



Pieris rapae und das Glucosinolat- Myrosinase-System: Cyanidentgiftung in Lepidoptera

Maike van Ohlen





Pieris rapae und das Glucosinolat-Myrosinase-System:
Cyanidentgiftung in Lepidoptera





Pieris rapae und das Glucosinolat-Myrosinase-System:
Cyanidentgiftung in Lepidoptera

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 Maïke van Ohlen
aus Leer



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, 2014

Zugl.: (TU) Braunschweig, Univ., Diss., 2014

1. Referentin:	Professorin Dr. Ute Wittstock
2. Referent:	Professor em. Dr. Thomas Hartmann
eingereicht am:	14.07.2014
mündliche Prüfung (Disputation) am:	01.08.2014

Druckjahr 2014

Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig,
Fakultät für Lebenswissenschaften

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2014

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, 2014

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-95404-805-2

eISBN 978-3-7369-4805-1



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:

Publikation

Stauber, E. J., Kuczka, P., Ohlen, M. van, Vogt, B. Janowitz, T., Piotrowski, M., Beuerle, T., Wittstock, U. Turning the “mustard oil bomb” into a “cyanide bomb”: Aromatic glucosinolate metabolism in a specialist insect herbivore. *PloS ONE* 7(4): e35545 (2012).

Tagungsbeiträge

Ohlen, M. van, Stauber, E. J., Wittstock, U.: Detoxification of glucosinolate-derived HCN in the crucifer-feeding specialist *Pieris rapae*. (Poster) Botanikertagung 2011, Berlin (2011).

Ohlen, M. van, Stauber, E. J., Wittstock, U.: Metabolism of aromatic glucosinolate-derived cyanide in the specialist herbivore *Pieris rapae*. (Vortrag) 28th Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology, Vilnius (2012).

Ohlen, M. van, Stauber, E. J., Wittstock, U.: Cabbage and the cabbage white: Cyanide detoxification in Pierids as one element of their coevolutionary relationship. (Poster) Botanikertagung 2013, Tübingen (2013).





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-spezififizierende 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 Strep-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	Evolutive 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



Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Schematische Darstellung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems am Beispiel der Hydrolyse von Benzylglucosinolat.....	5
Abb. 1.2 Glucosinolatmetabolismus in <i>P. rapae</i>	12
Abb. 1.3 Verbreitete Entgiftungswege für Cyanid und die beteiligten Enzyme.....	14
Abb. 1.4 Durch die <i>O</i> -Acetylserin(thiol)lyase katalysierte pflanzliche Cysteinbiosynthese. ...	20
Abb. 1.5 Durch die Cystathionin- β -Synthase katalysierte Reaktion in der tierischen Cysteinbiosynthese.	22
Abb. 1.6 Postulierter Reaktionsmechanismus der pflanzlichen β -Cyanoalanin-Synthase.....	23
Abb. 2.1 Entwicklungsstadien von <i>P. rapae</i>	29
Abb. 2.2 Weitere verwendete Lepidoptera-Raupen.....	31
Abb. 2.3 Schema der <i>rapid amplification of cDNA ends</i> -PCR.....	48
Abb. 2.4 Photometrischer Nachweis von Sulfid über die Bildung von Methylenblau.....	59
Abb. 2.5 Photometrischer Nachweis von Thiocyanat durch Komplexbildung.....	60
Abb. 2.6 Photometrischer Nachweis von Cystein über die Ninhydrinreaktion.....	61
Abb. 3.1 Nachweis von [^{14}N]- und [^{15}N] β -Cyanoalanin nach der Begasung mit [^{15}N]HCN.....	66
Abb. 3.2 Quantitativer Nachweis von [^{14}N]- und [^{15}N] β -Cyanoalanin in [^{15}N]HCN-begasteten Raupen ohne und mit Futterquelle.....	67
Abb. 3.3 Nachweis von [^{14}N]- und [^{15}N]Thiocyanat nach der Begasung mit [^{15}N]HCN.....	67
Abb. 3.4 Quantitativer Nachweis von [^{14}N]- und [^{15}N]Thiocyanat in [^{15}N]HCN-begasteten Raupen ohne und mit Futterquelle.....	68
Abb. 3.5 Quantitative Analyse von β -Cyanoalanin nach Fütterung mit cyanogenen Vorstufen über Nahrungspflanzen..	70
Abb. 3.6 Quantitative Analyse von Thiocyanat nach Fütterung mit cyanogenen Vorstufen über Nahrungspflanzen.	71
Abb. 3.7 HPLC-MS/MS-Nachweis von β -Cyanoalanin-Synthase- und Rhodaneseaktivität in Rohextrakten von <i>P. rapae</i>	73
Abb. 3.8 β -Cyanoalanin-Synthaseaktivität in Rohextrakten von <i>P. rapae</i> Raupen, Präpuppen, Puppen und Faltern.	74
Abb. 3.9 Rhodaneseaktivität in Rohextrakten von <i>P. rapae</i> Raupen, Präpuppen, Puppen und Faltern.....	75
Abb. 3.10 β -Cyanoalanin-Synthaseaktivität verschiedener Teile von Raupen von <i>P. rapae</i> . .	76
Abb. 3.11 Rhodaneseaktivität verschiedener Teile von Raupen von <i>P. rapae</i>	77



Abb. 3.12 Einfluss der Begasung mit Cyanid auf die β -Cyanoalanin-Synthase- und Rhodaneseaktivität im Darm von <i>P. rapae</i>	78
Abb. 3.13 Einfluss der Fütterung von cyanogenen Vorstufen über die Nahrung auf die β -Cyanoalanin-Synthaseaktivität im Darm von <i>P. rapae</i>	80
Abb. 3.14 Einfluss der Fütterung von cyanogenen Vorstufen über die Nahrung auf die Rhodaneseaktivität im Darm von <i>P. rapae</i>	81
Abb. 3.15 Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich der β -Cyanoalanin-Synthase aus <i>C. elegans</i> mit verschiedenen Lepidopterasequenzen.	83
Abb. 3.16 Mit CYSb-Oligonukleotiden und <i>P. rapae</i> cDNA erhaltene PCR-Produkte.	84
Abb. 3.17 <i>Nde</i> I-Restriktionsfragmentlängenanalyse von klonierten cDNA-Fragmenten putativer β -Cyanoalanin-Synthasen.....	85
Abb. 3.18 Vergleich der Vollängen-mRNA-Sequenzen und Aminosäuresequenzen von <i>PrBSAS1</i> , 2 und 3.	87
Abb. 3.19 Semiquantitative PCR zur Überprüfung einer Induktion nach Begasung mit Cyanid.	88
Abb. 3.20 Nachweis von rekombinanter <i>PrBSAS1</i> , 2 und 3 in <i>E. coli</i> -Rohextrakten.....	89
Abb. 3.21 β -Cyanoalanin-Synthaseaktivität in <i>E. coli</i> -Proteinrohextrakten mit rekombinanter <i>PrBSAS1</i> , 2 und 3.	90
Abb. 3.22 <i>O</i> -Acetylserin(thiol)lyaseaktivität in <i>E. coli</i> -Proteinrohextrakten von rekombinantem <i>PrBSAS1</i> , 2 und 3.	91
Abb. 3.23 Proteingele und Western Blot der Aufreinigung von rekombinantem <i>PrBSAS1</i> , 2 und 3 sowie der Vektorkontrolle.	92
Abb. 3.24 β -Cyanoalanin-Synthaseaktivität von gereinigten rekombinanten <i>PrBSAS</i>	93
Abb. 3.25 <i>O</i> -Acetylserin(thiol)lyaseaktivität in gereinigten rekombinanten <i>PrBSAS</i>	94
Abb. 3.26 Peptid-HPLC-MS/MS-Chromatogramm und Spektren von <i>PrBSAS2</i>	95
Abb. 3.27 Peptid-HPLC-MS/MS-Chromatogramm und Spektren von <i>PrBSAS3</i>	95
Abb. 3.28 β -Cyanoalanin-Synthase- und Rhodaneseaktivität verschiedener Teile von Raupen von <i>A. cardamines</i> vom dänischen Bagsværd-See.....	98
Abb. 3.29 β -Cyanoalanin-Synthase- und Rhodaneseaktivität in <i>P. xylostella</i>	99
Abb. 3.30 β -Cyanoalanin-Synthase- und Rhodaneseaktivität verschiedener Teile von Raupen von <i>G. rhamni</i>	100
Abb. 3.31 Mit CYSb-Oligonukleotiden und <i>A. cardamines</i> sowie <i>P. xylostella</i> cDNA erhaltene PCR-Produkte.	101
Abb. 4.1 Phylogenetische Einordnung der β -substituiertes Alanin-Synthasen aus <i>P. rapae</i> * und <i>A. cardamines</i> * zwischen uncharakterisierten Arthropodensequenzen und bakteriellen β -Cyanoalanin-Synthasen.	118



Abb. 7.1 Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich der <i>Oryza sativa</i> β -Cyanoalanin-Synthase-Proteinsequenz mit einer vorhergesagten Proteinsequenz aus <i>Bombyx mori</i>	151
Abb. 7.2 Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich von <i>Triticum aestivum</i> β -Cyanoalanin-Synthase mRNA und einer unbekanntesten EST-Sequenz aus <i>Aedes aegypti</i>	151
Abb. 7.3 Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich verschiedener annotierter Cystein-Synthasen und nicht benannter Proteinsequenzen aus verschiedenen Insekten.	152
Abb. 7.4 Sequenzvergleich der beiden aus <i>P. rapae</i> durch PCR erhaltenen Fragmente R und V mit den Proteinsequenzen aus Abb. 3.15.	153
Abb. 7.5 Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich einer <i>D. melanogaster</i> Schwefeltransferase mit anderen Insektensequenzen.	153
Abb. 7.6 Sequenzvergleich der partiellen und vollständigen Aminosäuresequenzen der β -substituiertes Alanin-Synthasen aus Lepidoptera.	154



Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1 Prinzipien der Entgiftung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems in spezialisierten und generalistischen Herbivoren.	6
Tab. 2.1 Verwendete Volumina der Extraktionsmittel für die Metabolitenanalyse.....	34
Tab. 2.2 Fließmittel-Gradienten für die Metabolitenanalytik mittels HPLC-MS/MS.....	35
Tab. 2.3 Massen, Fragmente und MS/MS-Spannungen zur Messung von Cyanidentgiftungsprodukten.....	36
Tab. 2.4 Einstellungen der HPLC-MS/MS-Methoden für die Analytik von β -Cyanoalanin und Thiocyanat.....	37
Tab. 2.5 Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele.....	62
Tab. 3.1 Sequenzidentitäten von β -substituiertes Alanin-Synthasen.	86
Tab. 3.2 Sequenzidentitäten der identifizierten β -substituiertes Alanin-Synthasen aus Lepidoptera.	102
Tab. 7.1 Für die Klonierung von cDNA-Fragmenten eingesetzte Oligonukleotide.....	146
Tab. 7.2 Für die 3'-RACE und 5'-RACE verwendete Oligonukleotide.	147
Tab. 7.3 Oligonukleotide für die semiquantitative PCR in 5'- zu 3'-Richtung.....	148
Tab. 7.4 Oligonukleotide für die Klonierung von <i>Full-length</i> - und Expressionskonstrukten in 5'- zu 3'-Richtung.	148
Tab. 7.5 HPLC-Gradient für die Peptidanalytik.....	149
Tab. 7.6 HPLC-MS/MS-Einstellungen für die Peptidanalytik.	149
Tab. 7.7 Sequenzen, m/z und MS/MS-Spannungen der spezifischen Peptide für die HPLC-MS/MS-Analytik.	150
Tab. 7.8 Kombinationen der degenerierten CYSb-Oligonukleotide in der PCR mit den erwarteten Fragmentlängen in Basenpaaren (bp).	152
Tab. 7.9 Für die phylogenetische Analyse nach (Wybouw <i>et al.</i> , 2014) verwendete Proteinsequenzen von β -substituiertes Alanin-Synthasen aus Bakterien, Pflanzen, Stramenopilen, Pilzen, Nematoden, Arthropoden und Säugetieren.....	154



Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

AP	alkalische Phosphatase
BCA	engl. <i>bicinchoninic acid</i> , dt. Bicinchoninsäure
Bp	Basenpaare
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i> , dt. Rinderserumalbumin
BSAS	β -substituiertes Alanin-Synthase
CAPS	Cyclohexylaminopropansulfonsäure
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CE	<i>collision energy</i>
CEP	<i>collision cell entrance potential</i>
CXP	<i>collision cell exit potential</i>
DMF	Dimethylformamid
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , dt. Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
DP	<i>declustering potential</i>
DPD	<i>N,N</i> -Dimethyl- <i>p</i> -Phenylendiamindihydrochlorid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EP	<i>entrance potential</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
HPLC-MS/MS	engl. <i>high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i> , dt. Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IUB	Internationale Union für Biochemie
IUPAC	engl. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> , dt. Internationale Union für reine und angewandte Chemie
L3	drittes Larvalstadium
L4	viertes Larvalstadium
L5	fünftes Larvalstadium
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i> , dt. Boten-RNA
MW	Mittelwert
OD ₆₀₀	optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
ORF	engl. <i>open reading frame</i> , dt. offener Leserahmen



Symbol- und Abkürzungsverzeichnis

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , dt. Polymerasekettenreaktion
Pfu-Polymerase	thermostabile DNA-Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
PrBSAS1	β -substituiertes Alanin-Synthase 1 aus <i>Pieris rapae</i>
PrBSAS2	β -substituiertes Alanin-Synthase 2 aus <i>Pieris rapae</i>
PrBSAS3	β -substituiertes Alanin-Synthase 3 aus <i>Pieris rapae</i>
PrNSP	Nitril-spezififizierendes Protein aus <i>Pieris rapae</i>
RACE	engl. <i>rapid amplification of cDNA ends</i> , dt. schnelle Vervielfältigung von cDNA-Enden
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	Ribonukleinsäure-Interferenz
Rpm	engl. <i>revolutions per minute</i> , dt. Umdrehungen je Minute
RT	Raumtemperatur
SD	engl. <i>standard deviation</i> , dt. Standardabweichung
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> , dt. Natriumdodecylsulfat
SOC	<i>Super Optimal Broth</i> -Medium mit Zugabe von Glucose
Taq-Polymerase	thermostabile DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TB	<i>Terrific Broth</i>
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TBS	engl. <i>tris-buffered saline</i> , dt. Tris-gepufferte Salzlösung
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	engl. <i>tween 20-tris-buffered saline</i> , dt. Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20 als Detergenz
USER	engl. <i>uracil-specific excision reagent</i> , dt. Uracil-spezifisches Entfernungsreagenz
UTR	engl. <i>untranslated region</i> , dt. nichttranslatierte Region

1 Einleitung

1.1 PFLANZEN UND HERBIVOREN IM EVOLUTIONÄREN WETTRÜSTEN

Pflanzen sind als Grundlage der Ernährung aller Herbivoren einem hohen Fraßdruck und zusätzlich zahlreichen physikalischen und chemischen Umweltstressoren ausgesetzt. Um dennoch effizient wachsen und sich fortpflanzen zu können, haben sich im Laufe der pflanzlichen Evolution zahlreiche Strategien und Abwehrmethoden entwickelt, die zumeist auf physikalischen Barrieren oder chemischen Substanzen beruhen. Die konkrete Abwehr von saugenden, kauenden oder minierenden Fraßfeinden basiert chemisch auf Sekundärstoffen, pflanzlichen Inhaltsstoffen, die für das ökologische Zusammenspiel mit der Umwelt gebildet werden, in den Prozessen von Wachstum und Entwicklung der Pflanze jedoch keine Rolle innehaben zu scheinen (diskutiert von Hartmann, 2007). Die Bedeutung der Sekundärstoffe zur Abschreckung von Herbivoren wurde bereits Ende des 19. Jahrhunderts von Ernst Stahl beschrieben, geriet jedoch in Vergessenheit (Stahl, 1888). Siebzig Jahre später definierte Gottfried Fraenkel auf dieser Basis die Schutzfunktion der Sekundärstoffe als Grund ihres Vorkommens und ihrer evolutionären Entstehung in Pflanzen, als „raison d’être“ (Fraenkel, 1959). Gleichzeitig erkannte er, dass viele spezialisierte Fraßfeinde diese Abwehrstoffe als Anreiz zu Eiablage und Fraß nutzen. Dabei stützte er sich unter anderem auf die Arbeiten von Thorsteinson, der auf Brassicaceae spezialisierten Herbivoren durch Zugabe von Glucosinolat als Stimulans andere Futtermittel schmackhaft machte (Thorsteinson, 1953).

Von Ehrlich und Raven wurde 1964 die Schutzfunktion von pflanzlichen Sekundärstoffen im evolutionären Zusammenhang der Weiterentwicklung der chemischen Abwehr der Pflanzen und der parallelen Adaptation und Spezifizierung ihrer Herbivoren untersucht (Ehrlich & Raven, 1964). In dieser Arbeit wurde erstmalig der Einfluss beider beteiligter Organismen auf die gegenseitige Entwicklung am Beispiel von Schmetterlingen und ihren Futterpflanzen untersucht. Neben zusätzlichen Faktoren wie der saisonalen und geografischen Verfügbarkeit der Futterpflanze ist die Futterwahl vor allem von den in der Pflanze enthaltenen Sekundärstoffen abhängig. Durch genetische Veränderungen passen einzelne Insektenarten ihren Stoffwechsel an diese Bedingungen an, sodass sie diese Pflanzenart effizienter nutzen können. Dadurch kommt es zu Nischenbildung und Spezialisierung (Ehrlich & Raven, 1964). Die ursprünglich als Abwehrstoffe gebildeten Substanzen werden dabei zu positiven Signalen für spezialisierte Herbivoren. Dies ist initial vorteilhaft für die angepasste Art, bis die weitere Entwicklung der Pflanzen oder Konkurrenten den Vorteil relativiert, was neue Anpassungsschritte hervorruft. Genetische Variabilität auf Seiten der Pflanze gilt als wichtiger Mechanismus für die Diversifizierung des Sekundärstoffwechsels unter dem Selektionsdruck der Umwelt. Gleichzeitig ermöglichen Adaptationsmechanismen auf Seite der Herbivoren die Entstehung neuer Arten



(Ehrlich & Raven, 1964). Diese „Koevolution“, die wechselseitige Anpassung von zwei eng miteinander assoziierten Arten, ist somit einer der einflussreichsten Faktoren bei der Diversifizierung und Evolution von Pflanzen- und Herbivorenarten (Ehrlich & Raven, 1964).

Beispiele für Koevolutionsmechanismen sind in fast jeder Pflanze-Herbivor-Interaktion zu finden. Für die Beziehung zwischen Pflanzen der Gattung *Bursera* aus der Familie der Balsambaumgewächse und ihre spezialisierten Herbivoren, die *Blepharida*-Käfer (Coleoptera:Chrysomelidae) wurde gezeigt, dass die chemische Zusammensetzung des Pflanzenmaterials wohl eine größere Bedeutung für die Futterpflanzenwahl innehat als die pflanzliche Phylogenie (Becerra, 1997). Raupen von *Estigmene acrea* (Lepidoptera:Arctiidae) sind polyphag, ernähren sich unter anderem jedoch von Pflanzen, die durch toxische Pyrrolizidinalkaloide geschützt sind. Sie besitzen spezifische Rezeptoren zur Erkennung dieser Futterpflanzen und können durch enzymatische Umsetzung die Giftigkeit der Alkaloide herabsetzen. Außerdem können sie die Alkaloide sequestrieren, um sie zu ihrem eigenen Schutz gegen Parasitoide sowie zur Biosynthese eines männlichen Pheromons einzusetzen (Hartmann *et al.*, 2005).

Eines der am besten untersuchten Systeme von chemisch geschützten Pflanzen und ihren spezialisierten Herbivoren findet sich bei dem cyanogene Glucoside bildenden Hornklee *Lotus corniculatus* (Fabaceae) und seinem Fraßfeind, dem Sechsfleck-Widderchen *Zygaena filipendulae* (Lepidoptera:Zygaenidae). In den Vakuolen der Pflanzenzellen gespeicherte cyanogene Glucoside werden bei Verletzung des pflanzlichen Gewebes durch eigene oder tierische β -Glucosidasen gespalten, wobei das universelle Zellgift Cyanid (s. 1.2.5) freigesetzt wird (Conn, 1980, Saunders & Conn, 1978). Das Vorkommen von cyanogenen Glucosiden ist in der Pflanzenwelt weit verbreitet. Cyanogene Glucoside sind effizient in der Abwehr der meisten Fraßfeinde, insbesondere von Generalisten (Gleadow & Woodrow, 2002). Außer der Funktion in der Herbivorenabwehr dienen die cyanogenen Glucoside den Pflanzen als mobilisierbarer Stickstoff- und Zuckerspeicher (Jenrich *et al.*, 2007). Neben Pflanzen verwenden jedoch auch zahlreiche Arthropodenarten cyanogene Glucoside um sich gegen Fraßfeinde zu schützen (Duffey, 1981). Konvergent zur Biosynthese in Pflanzen ist in einigen Tierarten ein Biosyntheseweg zur Produktion der beiden verbreiteten aliphatischen cyanogenen Glucoside Linamarin und Lotaustralin entstanden (Jensen *et al.*, 2011, Nahrstedt, 1988). Die Tiere profitieren mehrfach von den in der Futterpflanze enthaltenen cyanogenen Glucosiden. Durch eine spezielle Fraßtechnik und morphologische und biochemische Voraussetzungen können einige Arten die Moleküle beim Fraß aus den Pflanzenzellen aufnehmen, ohne sie unter Cyanidfreisetzung zu hydrolysieren (Pentzold *et al.*, 2014). Sie sequestrieren die pflanzlichen cyanogenen Glucoside und verwenden diese zur Abwehr von Feinden, als Stickstoffspeichersubstanz sowie als Signalstoff bei der Partnerwahl im Zuge der Paarung der Falter, anstatt selbst *de novo*-Biosynthese betreiben zu müssen, weshalb sie auf cyanogenen Pflanzen besser gedeihen (Zagrobelny & Møller, 2011, Zagrobelny *et al.*, 2007). Die Pflanzen können sich also durch die Bildung von cyanogenen Glucosiden vor generalistischen Herbivoren schützen, unterstützen damit jedoch die spezialisierten Fraßfeinde in