



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Symbol- und Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Pflanzen und Herbivoren im evolutionären Wettrüsten	1
1.2 Das Glucosinolat-Myrosinase-System der Brassicaceae als Drehscheibe für Pflanzen-Insekten-Interaktionen.....	3
1.2.1 Die Abwehrfunktion des pflanzlichen Glucosinolat-Myrosinase-Systems.....	3
1.2.2 Anpassung von Generalisten und Spezialisten	6
1.2.3 <i>Pieris rapae</i> und das Nitril-spezifisierende Protein	8
1.2.4 Stoffwechsel der aus Glucosinolaten gebildeten Nitrile in <i>Pieris rapae</i>	10
1.2.5 Toxizität von Cyanid.....	13
1.2.6 Cyanidentgiftung.....	14
1.2.6.1 Entgiftungswege.....	14
1.2.6.2 Cyanidentgiftung in Mikroorganismen.....	15
1.2.6.3 Cyanidentgiftung in Pflanzen.....	16
1.2.6.4 Cyanidentgiftung in Wirbeltieren	16
1.2.6.5 Cyanidentgiftung in Arthropoden.....	17
1.2.7 β -substituiertes Alanin-Synthasen.....	19
1.2.7.1 Pyridoxal-5'-phosphat-abhängige Proteine des Faltungstyps II	19
1.2.7.2 O-Acetylserin(thiol)lyase	20
1.2.7.3 Cystathionin- β -Synthase.....	21
1.2.7.4 β -Cyanoalanin-Synthase	22
1.2.8 Rhodanese und andere Schwefeltransferasen	24
1.3 Zielsetzung	28
2 Material und Methoden	29
2.1 Versuchstiere und Futterpflanzen.....	29
2.1.1 <i>Pieris rapae</i>	29
2.1.2 <i>Anthocharis cardamines</i>	30
2.1.3 <i>Plutella xylostella</i>	31
2.1.4 <i>Gonepteryx rhamni</i>	31
2.1.5 <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
2.1.6 <i>Brassica oleracea var. gemmifera</i>	32



2.2	Biotests mit Insekten	32
2.2.1	HCN-Begasung von <i>P. rapae</i>	32
2.2.2	Fütterung von <i>P. rapae</i> mit <i>A. thaliana</i>	33
2.3	Analytische Methoden.....	33
2.3.1	Metabolitenextraktion aus <i>Pieris rapae</i>	33
2.3.2	HPLC-MS/MS für Metabolitenuntersuchungen	34
2.3.3	Probenvorbereitung für die HPLC-MS/MS-basierte Peptidanalytik	37
2.3.4	HPLC-MS/MS-basierte Peptidanalytik	38
2.4	Molekularbiologische Materialien und Methoden.....	39
2.4.1	Plasmidvektoren.....	39
2.4.2	Bakterienstämme	40
2.4.3	Oligonukleotide	40
2.4.4	Isolierung von RNA.....	41
2.4.5	Reverse Transkription.....	42
2.4.6	Polymerase-Kettenreaktion	42
2.4.6.1	Standard-PCR	42
2.4.6.2	Hotstart-PCR.....	43
2.4.6.3	Touchdown-PCR.....	43
2.4.6.4	PCR mit degenerierten Oligonukleotiden	44
2.4.6.5	Semiquantitative PCR.....	44
2.4.6.6	Vervollständigung der cDNA-Fragmente.....	45
2.4.6.7	Full-length-PCR	48
2.4.6.8	Kolonie-PCR	49
2.4.7	Agarosegelelektrophorese und DNA-Aufreinigung aus dem Gel	50
2.4.8	Photometrische Bestimmung von RNA-/DNA-Konzentrationen	50
2.4.9	Ligation und Transformation.....	51
2.4.10	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	52
2.4.11	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> und Sequenzierung.....	52
2.4.12	Uracil-specific excision reagent-Klonierung.....	53
2.4.13	Restriktionsverdau	54
2.4.14	Dauerkultur gentechnisch veränderter Bakterien	55
2.4.15	Überexpression der rekombinanten PrBSAS.....	55
2.5	Proteinbiochemische Methoden	56
2.5.1	Proteinextraktion und partielle Aufreinigung aus Raupen.....	56
2.5.2	Zellernte und Aufschluss von rekombinanten PrBSAS	57
2.5.3	Aufreinigung über den <i>Strep</i> -Tag und PD-10-Säulen	57
2.5.4	Proteinbestimmung.....	58
2.5.5	Bestimmung der Enzymaktivitäten	58



2.5.5.1	β -Cyanoalanin-Synthase	59
2.5.5.2	Rhodanese.....	59
2.5.5.3	O-Acetylserin(thiol)lyase	60
2.5.6	Polyacrylamidgelelektrophorese und Coomassiefärbung.....	61
2.5.7	Western Blot.....	63
3	Ergebnisse	65
3.1	Produkte der Entgiftung von Cyanid in <i>Pieris rapae</i>	65
3.1.1	Entgiftungsprodukte nach der Begasung mit Cyanid.....	65
3.1.1.1	Methodische Herangehensweise der Begasungsversuche.....	65
3.1.1.2	β -Cyanoalaninbildung nach Cyanidbegasung	65
3.1.1.3	Thiocyanatbildung nach Cyanidbegasung	67
3.1.2	Entgiftungsprodukte nach der Fütterung mit cyanogenen Pflanzen.....	69
3.1.2.1	Methodische Herangehensweise der Pflanzenfütterungsversuche	69
3.1.2.2	β -Cyanoalaningehalt nach dem Fraß von Pflanzen mit Cyanidvorstufen.....	69
3.1.2.3	Thiocyanatgehalt nach dem Fraß von Pflanzen mit Cyanidvorstufen.....	70
3.2	Aktivitäten von Cyanidentgiftungsenzymen in <i>P. rapae</i>	72
3.2.1	Vorkommen von β -Cyanoalanin-Synthase und Rhodanese in <i>P. rapae</i>	72
3.2.2	Enzymaktivität in verschiedenen Entwicklungsstadien	73
3.2.3	Verteilung der Enzymaktivitäten in Raupengewebe	75
3.2.4	Induzierbarkeit der Enzymaktivitäten.....	77
3.2.4.1	Induzierbarkeit durch Begasung mit Cyanid	77
3.2.4.2	Induzierbarkeit durch Fütterung von Cyanidvorläufermolekülen.....	79
3.3	Klonierung und Charakterisierung von β -Cyanoalanin-Synthasen aus <i>P. rapae</i>	81
3.3.1	Klonierungsstrategien für die β -Cyanoalanin-Synthase.....	81
3.3.2	Identifizierung von cDNA-Fragmenten putativer β -Cyanoalanin-Synthasen	83
3.3.3	Vervollständigung der cDNA-Sequenzen der β -Cyanoalanin-Synthase-Kandidaten	85
3.3.4	Induktionsuntersuchungen mittels semiquantitativer PCR.....	87
3.3.5	Heterologe Expression von <i>PrBSAS1, 2</i> und <i>3</i> und Aktivitätsnachweis im Rohextrakt.....	88
3.3.6	Charakterisierung gereinigter rekombinanter <i>PrBSAS1, 2</i> und <i>3</i>	91
3.3.7	Etablierung einer HPLC-MS/MS-Methode zum Nachweis von <i>PrBSAS1, 2</i> und <i>3</i>	94
3.4	Klonierung von Rhodanese-Kandidaten aus <i>P. rapae</i>	95
3.5	Vorkommen und Analyse von Cyanidentgiftungsenzymen in weiteren Lepidoptera-Arten.....	96
3.5.1	Enzymaktivitätsbestimmungen mit Proteinextrakten aus Raupen.....	96



3.5.1.1	Enzymaktivität in <i>Anthocharis cardamines</i>	96
3.5.1.2	Enzymaktivität in <i>Plutella xylostella</i>	98
3.5.1.3	Enzymaktivität in <i>Gonepteryx rhamni</i>	99
3.5.2	Klonierung von partiellen cDNA-Sequenzen von β -Cyanoalanin-Synthase-Kandidaten aus weiteren Lepidoptera-Arten	100
4	Diskussion	103
4.1	Mechanismen der Cyanidentgiftung in <i>P. rapae</i>	103
4.2	Evolutionäre Aspekte der Cyanidentgiftung in den Lepidoptera.....	113
4.3	Schlussfolgerungen und Perspektiven	121
4.3.1	Fazit.....	121
4.3.2	Weiterführende Untersuchungen zur Cyanidentgiftung in <i>P. rapae</i>	121
4.3.3	Anwendung der Erkenntnisse für die Schädlingsbekämpfung.....	124
5	Zusammenfassung	126
6	Literatur	128
7	Anhang	144
7.1	Verbrauchsmaterialien, Apparaturen und Geräte	144
7.2	Verwendete Oligonukleotide.....	146
7.3	Methoden für die Peptid-HPLC-MS/MS	149
7.4	Zusätzliche Daten.....	151