



Anna-Maria Steiner (Autor)

Evolution der Wirtspflanzenanpassung in Pieridae

Untersuchungen zur möglichen Rolle cyanidentgiftender Enzyme



Anna-Maria Steiner

Evolution der Wirtspflanzenanpassung in Pieridae:

Untersuchungen zur möglichen Rolle
cyanidentgiftender Enzyme



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/7815>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>



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