

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
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
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>13</b>
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 Polymerasenkettenreaktion . . . . .	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
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1 Cyanidentgiftungsenzyme in <i>P. rapae</i> . . . . .	33
3.1.1 Charakterisierung von $\beta$ -Cyanoalanin-Synthasen . . . . .	33
3.1.2 Klonierung und Charakterisierung von Rhodanessen 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 $\beta$ -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität in Raupen . . . . .	44
3.2.2 Klonierung von $\beta$ -Cyanoalanin-Synthasen . . . . .	47
3.2.3 Nachweis der $\beta$ -Cyanoalanin-Synthase-Aktivität der in Lepidoptera identifizierten Proteine mittels HPLC-MS/MS . . . . .	49
3.2.4 Phylogenetische Analyse von $\beta$ -Cyanoalanin-Synthasen aus Lepidoptera .	51
3.2.5 Kinetische Charakterisierung der $\beta$ -Cyanoalanin-Synthasen aus Lepidoptera	53
3.2.6 Expression von $\beta$ -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
<b>4 Diskussion</b>	<b>77</b>
4.1 Cyanidentgiftung in <i>P. rapae</i> . . . . .	77
4.2 Cyanidentgiftung in anderen Lepidoptera . . . . .	80
4.2.1 Evolutionärer Hintergrund der $\beta$ -Cyanoalanin-Synthasen . . . . .	84
4.3 RNAi in Lepidoptera . . . . .	85
4.4 Ausblick . . . . .	87
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>89</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>91</b>
<b>Anhang</b>	<b>103</b>
Für die phylogenetische Analyse verwendete Sequenzen . . . . .	103
Oligonukleotide . . . . .	109