

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Wehrmechanismen der Blattkäfer (Coleoptera: Chrysomelidae)	2
1.1.1	Chemische Abwehr der adulten Käfer	4
1.1.2	Chemische Abwehr der Blattkäferlarven	8
1.1.2.1	<i>De novo</i> -Synthese von iridoïden Monoterpenen (IM)	11
1.1.2.2	Sequestrierung phenolischer Glucoside	12
1.1.2.3	Gemischte Strategie der Biosynthese	13
1.1.2.4	Übersicht der verschiedenen Strategien	14
1.1.3	Chemische Abwehr der Blattkäfereier und -puppen	16
1.2	Ziel der Arbeit	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Chemikalien	20
2.1.1	Spezielle Chemikalien	20
2.1.2	Enzyme	21
2.1.3	Primer	21
2.2	Verwendete Organismen und Kulturführung	22
2.2.1	<i>Chrysomeliden</i> : Käfer und Larven von <i>C. tremulae</i> , <i>C. populi</i> und <i>Ph. cochleariae</i>	22
2.2.2	<i>E. coli</i> -Stämme	23
2.3	Plasmide	24
2.4	Molekularbiologische Methoden	25
2.4.1	Primerdesign	25
2.4.2	Isolierung von Gesamt-RNA	27
2.4.2.1	TRIZOL [®] -Methode	27
2.4.2.2	RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)	28
2.4.3	Isolierung von Gesamt-DNA	28
2.4.4	Aufreinigung von PCR-Produkten	28
2.4.4.1	NucleoSpin [®] Extract II-Kit	28
2.4.4.2	Reinigung aus einem Agarosegel	29
2.4.5	Isolierung von Plasmid-DNA	29
2.4.5.1	Isolierung von Plasmid-DNA nach MINIPREP-Methode	29
2.4.5.2	Isolierung von Plasmid-DNA nach STET-Methode	30
2.4.5.3	Isolierung von Plasmid-DNA mit Machery und Nagel-Kit	30

2.4.5.4	Isolierung von Plasmid-DNA mit PROMEGAKit	31
2.4.5.5	Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA (Midi)	31
2.4.6	Quantifizierung von RNA und DNA	31
2.4.7	cDNA-Synthese durch Reverse Transkription	32
2.4.8	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	32
2.4.8.1	Nested PCR	34
2.4.8.2	Adapter Ligation-PCR	34
2.4.8.3	Inverse PCR	36
2.4.8.4	Schnelle Amplifizierung von DNA-Enden (RACE)	37
2.4.8.5	Site-directed-mutagenesis	39
2.4.9	Agarose-Gelelektrophorese	39
2.4.10	Klonierungsreaktionen	40
2.4.10.1	Klonierung von PCR-Produkten	40
2.4.10.2	Klonierung in Expressionsvektoren	41
2.4.11	Transformation von kompetenten Zellen	42
2.4.12	Identifizierung positiver Klone	43
2.4.12.1	Blau-Weiß-Selektion	43
2.4.12.2	PCR-Screening	43
2.4.12.3	Restriktionsanalyse	44
2.4.13	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	44
2.4.14	Sequenzierung	45
2.4.15	Computergesteuerte Sequenzanalyse	45
2.5	Biochemische Methoden	46
2.5.1	Proteinbestimmung	46
2.5.2	Entsalzen, Umpuffern und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen	46
2.5.3	Proteinfällung mit TCA	47
2.5.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.5.5	Native Polyacrylamidgelelektrophorese	48
2.5.6	Blotten von Elektrophoresegelen	49
2.5.7	Proteinfärbung	50
2.5.8	2D-Gelelektrophorese	50
2.5.9	Affinitätsreinigung über Ni-NTA-Agarose	52
2.5.10	Enzymassay zur Aktivitätsbestimmung der SAO	54
2.5.11	Untersuchung der β -D-Glucosidase-Aktivität	56
2.5.12	Deglykosylierung mit PNGase F	56
2.5.13	N-terminale Sequenzierung	56
2.5.14	MS/MS-Sequenzierung	57
3	Ergebnisse	59
3.1	Sequenzierung von Peptiden	60
3.1.1	2D-Elektrophorese des Wehrsekrets von <i>C. populi</i>	60
3.2	Identifizierung von SAO codierenden cDNAs aus <i>C. tremulae</i>	64
3.2.1	Entwurf degenerierter Primer mit Peptiden aus N-terminaler Sequenzierung aus dem Wehrsekret von <i>C. tremulae</i>	64

3.2.2	Probleme bei der RNA-Isolierung und RT-PCR	65
3.2.3	Von der cDNA zur Gesamt-Sequenz	66
3.2.4	Vergleich mit Datenbanken	68
3.2.5	Charakterisierung der cDNA-Sequenz der SAO aus <i>C. tremulae</i> . .	69
3.2.5.1	Site-directed-mutagenesis	70
3.2.5.2	Proteinexpression und Reinigung	71
3.2.5.3	Enzymassay	73
3.2.5.4	Identifizierung der SAO aus <i>C. populi</i>	75
3.2.5.5	Identifizierung einer weiteren SAO aus <i>C. tremulae</i> . . .	76
3.3	Identifizierung einer weiteren GMC-homologen cDNA aus <i>C. tremulae</i> . .	77
3.3.1	Von der RNA zur ganzen Sequenz	78
3.4	Mutmaßliche Katalase aus <i>C. tremulae</i>	80
3.4.1	Bau degenerierter Primer mit Peptiden aus der MS/MS-Sequenzierung aus dem Wehrsekret von <i>C. tremulae</i>	80
3.4.2	Von der RNA zur ganzen Sequenz	81
3.4.3	Vergleich mit Datenbanken	82
3.5	Mutmaßliche β -Glucosidase aus <i>C. tremulae</i>	83
3.5.1	Nachweis einer β -Glucosidase-Aktivität aus dem Wehrsekret	83
3.5.2	Identifizierung einer β -Glucosidase aus dem Wehrsekret von <i>C. tre-</i> <i>mulae</i> mit Hilfe einer nativen PAGE	84
3.5.3	Identifizierung einer cDNA mit Homologie zu β -Glucosidase-co- dierenden cDNAs	85
3.5.4	Vergleich mit Datenbanken	89
3.6	Sequenzierung von Peptiden aus dem Wehrsekret von <i>Ph. cochleariae</i> . . .	89
3.6.1	Probleme bei der RNA-Isolierung und RT-PCR	91
4	Diskussion	93
4.1	Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreductasen	93
4.2	GMC-homologe Sequenzen aus <i>C. tremulae</i> und <i>C. populi</i>	95
4.3	Nuklein- und Aminosäuresequenz der Katalase und einer β -Glucosidase aus <i>C. tremulae</i>	99
4.4	Ausblick	101
A	Abkürzungen	104
B	Primer	107
	Literaturverzeichnis	109