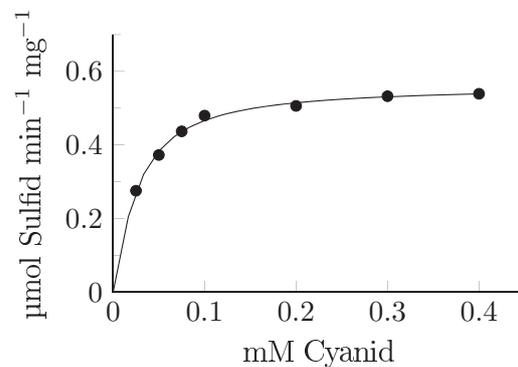


Abbildung 3.43: Michaelis-Menten-Plot für AcaBSAS2 und Cyanid. AcaBSAS2 wurde 10 min mit 6 mM Cystein und variierenden Cyanidkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

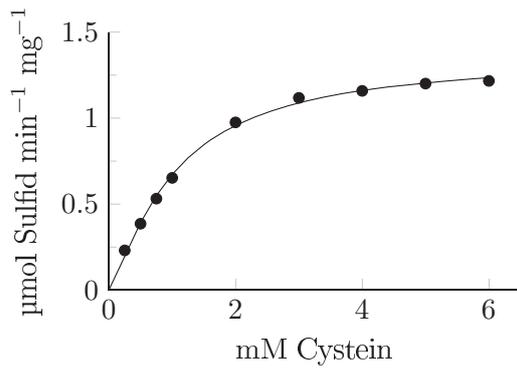


Abbildung 3.44: Michaelis-Menten-Plot für AcaBSAS3 und Cystein. AcaBSAS3 wurde 10 min mit 6 mM Cyanid und variierenden CysteinKonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

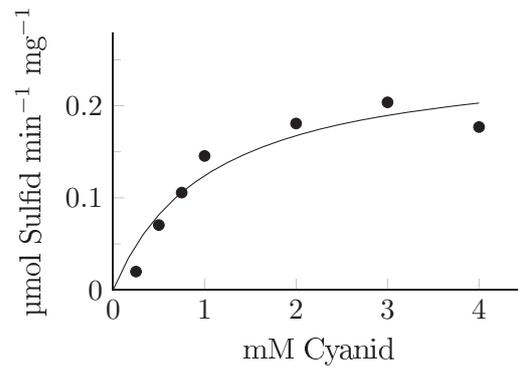


Abbildung 3.45: Michaelis-Menten-Plot für AcaBSAS3 und Cyanid. AcaBSAS3 wurde 10 min mit 6 mM Cystein und variierenden Cyanidkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

3.2.5.2 Kinetik von AcrBSAS1-AcrBSAS3 aus *A. crataegi*

Zur Charakterisierung von AcrBSAS1-AcrBSAS3 wurden zunächst für jedes Protein nach heterologer Expression in *E. coli* und anschließender Aufreinigung die Inkubationszeit und Proteinmenge ermittelt, bei der der Anstieg des Reaktionsproduktes Sulfid linear war und gleichzeitig die Absorption in einem gut messbaren Bereich lag. Hierzu wurden zunächst die Proteinmengen bei 10 min Inkubationszeit variiert. Für AcrBSAS1 waren 0,2 µg Protein im linearen Bereich und gut detektierbar (Abbildung 3.46), für AcrBSAS2 wurden 2 µg (Abbildung 3.48) und für AcrBSAS3 5 µg Protein ermittelt (Abbildung 3.50). Anschließend wurden diese Proteinmengen in einem Assay mit verschiedenen Inkubationszeiten eingesetzt, für alle drei Proteine waren 10 min Inkubationszeit im linearen Bereich (Abbildungen 3.47, 3.49 und 3.51).

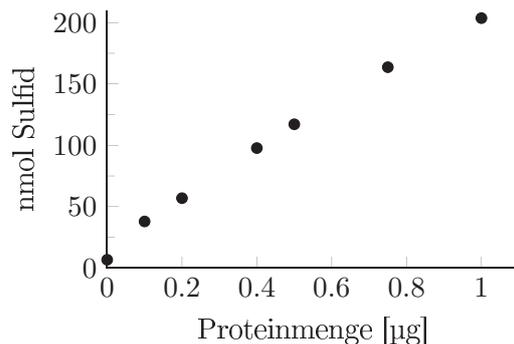


Abbildung 3.46: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcrBSAS1 mit verschiedenen Proteinmengen und 10 min Inkubationszeit. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

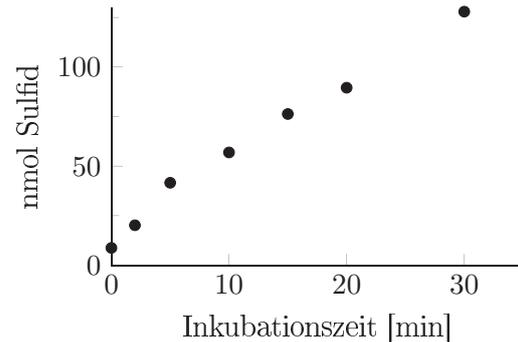


Abbildung 3.47: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcrBSAS1 mit 0.2 µg Protein und verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

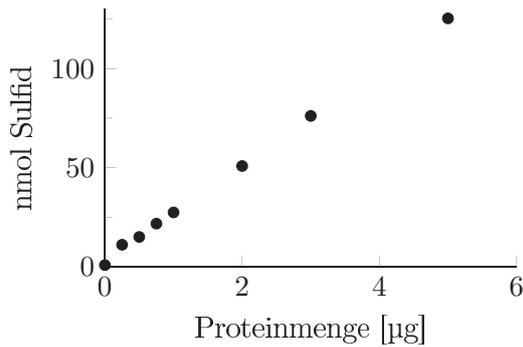


Abbildung 3.48: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcrBSAS2 mit verschiedenen Proteinmengen und 10 min Inkubationszeit. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

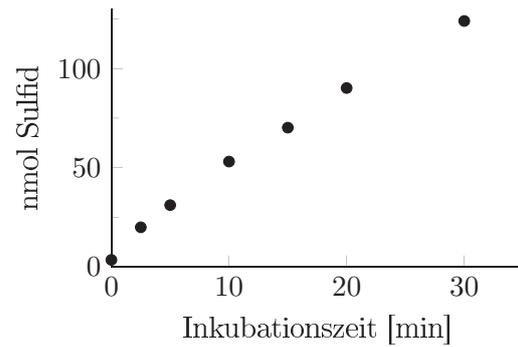


Abbildung 3.49: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcrBSAS2 mit 2 μ g Protein und verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

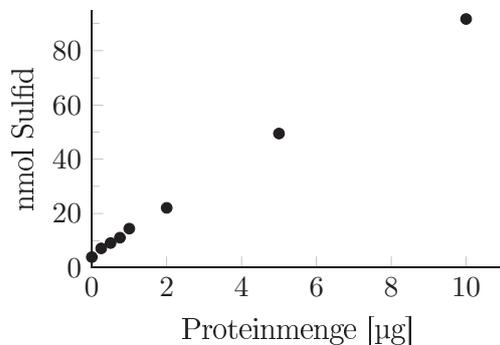


Abbildung 3.50: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcrBSAS3 mit verschiedenen Proteinmengen und 10 min Inkubationszeit. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

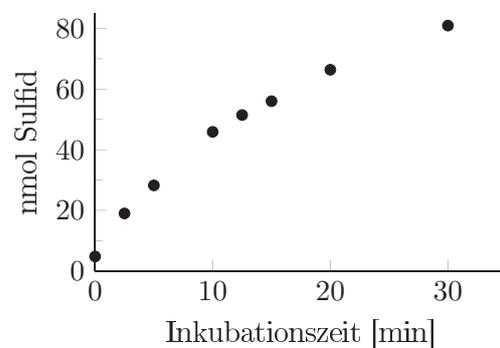


Abbildung 3.51: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von AcrBSAS3 mit 5 μ g Protein und verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

Zur Ermittlung der kinetischen Parameter wurden die zuvor ermittelten Proteinmengen und Inkubationszeiten verwendet. Für beide Substrate der von der β -Cyanoalanin-Synthase katalysierten Reaktion wurde die Kinetik separat bestimmt. Für Cystein als Substrat wurde Cyanid in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt und Cystein von 0-6 mM variiert (Abbildungen 3.52, 3.54 und 3.56). Für Cyanid als Substrat wurde im Assay 6 mM Cystein eingesetzt und die Cyanidkonzentration von 0-6 mM (AcrBSAS1 und AcrBSAS3) bzw. 0-0,6 mM (AcrBSAS2) variiert (Abbildungen 3.53, 3.55 und 3.57). Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.6: K_m - und V_{max} -Werte von AcrBSAS1-AcrBSAS3. Nach Inkubation der rekombinanten Proteine mit Cystein und Cyanid in der Gegenwart von Pyridoxalphosphat wurde Sulfid colorimetrisch bestimmt. Cyanid wurde in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt, wenn die Konzentration von Cystein variiert wurde und Cystein wurde in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt, wenn die Konzentration von Cyanid variiert wurde. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Wiederholungen \pm Standardfehler.

	Cystein		Cyanid	
	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]
AcrBSAS1	13,96 \pm 1,81	0,26 \pm 0,00	11,80 \pm 0,21	2,56 \pm 0,21
AcrBSAS2	2,09 \pm 0,19	0,58 \pm 0,04	0,44 \pm 0,05	0,04 \pm 0,00
AcrBSAS3	1,12 \pm 0,14	1,31 \pm 0,08	0,47 \pm 0,09	2,95 \pm 0,83

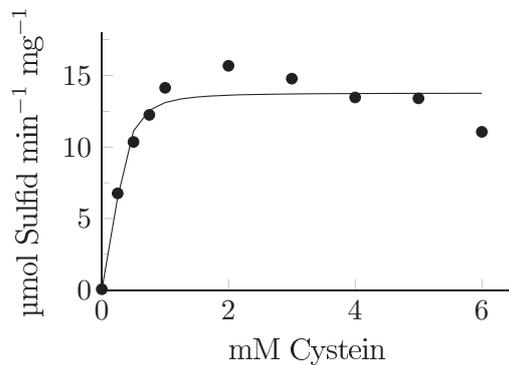


Abbildung 3.52: Michaelis-Menten-Plot für AcrBSAS1 und Cystein. AcrBSAS1 wurde 10 min mit 6 mM Cyanid und variierenden CysteinKonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

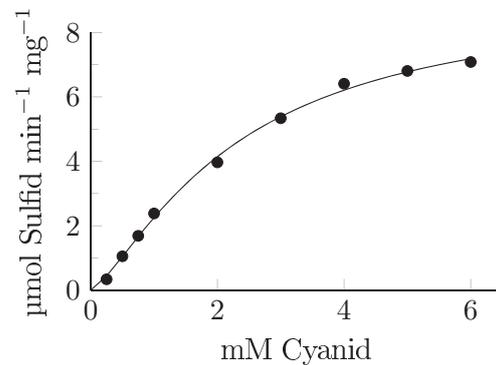


Abbildung 3.53: Michaelis-Menten-Plot für AcrBSAS1 und Cyanid. AcrBSAS1 wurde 10 min mit 6 mM Cystein und variierenden Cyanidkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

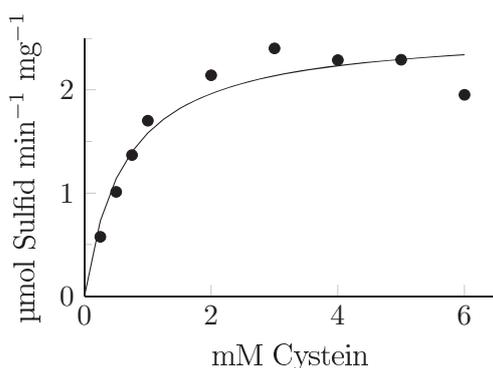


Abbildung 3.54: Michaelis-Menten-Plot für AcrBSAS2 und Cystein. AcrBSAS2 wurde 10 min mit 6 mM Cyanid und variierenden CysteinKonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

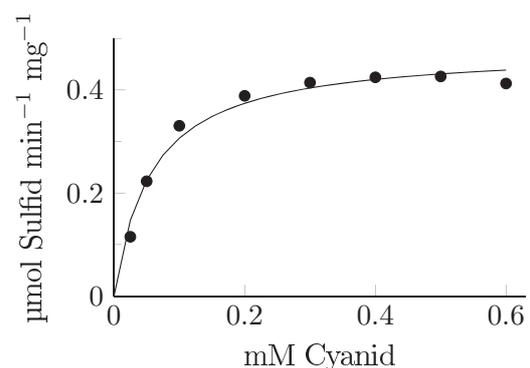


Abbildung 3.55: Michaelis-Menten-Plot für AcrBSAS2 und Cyanid. AcrBSAS2 wurde 10 min mit 6 mM Cystein und variierenden Cyanidkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

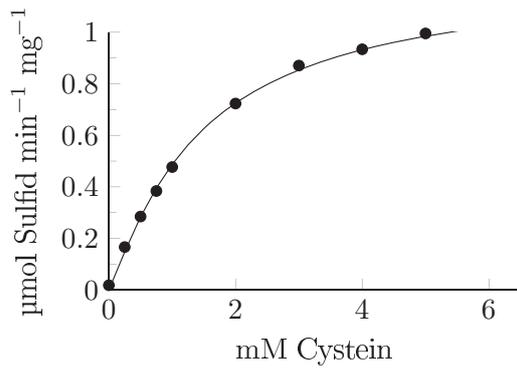


Abbildung 3.56: Michaelis-Menten-Plot für AcrBSAS3 und Cystein. AcrBSAS3 wurde 10 min mit 6 mM Cyanid und variierenden Cysteinkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

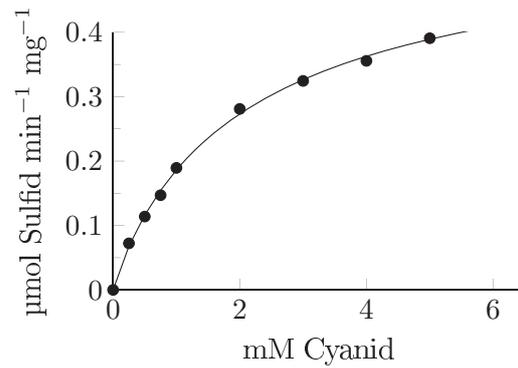


Abbildung 3.57: Michaelis-Menten-Plot für AcrBSAS3 und Cyanid. AcrBSAS3 wurde 10 min mit 6 mM Cystein und variierenden Cyanidkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

3.2.5.3 Kinetik von CcBSAS2-CcBSAS3 aus *C. croceus*

Zur Charakterisierung von CcBSAS2-CcBSAS3 wurden zunächst für jedes Protein nach heterologer Expression in *E. coli* und anschließender Aufreinigung die Inkubationszeit und Proteinmenge ermittelt, bei der der Anstieg des Reaktionsproduktes Sulfid linear war und gleichzeitig die Absorption in einem gut messbaren Bereich lag. Hierzu wurden zunächst die Proteinmengen bei 10 min Inkubationszeit variiert. Für CcBSAS2 waren 2 µg Protein im linearen Bereich und gut detektierbar (Abbildung 3.58), für CcBSAS3 wurden 12 µg Protein ermittelt (Abbildung 3.60). Anschließend wurden diese Proteinmengen in einem Assay mit verschiedenen Inkubationszeiten eingesetzt, für beide Proteine waren 10 min Inkubationszeit im linearen Bereich (Abbildungen 3.59 und 3.61).

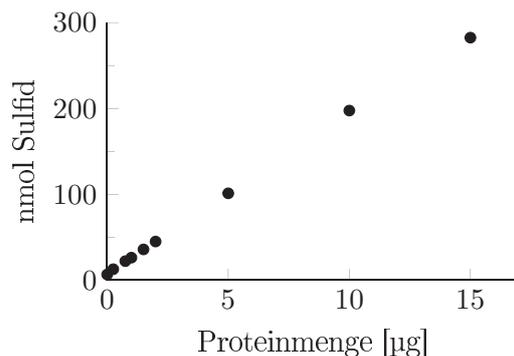


Abbildung 3.58: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von CcBSAS2 mit verschiedenen Proteinmengen und 10 min Inkubationszeit. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

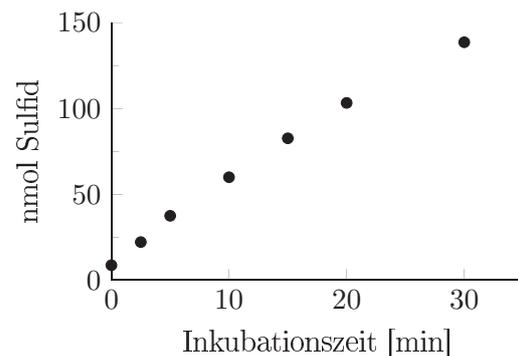


Abbildung 3.59: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von CcBSAS2 mit 3 µg Protein und verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

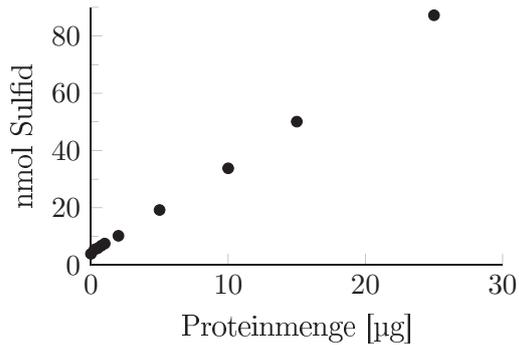


Abbildung 3.60: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von CcBSAS3 mit verschiedenen Proteinmengen und 10 min Inkubationszeit. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

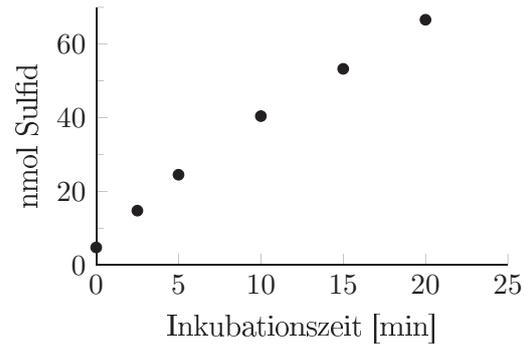


Abbildung 3.61: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von CcBSAS3 mit 12 μg Protein und verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

Zur Ermittlung der kinetischen Parameter (V_{max} , K_m) wurden die ermittelten Proteinmengen und Inkubationszeiten verwendet. Für Cystein als Substrat wurde Cyanid in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt und Cystein von 0-6 mM variiert (Abbildungen 3.62 und 3.64). Für Cyanid als Substrat wurden zur Ermittlung der Kinetik im Assay 6 mM Cystein eingesetzt und die Cyanidkonzentration von 0-0,6 mM (CcBSAS2) sowie 0-6 mM (CcBSAS3) variiert (Abbildungen 3.63 und 3.65). Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 3.7 dargestellt.

Tabelle 3.7: K_m - und V_{max} -Werte von CcBSAS2-CcBSAS3. Nach Inkubation der rekombinanten Proteine mit Cystein und Cyanid in der Gegenwart von Pyridoxalphosphat wurde Sulfid colorimetrisch bestimmt. Cyanid wurde in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt, wenn die Konzentration von Cystein variiert wurde und Cystein wurde in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt, wenn die Konzentration von Cyanid variiert wurde. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Wiederholungen \pm Standardfehler.

	Cystein		Cyanid	
	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]
CcBSAS2	$1,04 \pm 0,03$	$0,75 \pm 0,06$	$0,21 \pm 0,04$	$0,03 \pm 0,01$
CcBSAS3	$0,43 \pm 0,05$	$1,50 \pm 0,08$	$0,12 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,02$

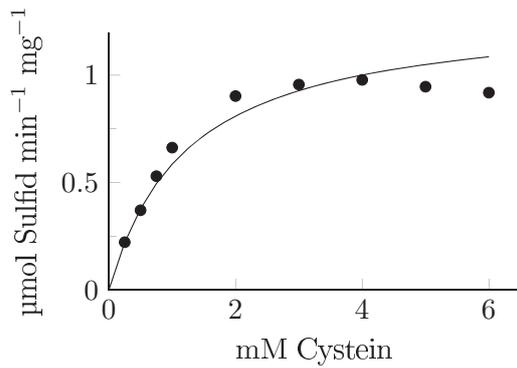


Abbildung 3.62: Michaelis-Menten-Plot für CcBSAS2 und Cystein. CcBSAS2 wurde 10 min mit 6 mM Cyanid und variierenden CysteinKonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

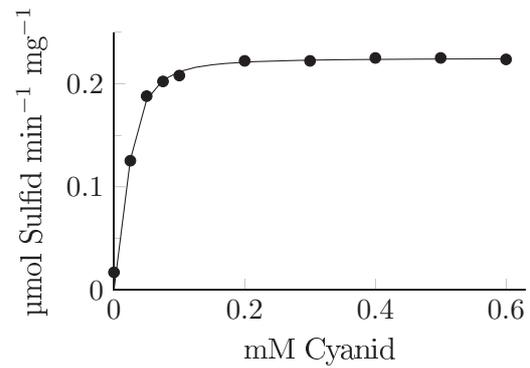


Abbildung 3.63: Michaelis-Menten-Plot für CcBSAS2 und Cyanid. CcBSAS2 wurde 10 min mit 6 mM Cystein und variierenden Cyanidkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

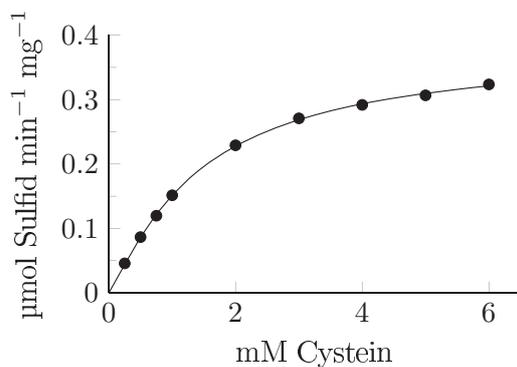


Abbildung 3.64: Michaelis-Menten-Plot für CcBSAS3 und Cystein. CcBSAS3 wurde 10 min mit 6 mM Cyanid und variierenden CysteinKonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

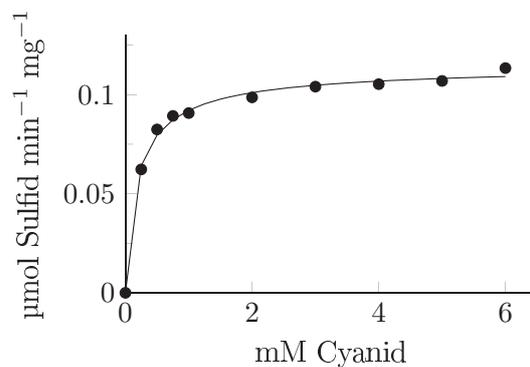


Abbildung 3.65: Michaelis-Menten-Plot für CcBSAS3 und Cyanid. CcBSAS3 wurde 10 min mit 6 mM Cystein und variierenden Cyanidkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

3.2.5.4 Kinetik von GrBSAS2-GrBSAS3 aus *G. rhamni*

Aufgrund der sehr geringen Expression von GrBSAS3 konnte nicht genügend Protein für eine kinetische Charakterisierung gewonnen werden. In einem Assay mit 20 µg Protein im Vergleich zum gleichen Volumen Vektorkontrolle wurde jedoch eine β-Cyanoalanin-Synthase Aktivität nachgewiesen (Abbildung 3.66).

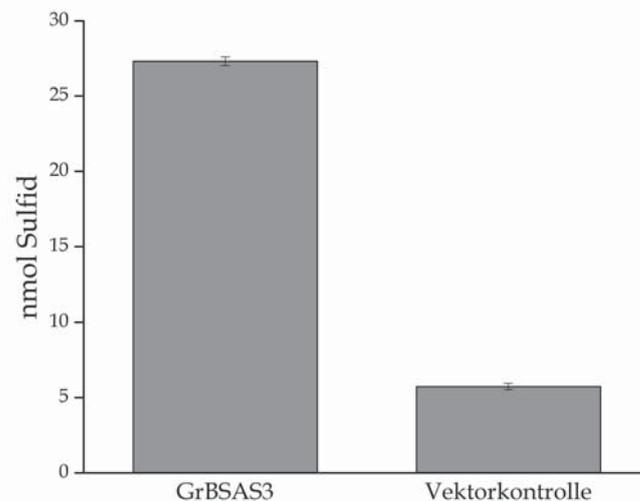


Abbildung 3.66: Aktivität von GrBSAS3 im β -Cyanoalanin-Synthase-Assay. 20 μg GrBSAS3 wurden mit 6 mM Cystein und Cyanid in Gegenwart von Pyridoxalphosphat 10 min inkubiert. Als Negativkontrolle diente das gleiche Volumen Vektorkontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten \pm Standardabweichung.

Zur Charakterisierung von GrBSAS2 wurden zunächst nach heterologer Expression in *E. coli* und anschließender Aufreinigung die Inkubationszeit und Proteinmenge ermittelt, bei der der Anstieg des Reaktionsproduktes Sulfid linear war und gleichzeitig die Absorption in einem gut messbaren Bereich lag. Hierzu wurden zunächst die Proteinmengen bei 30 min Inkubationszeit variiert. Für GrBSAS2 waren 5 μg Protein im linearen Bereich und gut detektierbar (Abbildung 3.67). Anschließend wurde diese Proteinmenge in einem Assay mit verschiedenen Inkubationszeiten eingesetzt, für GrBSAS2 waren 30 min Inkubationszeit im linearen Bereich (Abbildung 3.68).

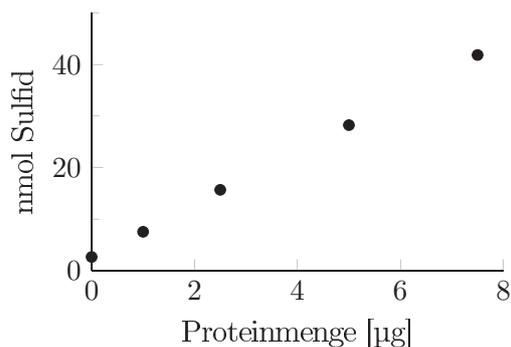


Abbildung 3.67: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von GrBSAS2 mit verschiedenen Proteinmengen und 30 min Inkubationszeit. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

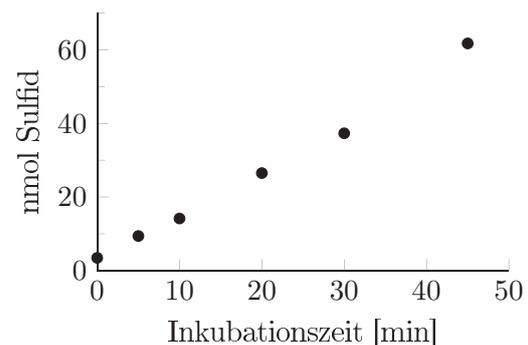


Abbildung 3.68: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von GrBSAS2 mit 5 μg Protein und verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

Zur Ermittlung der kinetischen Parameter wurden die zuvor ermittelten Proteinmengen und Inkubationszeiten verwendet. Für beide Substrate der von der β -Cyanoalanin-Synthase katalysierten Reaktion wurde die Kinetik separat bestimmt. Für Cystein als Substrat wurde Cyanid in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt und Cystein von 0-6 mM variiert (Abbildung 3.69).

Für Cyanid als Substrat wurde im Assay 6 mM Cystein eingesetzt und die Cyanidkonzentration von 0-0,3 mM variiert (Abbildung 3.70). Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 3.8 dargestellt.

Tabelle 3.8: K_m - und V_{max} -Werte von GrBSAS2. Nach Inkubation der rekombinanten Proteine mit Cystein und Cyanid in der Gegenwart von Pyridoxalphosphat wurde Sulfid colorimetrisch bestimmt. Cyanid wurde in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt, wenn die Konzentration von Cystein variiert wurde und Cystein wurde in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt, wenn die Konzentration von Cyanid variiert wurde. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Wiederholungen \pm Standardfehler. n.d. = nicht detektierbar.

GrBSAS2	Cystein		Cyanid	
	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]
GrBSAS2	$0,24 \pm 0,01$	$0,37 \pm 0,00$	$0,05 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,00$

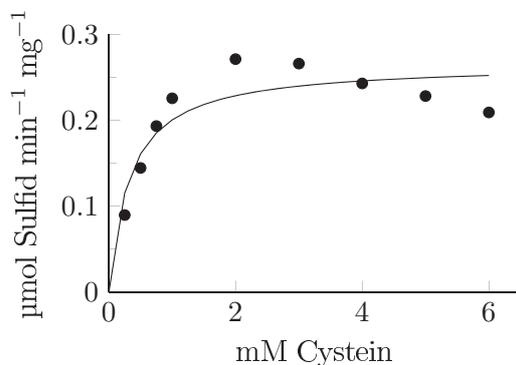


Abbildung 3.69: Michaelis-Menten-Plot für GrBSAS2 und Cystein. GrBSAS2 wurde 30 min mit 6 mM Cyanid und variierenden Cysteinkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

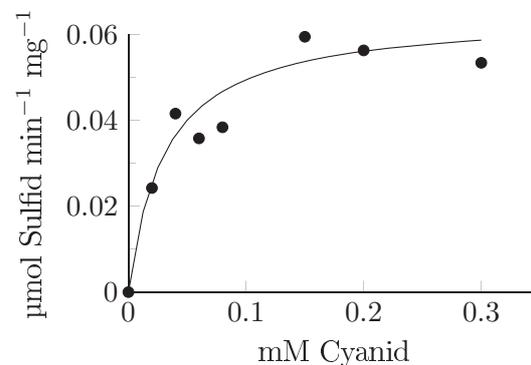


Abbildung 3.70: Michaelis-Menten-Plot für GrBSAS2 und Cyanid. GrBSAS2 wurde 30 min mit 6 mM Cystein und variierenden Cyanidkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

3.2.5.5 Kinetik von ZfBSAS2 aus *Z. filipendulae*

Zur Charakterisierung von ZfBSAS2 wurden nach heterologer Expression in *E. coli* und anschließender Aufreinigung die Inkubationszeit und Proteinmenge ermittelt, bei der der Anstieg des Reaktionsproduktes Sulfid linear war und gleichzeitig die Absorption in einem gut messbaren Bereich lag. Hierzu wurden zunächst die Proteinmengen bei 10 min Inkubationszeit variiert. Für ZfBSAS2 waren 1 μg Protein im linearen Bereich und gut detektierbar (Abbildung 3.71). Anschließend wurde diese Proteinmenge in einem Assay mit verschiedenen Inkubationszeiten eingesetzt, hier waren 10 min Inkubationszeit im linearen Bereich (Abbildung 3.72).

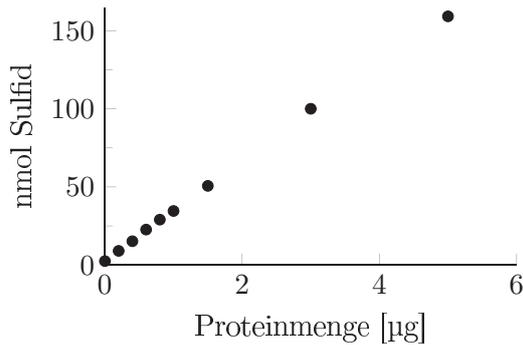


Abbildung 3.71: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von ZfBSAS2 mit verschiedenen Proteinmengen und 10 min Inkubationszeit. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

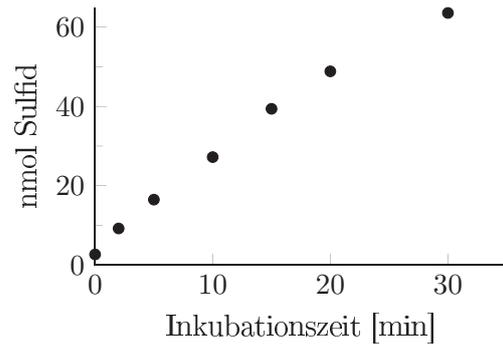


Abbildung 3.72: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von ZfBSAS2 mit 1 μ g Protein und verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

Zur Ermittlung der kinetischen Parameter wurden die zuvor ermittelten Proteinmengen und Inkubationszeiten verwendet. Für beide Substrate der von der β -Cyanoalanin-Synthase katalysierten Reaktion wurde die Kinetik separat bestimmt. Für Cystein als Substrat wurde Cyanid in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt und Cystein von 0-6 mM variiert (Abbildung 3.73). Für Cyanid als Substrat wurde im Assay 6 mM Cystein eingesetzt und die Cyanidkonzentration von 0-0,3 mM variiert (Abbildung 3.74). Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 3.9 dargestellt.

Tabelle 3.9: K_m - und V_{max} -Werte von ZfBSAS2. Nach Inkubation der rekombinanten Proteine mit Cystein und Cyanid in der Gegenwart von Pyridoxalphosphat wurde Sulfid colorimetrisch bestimmt. Cyanid wurde in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt, wenn die Konzentration von Cystein variiert wurde und Cystein wurde in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt, wenn die Konzentration von Cyanid variiert wurde. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Wiederholungen \pm Standardfehler.

	Cystein		Cyanid	
	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]
ZfBSAS2	$2,99 \pm 0,48$	$0,74 \pm 0,04$	$0,79 \pm 0,11$	$0,03 \pm 0,00$

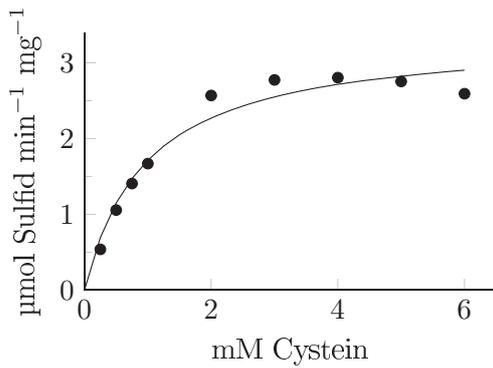


Abbildung 3.73: Michaelis-Menten-Plot für ZfBSAS2 und Cystein. ZfBSAS2 wurde 10 min mit 6 mM Cyanid und variierenden Cysteinkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

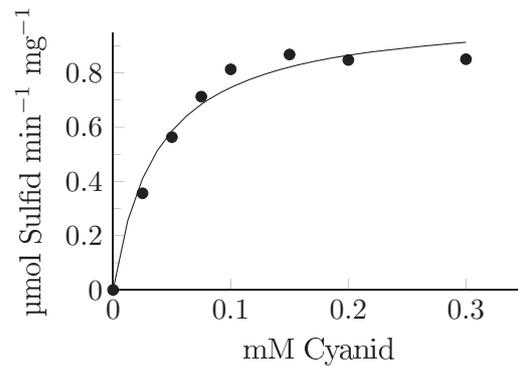


Abbildung 3.74: Michaelis-Menten-Plot für ZfBSAS2 und Cyanid. ZfBSAS2 wurde 10 min mit 6 mM Cystein und variierenden Cyanidkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

3.2.5.6 Kinetik von SIBSAS2a-SIBSAS2b aus *S. littoralis*

Zur Charakterisierung von SIBSAS2a-SIBSAS2b wurden zunächst für jedes Protein nach heterologer Expression in *E. coli* und anschließender Aufreinigung die Inkubationszeit und Proteinmenge ermittelt, bei der der Anstieg des Reaktionsproduktes Sulfid linear war und gleichzeitig die Absorption in einem gut messbaren Bereich lag. Hierzu wurden zunächst die Proteinmengen bei 10 min Inkubationszeit variiert. Für SIBSAS2a waren 2,5 µg im linearen Bereich und gut detektierbar (Abbildung 3.75), für SIBSAS2b wurden 0,4 µg Protein ermittelt (Abbildung 3.77). Anschließend wurden diese Proteinmengen in einem Assay mit verschiedenen Inkubationszeiten eingesetzt, für beide Proteine waren 10 min Inkubationszeit im linearen Bereich (Abbildungen 3.76 und 3.78).

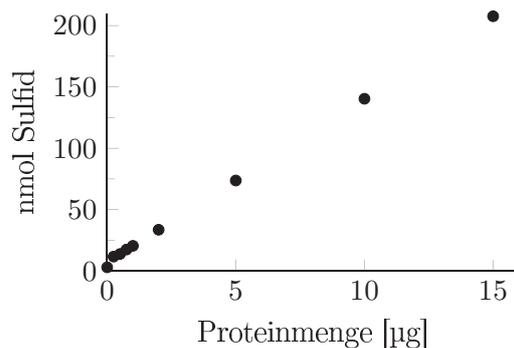


Abbildung 3.75: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von SIBSAS2a mit verschiedenen Proteinmengen und 10 min Inkubationszeit. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

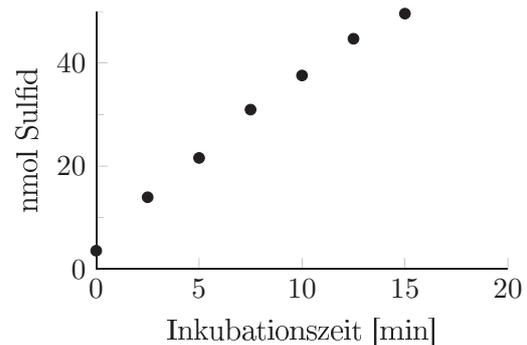


Abbildung 3.76: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von SIBSAS2a mit 2,5 µg Protein und verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

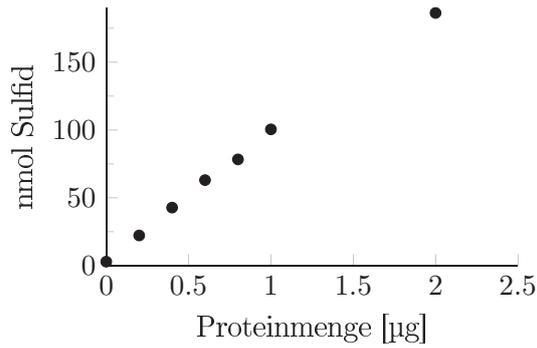


Abbildung 3.77: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von SIBSAS2b mit verschiedenen Proteinmengen und 10 min Inkubationszeit. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

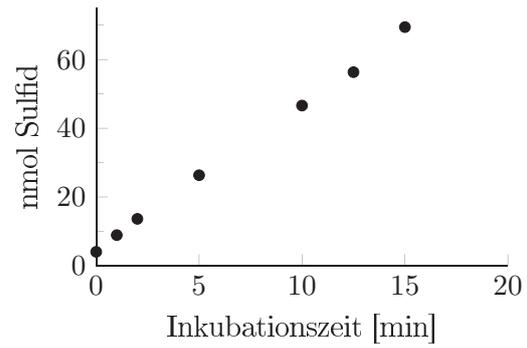


Abbildung 3.78: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von SIBSAS2b mit 0,4 μ g Protein und verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

Zur Ermittlung der kinetischen Parameter wurden die zuvor ermittelten Proteinmengen und Inkubationszeiten verwendet. Für beide Substrate der von der β -Cyanoalanin-Synthase katalysierten Reaktion wurde die Kinetik separat bestimmt. Für Cystein als Substrat wurde Cyanid in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt und Cystein von 0-6 mM variiert (Abbildungen 3.79 und 3.81). Für Cyanid als Substrat wurde im Assay 6 mM Cystein eingesetzt und die Cyanidkonzentration von 0-0,6 mM (SIBSAS2a) bzw. 0-6 mM (SIBSAS2b) variiert (Abbildungen 3.80 und 3.82). Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 3.10 dargestellt.

Tabelle 3.10: K_m - und V_{max} -Werte von SIBSAS2a-SIBSAS2b. Nach Inkubation der rekombinanten Proteine mit Cystein und Cyanid in der Gegenwart von Pyridoxalphosphat wurde Sulfid colorimetrisch bestimmt. Cyanid wurde in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt, wenn die Konzentration von Cystein variiert wurde und Cystein wurde in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt, wenn die Konzentration von Cyanid variiert wurde. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Wiederholungen \pm Standardfehler.

	Cystein		Cyanid	
	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]
SIBSAS2a	1,44 \pm 0,06	0,60 \pm 0,01	0,38 \pm 0,07	0,03 \pm 0,00
SIBSAS2b	11,59 \pm 0,87	1,07 \pm 0,03	6,41 \pm 0,80	0,29 \pm 0,05

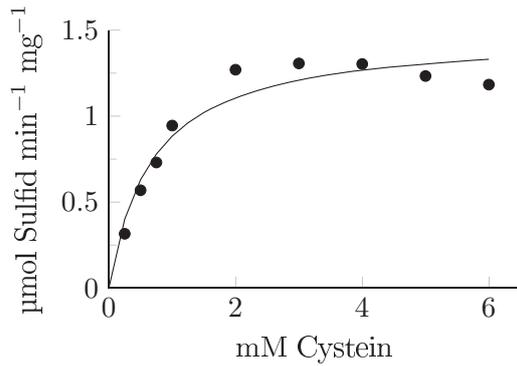


Abbildung 3.79: Michaelis-Menten-Plot für SIBSAS2a und Cystein. SIBSAS2b wurde 10 min mit 6 mM Cyanid und variierenden CysteinKonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

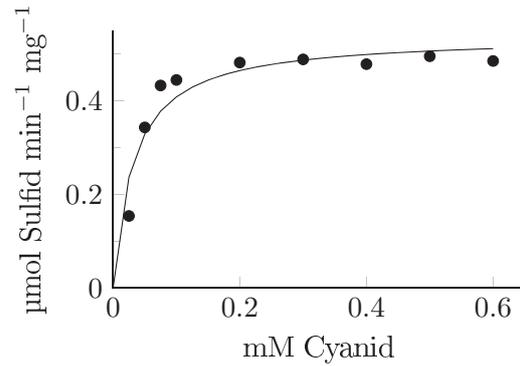


Abbildung 3.80: Michaelis-Menten-Plot für SIBSAS2a und Cyanid. SIBSAS2a wurde 10 min mit 6 mM Cystein und variierenden Cyanidkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

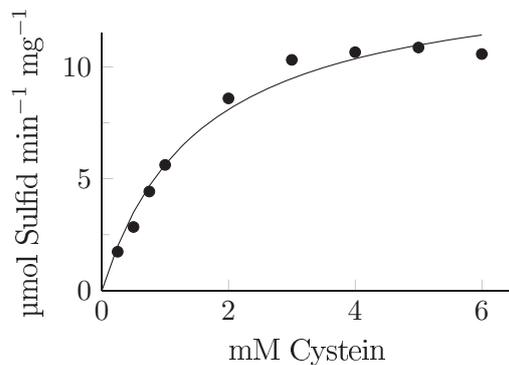


Abbildung 3.81: Michaelis-Menten-Plot für SIBSAS2b und Cystein. SIBSAS2b wurde 10 min mit 6 mM Cyanid und variierenden CysteinKonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

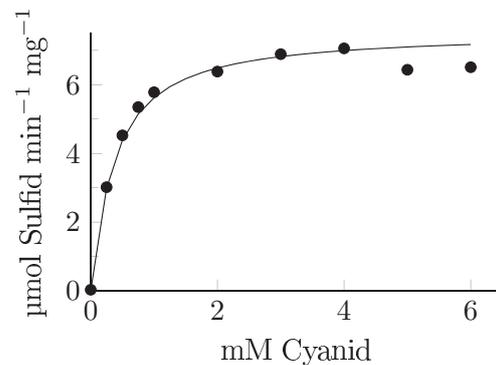


Abbildung 3.82: Michaelis-Menten-Plot für SIBSAS2b und Cyanid. SIBSAS2b wurde 10 min mit 6 mM Cystein und variierenden Cyanidkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

3.2.5.7 Kinetik von PxBSAS2 aus *P. xylostella*

Zur Charakterisierung von PxBSAS2 wurden zunächst nach heterologer Expression in *E. coli* und anschließender Aufreinigung die Inkubationszeit und Proteinmenge ermittelt, bei der der Anstieg des Reaktionsproduktes Sulfid linear war und gleichzeitig die Absorption in einem gut messbaren Bereich lag. Hierzu wurden zunächst die Proteinmengen bei 10 min Inkubationszeit variiert. Für PxBSAS2 waren 1 µg Protein im linearen Bereich und gut detektierbar (Abbildung 3.83). Anschließend wurde diese Proteinmenge in einem Assay mit verschiedenen Inkubationszeiten eingesetzt, für PxBSAS2 waren 10 min Inkubationszeit im linearen Bereich (Abbildung 3.84).

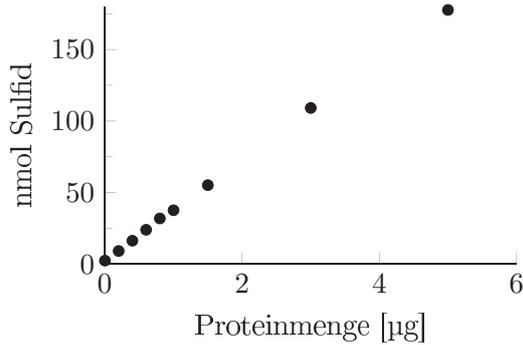


Abbildung 3.83: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von PxBAS2 mit verschiedenen Proteinmengen und 10 min Inkubationszeit. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

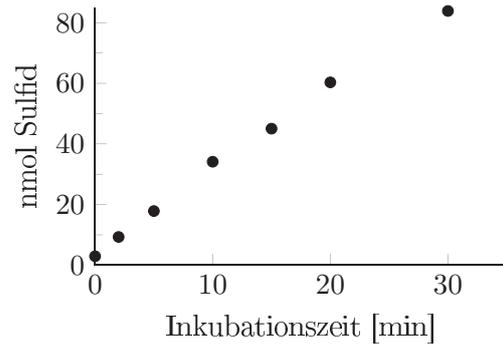


Abbildung 3.84: β -Cyanoalanin-Synthase-Assay von PxBAS2 mit 1 μg Protein und verschiedenen Inkubationszeiten. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Einzelbestimmung.

Zur Ermittlung der kinetischen Parameter wurden die zuvor ermittelten Proteinmengen und Inkubationszeiten verwendet. Für beide Substrate der von der β -Cyanoalanin-Synthase katalysierten Reaktion wurde die Kinetik separat bestimmt. Für Cystein als Substrat wurde Cyanid in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt und Cystein von 0-6 mM variiert (Abbildung 3.85). Für Cyanid als Substrat wurde im Assay 6 mM Cystein eingesetzt und die Cyanidkonzentration von 0-0,3 mM variiert (Abbildung 3.86). Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 3.11 dargestellt.

Tabelle 3.11: K_m - und V_{max} -Werte von PxBAS2. Nach Inkubation der rekombinanten Proteine mit Cystein und Cyanid in der Gegenwart von Pyridoxalphosphat wurde Sulfid colorimetrisch bestimmt. Cyanid wurde in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt, wenn die Konzentration von Cystein variiert wurde und Cystein wurde in einer Konzentration von 6 mM eingesetzt, wenn die Konzentration von Cyanid variiert wurde. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Wiederholungen \pm Standardfehler.

	Cystein		Cyanid	
	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]
PxBAS2	$3,72 \pm 0,46$	$0,52 \pm 0,04$	$1,12 \pm 0,09$	$0,02 \pm 0,00$

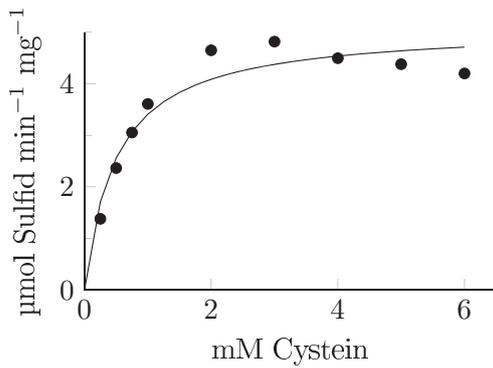


Abbildung 3.85: Michaelis-Menten-Plot für PxBAS2 und Cystein. PxBAS2 wurde 10 min mit 6 mM Cyanid und variierenden Cysteinkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

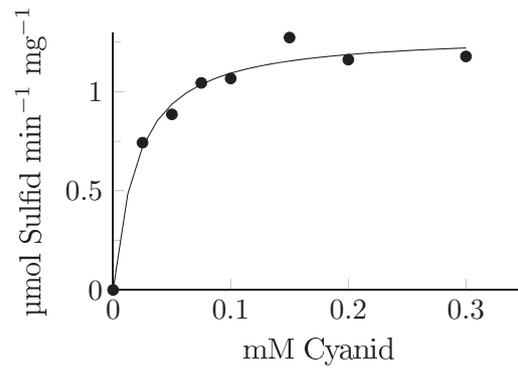


Abbildung 3.86: Michaelis-Menten-Plot für PxBAS2 und Cyanid. PxBAS2 wurde 10 min mit 6 mM Cystein und variierenden Cyanidkonzentrationen in Gegenwart von Pyridoxalphosphat inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten aus einem von drei unabhängigen Versuchen.

3.2.6 Expression von β -Cyanoalanin-Synthasen in Raupen

3.2.6.1 Expression von *AcaBSAS1-AcaBSAS3* in *A. cardamines*

Zur Untersuchung der Expression von *AcaBSAS1-AcaBSAS3* wurde ein qPCR-Protokoll entwickelt. Die Primereffizienz wurde unter Verwendung einer Verdünnungsreihe aus gepoolter cDNA des untersuchten Raupenmaterials bestimmt (Tabelle 3.12). Raupen des fünften Larvenstadiums wurden in Kopf, entleerten und gewaschenen Darm und Integument zerteilt. Die Berechnung der Expression erfolgte unter Normalisierung auf *EF1 α* bzw. *GAPDH* als Referenzgenen mit einer Variante der ΔC_T -Methode (Abschnitt 2.3.4.6 Formel 7).

Tabelle 3.12: Effizienzen der verwendeten Oligonukleotide für die Expressionsanalyse von *AcaBSAS1-AcaBSAS3*. Die Effizienzen wurden mit einer cDNA-Verdünnungsreihe aus gepoolter cDNA von *A. cardamines* bestimmt.

Zielgen	Effizienz
<i>GAPDH</i>	92,6 %
<i>EF1α</i>	96,6 %
<i>AcaBSAS1</i>	94,9 %
<i>AcaBSAS2</i>	100,4 %
<i>AcaBSAS3</i>	95,8 %

Die Expression von *AcaBSAS1* war im Darmgewebe am höchsten. In den anderen untersuchten Geweben war keine bzw. nur eine geringe Expression detektierbar. Die Expression von *AcaBSAS2* war in allen Geweben nachweisbar, am höchsten im Darmgewebe und im Integument. *AcaBSAS3* war hauptsächlich im Darm exprimiert, jedoch war die Expression deutlich geringer als die von *AcaBSAS1* und *AcaBSAS2* (Abbildung 3.87).

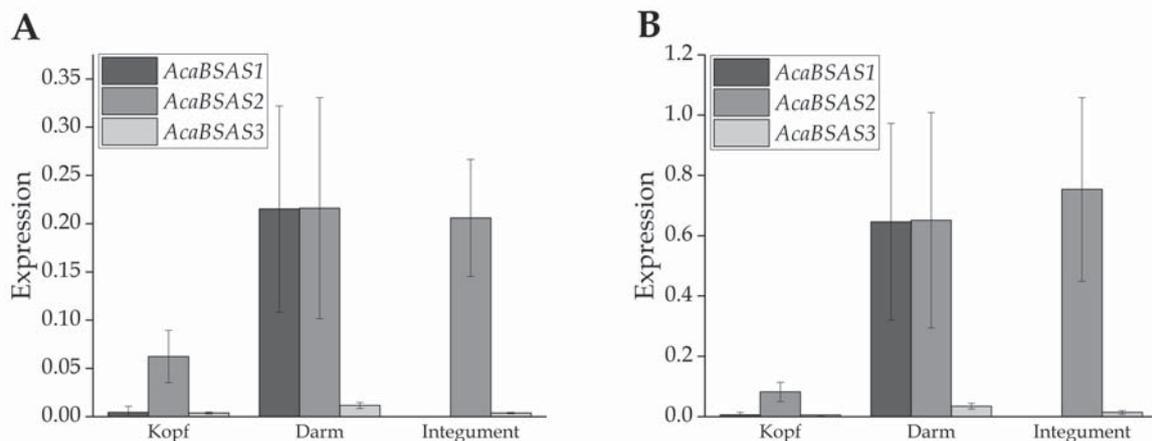


Abbildung 3.87: Expression von *AcaBSAS1-AcaBSAS3* in Raupen von *A. cardamines*. Raupen verschiedener Larvenstadien wurden in Kopf, Darm und Integument sezziert und die RNA isoliert. Die C_T -Werte von *AcaBSAS1-AcaBSAS3* wurden auf *EF1 α* (A) und *GAPDH* (B) als Referenzgene normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Replikaten \pm Standardabweichung

3.2.6.2 Expression von *SIBSAS2a-SIBSAS2b* in *S. littoralis*

Zur Untersuchung der Expression von *SIBSAS2a-SIBSAS2b* wurde ein qPCR-Protokoll entwickelt. Die Primereffizienz wurde unter Verwendung einer Verdünnungsreihe aus gepoolter cDNA des untersuchten Raupenmaterials bestimmt (Tabelle 3.13). Raupen des fünften Larvenstadiums wurden in Kopf, entleerten und gewaschenen Darm und Integument zerteilt. Die Berechnung der Expression erfolgte unter Normalisierung auf *EF1 α* bzw. *GAPDH* als Referenzgenen mit einer Variante der ΔC_T -Methode (Abschnitt 2.3.4.6 Formel 7).

Tabelle 3.13: Effizienzen der verwendeten Oligonukleotide für die Expressionsanalyse von *SIBSAS2a* und *SIBSAS2b*. Die Effizienzen wurden mit einer cDNA-Verdünnungsreihe aus gepoolter cDNA von *S. littoralis* bestimmt.

Zielgen	Effizienz
<i>GAPDH</i>	100,7 %
<i>β-Actin</i>	93,3 %
<i>SIBSAS2a</i>	92,4 %
<i>SIBSAS2b</i>	102,3 %

Die Expression von *SIBSAS2a* war höher als die Expression von *SIBSAS2b*. *SIBSAS2a* war in allen untersuchten Geweben gleich stark exprimiert, die Expression von *SIBSAS2b* dagegen war fast ausschließlich auf das Darmgewebe beschränkt (Abbildung 3.88).

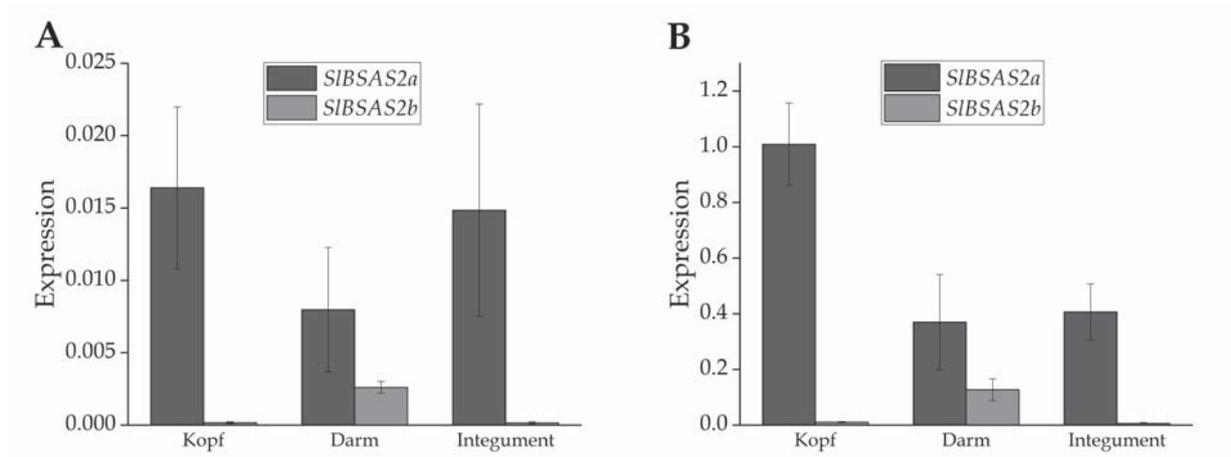


Abbildung 3.88: Expression von *SIBSAS2a* und *SIBSAS2b* in Raupen von *S. littoralis*. Raupen des fünften Larvenstadiums wurden in Kopf, Darm und Integument seziiert und die RNA isoliert. Die C_T -Werte von *SIBSAS2a* und *SIBSAS2b* wurden auf *β -Actin* (A) und *GAPDH* (B) als Referenzgene normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus fünf biologischen Replikaten \pm Standardabweichung

3.3 PrNSP-RNAi in *P. rapae*

3.3.1 Verfütterung von dsRNA

Die ersten Versuche zur Unterdrückung der Expression von *PrNSP* in den Raupen des Kleinen Kohlweißlings wurden über die Verfütterung von dsRNA gemacht, da das Zielgen ausschließlich im Darm exprimiert wird. Als Kontrolle diente dsRNA von *GFP*. In einem ersten Experiment wurden die Blattscheiben in dsRNA-Lösung einer Konzentration von 100 ng/µl eingelegt und an Raupen verschiedener Larvenstadien verfüttert. Um den Zeitraum der stärksten Unterdrückung der Genexpression einzugrenzen, wurden über 7 Tage alle 24 h Proben eingefroren. Die Analyse mittels semiquantitativer PCR ergab jedoch keinen Unterschied in der Expression von *PrNSP* zwischen den behandelten Raupen und den Kontrollraupen. Im folgenden Experiment wurde daher die Konzentration der eingesetzten dsRNA-Lösung auf 250 ng/µl erhöht und es wurden Raupen eines einheitlichen Larvenstadiums verwendet, um Schwankungen zu verringern. Die Analyse der Proben deutete auf eine leichte Verringerung der Expression von *PrNSP* nach 24 h hin. Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde ein drittes Experiment durchgeführt, bei dem lediglich die Zeitpunkte 24 h, 48 h sowie 72 h nach Fütterung der dsRNA untersucht wurden. Zudem wurde für die Herstellung der dsRNA eine kürzere Sequenz gewählt, welche anhand eines Alignments mit den nah verwandten *MA*-Genen ausgewählt wurde. Hierbei wurde der Teil der Sequenz gewählt, der die niedrigste Übereinstimmung mit den *MA*-Genen besitzt. Die Auswertung mittels qPCR (Abschnitt 2.3.4.6 Formel 6) ergab jedoch keine Verringerung der Expression des Zielgens relativ zur Expression in den Kontrollraupen (Abbildung 3.89).

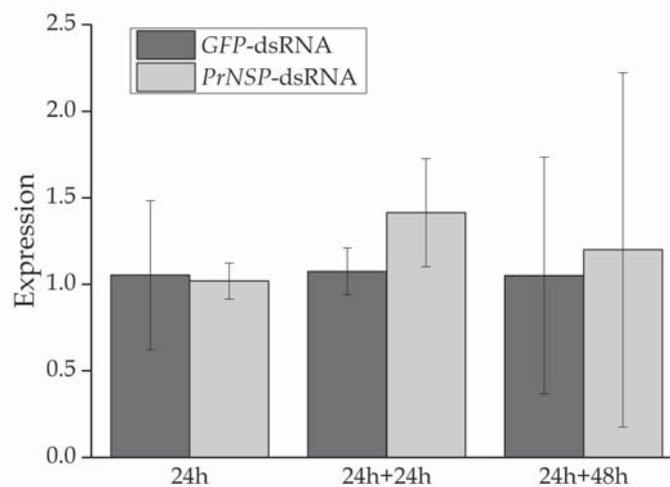


Abbildung 3.89: Expression von *PrNSP* in *P. rapae* nach Verfütterung von *PrNSP*-dsRNA auf Blattscheiben (Versuch 3). RNA wurde nach 24h dsRNA-Fütterung oder nach zusätzlicher Fütterung mit unbehandelten Blättern für 24h oder 48h isoliert. Die CT-Werte wurden auf *GAPDH*, *EF1α* und *β-Actin* als Referenzgene normalisiert und auf den Wert für die Kontrollraupen bezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Replikaten ± Standardabweichung.

3.3.2 Pflanzenvermittelte RNAi

Um eine Aufnahme größerer Mengen von dsRNA zu gewährleisten, wurde als weitere Methode die pflanzenvermittelte RNAi verwendet. In das Genom verschiedener Mutanten von *A. thaliana* wurde hierzu durch Infiltration mit *A. tumefaciens* die Sequenz von *PrNSP* in einem viralen Vektor integriert. Durch die systemische Ausbreitung des Virus und die Aktivierung der antiviralen Abwehr der Pflanze kommt es zur Bildung von dsRNA, welche die Raupen beim Fressen von Blättern der infiltrierten Pflanzen aufnehmen. Für die Versuche wurden *A. thaliana nsp1-1* verwendet. Hierbei handelt es sich um T-DNA Mutanten von *A. thaliana*, die kein AtNSP1 bilden, so dass bei Zerstörung der Rosettenblätter nur Isothiocyanat und kein Nitril gebildet wird (Burow et al., 2009). Eine Unterdrückung von *PrNSP* sollte sich bei Fraß auf dieser Mutante stärker auswirken als bei Fraß auf Pflanzen des Wildtyps. Als Kontrollpflanzen diente die Quadrupelmutante *A. thaliana cyp79B2 cyp79B3 myb28 myb29* (*A. thaliana myb x cyp*), welche keine aliphatischen und indolischen Glucosinolate enthält (Sun et al., 2009). In diesem Versuch wurden je 20 Eier von *P. rapae* auf Blätter der Pflanzen übertragen und die Raupen nach dem Schlüpfen einzeln auf täglich erneuerten Blättern gehalten. Nach 10 Tagen wurde das Raupengewicht bestimmt (Abbildung 3.90). Das Gewicht der Raupen, die mit der Vektorkontrolle infiltrierte Pflanzen gefressen hatten, unterschied sich nicht zwischen den beiden verwendeten Mutanten. Bei den Pflanzen, die mit dem *PrNSP*-Konstrukt infiltriert worden waren, war das Gewicht der Raupen, die auf *A. thaliana nsp1-1* gefressen hatten, signifikant höher als das der Raupen auf der Quadrupelmutante (Abbildung 3.90).

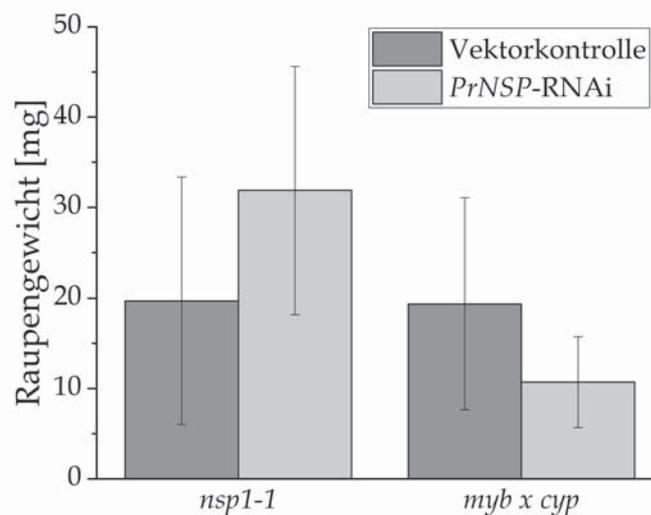


Abbildung 3.90: Gewicht der Raupen von *P. rapae* nach dem Fressen auf transformierten *A. thaliana*. Nach zehn Tagen auf transformierten *A. thaliana nsp1-1* bzw. *A. thaliana myb x cyp* wurde das Gewicht der überlebenden Raupen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 13 bis 18 Raupen \pm Standardabweichung.

Die Expression von *PrNSP* wurde mittels qPCR untersucht, die Normalisierung der Expression von *PrNSP* erfolgte durch *GAPDH*, *EF1 α* und *18S rRNA* als Referenzgene (Abschnitt 2.3.4.6 Formel 6). Die Expression von *PrNSP* in den Raupen, die auf *nsp1-1*-Pflanzen gefressen hatten, welche mit dem *PrNSP*-Konstrukt infiltriert worden war, war signifikant niedriger als die Expression in den Raupen, welche mit der Vektorkontrolle infiltrierte *nsp1-1*-Pflanzen gefressen hatten (Abbildung 3.91 A). Zwischen den beiden Versuchsansätzen auf der Quadrupelmutante wurde kein signifikanter Unterschied in der Expression von *PrNSP* nachgewiesen (Abbildung 3.91 B).

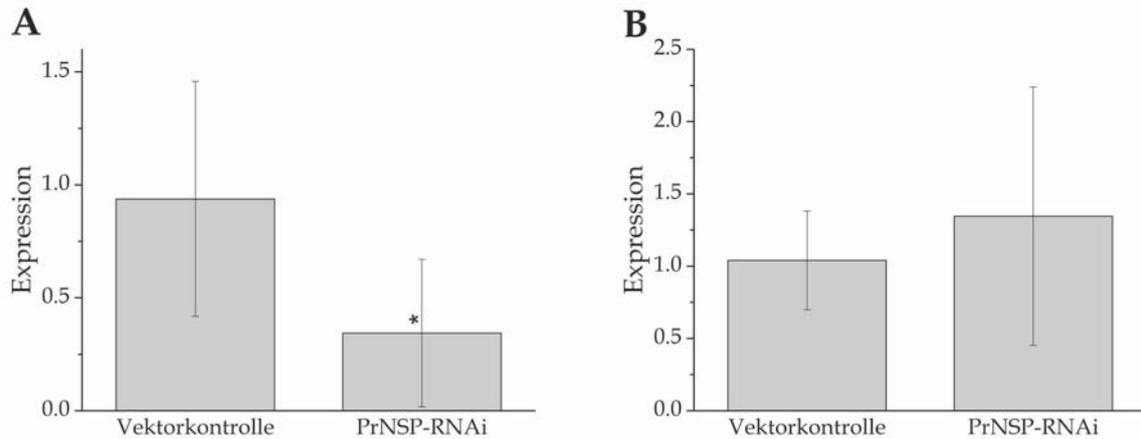


Abbildung 3.91: Expression von *PrNSP* in Raupen von *P. rapae* nach dem Fressen auf transformierten *A. thaliana*. Nach acht Tagen auf transformierten *A. thaliana nsp1-1* (A) bzw. *A. thaliana myb x cyp* (B) wurde die RNA aus dem mittleren Darmabschnitt der Raupen isoliert und für die qPCR verwendet. Die CT-Werte wurden auf *GAPDH*, *EF1 α* und *18S rRNA* als Referenzgene normalisiert und auf die Vektorkontrolle bezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus sechs bis sieben Raupen \pm Standardabweichung.

Der Versuch wurde mit einer neuen Kolonie von *P. rapae* wiederholt. Da die Klimakammer etwas wärmer eingestellt war als bei dem Kooperationspartner am Max Planck Institut für Chemische Ökologie in Jena, entwickelten sich die Raupen schneller und wurden schon nach acht Tagen, kurz vor dem Erreichen des fünften Larvenstadiums seziiert. Die Ergebnisse des ersten Versuchs wurden bei dieser Wiederholung bestätigt. Im Raupengewicht war kein Unterschied zwischen den Raupen der verschiedenen Versuchsansätze zu erkennen (Abbildung 3.92).

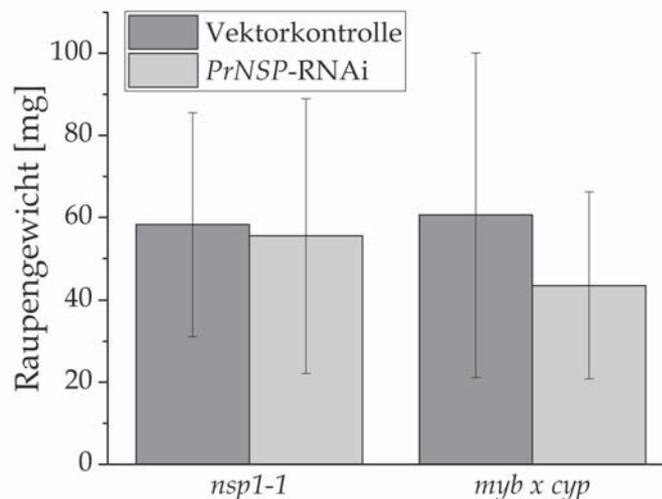


Abbildung 3.92: Gewicht der Raupen von *P. rapae* nach dem Fressen auf transformierten *A. thaliana*. Nach acht Tagen auf transformierten *A. thaliana nsp1-1* bzw. *A. thaliana myb x cyp* wurde das Gewicht der überlebenden Raupen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus neun bis 18 Raupen \pm Standardabweichung.

Der Mittelwert der Expression von *PrNSP* war in den Raupen auf *A. thaliana nsp1-1* auch in diesem Versuchsansatz gegenüber der Kontrolle reduziert, wenn die mit dem *PrNSP*-Konstrukt infiltrierten Pflanzen gefressen wurden. Die biologische Variabilität war jedoch sehr hoch und die Reduktion der Expression in diesem Experiment nicht signifikant (Abbildung 3.93 A). Auch

in diesem Experiment wurde bei den Raupen auf der Quadrupelmutante von *A. thaliana* keine Reduktion der Expression festgestellt (Abbildung 3.93 B).

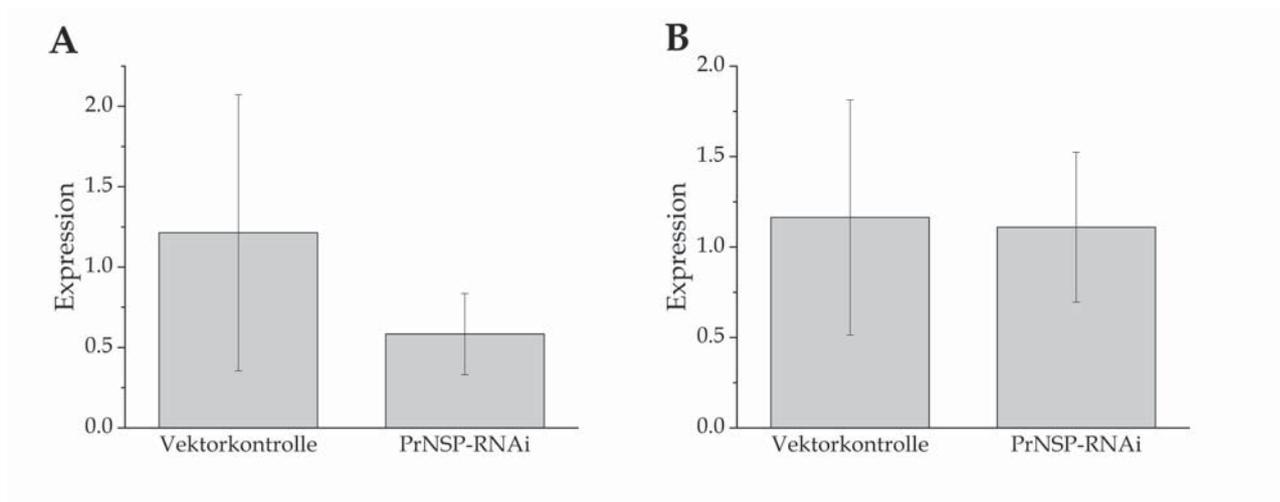


Abbildung 3.93: Expression von *PrNSP* in Raupen von *P. rapae* nach dem Fressen auf transformierten *A. thaliana*. Nach acht Tagen auf transformierten *A. thaliana nsp1-1* (A) bzw. *A. thaliana myb x cyp* (B) wurde die RNA aus dem mittleren Darmabschnitt der Raupen isoliert und für die qPCR verwendet. Die CT-Werte wurden auf *GAPDH*, *EF1 α* und *18S rRNA* als Referenzgene normalisiert und auf die Vektorkontrolle bezogen. Dargestellt ist der Mittelwert aus sieben bis acht Raupen \pm Standardabweichung.



4 Diskussion

4.1 Cyanidentgiftung in *P. rapae*

Beim Fraß auf Pflanzen, die aromatische Glucosinolate enthalten, werden in den Raupen von *P. rapae* aromatische Nitrile gebildet. Beim weiteren Metabolismus von Phenylacetonitril, welches im Kleinen Kohlweißling beim Fraß von benzyglucosinolathaltigen Pflanzenteilen entsteht, wird Cyanid gebildet. Diese, gemessen am Körpergewicht der Raupen, sehr hohen Cyanidmengen müssen effizient entgiftet werden. In vorherigen Untersuchungen wurde der Metabolismus von Cyanid zu β -Cyanoalanin und Thiocyanat gezeigt (Stauber et al., 2012). Dies legte eine Beteiligung der beiden Cyanidentgiftungsenzyme β -Cyanoalanin-Synthase und Rhodanese nahe (Stauber et al., 2012). van Ohlen et al. (2016) identifizierten mit PrBSAS1-PrBSAS3 aus *P. rapae* die ersten β -Cyanoalanin-Synthasen aus Lepidoptera. In der vorliegenden Arbeit wurden die drei gefundenen Enzyme weiter charakterisiert. Die kinetische Untersuchung zeigte, dass die drei β -Cyanoalanin-Synthasen unterschiedliche Eigenschaften besitzen (Tabelle 4.1). Während PrBSAS1 einen hohen Turnover, aber eine niedrige Affinität zum Cyanid besitzt, ist bei PrBSAS2 der Turnover niedriger, aber die Affinität höher. Für PrBSAS3 konnte die Kinetik für Cyanid als Substrat nicht bestimmt werden. Die kinetischen Werte deuten auf eine unterschiedliche physiologische Funktion der Enzyme hin. Die Lokalisation der Aktivität im Darm der Raupen unterstützt eine Funktion in der Entgiftung von Cyanid, welches durch die Aufnahme und Verstoffwechslung benzyglucosinolatreicher Nahrung in den Darmzellen entsteht (van Ohlen et al., 2016). Auch die Expressionsanalysen zeigen, dass die Gene der drei β -Cyanoalanin-Synthasen hauptsächlich im Darm exprimiert sind. *PrBSAS2* ist deutlich stärker exprimiert als *PrBSAS1* und *PrBSAS3* (Abbildung 3.12). Zusammen mit den kinetischen Parametern liegt eine Beteiligung von PrBSAS2 an der Cyanidentgiftung nahe. *PrBSAS1* ist nur schwach exprimiert, könnte aber durch den hohen Turnover ebenfalls an der Entgiftung von Cyanid beteiligt sein. Da für PrBSAS3 keine kinetischen Werte für Cyanid vorliegen, ist die Funktion dieses Enzyms weiter unklar. Denkbar wäre zum Beispiel eine Beteiligung an der Verstoffwechslung von Sulfid. Für viele β -Cyanoalanin-Synthasen wurde gezeigt, dass sie auch eine O-Acetylserin(thiol)lyase-Aktivität besitzen (Hatzfeld et al., 2000; Vozdek et al., 2013; Shirzadian-Khorramabad et al., 2010). O-Acetylserin(thiol)lyasen katalysieren die Umsetzung von O-Acetylserin und Sulfid zu Cystein und Acetat (Hell & Wirtz, 2011). Bei der Entgiftung von Cyanid durch β -Cyanoalanin-Synthasen entstehen äquimolare Mengen Sulfid, welches als Zellgift wirken kann, daher wäre eine Beteiligung einer O-Acetylserin(thiol)lyase durchaus denkbar. Bisherige Analysen lieferten jedoch keine Belege für eine derartige Aktivität (Abschnitt 3.1.1.3)

Tabelle 4.1: K_m - und V_{max} -Werte von Cyanidgiftungsenzymen aus *P. rapae*. Nach der Inkubation der rekombinanten Proteine mit den entsprechenden Substraten wurde die Produktbildung photometrisch bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Wiederholungen \pm Standardfehler. n.d. = nicht detektierbar.

	Cyanid		Cystein	
	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]
PrBSAS1	16,86 \pm 2,80	7,78 \pm 1,54	12,32 \pm 1,74	0,42 \pm 0,04
PrBSAS2	0,71 \pm 0,05	0,28 \pm 0,08	2,81 \pm 0,30	0,61 \pm 0,08
PrBSAS3	n.d.	n.d.	0,71 \pm 0,03	1,27 \pm 0,10

	Cyanid		Thiosulfat	
	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]	V_{max} [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	K_m [mM]
Rho1	0,03 \pm 0,00	3,35 \pm 0,50	n.d.	n.d.
Rho2	25,23 \pm 2,60	56,16 \pm 10,30	14,17 \pm 1,45	0,84 \pm 0,27

Wegen des Metabolismus von Cyanid zu Thiocyanat (Stauber et al., 2012) war der Nachweis der Aktivität und die Identifizierung von cDNAs möglicher Rhodanesen von Interesse. Rhodanesen besitzen eine hochkonservierte dreidimensionale Struktur, stellen aber auf Sequenzebene eine sehr heterogene Enzymgruppe dar (Cipollone et al., 2007). Die Identifizierung dieser Enzyme ist daher eine Herausforderung. Im Rahmen dieser Arbeit gelang in Kooperation mit Dr. Heiko Vogel (Max Planck Institut für Chemische Ökologie, Jena) die erste Identifizierung von Rhodanesen aus Insekten. Bei den beiden identifizierten Enzymen Rho1 und Rho2 handelt es sich nicht um Rhodanesen im engeren Sinne, d.h. Tandem-Domänen-Rhodanesen, sondern um Einzel-Domänen-Rhodanesen. Die kinetische Charakterisierung zeigte für Rho1 eine Cyanid-Affinität, die im Bereich der β -Cyanoalanin-Synthase PrBSAS1 lag, jedoch mit einem sehr niedrigen Turnover (Tabelle 4.1). Auch Rho2 setzte im Enzymassay Cyanid zu Thiocyanat um, besaß jedoch nur eine sehr niedrige Affinität zu Cyanid (Tabelle 4.1). Die Expression der beiden Rhodanese gene ist auf das Darmgewebe der Raupen beschränkt, in den adulten Schmetterlingen war eine Expression kaum nachweisbar (Abbildung 3.22). *Rho2* war in dem Darmgewebe deutlich stärker exprimiert als *Rho1*, die auf *GAPDH* normalisierte Expression entsprach in etwa der von *PrBSAS2*.

Die physiologische Funktion von Rhodanesen ist bis heute noch nicht endgültig geklärt. Neben der klassischen Funktion in der Entgiftung von Cyanid werden Rhodanesen mittlerweile viele andere Rollen im Schwefelstoffwechsel zugeschrieben (Cipollone et al., 2007). Auch bei den hier identifizierten Enzymen ist die physiologische Rolle noch unklar. Die bioinformatische Analyse deutet auf eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der beiden Rhodanesen hin. Während Rho1 ein mitochondriales Signalpeptid besitzt, ist die vorhergesagte Lokalisation von Rho2 cytosolisch. Die mitochondriale Lokalisation von Rho1 unterstützt zusammen mit den kinetischen Untersuchungen eine mögliche Rolle in der Cyanidgiftung. Für Rho2 dagegen ist eine andere Funktion wahrscheinlich, da die cytosolische Lokalisation gegen eine klassische Rhodanese funktion spricht und die kinetischen Konstanten keine ausreichende Affinität zu Cyanid als Substrat anzeigen. Neben einer Funktion in der Cyanidgiftung wird Einzel-Domänen-Rhodanesen auch eine Funktion unter Stressbedingungen zugeschrieben. Ein Beispiel ist PspE, eine Einzel-Domänen-Rhodanese aus *E. coli*, die zu dem *psp*-Operon gehört, welches unter Stressbedingungen oder nach einer Phagen-Infektion induziert wird (Adams et al., 2002). Auch die kürzlich identifizierte Einzel-Domänen-Rhodanese aus *Macrobrachium nipponense* (Decapoda: Palaemonidae) wird unter oxidativem Stress verstärkt exprimiert (Tang et al., 2018). Andere postulierte Funktionen von Einzel-Domänen-Rhodanesen beinhalten eine Rolle

in der Schwefeloxidation sowie dem Metabolismus und der Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern (Kreis-Kleinschmidt et al., 1995; Acosta et al., 2005).

Voraussetzung für die Cyanidbildung ist die α -Hydroxylierung der Glucosinolat-abgeleiteten aromatischen Nitrile (Stauber et al., 2012). Um zu untersuchen, ob das Enzym, welches diesen Schritt katalysiert, spezifisch für *P. rapae* ist oder ob es sich dabei um ein allgemein vorkommendes Entgiftungsenzym handelt, wurde Phenylacetonitril mit NADPH und Darmmikrosomen von *P. rapae* und *S. littoralis* inkubiert. Nur im Ansatz mit Darmmikrosomen von *P. rapae* wurde das Zerfallsprodukt des α -Hydroxynitrils Benzaldehyd nachgewiesen (Abbildung 3.23). In den Mikrosomen aus dem Darm des Generalisten *S. littoralis* wurde kein Benzaldehyd detektiert. Dies könnte darauf hindeuten, dass das Enzym in *P. rapae* spezifisch Glucosinolat-abgeleitete aromatische Nitrile hydroxyliert. Anders als andere Lepidoptera kommt *P. rapae* mit großen Nitrilmengen in Kontakt, da das raupeneigene PrNSP im Darm für den Abbau aufgenommener Glucosinolate zu Nitrilen sorgt. *S. littoralis* kommt mit diesem Substrat in der Natur normalerweise nicht in Kontakt, bzw. nur mit geringen Mengen, die durch pflanzliche spezifizierende Proteine beim Glucosinolat-Abbau gebildet werden. Möglicherweise sind die entsprechenden Cytochrom P450-Enzyme in *S. littoralis* aber induzierbar, so dass sie in den vorhergehenden Untersuchungen nicht erfasst wurden.

4.2 Cyanidentgiftung in anderen Lepidoptera

P. rapae gehört zu der Unterfamilie Pierinae, welche vor etwa 80 Millionen Jahren einen Wirtswechsel auf glucosinolathaltige Pflanzen vollzog. In frühen Brassicales waren Phenylalanin- und Tyrosin-abgeleitete Glucosinolate sehr verbreitet (Mithen et al., 2010). Daher war die Hauptfragestellung dieser Arbeit, ob die Cyanidentgiftung eine Rolle in der Wirtspflanzenanpassung der Pierinae gespielt hat. Als essentiell für den Wechsel auf Brassicales wird das NSP angesehen, welches nur in den Arten der Pierinae vorhanden ist, die auf glucosinolathaltige Pflanzen spezialisiert sind (Wheat et al., 2007). Da es durch den weiteren Metabolismus der entstehenden aromatischen Nitrile zur Cyanidfreisetzung kommt, liegt nahe, dass diese Arten erhöhten Mengen an Cyanid ausgesetzt waren und dieses effizient entgiften können. Für die Analyse der Cyanidentgiftung in Lepidoptera wurden Vertreter der Pieridae aus beiden Unterfamilien eingeschlossen. Aus der Unterfamilie Pierinae wurde neben *P. rapae* und *A. cardamines* als Spezialisten auf glucosinolathaltigen Pflanzen auch *A. crataegi* analysiert. Diese Art hat einen sekundären Wirtswechsel zu Rosaceae gemacht und besitzt keine NSP-Aktivität mehr (Wheat et al., 2007). Aus der Unterfamilie der Coliadae, welche keinen Wirtswechsel auf glucosinolathaltige Pflanzen gemacht hat, wurden *C. croceus* und *G. rhamnii* untersucht. Zusätzlich wurden weiter entfernte Schmetterlingsarten eingeschlossen. Hierzu gehörte neben *P. xylostella*, einem weiteren Spezialisten auf glucosinolathaltigen Pflanzen, *Z. filipendulae*. Raupen dieser Art fressen auf Pflanzen, die cyanogene Glykoside enthalten und können auch selber cyanogene Glykoside synthetisieren. Außerdem wurde mit *S. littoralis* ein Generalist mit breitem Wirtspektrum untersucht, der sich auch auf glucosinolathaltigen Pflanzen entwickeln kann.

In ersten Assays mit Raupenextrakten wurde in dieser und vorhergehenden Arbeiten gezeigt, dass alle untersuchten Arten β -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität im Darmgewebe besitzen (Herfurth et al., 2017). Deutliche Rhodanese-Aktivität dagegen war nur im Darm von *P. rapae*, *A. cardamines* und *P. xylostella* nachweisbar, interessanterweise also in den Arten, die auf glucosinolathaltige Pflanzen spezialisiert sind. Während die Expression eines nitrilspezifisierenden Proteins *P. rapae* und *A. cardamines* das Fressen auf glucosinolathaltigen Pflanzen ermöglicht (Wheat et al., 2007), besitzt *P. xylostella* einen anderen Entgiftungsweg. Die Raupen von *P. xylostella* besitzen im Darm eine Sulfatase, welche die mit der Nahrung aufgenommenen Glucosinolate desulfatiert (Ratzka et al., 2002). Die dadurch entstehenden Desulfo-Glucosinolate stellen für die Myrosinase kein Substrat mehr dar und die Bildung der giftigen Isothiocyanate wird verhindert. Während die beiden Spezialisten aus der Familie der Pieridae bei der Entgiftung der Glucosinolate Cyanid bilden, kommt *P. xylostella* durch den Fraß auf glucosinolathaltigen Pflanzen nicht mit erhöhten Mengen Cyanid in Berührung. Die gefundene Aktivität der Rhodanese kann in dieser Art also nicht durch eine erhöhte Cyanidexposition durch Metabolisierung von Glucosinolaten erklärt werden. In einer früheren Untersuchung vieler Lepidoptera-Arten wurde gezeigt, dass Rhodanese-Aktivität sehr weit verbreitet ist, jedoch nicht mit dem Fraß auf cyanogenen Pflanzen korreliert (Beesley et al., 1985). Daher wurde geschlossen, dass Rhodanesen keine Funktion in der Cyanidentgiftung besitzen (Beesley et al., 1985). Die Rhodaneseaktivität in *P. xylostella* war im Vergleich zu *A. cardamines* relativ schwach ausgeprägt, allerdings wurde diese in Gesamtraupen und nicht im isolierten Darm nachgewiesen. Hier wären weitere Untersuchungen nötig, um das Enzym zu identifizieren und eventuelle abweichende physiologische Funktionen zu klären. Bei den beiden Spezialisten aus der Unterfamilie Pierinae, *P. rapae* und *A. cardamines*, war dagegen eine deutliche Rhodanese-Aktivität nachweisbar. In *P. rapae* gelang, wie in Abschnitt 4.1 diskutiert, die Identifizierung von zwei Enzyme, welche zu dieser Aktivität beitragen könnten. In diesen Arten ist eine Beteiligung der Rhodanesen an der Cyanidentgiftung denkbar. Zusammen mit weiteren Cyanidentgiftungsenzymen könnten Rhodanesen eine Rolle bei der Entgiftung

der großen Mengen Cyanid spielen, welche vermutlich intrazellulär am endoplasmatischen Retikulum in Anschluss an die Hydroxylierung der gebildeten aromatischen Nitrile entstehen.

Bei der Suche nach möglichen β -Cyanoalanin-Synthasen in den untersuchten Arten wurden in dieser Arbeit degenerierte Primer verwendet, mit welchen van Ohlen et al. (2016) in *P. rapae* die drei β -Cyanoalanin-Synthasen PrBSAS1-PrBSAS3 identifizierten. Auch in den anderen Arten war die Suche erfolgreich und es wurden insgesamt 14 neue β -Cyanoalanin-Synthasen identifiziert. Die gefundenen Sequenzen codieren alle für Enzyme eine ähnlichen Größe von etwa 35 kDa (Tabelle 4.2) und besitzen untereinander eine Ähnlichkeit von 70-90 %.

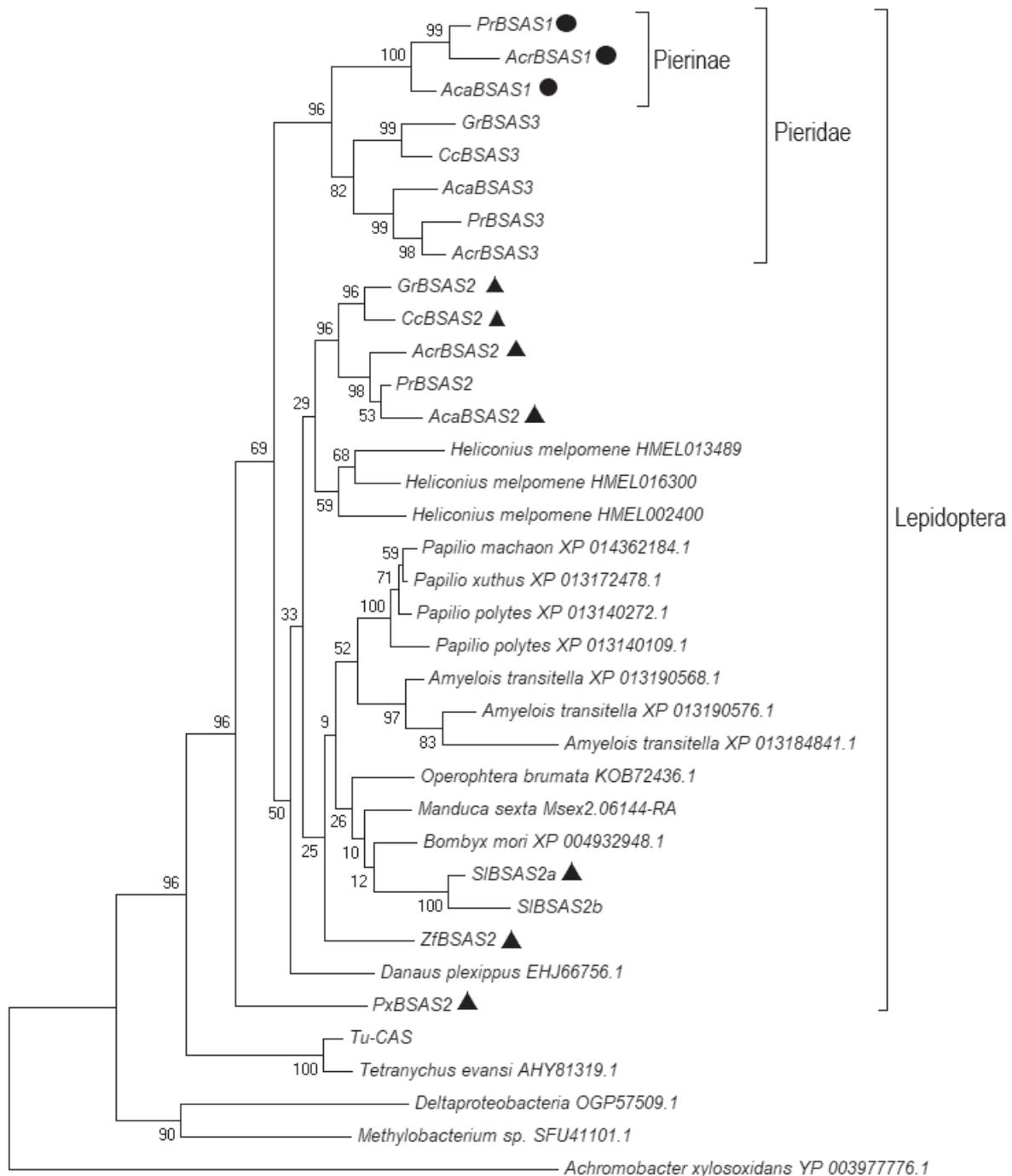
Tabelle 4.2: Identifizierte β -Cyanoalanin-Synthasen aus Lepidoptera. Die gefundenen Sequenzen wurden nach ihrer Ähnlichkeit auf Aminosäure-Ebene zu PrBSAS1-PrBSAS3 benannt. Das Molekulargewicht (MW) der codierten Proteine wurde mit dem Programm Protein Molecular Weight bestimmt (www.bioinformatics.org).

Art	Enzym	MW (kDa)	% Identität zu		
			PrBSAS1	PrBSAS2	PrBSAS3
<i>A. cardamines</i>	AcaBSAS1	35,1	89,5	70,5	71,1
	AcaBSAS2	34,9	64,6	91,4	72,0
	AcaBSAS3	34,8	71,7	73,2	85,3
<i>A. crataegi</i>	AcrBSAS1	35,0	88,9	64,2	67,3
	AcrBSAS2	34,7	65,2	90,5	72,3
	AcrBSAS3	34,9	72,3	72,3	89,0
<i>C. croceus</i>	CcBSAS2	35,7	67,7	84,6	72,1
	CcBSAS3	34,9	73,9	72,6	76,4
<i>G. rhamnii</i>	GrBSAS2	34,7	68,3	85,5	73,2
	GrBSAS3	34,9	69,9	70,2	74,2
<i>Z. filipendulae</i>	ZfBSAS2	35,4	66,2	75,7	66,9
<i>S. littoralis</i>	SIBSAS2a	35,6	67,7	75,7	68,7
	SIBSAS2b	35,9	66,5	70,5	66,9
<i>P. xylostella</i>	PxBSAS2	34,4	63,8	70,4	67,0

In Enzymassays mit den heterolog exprimierten Proteinen wurde für alle Enzyme eine β -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität nachgewiesen. Bei der phylogenetischen Analyse der gefundenen Sequenzen gruppieren sich die nach ihrer Ähnlichkeit zu den Enzymen aus *P. rapae* mit BSAS1, BSAS2 bzw. BSAS3 benannten Proteine der verschiedenen Arten zusammen (Abbildung 4.1). Die phylogenetische Analyse deutet auf eine besondere Enzymausstattung der Pieridae und ihrer Unterfamilie Pierinae hin. Während alle untersuchten Arten mindestens ein *BSAS2*-Homolog besaßen, wurden für die Pieridae zusätzliche β -Cyanoalanin-Synthasen identifiziert. *BSAS3*-Homologe waren in allen untersuchten Arten der Pieridae vorhanden. Vertreter der Unterfamilie Pierinae besaßen zusätzlich ein *BSAS1*-Homolog. Da die Ähnlichkeit der verschiedenen Proteine einer Art bei etwa 70 % liegt und sich die Proteine, wie für *P. rapae* beschrieben, auch in ihren kinetischen Eigenschaften unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um Homologe handelt, welche durch Genduplikationen entstanden sind.

Die in dieser Arbeit identifizierten β -Cyanoalanin-Synthasen unterscheiden sich in ihrer Kinetik. Die *BSAS2*-Homologe, welche in allen untersuchten Arten vorhanden waren, besitzen eine hohe Affinität zu Cyanid ($K_m=0,02-0,04$ mM). Der K_m dieser Enzyme ist mindestens um Faktor zehn niedriger als für die anderen untersuchten *BSAS*-Homologe, mit Ausnahme von CcBSAS3 (Abbildung 4.1). Da sich zu den *BSAS2*-Homologen auch die uncharakterisierten Enzyme aus anderen Familien gruppieren, scheinen diese Enzyme in Lepidoptera sehr weit verbreitet zu sein

und könnten eine Funktion in der basalen Entgiftung von Cyanid bei Aufnahme von cyanogenem Pflanzenmaterial erfüllen. Zum Teil besitzen die untersuchten Arten mehrere *BSAS2*-Homologe, was eventuell auf eine erhöhte Frequenz cyanogener Futterpflanzen zurückzuführen sein könnte. Ein Beispiel hierfür ist *Heliconius melpomene*. Für diese Art wurden in Datenbanken drei uncharakterisierte Sequenzen gefunden, welche sich zu den *BSAS2*-Homologen gruppieren. *H. melpomene* ist ein Spezialist auf cyanogenen Pflanzen und in der Lage, cyanogene Glykoside zu sequestrieren und *de novo* zu synthetisieren (Wray et al., 1983; Engler-Chaouat & Gilbert, 2007). Auch für *S. littoralis* wurden zwei *BSAS2*-Homologe gefunden. Diese Art hat sich auf keine Futterpflanze spezialisiert, sondern gehört zu den Generalisten. Je nach Nahrungsquelle kommen die Raupen von *S. littoralis* auch mit hohen Mengen an Cyanid in Kontakt, was eine Ausstattung mit effizienten Entgiftungsenzymen nötig macht. Beim Vergleich der kinetischen Werte für PrBSAS2 aus *P. rapae* mit den β -Cyanoalanin-Synthasen aus den anderen untersuchten Arten fällt auf, dass PrBSAS2 eine 10-fach geringere Affinität zu Cyanid aufweist. *P. rapae* kommt durch die Spezialisierung auf glucosinolathaltige Pflanzen nicht mit cyanogenem Pflanzenmaterial in Kontakt. Cyanid entsteht erst in den Raupen, sofern diese benzylglucosinolathaltige Futterpflanzen fressen. Für die Entgiftung der hohen Mengen an Cyanid, welche bei dem Fressen auf diesen Pflanzen entstehen, könnten die anderen Entgiftungsenzyme, z.B. PrBSAS1 mit einem hohen Turnover, eine wichtigere Rolle spielen. Der andere untersuchte Spezialist aus der Unterfamilie der Pierinae, *A. cardamines*, besitzt dagegen mit AcaBSAS2 ein *BSAS2*-Homolog mit einer hohen Affinität zu Cyanid. Die Raupen dieser Art haben jedoch eine nicht ganz so große Spannweite an Futterpflanzen wie *P. rapae* und fressen hauptsächlich auf *Alliaria petiolata* (Courtney, 1982). Diese Pflanze besitzt einen besonderen Stoffwechselweg des Hauptglucosinolats Allylglucosinolat. Bei Gewebeerstörung entsteht Allylthiocyanat, welches anschließend zu Cyanid umgesetzt wird (Frisch et al., 2015). Die Raupen von *A. cardamines* sind somit cyanogenem Pflanzenmaterial ausgesetzt und haben deshalb vielleicht AcaBSAS2 als Enzym mit hoher Cyanidaffinität bewahrt.



0.1

Abbildung 4.1: Phylogenie und Kinetik von charakterisierten β -Cyanoalanin-Synthasen aus Lepidoptera und Milben und uncharakterisierten Homologen aus Lepidoptera. Charakterisierte Sequenzen sind mit BSAS benannt. Uncharakterisierte bakterielle Proteine wurde als Wurzel verwendet. Der Maximum-Likelihood-Baum wurde mit 1000 Bootstrap Replikaten generiert, die Länge der Äste korreliert mit der Anzahl der Substitutionen entsprechend dem gezeigten Maßstab. β -Cyanoalanin-Synthasen mit V_{max} von 10-20 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ sind mit einem Kreis markiert, Enzyme mit einem K_m von 0,02-0,04 mM mit einem Dreieck.

Die *BSAS1*-Homologe, welche auf die Unterfamilie Pierinae beschränkt sind, zeigen zwar eine geringe Affinität zu Cyanid als Substrat, jedoch eine hohe maximale Geschwindigkeit (etwa um Faktor zehn höher als andere *BSAS*-Homologe, mit Ausnahme von *SIBSAS2b*) und damit

einen hohen Turnover (Abbildung 4.1). Eine Funktion in der Cyanidentgiftung durch das Verhindern der Akkumulation großer Cyanidmengen in den Darmzellen beim Metabolismus Glucosinolat-abgeleiteter aromatischer Nitrile ist daher denkbar. Die *BSAS3*-Homologe in der Familie Pieridae zeigen weder eine hohe Affinität zu Cyanid noch einen hohen Turnover, eine Beteiligung dieser Enzyme an der Cyanidentgiftung ist daher fraglich. Der Nachweis einer möglichen alternative Aktivität als O-Acetylerin(thiol)lyase gelang bisher jedoch nicht.

Neben dem Expressionsprofil von *PrBSAS1-PrBSAS3* wurde in dieser Arbeit auch bei *A. cardamines* und *S. littoralis* die Expression der identifizierten Gene untersucht. In den anderen untersuchten Arten waren nicht genug Individuen für eine Expressionsanalyse vorhanden. *A. cardamines* ist ebenfalls ein Spezialist auf glucosinolathaltigen Pflanzen und eng verwandt mit *P. rapae*, das Expressionsmuster von *AcaBSAS1-AcaBSAS3* unterscheidet sich jedoch von dem in *P. rapae* gefundenen Profil. Während bei *P. rapae* die Expression aller drei Gene auf das Darmgewebe beschränkt ist und die höchste Expression für *PrBSAS2* gefunden wurde, war *AcaBSAS2* zwar auch am stärksten, aber in allen untersuchten Geweben exprimiert (Abbildung 3.87). Die Expression von *AcaBSAS1* war ähnlich hoch wie die Expression von *AcaBSAS2*, jedoch auf das Darmgewebe beschränkt. *AcaBSAS3* war deutlich schwächer und ebenfalls hauptsächlich im Darmgewebe exprimiert. Genau wie bei *P. rapae* war also das Gen stark exprimiert, welches für das Enzym mit der höchsten Cyanid-Affinität (*AcaBSAS2* bzw. *PrBSAS2*) codiert. Im Gegensatz zu *P. rapae* war jedoch auch die Expression von *AcaBSAS1* hoch, also dem Gen, welches für das Enzym mit dem höchsten Turnover (*AcaBSAS1*) codiert. In *A. cardamines* waren somit die Gene beider Enzyme, welchen eine Rolle in der Cyanidentgiftung zugeordnet wird, in etwa gleich stark exprimiert. Interessant ist dabei die Expression von *AcaBSAS2*, welche nicht wie bei *P. rapae* auf den Darm beschränkt war, sondern in allen Geweben vorhanden war.

Bei dem untersuchten Generalisten *S. littoralis* wurden zwei *BSAS2*-Homologe identifiziert. Hier zeigte sich für *SIBSAS2a* eine ähnliche Expression wie für *AcaBSAS2* aus *A. cardamines*, das Gen war in allen Geweben etwa gleich stark exprimiert (Abbildung 3.88). *SIBSAS2b* dagegen war deutlich schwächer und ausschließlich im Darmgewebe der Raupen exprimiert. Genau wie bei *A. cardamines* ist somit auch in dieser Art das *BSAS2*-Homolog am stärksten und in allen Geweben exprimiert, welches für das Enzym mit der höchsten Cyanid-Affinität codiert.

Für die *BSAS2*-Homologe ist eine Funktion in der basalen Cyanidentgiftung denkbar, da sie in allen bisher untersuchten Lepidoptera gefunden wurden. Bei der Aufnahme von cyanogenem Pflanzenmaterial entsteht Cyanid schon beim Fraßvorgang durch das Zerstören der Kompartimentierung und nicht wie beim Metabolismus von aromatischen Nitrilen in Pierinae erst in den Darmzellen. Da Cyanid in diesem Fall z.B. auch über die Haut aufgenommen werden kann, könnte dies eine Expression von Cyanidentgiftungsenzymen in allen Raupengeweben erklären.

4.2.1 Evolutionärer Hintergrund der β -Cyanoalanin-Synthasen

Für das bisher einzige andere charakterisierte β -Cyanoalanin-Synthase-Gen aus Arthropoden, *Tu-CAS* aus einer Spinnmilbe (*Tetranychus urticae*), wurde ein interessanter evolutionärer Hintergrund postuliert. Mit hoher Wahrscheinlichkeit kam das Gen durch einen horizontalen Gentransfer aus Bakterien in die Milben (Wybouw et al., 2014). Der Begriff horizontaler Gentransfer beschreibt die asexuelle Übertragung von Genen über Artengrenzen hinweg. Dieses Phänomen ist vor allem in Prokaryoten bekannt und gut untersucht. In Eukaryoten wurde horizontaler Gentransfer bisher vor allem in Arthropoden beschrieben. Da die übertragenen Gene oft die Anpassung an Wirtspflanzen ermöglicht oder erleichtert haben, wurde ihm eine Rolle in der Evolution von Herbivoren zugeschrieben (Wybouw et al., 2016). Ein horizontaler Gentransfer lässt sich meist nicht direkt nachweisen, kann aber durch verschiedene Untersuchungen mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit abgeleitet werden. Der Goldstandard ist hier die molekulare phylogenetische Analyse, da sich hierbei das übertragene Gen mit Homologen nicht verwandter Arten, wie z.B. bakteriellen Sequenzen, gruppiert. Für *PrBSAS1-PrBSAS3* aus *P. rapae* wurde gezeigt,

dass sie sich bei phylogenetischen Analysen zusammen mit den Sequenzen aus den Spinnmilben innerhalb bakterieller Sequenzen gruppieren (van Ohlen et al., 2016). Der bakterielle Ursprung dieser Gene wurde in dieser Arbeit durch die Analyse der genomischen Sequenzen unterstützt, da keine Introns nachgewiesen werden konnten (Abbildung 3.13). Auch für die identifizierten β -Cyanoalanin-Synthasen der anderen untersuchten Lepidoptera-Arten ist dieser evolutionäre Hintergrund wahrscheinlich, da die gefundenen Sequenzen eine hohe Ähnlichkeit zu PrBSAS1-PrBSAS3 aufweisen und sich in der phylogenetischen Analyse zusammen mit den drei Sequenzen aus *P. rapae* gruppieren.

4.3 RNAi in Lepidoptera

Um die physiologische Funktion der β -Cyanoalanin-Synthasen der Pieridae weiter untersuchen zu können, sollte in dieser Arbeit die RNAi als Methode in *P. rapae* etabliert werden. Da die Raupen von *Pieris*-Arten vor allem in der nördlichen Hemisphäre bedeutende Schädlinge in der Landwirtschaft sind, wäre auch in Hinblick auf eine spätere Anwendung in der Schädlingsbekämpfung eine erfolgreiche RNAi-Methode attraktiv. Für die ersten Versuche wurde in dieser Arbeit das *NSP* der Raupen als Zielgen gewählt, weil hier durch die nachgewiesene Toxizität der Isothiocyanate bei erfolgreichem *Silencing* ein deutlicher Phänotyp zu erwarten ist. Für die Cyanidentgiftungsenzyme Rhodanese und β -Cyanoalanin-Synthase könnte es dagegen nötig sein, beide Entgiftungswege zu unterdrücken, bevor ein Effekt auf die Raupen sichtbar wird. *PrNSP* ist ausschließlich im Darm exprimiert, weshalb eine Zufuhr von dsRNA über die Nahrung gewählt wurde. Das Verfüttern von in dsRNA getränkten Blattscheiben brachte keinen Erfolg. Das Verfüttern von dsRNA war zwar laut Literatur in einigen Lepidoptera-Arten erfolgreich (Porta et al., 2011; Zhang et al., 2012; Camargo et al., 2015; Wang et al., 2015; Cao et al., 2017; Chaitanya et al., 2017; Meng et al., 2017b), jedoch gibt es nach wie vor eine hohe Variabilität in der RNAi Effizienz in Lepidoptera. Nur wenige Arten zeigen eine deutliche systemische RNAi, d.h. einen deutlichen Effekt im ganzen Organismus nach Aufnahme von nur wenigen Molekülen dsRNA. Das Nichtvorhandensein der RdRP zum Vervielfältigen des RNAi-Signals wird weiterhin oft als Grund angesehen und könnte auch in dieser Arbeit ein Faktor gewesen sein. Jedoch gibt es auch in den neueren Studien Gegenbeispiele, bei denen die Aufnahme von wenigen Nanogramm dsRNA zu deutlichen Antworten führte (z.B. Di Lelio et al. (2014)). Diese Arten können das Fehlen der RdRP offenbar kompensieren.

Für die Anwendung von RNAi in der Schädlingsbekämpfung ist eine effiziente orale Aufnahme der dsRNA unabdingbar. Mit der Herstellung von Pflanzen, welche dsRNA produzieren, wurde 2007 ein deutlicher Fortschritt erzielt (Baum et al., 2007; Mao et al., 2007). Dies zeigt sich in der steigenden Zahl an Publikationen, welche erfolgreich PMRi benutzen (Mao et al., 2011; Poreddy et al., 2015; Reddy et al., 2016; Maligeppagol et al., 2017; Kumar et al., 2012, 2014; Bao et al., 2016) und der Verwendung dieser Technik im Pflanzenschutz (Baum & Roberts, 2014). Da durch das Verfüttern transgener Pflanzen, welche dsRNA exprimieren, eine konstante Zufuhr großer Mengen dsRNA gewährleistet wird, wurde diese Technik nach den ersten erfolglosen Versuchen auch in dieser Arbeit angewendet. Hierzu wurden *A. thaliana* Mutanten transient über VIGS mit *PrNSP*-Konstrukten transformiert. Die Analyse der Genexpression in den Raupen nach acht- bis zehntägiger Verfütterung zeigte in beiden durchgeführten Versuchen eine Reduktion der Expression von *PrNSP* um etwa 50 % (Abbildungen 3.91 und 3.93). Dieses *Silencing* hatte jedoch keine Auswirkungen auf das Wachstum oder die Überlebensrate der Raupen. Ein Grund könnte die sehr hohe Expression von *PrNSP* sein. Beim Vergleich der CT-Werte von *PrNSP* mit denen der Referenzgene wird deutlich, dass *PrNSP* im Darm der Raupen höher exprimiert ist, als *Actin* oder *EF1 α* . Obwohl die Expression erfolgreich um etwa die Hälfte reduziert wurde, reichen die vorhandenen Transkripte offenbar aus, um die Enzymproduktion für die Entgiftung der Glucosinolate sicherzustellen. Ein weiterer Faktor der den Erfolg von RNAi bestimmt, ist der Protein-Turnover. Selbst wenn das *Silencing* des Zielgens nahezu

vollständig ist, tritt ein Effekt erst ein, wenn auch die schon vorhandenen Proteine abgebaut wurden. Im hier durchgeführten Versuch fand die Verfütterung der dsRNA über einen langen Zeitraum von acht bis zehn Tagen statt, so dass vorhandenes PrNSP vermutlich abgebaut wurde.

Bei der Auswertung der VIGS-Versuche fiel auf, dass die Expression von *PrNSP* in den Raupen, die auf der transformierten Quadrupelmutante von *A. thaliana* fraßen, gegenüber der Vektorkontrolle nicht reduziert war. Die Raupen auf beiden verwendeten Mutanten von *A. thaliana* entwickelten sich gleich schnell, daher kann eine verminderte Aufnahme von Blattmaterial und damit dsRNA nicht der Grund für dieses Ergebnis sein. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Transformation der Quadrupelmutante nicht effizient war. Um dies zu klären, müssten die beiden *A. thaliana* Mutanten nach der Transformation auf das Vorhandensein der dsRNA von *PrNSP* untersucht und diese quantifiziert werden.

Beim Vergleich der neueren Publikationen zu RNAi in Lepidoptera scheint die erfolgreichste Applikationsart nach wie vor die Injektion zu sein. Zwar gab es auch hier Fälle, in denen kein erfolgreiches *Silencing* erzielt wurde (Yokoi et al., 2013; Di Lelio et al., 2014). Die offenbar höhere Aktivität von dsRNasen in der Hämolymphe von Lepidoptera gegenüber anderen Insektenarten könnte dazu beitragen, dass es trotz erfolgreicher Aufnahme der dsRNA in einigen Fällen nicht zu einem deutlichen *Silencing* der Zielgene kam (Garbutt et al., 2013). Die große Anzahl erfolgreicher Versuche ist jedoch ein Argument dafür, die Injektion auch in *P. rapae* als mögliche Methode in Betracht zu ziehen. Es gibt bisher eine Publikation in der RNAi erfolgreich in *P. rapae* angewendet wurde (Wang et al., 2012a). In diesem Fall wurde die Expression von Calreticulin unterdrückt, welches vor allen in den Hämocyten der Raupen exprimiert wird. Die dsRNA wurde hier durch Injektion in die Puppen verabreicht. Nach 12 h wurde die Expression des *Calreticulin*-Gens in den Hämocyten untersucht. Das *Silencing* des Gens war hier erfolgreich, allerdings wurde die Expression ebenfalls nur um etwa 50 % reduziert. Im Gegensatz zu den Versuchen in dieser Arbeit konnte in dieser Publikation auch ein Effekt auf den Phänotyp gezeigt werden. Calreticulin besitzt in *P. rapae* offenbar eine Funktion im Immunsystem und es wurde gezeigt, dass die Unterdrückung der Expression zu einer verminderten Einkapselungsrate von Beads führt (Wang et al., 2012a). RNAi in *P. rapae* scheint also auch durch Injektion, zumindest in Puppen, erfolgreich zu sein. Dass in beiden Ansätzen die Expression der Gene nur um etwa 50 % reduziert wurde, zeigt jedoch auch, dass RNAi in dieser Art kein effizienter Prozess zu sein scheint.

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Raupen von *P. rapae* über eine vielfältige Enzymausstattung zur Entgiftung von Cyanid verfügen. Für beide an der Cyanidentgiftung beteiligten Wege wurden Enzyme auf molekularer Ebene identifiziert und charakterisiert. Die Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung einiger der identifizierten Enzyme an der Entgiftung hin. Die Analyse der physiologischen Funktion der Enzyme durch Induktionsversuche oder RNAi wären hilfreich, um die Verstoffwechslung von Cyanid in *P. rapae* weiter aufzuklären. Ebenso wären Untersuchungen zu einer möglichen weiteren Verstoffwechslung des gebildeten β -Cyanoalanins in *P. rapae* sehr interessant.

In allen untersuchten Lepidoptera-Arten wurde β -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität nachgewiesen. Alle identifizierten Enzyme setzten im Enzymassay Cyanid zu β -Cyanoalanin um. Ob sie aber auch eine physiologische Funktion in der Cyanidentgiftung besitzen, ist noch offen. Insbesondere für die *BSAS3*-Homologe, welche nur in Vertretern der Pieridae gefunden wurden, jedoch weder eine hohe Cyanid-Affinität, noch einen hohen Turnover besaßen, ist noch unklar, welche Rolle diese Enzyme spielen. Hier wäre es ebenfalls wichtig, die Funktion *in vivo* zu untersuchen, zum Beispiel durch RNAi. Außerdem wäre eine Untersuchung der Lokalisation interessant, da bisher nur über bioinformatische Analysen eine cytosolische Lokalisation vorhergesagt wurde.

Da in der Familie Pieridae nur für *P. rapae* und *A. cardamines* eine Rhodanese-Aktivität gezeigt wurde, wäre es von Interesse, auch in *A. cardamines* mögliche Rhodanese-Sequenzen zu identifizieren und zu charakterisieren. Eine genaue Untersuchung der Lokalisation der Rhodanesen und *in vivo*-Experimente zur physiologischen Rolle der Enzyme würden zu einem besseren Verständnis der Funktion beitragen.

Bei der Charakterisierung von β -Cyanoalanin-Synthasen aus verschiedenen Lepidoptera und der phylogenetischen Analyse der Sequenzen wurde deutlich, dass Pieridae über spezielle Cyanidentgiftungsenzyme verfügen, die möglicherweise zu dem Wirtswechsel auf glucosinolathaltige Pflanzen beigetragen haben. Die β -Cyanoalanin-Synthasen stammen mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer bakteriellen Sequenz ab, welche durch horizontalen Gentransfer in einen gemeinsamen Vorfahren der untersuchten Lepidoptera gelangte. Die *BSAS*-Homologe entstanden vermutlich durch Genduplikation. Die Theorie des horizontalen Gentransfers in Lepidoptera könnte in nachfolgenden Arbeiten durch weitere Untersuchungen, wie das Sequenzieren von flankierenden Sequenzen bestätigt werden.

RNAi als Methode zur Untersuchung der physiologischen Funktion von Genen ist in Lepidoptera oft nicht effizient. Auch in *P. rapae* zeigte sich nach Verfüttern von dsRNA-produzierenden Pflanzen nur eine leichte Reduktion des Zieltranskripts. Auf Basis der erfolgreichen Publikationen zu RNAi in Lepidoptera in den letzten Jahren wäre es interessant, die Injektion von dsRNA in die Raupen von *P. rapae* zu testen, da mit dieser Methode eventuell ein noch deutlicheres *Silencing* erzielt werden kann. Eine weitere Möglichkeit zur einfachen Ausschalten von Genen ist die CRISPR/Cas9-Methode. CRISPR steht für **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats. Diese Methode leitet sich aus dem adaptiven Immunsystem der Bakterien ab. Die Endonuklease Cas9 erkennt durch die Bindung eines RNA-Duplex doppelsträngige DNA und schneidet diese sequenzspezifisch. Durch anschließende Reparaturmechanismen werden Mutationen in die DNA-Sequenz eingefügt (Barrangou, 2014). Diese Methode kann durch Verwendung genspezifischer Single-guide RNAs (sgRNA) zum *Genome Editing* genutzt werden, beispielsweise um bestimmte Gene auszuschalten und damit deren Funktion zu untersuchen. In den letzten Jahren wurde CRISPR/Cas9 auch bei einigen Lepidoptera-Arten erfolgreich angewendet, darunter *B. mori*, *Papilio xuthus*, *S. littoralis*, *S. litura*, *P. xylostella*, *H. armigera* und *Cydia pomonella* (Wang et al., 2013a; Li et al., 2015a; Koutroumpa et al., 2016; Bi et al.,



2016; Huang et al., 2016; Ye et al., 2017; Garczynski et al., 2017). In allen Fällen wurden durch die Injektion von sgRNA und Cas9 mRNA in frisch gelegte Eier hohe Mutationsraten erzielt. Die hohe Erfolgsrate in verschiedenen Familien der Lepidoptera macht auch eine erfolgreiche Anwendung von CRISPR/Cas9 in *P. rapae* wahrscheinlich und könnte daher als Alternative zu RNAi angewendet werden, um die Funktion der Cyanidengiftungsenzyme zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Der Kleine Kohlweißling, *P. rapae* (Lepidoptera: Pieridae), ist ein Spezialist auf glucosinolat-haltigen Pflanzen. *P. rapae* gehört zu der Unterfamilie Pierinae, die vor etwa 80 Millionen Jahren einen Wirtswechsel von Fabales auf Brassicales vollzogen hat. Für diesen Wirtswechsel war das im Darm exprimierte NSP der Raupen essentiell, das beim Abbau der Glucosinolate zur Nitrilbildung führt. Durch die weitere Verstoffwechslung von Phenylalanin-abgeleiteten aromatischen Nitrilen in den Raupen entstehen äquimolaren Mengen Cyanid. Da in den ursprünglichen Brassicales aromatische Glucosinolate weit verbreitet waren, liegt die Hypothese nahe, dass das Vorhandensein effizienter Mechanismen zur Cyanidentgiftung eine Voraussetzung für den Wirtswechsel darstellte. In dieser Arbeit sollten β -Cyanoalanin-Synthasen und Rhodanesen als mögliche cyanidentgiftende Enzyme in *P. rapae* und anderen Lepidoptera-Arten identifiziert und charakterisiert werden, um die mögliche Rolle der Effizienz der Cyanidentgiftung für den Wirtswechsel zu untersuchen. In früheren Arbeiten waren bereits drei β -Cyanoalanin-Synthasen, PrBSAS1-PrBSAS3, aus *P. rapae* identifiziert worden. Zur weiteren Untersuchung der physiologischen Funktion dieser Enzyme sollte RNAi als Methode in *P. rapae* etabliert werden.

Die Analyse von Lepidoptera-Arten mit und ohne Spezialisierung auf glucosinolathaltige Pflanzen zeigte, dass β -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität weit verbreitet ist, während Rhodanese-Aktivität nur in wenigen Arten zu finden ist. Eine zuvor bereits zur Klonierung von PrBSAS1-PrBSAS3 eingesetzte PCR-Strategie mit degenerierten Primern wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf andere Arten der Lepidoptera angewandt. Zusätzlich wurden Informationen aus Datenbanken genutzt. Durch diesen Ansatz gelang die Identifizierung von 14 β -Cyanoalanin-Synthasen, die nach ihrer Ähnlichkeit zu PrBSAS1-PrBSAS3 benannt wurden. Während alle untersuchte Arten mindestens ein BSAS2-Homolog aufwiesen, wurden in Pieridae zusätzliche Enzyme gefunden. Alle untersuchten Arten aus der Familie Pieridae besaßen ein BSAS3-Homolog, Vertreter der Unterfamilie Pierinae zusätzlich ein BSAS1-Homolog.

Die Charakterisierung von PrBSAS1-PrBSAS3 nach Expression in *E. coli* zeigte Unterschiede in der Kinetik, was auf verschiedene physiologische Funktionen hindeutet. PrBSAS2 besaß die höchste Affinität zu Cyanid, PrBSAS1 die höchste Effizienz. Die Gene von PrBSAS1-PrBSAS3 waren hauptsächlich im Darm der Raupen exprimiert, wobei *PrBSAS2* am stärksten exprimiert war. Auch die Enzyme aus den anderen Arten wurden heterolog in *E. coli* exprimiert und nach der Aufreinigung charakterisiert. Die analysierten BSAS2-Homologe besaßen eine hohe Affinität zu Cyanid als Substrat ($K_m=0,02-0,04$ mM), während BSAS1- und BSAS3-Homologe K_m -Werte im höheren millimolaren Bereich aufwiesen. Zusammen mit ihrem verbreiteten Vorkommen in Lepidoptera liegt eine Funktion in der basalen Entgiftung von kleinen Cyanidmengen nahe. Die BSAS1-Homologe in Pierinae erwiesen sich im Vergleich zu den BSAS2- und BSAS3-Homologen als sehr effizient ($V_{max}=10-20$ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). Dies deutet auf eine Beteiligung in der Entgiftung großer Cyanidmengen hin, z.B. nach Fraß auf benzylglucosinolathaltigen Pflanzen. Für die BSAS3-Homologe ist aufgrund ihrer geringen Affinität und Effizienz eine Beteiligung an der Cyanidentgiftung unwahrscheinlich, weitere mögliche Funktionen müssten in weiterführenden Arbeiten untersucht werden.

Um erste Aussagen zur möglichen Rolle von Rhodanesen machen zu können, wurden Datenbankinformationen genutzt, um Rhodanesen aus *P. rapae* zu klonieren. Mit der Identifizierung von Rho1 und Rho2 gelang erstmalig die Identifizierung von Rhodanesen aus Insekten. Rho1

und Rho2 unterscheiden sich in ihrer Kinetik und vorhergesagten subzellulären Lokalisation. Während Rho2 vermutlich im Cytosol lokalisiert ist und nur eine geringe Affinität zu Cyanid aufweist, besitzt Rho1 ein mitochondriales Signalpeptid und einen deutlich niedrigeren K_m -Wert. *Rho1* und *Rho2* werden hauptsächlich im Darm der Raupen exprimiert, was eine Funktion in der Cyanidentgiftung unterstützt, die genaue physiologische Funktion ist jedoch noch ungeklärt.

Zur Etablierung der RNAi in *P. rapae* wurden zwei auf Verfütterung von dsRNA basierende Methoden mit *PrNSP* als Zielgen getestet. Das Verfüttern von dsRNA-haltiger Lösung auf Blattscheiben führte nicht zu einer Reduktion des Expressionsniveaus von *PrNSP*. Bei Verfütterung von Pflanzen, die die dsRNA aufgrund einer transienten Transformation mit *PrNSP*-RNAi-Konstrukten exprimierten, wurde eine Reduktion der *PrNSP*-Expression um etwa 50 % erzielt. Diese Reduktion hatte jedoch keinen Einfluss auf das Gewicht und Überleben der Raupen auf glucosinolathaltigen Pflanzen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass innerhalb der Pieridae und insbesondere innerhalb der Pierinae zusätzliche β -Cyanoalanin-Synthasen vorkommen, die in anderen Lepidoptera nicht gefunden wurden. Zusammen mit der hohen Effizienz der auf Pierinae beschränkten BSAS1-Homologe unterstützt dies eine Rolle der Cyanidentgiftung durch β -Cyanoalanin-Synthasen für die Wirtspflanzenanpassung der Pieridae. Weiterführende Arbeiten sollten die Funktion der BSAS3-Homologe sowie die Beteiligung von Rhodanesen an der Cyanidentgiftung untersuchen. Für die Untersuchung der physiologischen Funktion der cyanidentgiftenden Enzyme sollte die RNAi-Methode weiter optimiert werden.



Literaturverzeichnis

- Acosta, M., Beard, S., Ponce, J., Vera, M., Mobarec, J. C., & Jerez, C. A. (2005). Identification of putative sulfurtransferase genes in the extremophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 genome: structural and functional characterization of the proteins. *Omics: a Journal of Integrative Biology*, 9(1), 13–29.
- Adams, H., Teertstra, W., Koster, M., & Tommassen, J. (2002). PspE (phage-shock protein E) of *Escherichia coli* is a rhodanese. *FEBS Letters*, 518(1-3), 173–176.
- Agerbirk, N., Müller, C., Olsen, C. E., & Chew, F. S. (2006). A common pathway for metabolism of 4-hydroxybenzylglucosinolate in *Pieris* and *Anthocaris* (Lepidoptera: Pieridae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 34(3), 189–198.
- Agerbirk, N., Olsen, C. E., Poulsen, E., Jacobsen, N., & Hansen, P. R. (2010). Complex metabolism of aromatic glucosinolates in *Pieris rapae* caterpillars involving nitrile formation, hydroxylation, demethylation, sulfation, and host plant dependent carboxylic acid formation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(2), 126–137.
- Agrawal, A. A., & Kurashige, N. S. (2003). A role for isothiocyanates in plant resistance against the specialist herbivore *Pieris rapae*. *Journal of Chemical Ecology*, 29(6), 1403–1415.
- Andréasson, E., Jørgensen, L. B., Höglund, A.-S., Rask, L., & Meijer, J. (2001). Different myrosinase and idioblast distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Physiology*, 127(4), 1750–1763.
- Bao, W., Cao, B., Zhang, Y., & Wuriyangan, H. (2016). Silencing of *Mythimna separata* chitinase genes via oral delivery of in planta-expressed RNAi effectors from a recombinant plant virus. *Biotechnology Letters*, 38(11), 1961–1966.
- Barrangou, R. (2014). Cas9 targeting and the CRISPR revolution. *Science*, 344(6185), 707–708.
- Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., et al. (2007). Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 25(11), 1322–1326.
- Baum, J. A., & Roberts, J. K. (2014). Progress towards RNAi-mediated insect pest management. *Advances in Insect Physiology*, 47, 249–295.
- Beesley, S., Compton, S., & Jones, D. A. (1985). Rhodanese in insects. *Journal of Chemical Ecology*, 11(1), 45–50.
- Bergomaz, R., & Boppré, M. (1986). A simple instant diet for rearing Arctiidae and other moths. *Journal of the Lepidopterists' Society*, 40, 131–137.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363–366.
- Bessie, I. U., & Agboola, F. K. (2013). Detoxification of cyanide in insects. I. Purification and some properties of rhodanese from the gut of the variegated grasshopper *Zonocerus variegatus* (Orthoptera: Pyrgomorphidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 33(3), 153–162.



- Bi, H.-L., Xu, J., Tan, A.-J., & Huang, Y.-P. (2016). CRISPR/Cas9-mediated targeted gene mutagenesis in *Spodoptera litura*. *Insect Science*, 23(3), 469–477.
- Bimboim, H., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523.
- Blumenthal, S., Hendrickson, H., Abrol, Y., & Conn, E. E. (1968). Cyanide metabolism in higher plants III. The biosynthesis of β -cyanoalanine. *Journal of Biological Chemistry*, 243(20), 5302–5307.
- Bolognesi, R., Ramaseshadri, P., Anderson, J., Bachman, P., Clinton, W., Flannagan, R., Ilagan, O., Lawrence, C., Levine, S., Moar, W., et al. (2012). Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PLoS One*, 7(10), e47534.
- Bordo, D., & Bork, P. (2002). The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. *EMBO reports*, 3(8), 741–746.
- Burow, M., Bergner, A., Gershenzon, J., & Wittstock, U. (2007). Glucosinolate hydrolysis in *Lepidium sativum*—identification of the thiocyanate-forming protein. *Plant Molecular Biology*, 63(1), 49–61.
- Burow, M., Losansky, A., Müller, R., Plock, A., Kliebenstein, D. J., & Wittstock, U. (2009). The genetic basis of constitutive and herbivore-induced ESP-independent nitrile formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149(1), 561–574.
- Burow, M., Müller, R., Gershenzon, J., & Wittstock, U. (2006). Altered glucosinolate hydrolysis in genetically engineered *Arabidopsis thaliana* and its influence on the larval development of *Spodoptera littoralis*. *Journal of Chemical Ecology*, 32(11), 2333–2349.
- Busching, C. (2016). Enzyme der Cyanidentgiftung in *Pieris rapae*: Untersuchungen zur Cysteinsynthase-Aktivität von PrBSAS1-PrBSAS3 und Klonierung von Rhodanese-cDNAs. Bachelorarbeit, TU Braunschweig.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622.
- Camargo, R. d. A., Herai, R. H., Santos, L. N., Bento, F. M., Lima, J. E., Marques-Souza, H., & Figueira, A. (2015). De novo transcriptome assembly and analysis to identify potential gene targets for RNAi-mediated control of the tomato leafminer (*Tuta absoluta*). *BMC Genomics*, 16(1), 635.
- Cao, B., Bao, W., & Wuriyangan, H. (2017). Silencing of target chitinase genes via oral delivery of dsRNA caused lethal phenotypic effects in *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181(2), 860–866.
- Cao, J., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, H., Li, Z., Yang, Q., Zhang, S., Zhang, Q., & Liu, X. (2015). Molecular characterization and functional analysis of the ultraspiracle (USP) in the oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Olethreutidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 190, 54–62.
- Cappelle, K., de Oliveira, C., Van Eynde, B., Christiaens, O., & Smagghe, G. (2016). The involvement of clathrin-mediated endocytosis and two Sid-1-like transmembrane proteins in double-stranded RNA uptake in the Colorado potato beetle midgut. *Insect Molecular Biology*, 25(3), 315–323.



- Chaitanya, B., Asokan, R., Sita, T., Rebijith, K., Kumar, P. R., & Kumar, N. K. (2017). Silencing of JHEH and EcR genes of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) through double stranded RNA oral delivery. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(2), 637–643.
- Choi, M.-Y., Vander Meer, R. K., Coy, M., & Scharf, M. E. (2012). Phenotypic impacts of PBAN RNA interference in an ant, *Solenopsis invicta*, and a moth, *Helicoverpa zea*. *Journal of Insect Physiology*, 58(8), 1159–1165.
- Cipollone, R., Ascenzi, P., & Visca, P. (2007). Common themes and variations in the rhodanese superfamily. *IUBMB life*, 59(2), 51–59.
- Claros, M. G. (1995). MitoProt, a Macintosh application for studying mitochondrial proteins. *Bioinformatics*, 11(4), 441–447.
- Courtney, S. P. (1982). Coevolution of Pierid butterflies and their cruciferous foodplants IV. Crucifer apparency and *Anthocharis cardamines* (L.) oviposition. *Oecologia*, 52(2), 258–265.
- Dagert, M., & Ehrlich, S. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*, 6(1), 23–28.
- De Duve, C., Pressman, B., Gianetto, R., Wattiaux, R., & Appelmann, F. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochemical Journal*, 60(4), 604.
- de Vos, M., Kriksunov, K. L., & Jander, G. (2008). Indole-3-acetonitrile production from indole glucosinolates deters oviposition by *Pieris rapae*. *Plant Physiology*, 146(3), 916–926.
- Di Lelio, I., Varricchio, P., Di Prisco, G., Marinelli, A., Lasco, V., Caccia, S., Casartelli, M., Giordana, B., Rao, R., Gigliotti, S., et al. (2014). Functional analysis of an immune gene of *Spodoptera littoralis* by RNAi. *Journal of Insect Physiology*, 64, 90–97.
- Dong, K., Sun, L., Liu, J.-T., Gu, S.-H., Zhou, J.-J., Yang, R.-N., Dhiloo, K. H., Gao, X.-W., Guo, Y.-Y., & Zhang, Y.-J. (2017). RNAi-Induced Electrophysiological and Behavioral Changes Reveal two Pheromone Binding Proteins of *Helicoverpa armigera* Involved in the Perception of the Main Sex Pheromone Component Z11-16: Ald. *Journal of Chemical Ecology*, 43(2), 207–214.
- Dong, X., Zhai, Y., Hu, M., Zhong, G., Huang, W., Zheng, Z., & Han, P. (2013). Proteomic and properties analysis of botanical insecticide Rhodojaponin III-induced response of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *PloS one*, 8(7), e67723.
- Du, M., Yin, X., Zhang, S., Zhu, B., Song, Q., & An, S. (2012). Identification of lipases involved in PBAN stimulated pheromone production in *Bombyx mori* using the DGE and RNAi approaches. *PloS one*, 7(2), e31045.
- Dudek, M., Frendo, J., & Koj, A. (1980). Subcellular compartmentation of rhodanese and 3-mercaptopyruvate sulphurtransferase in the liver of some vertebrate species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 65(2), 383–386.
- Durand, N., Carot-Sans, G., Chertemps, T., Montagné, N., Jacquin-Joly, E., Debernard, S., & Maïbèche-Coisne, M. (2010). A diversity of putative carboxylesterases are expressed in the antennae of the noctuid moth *Spodoptera littoralis*. *Insect Molecular Biology*, 19(1), 87–97.
- Ehrlich, P. R., & Raven, P. H. (1964). Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution*, 18(4), 586–608.



- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., & Von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology*, 300(4), 1005–1016.
- Engler-Chauvat, H. S., & Gilbert, L. E. (2007). De novo synthesis vs. sequestration: negatively correlated metabolic traits and the evolution of host plant specialization in cyanogenic butterflies. *Journal of Chemical Ecology*, 33(1), 25–42.
- Ettlinger, M. G., & Lundeen, A. J. (1957). First synthesis of a mustard oil glucoside; the enzymatic Lossen rearrangement. *Journal of the American Chemical Society*, 79(7), 1764–1765.
- Feinberg, E. H., & Hunter, C. P. (2003). Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science*, 301(5639), 1545–1547.
- Feng, E., Chen, H., Li, Y., Jiang, W., Wang, Z., & Yin, Y. (2014). Gene cloning, expression, and function analysis of SpL14-3-3 ζ in *Spodoptera litura* and its response to the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 172, 49–56.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811.
- Fischer, H. M., Wheat, C. W., Heckel, D. G., & Vogel, H. (2008). Evolutionary origins of a novel host plant detoxification gene in butterflies. *Molecular Biology and Evolution*, 25(5), 809–820.
- Franzke, A., Lysak, M. A., Al-Shehbaz, I. A., Koch, M. A., & Mummenhoff, K. (2011). Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae. *Trends in Plant Science*, 16(2), 108–116.
- Frisch, T., Motawia, M. S., Olsen, C. E., Agerbirk, N., Møller, B. L., & Bjarnholt, N. (2015). Diversified glucosinolate metabolism: biosynthesis of hydrogen cyanide and of the hydroxynitrile glucoside alliarinoside in relation to sinigrin metabolism in *Alliaria petiolata*. *Frontiers in Plant Science*, 6.
- Frohman, M. A., Dush, M. K., & Martin, G. R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(23), 8998–9002.
- Gaitonde, M. (1967). A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochemical Journal*, 104(2), 627.
- Ganbaatar, O., Cao, B., Zhang, Y., Bao, D., Bao, W., & Wuriyangan, H. (2017). Knockdown of *Mythimna separata* chitinase genes via bacterial expression and oral delivery of RNAi effectors. *BMC Biotechnology*, 17(1), 9.
- Garbutt, J. S., Bellés, X., Richards, E. H., & Reynolds, S. E. (2013). Persistence of double-stranded RNA in insect hemolymph as a potential determiner of RNA interference success: evidence from *Manduca sexta* and *Blattella germanica*. *Journal of Insect Physiology*, 59(2), 171–178.
- Garczynski, S. F., Martin, J. A., Griset, M., Willett, L. S., Cooper, W. R., Swisher, K. D., & Unruh, T. R. (2017). CRISPR/Cas9 Editing of the Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) CpomOR1 Gene Affects Egg Production and Viability. *Journal of Economic Entomology*, 110(4), 1847–1855.



- Ghildiyal, M., & Zamore, P. D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics*, 10(2), 94–108.
- Gordon, K. H., & Waterhouse, P. M. (2007). RNAi for insect-proof plants. *Nature Biotechnology*, 25(11), 1231–1232.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., & Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila cells*. *Nature*, 404(6775), 293–296.
- Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R., & Hannon, G. J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, 293(5532), 1146–1150.
- Han, P., Fan, J., Liu, Y., Cuthbertson, A. G., Yan, S., Qiu, B.-L., & Ren, S. (2014). RNAi-mediated knockdown of serine protease inhibitor genes increases the mortality of *Plutella xylostella* challenged by destruxin A. *PLoS one*, 9(5), e97863.
- Hanin, O., Azrielli, A., Applebaum, S., & Rafaeli, A. (2012). Functional impact of silencing the *Helicoverpa armigera* sex-peptide receptor on female reproductive behaviour. *Insect Molecular Biology*, 21(2), 161–167.
- Hatzfeld, Y., Maruyama, A., Schmidt, A., Noji, M., Ishizawa, K., & Saito, K. (2000). β -Cyanoalanine synthase is a mitochondrial cysteine synthase-like protein in spinach and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 123(3), 1163–1172.
- Hell, R., & Wirtz, M. (2011). Molecular biology, biochemistry and cellular physiology of cysteine metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book*, (p. e0154).
- Herfurth, A.-M., Ohlen, M. v., & Wittstock, U. (2017). β -Cyanoalanine Synthases and Their Possible Role in Pierid Host Plant Adaptation. *Insects*, 8(2), 62.
- Hirai, M., Terenius, O., Li, W., & Faye, I. (2004). Baculovirus and dsRNA induce Hemolin, but no antibacterial activity, in *Antheraea pernyi*. *Insect Molecular Biology*, 13(4), 399–405.
- Huang, Y., Chen, Y., Zeng, B., Wang, Y., James, A. A., Gurr, G. M., Yang, G., Lin, X., Huang, Y., & You, M. (2016). CRISPR/Cas9 mediated knockout of the abdominal-A homeotic gene in the global pest, diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 75, 98–106.
- Ivashuta, S., Zhang, Y., Wiggins, B. E., Ramaseshadri, P., Segers, G. C., Johnson, S., Meyer, S. E., Kerstetter, R. A., McNulty, B. C., Bolognesi, R., et al. (2015). Environmental RNAi in herbivorous insects. *RNA*, 21(5), 840–850.
- Jeschke, V., Gershenzon, J., & Vassão, D. G. (2016). A mode of action of glucosinolate-derived isothiocyanates: Detoxification depletes glutathione and cysteine levels with ramifications on protein metabolism in *Spodoptera littoralis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 71, 37–48.
- Kim, M., Lee, S., Chun, Y. S., Na, J., Kwon, H., Kim, W., & Kim, Y. (2017). Heat tolerance induction of the Indian Meal Moth (Lepidoptera: Pyralidae) is accompanied by upregulation of heat shock proteins and polyols. *Environmental Entomology*, 46(4), 1005–1011.
- Koutroumpa, F. A., Monsempe, C., François, M.-C., De Cian, A., Royer, C., Concorde, J.-P., & Jacquín-Joly, E. (2016). Heritable genome editing with CRISPR/Cas9 induces anosmia in a crop pest moth. *Scientific Reports*, 6.
- Kreis-Kleinschmidt, V., Fahrenholz, F., Kojro, E., & Kröger, A. (1995). Periplasmic sulphide dehydrogenase (Sud) from *Wolinella succinogenes*: isolation, nucleotide sequence of the sud gene and its expression in *Escherichia coli*. *The FEBS Journal*, 227(1-2), 137–142.



- Kumar, P., Pandit, S. S., & Baldwin, I. T. (2012). Tobacco rattle virus vector: a rapid and transient means of silencing *Manduca sexta* genes by plant mediated RNA interference. *PLoS one*, 7(2), e31347.
- Kumar, P., Pandit, S. S., Steppuhn, A., & Baldwin, I. T. (2014). Natural history-driven, plant-mediated RNAi-based study reveals CYP6B46's role in a nicotine-mediated antipredator herbivore defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(4), 1245–1252.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874.
- Lambrix, V., Reichelt, M., Mitchell-Olds, T., Kliebenstein, D. J., & Gershenzon, J. (2001). The *Arabidopsis* epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. *The Plant Cell Online*, 13(12), 2793–2807.
- Li, C., Yu, J.-F., Lu, Q., Xu, J., Liu, J.-H., & Ye, H. (2014). Molecular characterization and functional analysis of a putative sex-peptide receptor in the tobacco cutworm *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775)(Lepidoptera: Noctuidae). *Austral Entomology*, 53(4), 424–431.
- Li, Q., Eigenbrode, S. D., Stringam, G., & Thiagarajah, M. (2000). Feeding and growth of *Plutella xylostella* and *Spodoptera eridania* on *Brassica juncea* with varying glucosinolate concentrations and myrosinase activities. *Journal of Chemical Ecology*, 26(10), 2401–2419.
- Li, X., Fan, D., Zhang, W., Liu, G., Zhang, L., Zhao, L., Fang, X., Chen, L., Dong, Y., Chen, Y., et al. (2015a). Outbred genome sequencing and CRISPR/Cas9 gene editing in butterflies. *Nature Communications*, 6.
- Li, Y., Dou, K., Gao, S., Sun, J., Wang, M., Fu, K., Yu, C., Wu, Q., Li, Y., & Chen, J. (2015b). Impacts on silkworm larvae midgut proteomics by transgenic *Trichoderma* strain and analysis of glutathione S-transferase sigma 2 gene essential for anti-stress response of silkworm larvae. *Journal of Proteomics*, 126, 218–227.
- Li, Y.-P., Xiao, M., Li, L., Song, C.-X., Wang, J.-L., & Liu, X.-S. (2015c). Molecular characterization of a peptidoglycan recognition protein from the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* and its role in the prophenoloxidase activation pathway. *Molecular Immunology*, 65(1), 123–132.
- Lichtenstein, E., Morgan, D., & Mueller, C. (1964). Insecticides in nature, naturally occurring insecticides in Cruciferous crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 12(2), 158–161.
- Liu, Q.-N., Lin, K.-Z., Yang, L.-N., Dai, L.-S., Wang, L., Sun, Y., Qian, C., Wei, G.-Q., Liu, D.-R., Zhu, B.-J., et al. (2015). Molecular characterization of an *apolipophorin-III* gene from the Chinese Oak Silkworm, *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 88(3), 155–167.
- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., & Dinesh-Kumar, S. (2002). Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal*, 30(4), 415–429.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Lu, Q., Huang, L.-Y., Chen, P., Yu, J.-F., Xu, J., Deng, J.-Y., & Ye, H. (2015). Identification and RNA interference of the Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide (PBAN) in the common cutworm moth *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 108(3), 1344–1353.



- Maligeppagol, M., Asokan, R., Krishna, V., Chandra, S., Latha, J., NK, K. K., Ellango, R., et al. (2017). Transgenic tomato expressing dsRNA of juvenile hormone acid O-methyl transferase gene of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) affects larval growth and its development. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(2), 559–567.
- Mao, Y.-B., Cai, W.-J., Wang, J.-W., Hong, G.-J., Tao, X.-Y., Wang, L.-J., Huang, Y.-P., & Chen, X.-Y. (2007). Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, 25(11), 1307–1313.
- Mao, Y.-B., Tao, X.-Y., Xue, X.-Y., Wang, L.-J., & Chen, X.-Y. (2011). Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. *Transgenic Research*, 20(3), 665–673.
- Meng, F., Li, Y., Zang, Z., Li, N., Xue, R., Cao, Y., Li, T., Zhou, Q., & Li, W. (2017a). Expression of the double-stranded RNA of the soybean pod borer *Leguminivora glycinivorella* (Lepidoptera: Tortricidae) ribosomal protein P0 gene enhances the resistance of transgenic soybean plants. *Pest Management Science*.
- Meng, F. L., Ran, R. X., Li, Y., Li, N., Li, H. Z., Wang, Z. K., & Li, W. B. (2017b). RNA interference mediated serine protease gene (*Spbtry1*) knockdown affects growth and mortality in the soybean pod borer (Lepidoptera: Olethreutidae). *Florida Entomologist*, 100(3), 607–615.
- Meng, X., Hu, J., Xu, X., Wang, Z., Hu, Q., Jin, F., & Ren, S. (2013). Toxic effect of destruxin A on abnormal wing disc-like (SLAWD) in *Spodoptera litura fabricius* (Lepidoptera: Noctuidae). *PloS one*, 8(2), e57213.
- Meyers, D. M., & Ahmad, S. (1991). Link between L-3-cyanoalanine synthase activity and differential cyanide sensitivity of insects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1075(2), 195–197.
- Miles, C. I., Del Campo, M. L., & Renwick, J. A. A. (2005). Behavioral and chemosensory responses to a host recognition cue by larvae of *Pieris rapae*. *Journal of Comparative Physiology A*, 191(2), 147–155.
- Mithen, R., Bennett, R., & Marquez, J. (2010). Glucosinolate biochemical diversity and innovation in the Brassicales. *Phytochemistry*, 71(17), 2074–2086.
- Montgomery, M. K., Xu, S., & Fire, A. (1998). RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26), 15502–15507.
- Müller, R., De Vos, M., Sun, J. Y., Sønderby, I. E., Halkier, B. A., Wittstock, U., & Jander, G. (2010). Differential effects of indole and aliphatic glucosinolates on lepidopteran herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 36(8), 905–913.
- Mumm, R., Burow, M., Bukovinszkiné Kiss, G., Kazantzidou, E., Wittstock, U., Dicke, M., & Gershenson, J. (2008). Formation of simple nitriles upon glucosinolate hydrolysis affects direct and indirect defense against the specialist herbivore, *Pieris rapae*. *Journal of Chemical Ecology*, 34(10), 1311.
- Ningshen, T. J., Aparoy, P., Ventaku, V. R., & Dutta-Gupta, A. (2013). Functional interpretation of a non-gut hemocoelic tissue aminopeptidase N (APN) in a lepidopteran insect pest *Achaea janata*. *PloS one*, 8(11), e79468.



- Nour-Eldin, H. H., Hansen, B. G., Nørholm, M. H., Jensen, J. K., & Halkier, B. A. (2006). Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Research*, 34(18), e122–e122.
- Oda, Y., Matsumoto, H., Kurakake, M., Ochiai, M., Ohnishi, A., & Hayakawa, Y. (2010). Adaptor protein is essential for insect cytokine signaling in hemocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(36), 15862–15867.
- Ploegman, J., Drent, G., Kalk, K., & Hol, W. (1978). Structure of bovine liver rhodanese: I. Structure determination at 2.5 Å resolution and a comparison of the conformation and sequence of its two domains. *Journal of Molecular Biology*, 123(4), 557–594.
- Poreddy, S., Mitra, S., Schöttner, M., Chandran, J., Schneider, B., Baldwin, I. T., Kumar, P., & Pandit, S. S. (2015). Detoxification of hostplant's chemical defence rather than its anti-predator co-option drives β -glucosidase-mediated lepidopteran counteradaptation. *Nature Communications*, 6, 8525.
- Porta, H., Jiménez, G., Cordoba, E., León, P., Soberón, M., & Bravo, A. (2011). Tobacco plants expressing the Cry1AbMod toxin suppress tolerance to Cry1Ab toxin of *Manduca sexta* cadherin-silenced larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7), 513–519.
- Qiao, C., Li, J., Wei, X.-H., Wang, J.-L., Wang, Y.-F., & Liu, X.-S. (2014). SRP gene is required for *Helicoverpa armigera* prophenoloxidase activation and nodulation response. *Developmental & Comparative Immunology*, 44(1), 94–99.
- Raha, S., Merante, F., Proteau, G., & Reed, J. K. (1990). Simultaneous isolation of total cellular RNA and DNA from tissue culture cells using phenol and lithium chloride. *Gene Analysis Techniques*, 7(7), 173–177.
- Ratzka, A., Vogel, H., Kliebenstein, D. J., Mitchell-Olds, T., & Kroymann, J. (2002). Disarming the mustard oil bomb. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17), 11223–11228.
- Ray, W. K., Zeng, G., Potters, M. B., Mansuri, A. M., & Larson, T. J. (2000). Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin. *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2277–2284.
- Reddy, K., Rajam, M., et al. (2016). Targeting chitinase gene of *Helicoverpa armigera* by host-induced RNA interference confers insect resistance in tobacco and tomato. *Plant Molecular Biology*, 90(3), 281–292.
- Renwick, J., & Lopez, K. (1999). Experience-based food consumption by larvae of *Pieris rapae*: addiction to glucosinolates? *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 91(1), 51–58.
- Ressler, C., et al. (1962). Isolation and identification from common vetch of the neurotoxin β -cyano-L-alanine, a possible factor in neurolathyrism. *Journal of Biological Chemistry*, 237(3), 733–735.
- Saleh, M.-C., van Rij, R. P., Hekele, A., Gillis, A., Foley, E., O'Farrell, P. H., & Andino, R. (2006). The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature Cell Biology*, 8(8), 793–802.
- Sarsby, J., Towers, M. W., Stain, C., Cramer, R., & Koroleva, O. A. (2012). Mass spectrometry imaging of glucosinolates in *Arabidopsis* flowers and siliques. *Phytochemistry*, 77, 110–118.
- Shabab, M., Khan, S. A., Vogel, H., Heckel, D. G., & Boland, W. (2014). OPDA isomerase GST16 is involved in phytohormone detoxification and insect development. *The FEBS Journal*, 281(12), 2769–2783.



- Shirzadian-Khorramabad, R., Jing, H.-C., Everts, G. E., Schippers, J. H., Hille, J., & Dijkwel, P. P. (2010). A mutation in the cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase induces a genome-dependent early leaf death phenotype in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 10(1), 80.
- Shukla, J. N., Kalsi, M., Sethi, A., Narva, K. E., Fishilevich, E., Singh, S., Mogilicherla, K., & Palli, S. R. (2016). Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. *RNA Biology*, 13(7), 656–669.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H., & Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell*, 107(4), 465–476.
- Sörbo, B. (1957). A colorimetric method for the determination of thiosulfate. *Biochimica et Biophysica acta*, 23, 412–416.
- Spallarossa, A., Donahue, J. L., Larson, T. J., Bolognesi, M., & Bordo, D. (2001). *Escherichia coli* GlpE is a prototype sulfurtransferase for the single-domain rhodanese homology superfamily. *Structure*, 9(11), 1117–1125.
- Stauber, E. J., Kuczka, P., Van Ohlen, M., Vogt, B., Janowitz, T., Piotrowski, M., Beuerle, T., & Wittstock, U. (2012). Turning the ‘mustard oil bomb’ into a ‘cyanide bomb’: aromatic glucosinolate metabolism in a specialist insect herbivore. *PLoS One*, 7(4), e35545.
- Sun, J. Y., Sønderby, I. E., Halkier, B. A., Jander, G., & de Vos, M. (2009). Non-volatile intact indole glucosinolates are host recognition cues for ovipositing *Plutella xylostella*. *Journal of Chemical Ecology*, 35(12), 1427–1436.
- Sylvester, D., & Sander, C. (1990). Immunohistochemical localization of rhodanese. *The Histochemical Journal*, 22(4), 197–200.
- Tabara, H., Grishok, A., Mello, C. C., et al. (1998). RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science*, 282(5388), 430–431.
- Tang, T., Li, X., Liu, X., Wang, Y., Ji, C., Wang, Y., Wang, X., Xie, S., Liu, F., & Wang, J. (2018). A single-domain rhodanese homologue MnRDH1 helps to maintain redox balance in *Macrobrachium nipponense*. *Developmental & Comparative Immunology*, 78, 160–168.
- Tang, T., Zhao, C., Feng, X., Liu, X., & Qiu, L. (2012). Knockdown of several components of cytochrome P450 enzyme systems by RNA interference enhances the susceptibility of *Helicoverpa armigera* to fenvalerate. *Pest Management Science*, 68(11), 1501–1511.
- Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J. S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., Kanginakudru, S., Albrechtsen, M., An, C., Aymeric, J.-L., Barthel, A., et al. (2011). RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology*, 57(2), 231–245.
- Timmons, L., & Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395(6705), 854–854.
- Tookey, H. (1973). Crambe thioglucoside glucohydrolase (EC 3.2. 3.1): separation of a protein required for epithiobutane formation. *Canadian Journal of Biochemistry*, 51(12), 1654–1660.
- Ulvila, J., Parikka, M., Kleino, A., Sormunen, R., Ezekowitz, R. A., Kocks, C., & Rämetsä, M. (2006). Double-stranded RNA is internalized by scavenger receptor-mediated endocytosis in *Drosophila* S2 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20), 14370–14375.



- van Ohlen, M., Herfurth, A.-M., Kerbstadt, H., & Wittstock, U. (2016). Cyanide detoxification in an insect herbivore: molecular identification of β -cyanoalanine synthases from *Pieris rapae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 70, 99–110.
- Vergara, F., Svatoš, A., Schneider, B., Reichelt, M., Gershenzon, J., & Wittstock, U. (2006). Glycine conjugates in a lepidopteran insect herbivore—the metabolism of benzylglucosinolate in the cabbage white butterfly, *Pieris rapae*. *ChemBioChem*, 7(12), 1982–1989.
- Vergara, F., Svatoš, A., Schneider, B., Reichelt, M., Gershenzon, J., & Wittstock, U. (2007). Glycine conjugates in a lepidopteran insect herbivore—the metabolism of benzylglucosinolate in the cabbage white butterfly, *Pieris rapae*. *ChemBioChem*, 8(15), 1757–1757.
- Virtanen, A. (1962). Organische Schwefelverbindungen in Gemüse-und Futterpflanzen. *Angewandte Chemie*, 74(11), 374–382.
- Vozdek, R., Hnízda, A., Krijt, J., Šerá, L., & Kožich, V. (2013). Biochemical properties of nematode O-acetylserine (thiol) lyase paralogs imply their distinct roles in hydrogen sulfide homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1834(12), 2691–2701.
- Wang, J., Gu, L., Ireland, S., Garczynski, S. F., & Knipple, D. C. (2015). Phenotypic screen for RNAi effects in the codling moth *Cydia pomonella*. *Gene*, 572(2), 184–190.
- Wang, L., Fang, Q., Zhu, J., Wang, F., Akhtar, Z. R., & Ye, G. (2012a). Molecular cloning and functional study of calreticulin from a lepidopteran pest, *Pieris rapae*. *Developmental & Comparative Immunology*, 38(1), 55–65.
- Wang, Y., Li, Z., Xu, J., Zeng, B., Ling, L., You, L., Chen, Y., Huang, Y., & Tan, A. (2013a). The CRISPR/Cas system mediates efficient genome engineering in *Bombyx mori*. *Cell Research*, 23(12), 1414.
- Wang, Y., Zhang, H., Li, H., & Miao, X. (2011). Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. *PLoS one*, 6(4), e18644.
- Wang, Z., Dong, Y., Desneux, N., & Niu, C. (2013b). RNAi silencing of the HaHMG-CoA reductase gene inhibits oviposition in the *Helicoverpa armigera* cotton bollworm. *PloS one*, 8(7), e67732.
- Wang, Z., Zhang, W., Chen, H., Yin, Y., et al. (2012b). Cloning and characterisation of the gallerimycin gene from immunised *Spodoptera litura*. *Bulletin of Insectology*, 65(2), 233–238.
- Wheat, C. W., Vogel, H., Wittstock, U., Braby, M. F., Underwood, D., & Mitchell-Olds, T. (2007). The genetic basis of a plant–insect coevolutionary key innovation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(51), 20427–20431.
- Winde, I., & Wittstock, U. (2011). Insect herbivore counteradaptations to the plant glucosinolate–myrosinase system. *Phytochemistry*, 72(13), 1566–1575.
- Winston, W. M., Molodowitch, C., & Hunter, C. P. (2002). Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, 295(5564), 2456–2459.
- Winston, W. M., Sutherlin, M., Wright, A. J., Feinberg, E. H., & Hunter, C. P. (2007). *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(25), 10565–10570.



- Wittstock, U., Agerbirk, N., Stauber, E. J., Olsen, C. E., Hippler, M., Mitchell-Olds, T., Gershenzon, J., & Vogel, H. (2004). Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(14), 4859–4864.
- Wittstock, U., Kliebenstein, D. J., Lambrix, V., Reichelt, M., & Gershenzon, J. (2003). Chapter five glucosinolate hydrolysis and its impact on generalist and specialist insect herbivores. *Recent Advances in Phytochemistry*, 37, 101–125.
- Wray, V., Davis, R., & Nahrstedt, A. (1983). Biosynthesis of cyanogenic glycosides in butterflies and moths: incorporation of valine and isoleucine into linamarin and lotaustralin by *Zygaena* and *Heliconius* species (Lepidoptera). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 38(7-8), 583–588.
- Wu, F., Kang, L., Wang, P., & Zhao, Q. (2016). The expression analysis of cysteine proteinase-like protein in wild-type and nm2 mutant silkworm (Lepidoptera: *Bombyx mori*). *Gene*, 586(1), 170–175.
- Wybouw, N., Dermauw, W., Tirry, L., Stevens, C., Grbić, M., Feyereisen, R., & Van Leeuwen, T. (2014). A gene horizontally transferred from bacteria protects arthropods from host plant cyanide poisoning. *eLife*, 3, e02365.
- Wybouw, N., Pauchet, Y., Heckel, D. G., & Van Leeuwen, T. (2016). Horizontal gene transfer contributes to the evolution of arthropod herbivory. *Genome Biology and Evolution*, 8(6), 1785–1801.
- Xiang, H., Li, M., Guo, J., Jiang, J., & Huang, Y. (2011). Influence of RNAi knockdown for E-complex genes on the silkworm proleg development. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 76(1), 1–11.
- Xu, X., Jin, F., Wang, Y., Freed, S., Hu, Q., & Ren, S. (2015). Molecular cloning and characterization of gloverin from the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. and its interaction with bacterial membrane. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(10), 1529–1541.
- Yao, Q., Zhang, D., Tang, B., Chen, J., Chen, J., Lu, L., & Zhang, W. (2010). Identification of 20-hydroxyecdysone late-response genes in the chitin biosynthesis pathway. *PloS one*, 5(11), e14058.
- Ye, Z.-F., Liu, X.-L., Han, Q., Liao, H., Dong, X.-T., Zhu, G.-H., & Dong, S.-L. (2017). Functional characterization of PBP1 gene in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) by using the CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*, 7(1), 8470.
- Yokoi, K., Kamezaki, M., Yoshida, T., Tanaka, T., & Miura, K. (2013). Sensitivity to RNA interference-mediated gene silencing in intact and ligated larvae of the armyworm, *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied Entomology and Zoology*, 48(4), 431–439.
- Yoon, J.-S., Gurusamy, D., & Palli, S. R. (2017). Accumulation of dsRNA in endosomes contributes to inefficient RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 90, 53–60.
- Zagrobelny, M., Bak, S., Rasmussen, A. V., Jørgensen, B., Naumann, C. M., & Møller, B. L. (2004). Cyanogenic glucosides and plant–insect interactions. *Phytochemistry*, 65(3), 293–306.
- Zagrobelny, M., Scheibye-Alsing, K., Jensen, N. B., Møller, B. L., Gorodkin, J., & Bak, S. (2009). 454 pyrosequencing based transcriptome analysis of *Zygaena filipendulae* with focus on genes involved in biosynthesis of cyanogenic glucosides. *BMC Genomics*, 10(1), 574.



- Zhang, H., Li, H., Guan, R., & Miao, X. (2015a). Lepidopteran insect species-specific, broad-spectrum, and systemic RNA interference by spraying dsRNA on larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 155(3), 218–228.
- Zhang, J., Khan, S. A., Hasse, C., Ruf, S., Heckel, D. G., & Bock, R. (2015b). Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. *Science*, 347(6225), 991–994.
- Zhang, S., Liu, X., Zhu, B., Yin, X., Du, M., Song, Q., & An, S. (2014). Identification of differentially expressed genes in the pheromone glands of mated and virgin *Bombyx mori* by digital gene expression profiling. *PloS one*, 9(10), e111003.
- Zhang, W., Ma, L., Xiao, H., Xie, B., Smagghe, G., Guo, Y., & Liang, G. (2016). Molecular characterization and function analysis of the vitellogenin receptor from the Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner)(Lepidoptera, Noctuidae). *PloS one*, 11(5), e0155785.
- Zhang, Y.-l., Zhang, S.-z., Kulye, M., Wu, S.-r., Yu, N.-t., Wang, J.-h., Zeng, H.-m., & Liu, Z.-x. (2012). Silencing of molt-regulating transcription factor gene, CiHR3, affects growth and development of sugarcane stem borer, *Chilo infuscatellus*. *Journal of Insect Science*, 12(1).
- Zhao, J., Liu, N., Ma, J., Huang, L., & Liu, X. (2016). Effect of silencing CYP6B6 of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on its growth, development, and insecticide tolerance. *Journal of Economic Entomology*, 109(6), 2506–2516.
- Zhu, Y., Machleder, E., Chenchik, A., Li, R., & Siebert, P. (2001). Reverse transcriptase template switching: A SMARTTM approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques*, 30(4), 892–897.



Anhang

Für die phylogenetische Analyse verwendete Sequenzen

AcaBSAS1 MF038037

MGQACEKQTDIRASAIELIGNTPLVALDRLHPGPGRILAKCEFMNPGGSIKCRASLHMIQ
KARLRGTLKPGDPVVEATSGNQGCGLAVACAVLGHPLTLTMSKGNTVQRAIHMEALG
AKCIRVPQVEGTYGNVTNADLMAAKDEAISFHEKTGAFFVKQFVNEDNVEAHYTTTG
PEIWYQTGNRVDAFVTA VGTSGTFMGVSKYLKKQNP KIRCYVVEPEGCEPIKGKPKITK
ASNTLQSSYGVIPDLFKFEYMNETITVTDEEAEEYRDLIGSKEGLYVGYTSGANVCAA
VKLLKSGKLPKNAWVVTILFDTGLKYTPVPESLM

AcaBSAS2 MF038036

MTKENGIPNEIKSSALDLIGETPLLALDRLHPGPGRILVKCEFNNPGASIKCRSAMHMIQ
EARAKGELKPGQPVEVTSGNQGVGLAIVCAIYGHPLTATMSKGNSVQRAVHMEALG
AKCIRVPQVEGTYGNVTINDVKAEEEEGLKIAKETGAYYVNQFNDDNANSHYLTTGP
EIWRQSGHHVDAFIATVGTAGTFAGTSRYLKEKNPDIQCYVVEPEGSQPIRGCEITKPL
HLLQSGSYGCIPNLFKFETMDGTL SVTDEEA VRYKNLVGEKEGLYVGYTSGANVAAAV
KLLKSGKLPEDAWVVTPLNDSGLKYTPVPDSL T

AcaBSAS3 MF038035

MDSNGIPNEIKASALDLIGNTPLVALDRLHPGPGRILAKCEFMNPGGSIKCRSSLHMIQK
ARERGELKPGGSVVEVTSGNQGCGLAVVCAVLGHDLTVTMSKGNSIQRVIHMEALGAK
CIRYPLVQGTYGNVTFADVEEALAAATNMSEESGAFFVKQFCNLENEEAHYVTTGPEI
WRQTGHRVDAFVTA VGTSGTFSGVSTFLKEQNP DVKCFVVEPEGSQPLKGCPITKPLH
LLQGASYGIIPDLFKPDLMEDSISVTDKEAVHYKDLIGTKEGLFVGYTSGANVAAAVKL
LNSGKLPKDAWVVTTLCDTGLKYTPVPESLIE

AcrBSAS1 MF038034

MGQTCEKQTDIRSSALELIGNTPLVALDRLYPGPGRLLAKCESMNPGGSIKDRASYHMI
KKARLRGELKPGDPVIEATSGNQGCGLAVSCAVLGHPLTLTMSKGNTVQRAIHMEALG
ATCVRVPQVEGTYGHVTNADLMVVKKEAIVLQQKTGAFFVNQFLNEDNVEAHYISTG
PEIWHQTAGR VNAFVTA VGTSGTFMGVSRFLKKQNP KIQCYVVEPEGCEPIKGKPIIKA
SNTLQSSYGLVPDLFKYEVMSETITVTDEEAQEYMHLIGKKEGLYVGYTSGANVCAA
VKLLKSGKLSKKA WVVTILFDTGLKYTPVPSLM

AcrBSAS2 MF038033

MAKVNGIKNEIKTSALELIGETPLLALDRLHPGPGRILVKCEFNMNPGASIKCRSSLHMIQE
ARAKGLLKPGQPVEVTSGNQGCGLAIVCAIYGHPLTVTMSKGNSLQRAIHMEALGAK
CVRVPQVEGTYGNVTVNDVNAAEEEEGLKIVKETGAYYVNQFNEDNANSHYLTTGPE
IWRQSGHNVD AFVATVGTAGTFAGTSRYLKEKNPNIKCFVVEPEGSQPIKGCPITKPLH
LLQSGSYGCIPNLFNFDTMDGTL SVTDEEA VEYKNLIGEKEGLFVGF TSGANVAAAVK
LLKSGLIPENSCLVTILNDTGLKYTPVAESLI



AcrBSAS3 MF038032

MTNAISVSNEIKASALELIGNTPLLALDRLHPGPGRILVKCEFMNPGGSLKCRSSLHMIQK
ARERGELKPGGDVVEVTSGNQGCGLGVVCSVLGHPLTVTMSKGNISQIRALHMEALGA
KCIRYPLVKGTYGNVTFADVEPALEGAMKMSEETGAFFVKQMANPDNIEAHYETTGP
EIWRQSGHRVDAFVTAVGTSFTFTGVSKYLKEQNPEIQCFVVEPEGSQPLKGCPIPKPL
HMLQGASYGVPDLFNPDLMEDSISVTDEESVHYKDLLGTKEGLFVGYTSGANVAAA
KLLNSGKLPKDAWVVTILSDTGLKYTPVPDNLIE

CcBSAS2 MF038031

MAKVNGIQNEIKESALDLIGNTPIVALDRLHPGPGRILAKCEFMNPGASIKCRSSLHMIN
KAIEKGLLKPGQSVLEVTSGNQGCGLAVVCSVMGHPLTVTMSMGNSAQRAIHMEALGA
KCVRVPPQVEGTYGNVTLADVKA AEKEGLRLAEEIGAYYVNQFNEDNANSHYCTTGP
EIWRQTGHRVDAFVATVGTAGTFTGSSRFLKEKNPNIQCYVVEPEGSQPIRGCAITKPL
HLLQGSYGVCVPLNFNFETMDGTL SVTDEEASKYMKLIGEKEGLYVGYTSGANVAAA
KLLNSGTLPEDAWVVTLLNDSGLKYTPVPESLSGNSNANS

CcBSAS3 MF038030

MTSSTNFPTDIKSSALELIGNTPLVALDRLHPGPGRILAKCEFMNPGASIKCRSSLHMIQK
ARERGDLKPGDPVIEVTSGNQGCGLAVVCAVLGHPLTLTMSKGN SVQRAIHMEALGAK
CIRYPQVEGTYGNITYADVSIPIEAAVTLAEETGAYFVQQLCNEDNSAAHYEATGPEIW
RQTGHRVDGFVTAVGTSFTFSGVSKFLKEQNPEILCCVVEPAGSEPLKGCPIVKPKHLL
QGSSYGIVPNLFKPEFMDESISVTDEETEHEHYKDLIGKKEGLYVGYTSGANVAAA
KLLKSGKLPKDAWVVTVLCDSGLKYTPVPESLIN

GrBSAS2 MF038029

MAKVNGIHSSEIKESALDLIGNTPIVALDRLHPGPGRILAKCEFMNPGASIKCRSSLHMIQV
AREKGLLKPGQPVEVTSGNQGCGLAVVCSVMGHPLTVTMSKGN SVQRAIHMEALGA
KCVRVPPQVEGTYGNVTLADVKA AEQEGLRIAEEETGAYYVNQFSNDDNANSHYCTTGP
EIWRQTGHRVDAFVATVGTAGTFAGSSAYLKEKNPKIQCYVVEPEGSQPIRGCPITKPL
HLLQGSYGVCIPNSFKFDTMDGTL SVTDEEATRYKNLIGEKEGLYVGYTSGANIAAAV
KLLNSGKLPKDAWVVTLLNDSGLKYTPVPESLT

GrBSAS3 MF038028

MAGPSPFPNEIKTSALELIGNTPLVALDRLHPGPGRILAKCEFMNPGASVKCRSSLYMIQ
RALERGDLKPGEPVIEVTSGNQGCGLAVVCAVLGHPLTVTMSKGN SVQRAIHMEALGA
KCIRYPQIEGTYGNVTYADVSIPIEAAIDMAQETGAYFVQQLCNEDNMAAHYDTTGPEI
WKQTGHRVDGFVA AVGTSGTFSGVSKYLKEQNPKVCCAVEPNGSEPLKGCPIVKPQ
HLLQGSYGIVPDLFKPYLMDESISVTDVETEHEFKDLIGKKEGLYVGYTSGANVAAA
KLLNSGKLSRDAWVVTILCDSGLKYTPVRESLIN

PrBSAS1 ALV66639.1

MGQACEKQTDVRASALELIGNTPLVALDRLYTGPGRLLAKCEFMNPGGSIKDRASYHM
IQKARLRGELKPGDLVIEATSGNQGCGLAVACSVLGHPLTLTMSKGN TVQRAIHMEAL
GAKCIRVPQVEGTYGNVTNADLMAAKDKAISMQKETGAFFVKQFLNEDNIEAHYTST
GPEIWHQTAGRNVAFVTAVGTSFTFMGVSKFLKKQNPKIQCYYVEPDGCEPIKGPIT
KASNTLQGSYGVPDLFKYDVMNDTITVTDEEAAEYMHLLIGKKEGLYVGYTSGANVC
AAVKLLKSGKLPKNAWVVTILFDTGLKYTPVPESLM



PrBSAS2 ALV66640.1

MSKVNVPNEIKASALDIIGETPLLALDRLHPGPGRILVKCEFMNPGASIKCRSSLHMIQE
ARAKGLLKPQPVLEVTSGNQGCGLAIVCAIYGHPLTVTMSKGNVQRAIHMEALGAK
CIRVPQVEGTYGNVTINDVKAAEEGLKIAEETGAYYVNQFNEDNANSHYLTTGPEI
WRQSGHRIDAFIATVGTAGTFACTSRYLKEKNPDIKCFVVEPEGSQPIKGTPIKPLHLL
QGSGYGCIPNLFNFETMDGTLSTDEEAVEYRKLIGEKEGLYVGYTSGANVAAAVKLL
KSGLIPEDAWVVTPLNDSGLKYTPVPDSL

PrBSAS3 ALV66641.1

MSEINGVKNEIKSSALELIGNTPLLALDRLHPGPGRILVKCEFMNPGGSIKCRSSLHMIEK
ARERGELKPGGEVVEVTSGNQGCGLAVVCSILGHPLTVTMSKGNVQRAIHMEALGAK
CIRYPLVKGSYGNVTFADVEPALEGAMKMSEETGSFFIQQIANPDNIDAHYKTTGPEIW
RQSGHRVDAFVTTVGTSGTFTGVSTYLKEQNPDIQCYVVEPDGSQPLIGCPITKPLHML
QGASYGIVPDLFKSDLMEDSISVTDEEAVYKDLIGTKEGLFVGYTSGANVAAAVKLL
SGKLPKDAWVVTVLCDTGLKYTPVPENMIE

PxBSAS2 MF038024

MSTIDGVIDGVHNEVKASALELIGNTPLVALDRLHPGPGRLLVKCEFMNPGASLKDRSS
LHMIQDARAEGRLAPGAPVVEITSGNQGCGLAVVCAVLGHPLTLTMSAGNSVQRALHM
EALGARCVRVPQVEGRYGSVTFADVEVCEKEGHKIVEETGAFLVNQFHNPSNSLSHYK
MMGPEIWRQTGGRVDGFVATMGTTGGVFTGTSTRFLKEQNKDVKTYVVEPAGAEVIK
DAITKPLHLLQGSGYGYVPSLFDRLDGLAVTDEETLEYRRLIGEKEGLFVGYTSA
NVAAAARLLRSGQLPPDAWVVTILCDTGLKYC

SIBSAS2a MF038026

MAPIEKDEQPKYLEGDIKASALELIGNTPLVALDRLYTGPGRILAKCEFMNPGASIKCRS
SLSMINRAIASGELKPGEPVVEITSGNQGCGLAVVCAVLGHPLTLAMSKGSSAQRALHM
EALGAKCVRVDQVEGTYGNVTYADVKAEEVGMKIVEEQNAYFVNQFHNEANADAH
YKSTGPEIWKQTGHHVDAFVATVGTSGTFACTSRYLKEQNPDIKTYVVEPAGAEIAG
CPITKPLHLLQGSGYGWIPDLFKFEHMDGTLSTDEEAVKYMMLVGEKEGLYVGYTSG
ANVAAAVKLLSGLIPEDAWVVTLLNDTGLKYTPVPEELFK

SIBSAS2b MF038025

MAPVEKNLKDEQPKYLKGDIAKASALELIGNTPMVALDRLYSGPGRILAKCEFMNPGASI
KCRSSLMINRAIASGELKPGEPVVEITSGNQGCGLAVVCAVLGHPLTLAMSKGNVQRA
IHMEALGAKVVRVDQVKGTYGNVTYADVEVVREVCCLKLVKDQNAFYVNQFSNEAN
ADAHYESTGPEIWQQTGHHVDAFVAAVGTAGTFMGTSRYLKEQNPNIKAYVVEPAGA
EAIAGCEVTKPLHLLQGSGYGLIPDLLKYEFMDGSLSVTDEEAVKYMMLIGEKEGLYV
YTSGANVAAAIKLLSGLVPEDAWVVTVLADTGLKYTPVPEELMK

ZfBSAS2 MF038027

MSPPVQLQHHDEIKSSALELIGNTPIVALDRLYTGPGRILAKCEFMNPGASIKCRSSLYMIQ
KALDEKLLKPGEPVLEVTSGNQGCGLAVVCAVLQHPPLTLTMSKGNVQRAVHMAALG
AKCIRVPQVEGTYGNVTLADVKAEEAELRIVEKTGAYYVNQFNNEANTLAHYETT
GPEIWRQTGGRVDAFVATVGTAGTFTGTSTYKKEKNPELKAIVVEPQGSSEPIKQLPITK
PLHVLQGSGYGCIPNLFNYSTMNDTISVTDEESKHYKLLGTKEGLYVGYTSGANVAA
AVKLLSGLTPDDAWVVTLLNDSGLKYSPTPDEIELSD



Amyelois transitella XP 013190568.1

MAPVDGVDNEIKSSALDLIGNTPIVALDRIYPGPGRILAKCEFMNPGASIKCRSSLHMIRK
AKESGELKPGQPVEVTSGNQGCGLAVVCSVLGHPLTLTMSKGNSVQRAIHMEALGAK
CIRVPQVEGTYGNVTLADVQAVEEVGLKIVEETKAFYVNQFNNEGNSESHYLTTGPEI
WKQTGQHVDVFLATVGTAGTFAGTSKYLKEKNPKLLSFVVEPAGSEPIKGEPITKPLH
LLQGSGYGCVPNLFKFDIDGTVSVTDEEAVKYKQLIGEKEGLYVGYTSGANVAAAMK
LLESGRVPKDSWIVTTLNDTGLKYTPVPEELTH

Amyelois transitella XP 013190576.1

MAPVDGIDNEIKSSALELIGNTPIVALDRIHPGPGRILAKCEFMNPGASVKCRSSLHMIRK
AKEFGELQPGQPVEITSGNQGCGLAVVCSVLGHPLTVTMSKGNSVQRALHMEALGA
KCVRPQVEGTYGKVTNADVQALEEVCTKIVEDTKAFYVNQFSNKGNSEAHYMTTGP
EIWRQTGQHVDVFLACVGTAGTFAGTTKYLKEKNPKLLSFVVEPAGSEPIKGEPKPKP
LHLLQGSGYGWIPDLFNYDDMDGTVSITDEEAVKYMELIGKKEGLYVGYTSGANVAAA
VKLLESGRVPKDSWIVTTLSDTGLKYTPVPEELTK

Amyelois transitella XP 013184841.1

MAAVDGIDNEIKSSALELIGNTPLVALDRIWAGPGRILAKCEFMSPGASIKDRSSLHMLQ
QARAAGLLRPGQRVVEKSSGNQGCGLAVVCAVLGHPLTVAMSKGNSVQRAIHMEALG
AACERVQVEGTYGSVTHADVQGLEEACLKIVDETKAYFVNQFSNVGNSEAHYRTTG
PEIWRQTGQHVDVFLTTVGTAGTFAGTSKYLKEKNPNLLSFVVEPAGSEPIKGDPIKPK
LHLLQGSGYGLIPDLFNYEHMDGTVSVTDEEAVEYMNNAVGRQEGFLVGFVGTSGANVAA
AVQLLRSGRVPARGAWLVTTLNDSGLKYTPVPRELTL

Bombyx mori XP 004932948.1

MANNNSVDNEIKASALDLIGNTPIVALDRLHWPGPGRILAKCEFMNPGASIKCRSSLKMIK
KALASGELKPKPEVVEVTSGNQGCGLAVVCAVLGHPLTLAMSKGNSAQRAIHMEALGA
KCVRPQVEGTYGNVTLNDVKAVEEVGLRIVKETGAYYVNQFNNDANSESHYQTTGP
EIWRQTGHRVDAFVATVGTAGTFTGTRYLKEKNPDLKAYVVEPEGAQPIRGLPVIKPK
LHLLQGSGYGCVPNLFKREYMDGTLSVSDEEAMEYKKLIGEKEGLYVGYTSAANVAAA
VKLLKSGQLPEDSWVVTMLNDTGLKYTPVPEEFT

Danaus plexippus EHJ66756.1

MSQTSGSTDIKASALELIGNTPLVALDRLWPGPGRILAKCEFMNPGASIKCRSSLYMITK
ALESGALKPGPEVLEITSGNQGCGLAVVCAVLGHPLTVTMSAGNSVQRAIHMEALGAR
CVRVPQVEGTYGNVTLSDVKAEEKGLKLVEETGAYYVNQFNNDMNSEAHYETTGP
IWRQTGQRVDAFVATVGTAGTFAGTSRYLKEKDPSIVCVVVEPEGSEPIKGCEVTKPL
HLLQGSGYGCVPNLFNYEHLDDTISVSDEEVLEYKRLIGEKEGLVGYTSAANVLA
LLKAGKLLKEDAWVTVLCDTGLKYTPVPEITKA

Heliconius melpomene HMEL013489

MASVNGVQNEIYASALDLIGNTPLVALDRLWTGPGRILAKCEFMSPGGSIKCRSSRHML
KARESGDLKPGGHVVEVTSGNQGCGLAVVCAVLGHPLVATMSKGNSVQRAIHIEALGA
KCVRPQVEGTYGNVTLADVDAKVKGLEIAKETGGFYVNQFHNPMVDVAHYASTG
PEIWRQTGHHVDAFIATVGTAGTFVGTSKYLKEKSPDTKCFVVEPAGSEPIKGEEITPK
LHLLQGSGYGSIPFLFSFDNFDGTISVTDEEAVKYKKLIGEKEGLYVGYTSGANVAAA
KLESGLPKDAWVVTMLNDTGLKYTPVPEELT



Heliconius melpomene HMEL016300

MASAHGVPNEIKASALDLIGNTPVALDRLWPGPGRILAKCEFMNPSASIKCRSSLHML
QKARENGELKPGAPVVEVTSGNQGCGLAVVCAVLGHQLTVTMSNGNSVQRAIHMEAL
GAKCVRVPQVEGTYGSVTLADAQQAEEKIGSEIAEETNAYYVNQFNQMNADAHYCST
GPEIWKQTGHRIDAFIATVGTAGTFTGTSTKFLKEKNPNIKCYVGEPSGSEPIKGSPIK
LHLLQSGSYGCIPNLFSDSLDGTVSITDEEAVKYKKLIGEKEGLYVGYTSGANVAAA
KLESGKLPKDAWVVTLLNDTGLKIIISYDTFTSGQNLGKYPQVPILSKHLNTRMLILGV
AQSHGRVLEKAGKQIDIFGDTKRRTTQMPYKTHRDFW

Heliconius melpomene HMEL002400

MLKLLFLTINVYLTLNQNINNKMAAYMNGDSNQIKASALDLIGNTPIVALDRLWPGPG
RILAKCEFMNPGTSTIKCRSSLHMIKKARESEELKPGAPVLEVTSNGQGCGLAVVCAVLG
HPLTVTMSKGNASQRAIHMEALGAKCIRVPQVEGTYGNVTLADVKAASEGLRLVKET
DAYYVNQFNQMNADAHYYSTGPEIWKQTGKHVDAFVATVGTAGTFSGTSRYLKEK
DSNIKCFVVEPSGSEPIKHPITKPLHLLQSGSYGCVPNLFSDTMDGTLSTVDEESLHY
KKLIGEKEGLYVGYTSGANVAAAALLQSGKIPKDAWVVTLLNDSGLKYTPVPQEMA

Manduca sexta Msex2.06144-RA

MAPIDGVDNEIKSSALDLIGNTPIVALDRLYTGPGRILAKCEFMNPGASIKCRSSLCMIKK
ALDSGELKPGAPVVEVTSGNQGCGLAVVCAVLGHPLTLTMSKGNASQRAIHMEALGA
KCVTVPPQVEGTYGNVTLADVKAVEEVGLKIIETGAYYVNQFNNDANAISHYETTGP
EIWRQTGQRVDAFVATVGTAGTFTGTARYLKEKNPEIKTFVVEPSGSEPIKGDITKP
LHLLQSGSYGCVPNLFKFEYLDEPISVTDEEAVEYMKLIGSKEGLYVGYTSGANVAAA
KILKSGKLPKDAWVVTLLNDTGLKYTPVPEELIK

Operophtera brumata KOB72436.1

MALVNGVGNEIKSSALELIGNTPIVALDRLHPGPGRILAKCEFMNPGASIKCRSSLRMIER
ALESGELQPGEVVEVTSGNQGCGLAVVCAVLGHPLTLTMSKGNASQRAIHMEALGAT
CLRVPQVEGTYGNVTLADVKAVEVEGLKVEKTGAFYVNQFNHGNLSHYETTGP
IWKQTGHRVDAFVATVGTAGTFTGTSTRYLKEMNPVKSIVVEPAGAEPKGDITKP
LHLLQSGSYGCVPNLFKFDYMDGTIPVTDEEAVDYMKQIGYKEGLYVGYTSGANVAA
AVKLLKSGKIPEDSWVVTLLNDSGLKYTPVPTEFT

Papilio machaon XP 014362184.1

MAAVNGVNGVISENGVSNEIKASALDLIGETPIVALDRLYPGPGRILAKCEFMNPGASIK
CRSSLYMIQNALQSGELKPGGPVLEVTSNGQGCGLAVVCAVLGHPLTLTMSKGNASQ
RAIHMEALGAKCIRVPQVEGTYGNVTLADVKAQAEAGMRLVDELGAYYVNQFNNEANA
EAHYKTTGPEIWRQTGHHVDVVFVATVGTAGTFMGTSKYLKEKNPNLLSFVVEPAGSE
PIKKEITKPLHLLQSGSYGCVPNLFKFDYMDGTVSVTDEEVIKYKNLIGEKEGLFVGY
TSGANVAAAVHLLQSGKVPKDAWVVTLLNDTGLKYTPVPDECDR

Papilio polytes XP 013140109.1

MMAAINGANGVNRGISENGVTNEIKASALDLIGETPIVALDRLYTGPGRILAKCEFMNP
GASIKCRSSLYMIRKALENGQLKPGGPVLEVTSNGQGCGLAVVCAVLGHPLTLTAMSEG
NSAQRAIHMEALGAKCVRVPQVEGTYGKVTADVMEVIAEGTRLVDELGAYYVNQLC
NEANVEAHYETTGPPEIWRQTGHHVDVVFVATVGTAGTFTGTSKYLKEMNPNNLSFVVE
PDGSEPIKKEITKPLHLLQSGSYGCVPNLFEFYMDGTVSITDEEAIKYKKLIGEKEGL
YVGYTSGANVAAAVHLLQSGKVPKDAWVVTLLNDTGLKYSPVPEETA



Papilio polytes XP 013140272.1

MMAAVNGVNGVISENGVTNEIKASALDLIGETPIVALDRLYPGPGRILAKCEFMNPGASI
KCRSSLYMIRKALESQGLKPGGSVLEVTSGNQGCGLAVVCAVLGHPLTLTMSKGNNSAQ
RAIHMEALGAKCVRVPQVEGTYGNVTLADVKAEEAEGMRLVDELGAYFVNQFNNEA
NADAHYATTGPEIWRQTGHHVDVVFVATVGTAGTFTGTSTKYLKEKKNPILLSFVVEPAG
SEPIKKEITKPLHLLQSGSYGCVPNLFKFDYMDGTVSVTDEEVIKYKNLIGEKEGLYV
GYTSGANVAAVHLLQSGKVPKDAWVVTTLNDTGLKYTPVPAECV

Papilio xuthus XP 013172478.1

MAAVNGVNGVISENGVTNEIKASALDLIGETPIVALDRLYPGPGRILAKCEFMNPGASIK
CRSSLYMIRKALESQGLKPGGPVLEVTSGNQGCGLAVVCAVLGHPLTLTMSKGNNSAQR
AIHMEALGAKCVRVPQVEGTYGNVTLADVKEAEEAEGMRLVDELGAYYINQFNNEANA
EAHYKTTGPEIWRQTGHHVDVVFVATVGTAGTFTGTSTKYLKEKKNPILLSFVVEPAGSE
PIKGKEITKPLHLLQSGSYGCVPNLFKFDYMDGTVSVTDEEVIKYKNLIGEKEGLFVGY
TSGANVAAVHLLQSGKVPKDAWVVTTLNDTGLKYTPVNECV

Tu-CAS XP 015786551.1

MTESTVDRINGITPSALDLIGNTPLIALDRLWPGPGRLLAKCEFLNPTASLKDRSSYYMI
AKAKESQGLKDGESVIEVTSGNQGGGIACVTAVMGHPFTVTMSKGNNSPQRAIMNNA
GANVILVDQVTGKPGNVTADDVAAAEEETAMKIREETNAYYVDQFNPTNCLAHYETT
GPEIWRQTNGRIDAFLVGCFTGGCFVGTSTKFLKEKKNPNVRCFVVEPEGCQPIAGCTIT
KPLHLLQSGSYGCVPTLFDKKNVYNDSSISVSDEEAIEYRKLLGQKEGLFCGFTTGGNIAA
AIKLLKSGQLPKDAWVVTTILCDSGLKYPE

Tetranychus evansi AHY81319.1

MTESTIDRINGITPSALDLIGNTPLIALDRLWPGPGRLLAKCEFLNPTASLKDRSSYYMIA
KAKEAGKLDGEPVIEVTSGNQGGGIACVTAVLGHFPFTVTMSKGNNSPQRAIMMKALG
ANVVLVDQVTGKPGNVTADDVAAAEEETAMNIKKETNAYYVDQFNPTNCLAHYETT
GPEIWKQTNGRIDAFLVGCFTGGCFVGTSTKFLKEKKNPNVKCFVVEPEGCQPIAGCTIT
KPLHLLQSGSYGCVPTLFDKNVYNNVPSVDEEAIKYRKLLGQKEGLFCGYTTGANIA
AAIKILESGQLSKDAWVVTTILCDSGLKYPE

Achromobacter xylosoxidans YP 003977776.1

MIVRMTTTYPTIEQTVGNTPLVRLQRIPGAAGAARGNVILAKLEGNNPAGSVKDRPAL
SMIARAEERGDIPGDTLIEATSGNTGIALAMAAAMRGYRMILIMPDNLSVERRAAMTA
YGAEILTPADKGGMEYARDLASAMQADGRGLVLDQFANPDNPRAHIEETGPEIWNQ
TEGRVTHFVSAMGTTGTIMGVSTYLKSRNPAVQVVGAAQPAEGSSIPGIRKWPEAYLPKI
FDRSRVDAYESIEQAEEAQMARRLAAEEGIFGGISSAGALVAALRVAERVNDATIVFIVC
DRGDRYLSTGVFN

Deltaproteobacteria OGP57509.1

MISRSALDLIGNTPLVTLDRHLHSGPGQLLAKCEFMQPGGSVKDRAALQIINDAYDDKRLV
KGRPVVEMTSGNMGAGLAVVCNVTGNPFVAVMSKGNNSPARVKMLES LGAEVVLTSQ
VDGSPGMVTKDIEVATEEAIRISKEKDAFYVDQFNNESSLRAHELGTGPEIWEVGN
LDCFVAAVSGGTFGLTSTKYLKNRKAGLYCAA VEPEGTQVLSGKPITDPRHVIQIGIGYS
LVPPHWDPKLCEDETVAVTDDEAIRYRSLLAEKESLLVGYSAANVCASVKLMNSGKFG
KYPMVVTTILCDTGLKY



Methylobacterium sp. SFU41101.1

MHSSSPRQTSPAATVTPSALGLIGNTPLLALDRIHPGPGRLLAKAEFMQPGGSKDRAA
 RAILLAAREDGRLAPGAPVEMTSGNMGAGLAVACAALGHPLVVTMSSGNPQRARM
 LEALGAEVVLVPQVDGAAGQVTGADVTAEEAARRLAAERGGFYVDQFHAPEGVRA
 HAETTGPEIWAQAAGRVDWLAAVGTGATFLGVAAALRAHNPRVICA AVEPEGCQPL
 AGLAVTNPRHLIQGTGYGSVPPHWSEGLMDLSLAVTDQEVEGWRRALATREGLHVG
 SAAANVAAAAALLRSGRLPADATAVTVLCLDTGLKY

Oligonukleotide

Tabelle A.1: Degenerierte Oligonukleotide zur Identifizierung von cDNA-Fragmenten putativer β -Cyanoalanin-Synthasen

Nummer	Name	Sequenz
1	for1CYSb	GCN AAR TGY GAR TTY ATG AAY CC
2	for2CYSb	GGN AAY CAR GGI TGY GGN YTN GC
3	for3CYSb	GGN CCI GAR ATH TGG MGN CAR AC
4	for1CYSb	AYA TGG MDG CNC TNG GHG C
5	rev1CYSb	GGN GTR TAY TTN ARN CCI GTR TC
6	rev2CYSb	ACR SAN ARI CCY TCY TTY TCN CC
7	rev3CYSb	GTY TGN CKC CAD ATY TCI GGN CC
8	rev1CYSb	GCV CCR CTV GTR WAN CCM AC

Tabelle A.2: Oligonukleotide zur Vervollständigung putativer β -Cyanoalanin-Synthasen und Rhodanesen aus Lepidoptera

Name	Sequenz(5'-3')	Verwendung
anchor-oligo(dT)18	GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT TT	3'RACE
anchor	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC	3'RACE
SMARTerIIA	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CGC GGG	5'RACE
RACElong	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT	5'RACE
RACEshort	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	5'RACE
Acbsas1 for1	GGT ATC AAA CCG GAA ATA GAG TGG	3'RACE AcaBSAS1
AcBSAS2 for1	CAC AAC CCA TTC GAG GAT GTG AG	3'RACE AcaBSAS2
AcBSAS3 for1	GCT GAT GTC GAA GAA GCC CTA GAG	3'RACE AcaBSAS3
AcBSAS1 rev1	TGG CGG CTA AAG ATG AAG CGA TAT C	5'RACE AcaBSAS1
AcBSAS2 rev1	CTC ACA TCC TCG AAT GGG TTG TG	5'RACE AcaBSAS2
AcBSAS2 rev2	CGC TAC AAA AGC ATC GAC GTG G	5'RACE AcaBSAS2
AcBSAS3 rev1	CTC TAG GGC TTC TTC GAC ATC AGC	5'RACE AcaBSAS3
AcBSAS3 rev3	CCT AGA ACT GCG CAG ACG A	5'RACE AcaBSAS3



AcBSAS1 full2 for	CAG AGT ACG CGG GCT TCA TT	Full-length AcaBSAS1
AcBSAS1 full2 rev	CTC TCC GAT TTA ATC TTT CAA CGC	Full-length AcaBSAS1
AcBSAS2 full for	CAG AAT AGA CAA GGC CTT AAG C	Full-length AcaBSAS2
AcBSAS2 full rev	CCT ATG TAT ATT ATC ACT TTT GAT CC	Full-length AcaBSAS2
AcBSAS3 full2 for	GGA GTG ACA ATT TAT ATC GTA GTG TAG	Full-length AcaBSAS3
AcBSAS3 full rev	CTC TCT CCC TCT AAT TAA CAA AGC G	Full-length AcaBSAS3
Acr1 for2	GAG TGG AGC TAA TGT GTG TGC G	3'RACE AcrBSAS1
AcrBSAS1 for1	GGT AGT GAC CAT TCT GTT CGA CAC C	3'RACE AcrBSAS1
Acr1 for1	TCA ATT TCG ACA CAA TGG ACG	3'RACE AcrBSAS2
AcrBSAS3 for1	CGT GCA TTA TAA AGA CCT GCT CGG	3'RACE AcrBSAS3
Acr1 rev2	GGA ATT GAT TTA CGA AGA ATG CCC	5'RACE AcrBSAS1
Acr1 rev2 nested	CCA TAA GAT CAG CAT TGG TCA CG	5'RACE AcrBSAS1
Acr1 rev3	GTT GAA CTG GTT AAC GTA GTA TGC G	5'RACE AcrBSAS2
Acr1 rev1	GGT TAC GGT AAG AGG ATG TCC	5'RACE AcrBSAS2
Acr3r ev2	CCT GTG GTC TCA TAG TGT GCC	5'RACE AcrBSAS3
Acr3 rev2 nested	GTC TGC AAA GGT GAC GTT TCC	5'RACE AcrBSAS3
Acr1 full for	GGA GAT TTC GTT CGA ATT TCG	Full-length AcrBSAS1
Acr1 full rev	GCA ACA CAT TTA GCT GAT CCG	Full-length AcrBSAS1
AcrCYS full for	CAG TGT TGA TTG ACA CCA GTA CAG	Full-length AcrBSAS2
AcrCYS full rev	GTA CTA AGA GAG GCA TAA TGT CTG AG	Full-length AcrBSAS2
Acr3 full for	GGA TTC ATT TAG ACT GAT AAC ACA GC	Full-length AcrBSAS3
Acr3 full rev	TAT ATA TCG GCC TTT AGC GTA CG	Full-length AcrBSAS3
CcrBSAS2 for1	GGT ACA TTG CCT GAA GAC GCA TGG G	3'RACE CcBSAS2
CcrBSAS1 for1	GCA ACG AAG ACA ATT CAG CTG CG	3'RACE CcBSAS3
Ccr2 rev2	TCT CGA TGA ACC AGT AAA TGT GC	5'RACE CcBSAS2
Ccr2 rev2 nested	GCG TAA ACC TTC TTT CTC AGC	5'RACE CcBSAS2
Ccr1 rev2	CAG CTG AAT TGT CTT CGT TGC	5'RACE CcBSAS3
CcrBSAS1 rev1	TGA GAG TTA GGG GAT GTC CTA GTA CTG C	5'RACE CcBSAS3
Ccr2 full for2	GGT ATA ACT CAA TCA ACA CAT CAG C	Full-length CcBSAS2
Ccr2 full rev2	CAC GCT TAT CTC GAT GCC AC	Full-length CcBSAS2



Ccr1 full for	GAG GTG TAG GTA ATC GTG TAT TGG	Full-length CcBSAS3
Ccr1 full rev	ACG GAA TTG TTG CGA GTC G	Full-length CcBSAS3
PxCYS2 for1	GAA GCA ACG CGT TAT AAG AAC C	3'RACE GrBSAS2
GrBSAS1 for1	CAG GAG ACG CAT GGG TTG TTA CC	3'RACE GrBSAS3
GrBSAS rev1	GGT TCT TAT AAC GCG TTG CTT C	5'RACE GrBSAS2
GrBSAS rev3	GCA AAC GTA CCC GCA GTA CC	5'RACE GrBSAS2
Gr1 rev2	CGC TGC CAT GTT GTC TTC G	5'RACE GrBSAS3
Gr1 rev2 nested	CTT CTA TAG GAA TTG ACA CGT CGG	5'RACE GrBSAS3
GrBSAS full for	CCG CTT TGC TTC AGT ATC AAT TGC	Full-length GrBSAS2
GrBSAS full rev	CAC GTA CTC ATT TTG AGA GAC TTG C	Full-length GrBSAS2
Gr1 full for2	CTG TAG ATT GAG TTC ACT GCT TAG G	Full-length GrBSAS3
Gr1 full rev2	AGC GAG AAA TGA ACT TGA AGC	Full-length GrBSAS3
Zf2 rev1	TGG CCT CGT TGT TGA ATT GG	5'RACE ZfBSAS2
ZfCYS full2 for	CCT CAA GCG GTG AAA ACT TCC	Full-length ZfBSAS2
ZfCYS full2 rev	CAT GCG TGA CTC GGA CTA TGC	Full-length ZfBSAS2
SIBSAS1 for1	GAA GTT AGT CGG TGA GAA GGA AGG	3'RACE SIBSAS2a
SIBSAS2 for1	GCT ATC AAA CTG TTG GAG TCA GG	3'RACE SIBSAS2b
SIBSAS1 neu rev1	CGT GAT TGG GCA TCC CG	5'RACE SIBSAS2a
SIBSAS1 neu rev2	GTT GGC CTC GTT GTG AAA TTG	5'RACE SIBSAS2a
SIBSAS2 rev	CTA CAG GTT CAC CAG GTT TCA GC	5'RACE SIBSAS2b
SIBSAS2 rev nested	CCT TGA TTG ATG CAC CAT GG	5'RACE SIBSAS2b
SIBSAS1 full forneu	GGA GTA TCC AAC TGG TAT CTG C	Full-length SIBSAS2a
SIBSAS1 full rev	CCT CAG ATG TTA TCA ATC ACA ATT AAT CAC	Full-length SIBSAS2a
SIBSAS2 full for	CTC CAA GCT CAC CTC CAA CC	Full-length SIBSAS2b
SIBSAS2 full rev	GTT TAT TAC ACG ATA CAC ATA ACA AGC	Full-length SIBSAS2b
PxCYS for	ATG TCG ACC ATT GAC GGA GTT ATT G	Full-length PxBSAS2
PxCYS rev	CTA GCA GTA CTT GAG GCC GGT GTC	Full-length PxBSAS2
Rho2 rev3	CGT CGA TGC CTG ATG ATG AGT T	5'RACE Rho2
Rho2 rev1	CAT TCA CGA GCC CGA GAA	5'RACE Rho2
Rho2 full for	CAG GTA TAC GAA GAT ATA TTT ACA AGC	Full-length Rho2
Rho2 full rev	CAT CGA TTG AAG ATG TCT TCT CC	Full-length Rho2
Rho2 USER for	GGC TTA AUA TGG GTA ATT CAA ATA GCA ATA GC	Expressionskonstrukt Rho2



Rho2 USER rev	GGT TTA AUT TAC TTC TGC TTG CTT GAC C	Expressionskonstrukt Rho2
Rho1 for USER	GGC TTA AUA TGA TCG GTC GTA TTT TAT C	Expressionskonstrukt Rho1
Rho1 oSP for USER	GGC TTA AUA TGG CAG AAC AAG TTA AAG	Expressionskonstrukt Rho1
Rho1 rev USER	GGT TTA AUT CAC TGT GTT TTA CTT GCC	Expressionskonstrukt Rho1

Tabelle A.3: Oligonukleotide zur Herstellung der Expressionskonstrukte putativer β -Cyanoalanin-Synthasen und Rhodanesen aus Lepidoptera

Name	Sequenz (5'-3')	Expressionskonstrukt
AcBSAS1 for USER	GGC TTA AUA TGG GTC AGG CGT GC	AcaBSAS1
AcBSAS1 rev USER	GGT TTA AUT CAC ATT AAA GAT TCT GGT ACA GG	AcaBSAS1
AcBSAS2 for USER	GGC TTA AUA TGA CTA AGG AGA ACG G	AcaBSAS2
AcBSAS2 rev USER	GGT TTA AUT TAT GTT AAG CTG TCT GGT AC	AcaBSAS2
AcBSAS3 for USER	GGC TTA AUA TGT CTG ATT CAA ATG	AcaBSAS3
AcBSAS3 rev USER	GGT TTA AUC CTC TAA TTA ACA AAG C	AcaBSAS3
AcrBSAS1 for USER	GGC TTA AUA TGG GTC AGA CGT GTG	AcrBSAS1
AcrBSAS1 rev USER	GGT TTA AUG ATC CGT TTT AAT AAA CTT GC	AcrBSAS1
AcrBSAS USER for	GGC TTA AUA TGG CTA AAG TGA ACG G	AcrBSAS2
AcrBSAS USER rev	GGT TTA AUT TAT ATT AAG CTT TCT GCT ACA GG	AcrBSAS2
AcrBSAS3 for USER	GGC TTA AUA TGA CTA ACG CAA TTA G	AcrBSAS3
AcrBSAS3 rev USER	GGT TTA AUC CTA AGT AAA ATT TAT TCG	AcrBSAS3
Ccr2 for USER	GGC TTA AUA TGG CAA AGG TGA ACG G	CcBSAS2
Ccr2 rev USER neu	GGT TTA AUC TTG GTT AAT AAC TTT CTC G	CcBSAS2
Ccr1 for USER	GGC TTA AUA TGA CCT CAT CGA CTA A	CcBSAS3
Ccr1 rev USER	GGT TTA AUC TAG TTT ATT AAT GAT TCT GG	CcBSAS3
GrBSAS2 for USER	GGC TTA AUA TGG CGA AGG TGA AC	GrBSAS2
GrBSAS2 rev USER	GGT TTA AUT TAT GTT AAA GAT TCT GGT ACT G	GrBSAS2



GrBSAS1 for USER	GGC TTA AUA TGG CTG GAC CAA GTC C	GrBSAS3
GrBSAS1 rev USER	GGT TTA AUC TAG TTT ATT AAA GAT TCG CGA AC	GrBSAS3
ZfBSAS for USER	GGC TTA AUA TGA GTC CGC CGG TAT TG	ZfBSAS2
ZfBSAS rev USER	GGT TTA AUC TAA TCG CTT AAT TCT ATC TCG TCT G	ZfBSAS2
SIBSAS1 USER for	GGC TTA AUA TGG CTC CCA TCG	SIBSAS2a
SIBSAS1 USER rev	GGT TTA AUT CAC TTG AAT AAC TCC TCA G	SIBSAS2a
SIBSAS2 USER for	GGC TTA AUA TGG CTC CCG TCG AGA AGA AC	SIBSAS2b
SIBSAS2 USER rev	GGT TTA AUT CAC TTC ATT AAT TCC TCT GGT ACT GGC	SIBSAS2b
PxCYS for USER	GGC TTA AUA TGT CGA CCA TTG ACG GAG TTA TTG	PxBASAS2
PxCYS rev USER	GGT TTA AUC TAG CAG TAC TTG AGG CCG GTG TC	PxBASAS2

Tabelle A.4: Oligonukleotide zur Expressionsanalyse mittels qPCR

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung (Quelle)
qPCR PrNSP for	TTG ACT TCC TCA CTG AAT ACT TCC	Expression PrNSP (EU265817.1)
qPCR PrNSP rev	ATG GTT CGT CCT GTC ATT GG	Expression PrNSP (EU265817.1)
qPCR Actin for	GGC ACC ACA CCT TCT ACA AT	Referenzgen <i>Actin P.rapae</i> (FJ905300.1)
qPCR Actin rev	TAT CTG GGT CAT CTT CTC TCT GTT	Referenzgen <i>Actin P.rapae</i> (FJ905300.1)
qPCR Efla for	CTG GCA CGG AGA CAA CAT	Referenzgen <i>EF1α P.rapae</i> (AY870550.1)
qPCR Efla rev	GCA GGT GGC AAG ATA GCA	Referenzgen <i>EF1α P.rapae</i> (AY870550.1)
qPCR 18s for	CGA TGG TAG TTT CTG CGA CT	Referenzgen <i>18S rRNA P.rapae</i> (AY631858.1)
qPCR 18s rev	GCT GCC TTC CTT GGA TGT	Referenzgen <i>18S rRNA P.rapae</i> (AY631858.1)
qPCR GAPDH for	ACA TTA TTC CTG CTG CTA CTG G	Referenzgen <i>GAPDH P.rapae</i> (JN204991.1)
qPCR GAPDH rev	GAC AGT CAA ATC CAC AAC AGA GA	Referenzgen <i>GAPDH P.rapae</i> (JN204991.1)
PrBSAS1 qPCR for2	GGT AAC ACT CCA TTG GTT GCT T	Expression PrBSAS1
PrBSAS1 qPCR rev2	ATG GTA CGA CGC TCG GTC	Expression PrBSAS1
PrBSAS2 qPCR for1	TAC CAT AAA TGA CGT CAA AGC TG	Expression PrBSAS2



PrBSAS2 qPCR rev1	GTA AGG TAG TGG GAG TTT GCA	Expression PrBSAS2
PrBSAS3 qPCR for1	AGA GGC AGT GTA TTA TAA GGA TCT C	Expression PrBSAS3
PrBSAS3 qPCR rev1	CAA TCC AGT GTC ACA TAG TAC AGT A	Expression PrBSAS3
Rho1 for1 qPCR	TTG GGC AAT GTA ACA CCC GT	Expression Rho1
Rho1 rev1 qPCR	ATT CTG CTG AGC CAT ACC CG	Expression Rho1
Rho2 for1 qPCR	GAG ACG TTC TCA AGA GGC CC	Expression Rho2
Rho2 rev1 qPCR	ACC AGT CCT CCC AAC TTC CT	Expression Rho2
Aca EF1a qPCR for	GTC AAG GAA TTG CGT CGT GG	Referenzgen <i>EF1α</i> <i>A.cardamines</i> (LC090568.1)
Aca EF1a qPCR rev	GTG AAG TCA GCT GCT CCC TT	Referenzgen <i>EF1α</i> <i>A.cardamines</i> (LC090568.1)
Aca GAPDH qPCR for	CAC CAC AAA CTG CCT TGC TC	Referenzgen <i>GAPDH</i> <i>A.cardamines</i> (KM046841.1)
Aca GAPDH qPCR rev	GGT AGC GTG AAC AGT GGT CA	Referenzgen <i>GAPDH</i> <i>A.cardamines</i> (KM046841.1)
AcaBSAS1 qPCR for1	ATC ACG AAG GCT TCT AAT ACG C	Expression AcaBSAS1
AcaBSAS1 qPCR rev1	GAT CAA ATC CCT ATA TTC CTC AGC C	Expression AcaBSAS1
AcaBSAS2 qPCR for1	AAG CGG TCA CCA CGT CG	Expression AcaBSAS2
AcaBSAS2 qPCR rev1	CCA CAA CAT AAC ATT GAA TAT CGG G	Expression AcaBSAS2
AcaBSAS3 qPCR for1	TGT AAC CTT TGC TGA TGT CGA AG	Expression AcaBSAS3
AcaBSAS3 qPCR rev1	GTA ATG TGC TTC TTC GTT TTC TAG ATT AC	Expression AcaBSAS3
Sl qPCR GAPDH for	GAG GAC CCA ACT GTG CCA AAA	Referenzgen <i>GAPDH</i> <i>S.littoralis</i> ((Durand et al., 2010))
Sl qPCR GAPDH rev	GCT TCA CCA GGC TGA ACA CG	Referenzgen <i>GAPDH</i> <i>S.littoralis</i> ((Durand et al., 2010))
Sl qPCR Actin for	CGG CAT GGG ACA GAA GGA CT	Referenzgen <i>Actin S.littoralis</i> ((Durand et al., 2010))
Sl qPCR Actin rev	CTC TGT TGG CCT TGG GGT TG	Referenzgen <i>Actin S.littoralis</i> ((Durand et al., 2010))
SIBSAS2a qPCR for1	TTG CTG GCA CCT CAA GG	Expression SIBSAS2a
SIBSAS2a qPCR rev1	GAT TGG GCA TCC CGC	Expression SIBSAS2a
SIBSAS2b qPCR for1	GTC GAG AAG AAC CTG AAG GAT G	Expression SIBSAS2b
SIBSAS2b qPCR rev1	GCC AAT ATT CTC CCA GGG C	Expression SIBSAS2b



