

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Biologisch-Pharmazeutische Fakultät



seit 1558

Biochemische Charakterisierung von
Isoprenyldiphosphat-Synthasen in Insekten

Bachelorarbeit
zur Erlangung des Grades eines
Bachelor of Science
vorgelegt von
Stefan Elsner
aus Hildburghausen

Jena, September 2013

Gutachter:

Prof. Dr. Wilhelm Boland

Dr. Axel Schmidt

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I Zusammenfassung	i
II Abbildungsverzeichnis	ii
III Abkürzungsverzeichnis	iii
1 Einleitung	1
1.1 Terpene	1
1.2 Isoprenyldiphosphat-Synthase	2
1.3 Rolle der Terpene in ausgewählten Insekten	3
1.3.1 Chrysomelidae	4
1.3.2 Cerambycidae	6
1.3.3 Tenebrionidae	6
1.3.4 Curculionidae	7
1.3.5 Pteromalidae	7
1.3.6 Aphididea	7
1.3.7 Bombycidae	8
1.4 Zielstellung	8
2 Material	9
2.1 Chemikalien	9
2.2 Lösungen und Puffer	10
2.2.1 Lösungen zur Isolation des Proteins	10
2.2.2 Lösungen und Puffer zur Durchführung des Enzymaktivitätstest	10
2.3 Kommerzielle Kits	10
2.4 Vektor, Enzyme und Nukleotide	11
2.5 Bakterienstämme	11
2.6 Nährmedien	11
2.7 Molekulargewichtsstandards	12
2.8 Materialien	12
2.9 Geräte	13

3	Methoden	14
3.1	Bioinformatische Auswertung	14
3.2	RNA-Isolation	14
3.3	Reverse Transkription	14
3.4	Klonierung	15
3.5	Transformation des Expressionsvektors	15
3.6	Plasmidisolierung und Sequenzierung	16
3.7	Heterologe Expression des Fusionsproteins	16
3.8	Proteinextraktion	16
3.9	Enzymaktivitätsnachweis	17
3.10	Chromatographische Vermessung	17
4	Auswertung	19
4.1	Vergleich der Aminosäuresequenzen	19
4.2	Klonierung	21
4.3	Rekombinante Herstellung der Enzyme	22
4.4	Enzymaktivitätstest	24
4.4.1	Aktivität der <i>PcIDS1</i> nach <i>Frick et al.</i>	24
4.4.2	Spezifische Enzymaktivität der IDS aus <i>C. lapponica</i>	25
4.4.3	Spezifische Enzymaktivität der IDS aus <i>T. castaneum</i>	26
4.4.4	Spezifische Enzymaktivität der IDS aus <i>N. vitripennis</i>	28
4.4.5	Spezifische Enzymaktivität der IDS aus <i>M. viciae</i>	30
4.4.6	Spezifische Enzymaktivität der IDS aus <i>M. persicae</i>	31
5	Diskussion	32
5.1	Faktorabhängige Produktspezifität	32
5.2	Einfluss des Translokationspeptids	34
5.3	Betrachtung der Aminosäuresequenzen	34
5.4	Ausblick	35
A	Literatur	I
B	Anhang	VII
C	Danksagung	XVI
D	Selbstständigkeitserklärung	XVII

I Zusammenfassung

Im Sekundärmetabolismus der Insekten haben Mono- und Sesquiterpene eine besondere Rolle. Während die Juvenilhormone zu den Sesquiterpene gehören, welche die physiologische Entwicklung der Insekten regulieren, dienen Monoterpene in einigen Spezien vor allem als Abwehrstoff oder Pheromon. Die Synthese der Terpenvorstufen erfolgt dabei über Isoprenyldiphosphat-Synthasen (IDS), welche die Alkylierungsreaktionen des allylischen Substrats DMADP und des Homoallyls IDP durchführen, sodass GDP resultiert. In einem weiteren Elongationszyklus kann wiederum die Verlängerung des GDP als Allylderivat durch den nucleophilen Angriff des IDP zu FDP erfolgen.

Eine aktuelle Publikation zeigt, dass im Meerrettichblattkäfer *Phaedon cochleariae* die Produktlänge der IDS 1 (*PcIDS1*) von Metallionen als Kofaktoren beeinflusst werden kann. Während die *PcIDS1* in Gegenwart von Co^{2+} annähernd vollständig GDP herstellt, erfolgt mit Mg^{2+} eine überwiegende Synthese von FDP. Aufgrund der Entdeckung dieses Phänomens wird in dieser Arbeit die Verbreitung dieser faktorabhängigen Produktspezifität in verschiedenen Insektenspezien untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Nukleotidsequenz der *PcIDS1* mit publizierten Sequenzen des National Center for Biotechnology Information (NCBI) und unveröffentlichten Sequenzen, welche am Max-Planck-Instituts für chemische Ökologie Jena erforscht wurden, verglichen, um homologe Synthasen zu ermitteln. Nachfolgend wurden die Transkripte der IDS aus den Insekten isoliert, rekombinant als Protein hergestellt und die Enzymaktivität unter dem Einfluss von Metallionen analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass die Promiskuität der *PcIDS1* sowohl bei dem artverwandten Blattkäfer *Chrysomela lapponica*, aber auch in den taxonomisch entfernten Blattläusen *Myzus persicae* und *Megoura viciae* vorkommt.

II Abbildungsverzeichnis

	Seite
1 Terpenbiosynthese	2
2 Larve des Meerrettichblattkäfers <i>P. cochleariae</i>	5
3 Darstellung der Sequenzübereinstimmungen	19
4 Agarosegelelektrophorese	22
5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	23
6 Enzymaktivität von <i>C. lapponica</i>	25
7 Enzymaktivität von <i>T. castaneum</i> (F ₁)	26
8 Enzymaktivität von <i>T. castaneum</i> (F ₂)	27
9 Enzymaktivität von <i>N. vitripennis</i> (F ₁)	28
10 Enzymaktivität von <i>N. vitripennis</i> (F ₂)	29
11 Enzymaktivität von <i>M. viciae</i>	30
12 Enzymaktivität von <i>M. persicae</i>	31

III Abkürzungsverzeichnis

μ	micro (10 ⁻⁶)
Abb.	Abbildung
<i>A. pisum</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i>
<i>B. mori</i>	<i>Bombyx mori</i>
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
<i>C. lapponica</i>	<i>Chysomela lapponica</i>
<i>C. populi</i>	<i>Chrysomela populi</i>
<i>D. ponderosae</i>	<i>Dendroctonus ponderosae</i>
cDNA	komplementäre DNA
Da	Dalton
ddH ₂ O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	-fache Erdbeschleunigung (x 9,81 m/s ²)
h	Stunde(n)
His-tag	Histidinanker
HPLC-MS/MS	Flüssigchromatographie-gekoppelte Massenspektroskopie
k	kilo
l	Liter
LB-Medium	Nährmedium zur Kultivierung von Bakte- rien (engl. lysogeny broth)
m	milli (10 ⁻³)
M	Mol/l
<i>M. persicae</i>	<i>Myzus persicae</i>
<i>M. viciae</i>	<i>Megoura viciae</i>
min	Minute(n)

nm	Nanometer
<i>N. vitripennis</i>	<i>Nasonia vitripennis</i>
<i>P. cochleariae</i>	<i>Phaedon cochleariae</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
ppm	peak per minute
psi	Maßeinheit des Druckes (engl. Pound-force per square inch)
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
<i>T. castaneum</i>	<i>Tribolium castaneum</i>
<i>T. fuscum</i>	<i>Tetropium fuscum</i>
U	Umdrehung(en)

1 Einleitung

1.1 Terpene

Terpene sind natürliche Produkte vieler pflanzlicher und tierischer Organismen. Es handelt sich bei diesen Stoffen grundlegend um Verbindungen, welche aus der Polymerisation von C_5 -Isopreneinheiten hervorgehen [1]. Entsprechend der Anzahl dieser C_5 -Einheiten lassen sich die Verbindungen in Monoterpene (C_{10}), Sesquiterpene (C_{15}), Diterpene (C_{20}), Sesterterpene (C_{25}), Triterpene (C_{30}), Tetraterpene (C_{40}) und Polyterpene ($C_{\geq 50}$) unterteilen [2]. Vor diesem Hintergrund sind in Anbetracht der Diversität der einzelnen Lebewesen und der kombinatorischen Vielzahl der Moleküle gegenwärtig 60 000 Terpene bekannt [3].

Während in Gramnegativen Bakterien Terpene über den Methylerythritolphosphatweg hergestellt werden, ist der Ausgangspunkt der Terpenbiosynthese bei Eukaryoten und Archaeen der Mevalonatweg, wobei in Pflanzen beide Synthesewege vorkommen [4]. Über den Mevalonatweg wird aus 3 Acetyl-CoA-Molekülen über 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) durch die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMGR) Mevalonsäure gebildet. Nach anschließender Phosphorylierung und Decarboxylierung sowie Eliminierung von H_2O unter Verbrauch von 3 ATP-Molekülen erfolgt die Bildung von Isopentenylidiphosphat (IDP). Dieses wird abschließend durch eine Isomerase im Gleichgewicht in Dimethylallyldiphosphat (DMADP) umgewandelt [1]. In einer nachfolgenden Alkylierungsreaktion kommt es zum Angriff des elektrophilen DMADP an die Doppelbindung des IDP und Freisetzung des Pyrophosphatrestes vom DMADP, woraus das C_{10} -Intermediat Geranyl-diphosphat (GDP) resultiert [5]. Das durch diesen kombinierten Substitutions-Eliminierungs-Prozess gebildete GDP kann als Allylderivat erneut elektrophil an ein weiteres IDP angreifen, woraus weitere Terpenvorstufen wie Farnesyl-diphosphat (FDP) resultieren [6].

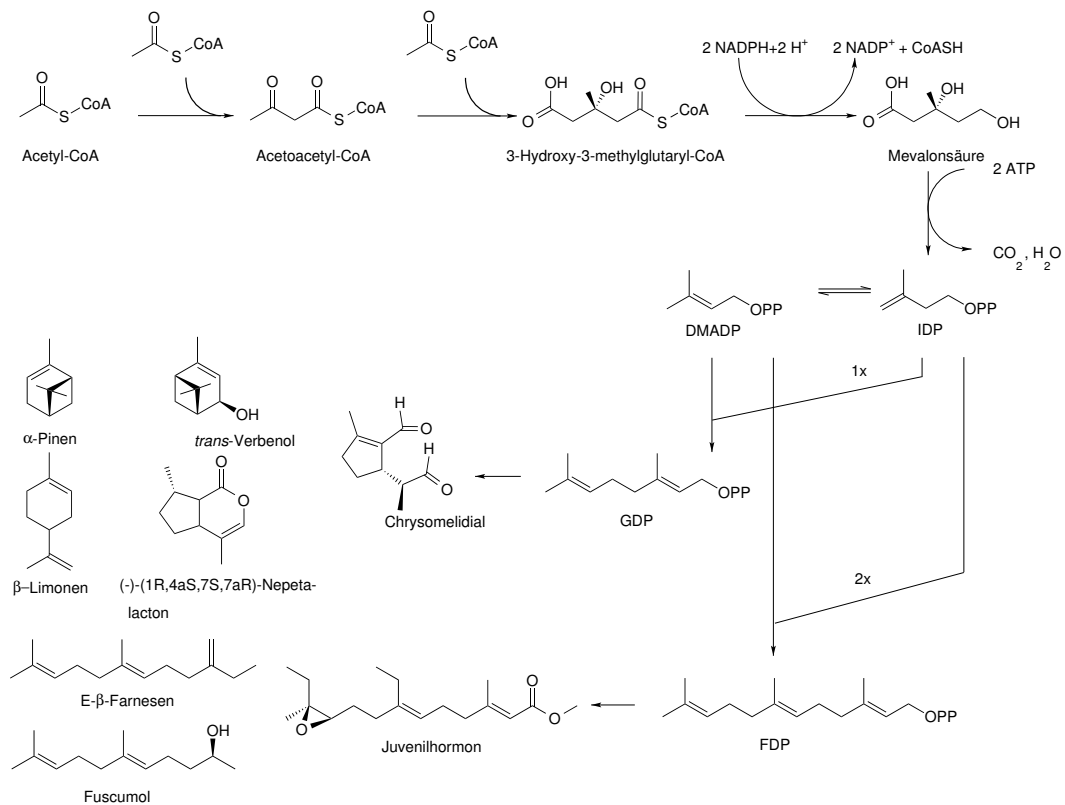


Abbildung 1: Terpenbiosynthese in Insekten.

1.2 Isoprenyldiphosphat-Synthase

Während im Mevalonatweg die HMGR ein Schlüsselenzym darstellt, stellt die Isoprenyldiphosphat-Synthase (IDS) bei der Elongation von Terpen-Vorstufen ein wichtiges regulatorisches Enzym dar [7]. Die IDS katalysiert die Kondensationsreaktion von IDP und DMADP und wird nach der Anzahl der C₅-Einheiten des Produktes und dessen Stereochemie in kurzkettenige, mittelkettenige und langkettenige *trans*-Prenyldiphosphatsynthasen sowie *cis*-Prenyldiphosphatsynthasen unterteilt [8]. Die in dieser Arbeit betrachteten Synthasen sind kurzkettenige *E*-Prenyldiphosphatsynthasen, deren charakteristisches Merkmal die geringe Anzahl der C₅-Isopren-einheiten des Endprodukts und der *trans*-Form der gebildeten Doppelbindung ist. Zudem zeichnet sich diese IDS in Bezug auf die enzymatische Aktivität durch die Notwendigkeit der Gegenwart von zweiwertigen Metallionen und der Dimerisierung aus [6].

Der katalytische Mechanismus basiert auf der Alkylierung des allylischen Substrats DMADP und des Homoallyls IDP, was zu einer C₁-C₄-Verknüpfung zwischen beiden Reaktionspartnern führt. Dabei erfolgt die Ionisierung des DMADP durch zweiwertige Metallionen und der Abspaltung des Diphosphatrestes. Das resultierende Carbokation greift elektrophil an das C₄-Atom des IDP an, woraus GDP hervorgeht. Durch eine Verlängerung von GDP, welches als allylisches Substrat an ein weiteres IDP-Molekül angreift, resultiert FDP [6].

Die Koordinierung der Substrate erfolgt über zweiwertige Metallionen mit Aspartatreichen Regionen des Enzyms, welche die Bezeichnungen FARM- (*first aspartate rich motif*) und SARM (*second aspartate rich motif*) tragen [6, 9]. Vergleiche der Aminosäuresequenzen zeigen, dass diese Motive in verschiedenen IDS konserviert sind und dem Aminosäuremuster DDxxD (D: Asparaginsäure; x: beliebige Aminosäure) entsprechen [6].

Jüngste Forschungsergebnisse über die *PcIDS1* besagen zudem, dass in Abhängigkeit der Metallionen die Elongation beeinflusst werden kann. Die *PcIDS1* stellt in Gegenwart von Co²⁺ und Mn²⁺ vorwiegend GDP her, während mit Mg²⁺ überwiegend FDP produziert wird [10]. Über diesen Regulationsmechanismus ist der Meerrettichblattkäfer in der Lage die Bereitstellung von GDP- als auch FDP mit einem Enzym zu gewährleisten.

Auch über die Konzentration des Substrats konnte in vergangenen Forschungsarbeiten dargestellt werden, dass eine heterolog exprimierte IDS der Blattlaus *M. persicae* beide Terpenorstufen synthetisieren kann [11]. Über eine Erhöhung der Konzentration des allylischen Substrats DMADP konnte dabei eine verstärkte Synthese von GDP festgestellt werden, während die Verwendung von GDP als einziges allylisches Substrat die Synthese von FDP hervorrief.

1.3 Rolle der Terpene in ausgewählten Insekten

Im Sekundärmetabolismus der Insekten haben vor allem Mono- und Sesquiterpene eine besondere Bedeutung. Während Monoterpene in Abhängigkeit von der Insektenart zur Synthese verschiedener Abwehrstoffe oder Pheromone genutzt werden können, stellt FDP die Vorstufe der Juvenilhormone dar, welche in allen Insekten vorkommen und vor allem die Embryonalentwicklung als auch die Metamorphose bzw. Parthenogenese regulieren [12, 13].

An der Synthese der Terpenvorstufen sind vor allem IDS beteiligt, deren kofaktor-abhängigen Produktspezifität in dieser Arbeit betrachtet werden. Zu diesem Zweck werden zur Untersuchung der Verbreitung dieses Regulationsmechanismus mehrere Insekten verschiedener Spezien betrachtet, in deren Sekundärmetabolismus die Synthese von Mono- oder Sesquiterpenen beschrieben und die mögliche Bedeutung für den Organismus bekannt ist.

Vor diesem Hintergrund wird nachfolgend die Familie der Blattkäfer (Coleoptera: Chrysomelidae) untersucht, dessen Vertreter der Meerrettichblattkäfer *Phaedon cochleariae* im Larvenstadium Monoterpene als Abwehrstoff verwendet und in einem Sekret absondert [14].

In den Familien der Bockkäfer (Coleoptera: Cerambycidae) und des Borkenkäfers (Coleoptera: Curculionidae) hingegen werden Monoterpene als Pheromone zur intraspezifischen Kommunikation verwendet, welche der massenhaften Besiedlung von Bäumen sowie der Lokalisierung von sexuellen Fortpflanzungspartnern dienen [15].

Außerdem wird der Reismehlkäfer *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) und die parasitische Wespe *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) betrachtet, welche Sesquiterpene zur Synthese von Juvenilhormonen benötigen [13]. Im Sekundärmetabolismus der Familie der Blattläuse (Hemiptera: Aphididae) haben Mono- und Sesquiterpene wiederum eine wichtige Rolle als Alarmpheromone sowie als sexuelles Kommunikationsmittel [16].

Abschließend wird der Schmetterling *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) betrachtet, welcher drei IDS besitzt, die an der Synthese der Juvenilhormone beteiligt sind [13, 17].

1.3.1 Chrysomelidae

Die meisten Blattkäfer sind ökologische Spezialisten, deren Existenzgrundlage auf einer koevolutionären Anpassung an ihre Wirtspflanze basiert. Wie viele andere spezialisierte Herbivoren besitzen sie die Fähigkeit, toxische Sekundärmetaboliten der Pflanze selektiv oder unselektiv aufzunehmen und zur eigenen Abwehr zu nutzen [18]. Der Pappelblattkäfer *Chrysomela populi* sequestriert selektiv Phenolglucoside wie Salicin oder Salicortin und oxidiert diese nach Abspaltung des Zuckerrestes über eine β -Glucosidase zum Abwehrstoff Salicylaldehyd [19, 20].

Eine unselektive Sequestrierung verfolgt hingegen *Chrysomela lapponica*, welcher ein breites Spektrum an Pflanzenglucosiden wie 2-Phenylethanol oder (3Z)-Hexenol aufnimmt [21]. Nach der Abspaltung des Zuckermoleküls wird das freie Aglycon mit Aminosäurederivaten verestert, woraus Carboxysäuren wie Isobutansäure und 2-Methylbutansäure entstehen [18, 22].

Die ursprüngliche Form der Bildung von Abwehrstoffen innerhalb der Chrysomelidae stellt allerdings die *de novo*-Synthese von Iridoiden dar. Sie ist abhängig von GDP und dient der Larve des Meerrettichblattkäfers *Phaedon cochleariae* zur Herstellung des pentazyklischen Monoterpens Chrysomelidial, welches bei Gefahr abgesondert wird [14, 23]. Die Synthese der Terpenvorstufen findet im Fettkörper der Larve statt, wo GDP produziert und nach Abspaltung des Phosphatrestes Geraniol gebildet wird. Dieses wird anschließend zu 8-Hydroxygeraniol oxidiert und zum 8-Hydroxygeraniol-8-O- β -D-Glucosid modifiziert [24]. Nach dem Transport über die Hemolympe in die Drüsenzellen erfolgt die Abspaltung des Zuckerrestes und die Oxidation über eine Sauerstoff abhängige Oxidase zu 8-Oxocitral [25]. Aus dem Aldehyd resultiert nachfolgend das pentazyklische Chrysomelidial [26]. Die Defensivstoffe werden bei den Larven in mehreren dorsalen Reservoirs gespeichert, wobei diese bei Gefahr über 9 Drüsenpaare auf dem Thorax und dem Abdomen der Käferlarve nach außen gestülpt werden [27].



Abbildung 2: Larve des Meerrettichblattkäfers *P. cochleariae* [10].

1.3.2 Cerambycidae

Der Bockkäfer *Tetropium fuscum* ist ein invasiver Baumschädling, welcher erstmals im Südosten Kanadas entdeckt wurde [28]. Ähnlich den Borkenkäfern sind die Weibchen der Bockkäfer die Erstbesiedler der Wirtspflanze, wobei sie zum Einen über pflanzliche Metaboliten wie α -Pinen bzw. β -Phellandrene und zum Anderen über Pheromone des Borkenkäfers Ipsdienol, Ipsenol sowie Verbenon angelockt werden [15]. Die massenhafte Aggregation des Baumes wird bei dieser Spezies vor allem über 3R-Hydroxyketone und 2R,3R-(2,3)-Hexandiole sowie Fuscumol vermittelt [29].

Über die Biosynthese von terpenoiden Strukturen in diesen Käfers ist noch wenig bekannt. Aktuelle Untersuchungen zeigen lediglich, dass die Synthese des Aggregationshormone Fuscumol aus Geranylaceton und Farnesol erfolgt, wobei der Mechanismus noch unklar ist [30].

Die sexuelle Fortpflanzung wird in der Familie sowohl über Isoleucinderivate als auch über oxidierte Monoterpene reguliert. Beispielsweise geht das Sexpheromon des Bockkäfers *Migdolus fryanus* aus Isoleucinderivaten hervor, wohingegen der sexuelle Lockstoff Versperal (10-Oxoisopiperitenon) von *Vesperus xatarti* aus der Oxidation von Monoterpenen entsteht. [31, 32].

1.3.3 Tenebrionidae

Der Schwarzkäfer *Tribolium castaneum* ist überall dort zu finden, wo Getreide oder getrocknete Lebensmittel gelagert werden. Seine geringe Generationszeit und die geringe Genomgröße machen ihn zu einem idealen Modellobjekt zur Erforschung der Insektenentwicklung und Insektizitresistenz [33]. Die IDS des Käfers dient vor allem zur Vorstufensynthese der Juvenilhormone [13].

1.3.4 Curculionidae

Die Familie des Borkenkäfers *Dendroctonus ponderosae* gehört zu den größten Schädlingen nordamerikanischer Koniferenwälder [34]. Um die chemische Abwehr der Wirtspflanze zu schwächen, wird diese massenhaft befallen [35]. Dabei initiieren die Weibchen den Angriff, indem sie den Botenstoff *trans*-Verbenol freisetzen und auf diese Weise die Attraktivität für weitere Mitglieder dieser Insektenspezies erhöhen [36].

Dieser Stoff wird zum Einen aus dem Abwehrstoff α -Pinen des Baumes durch Hydroxylierung zum bicyklisches Monoterpen *trans*-Verbenol umgesetzt und zum anderen de-novo synthetisiert [37, 38]. Nach der Ankunft männlichen Käfer emittieren diese über die Epoxidierung und Zyklisierung der 6-(Z)-Nonen-2-on-Fettsäure das Aggregationspheromon *exo*-Brevicomin, welches in geringe Mengen emittiert wird und weitere Weibchen anlockt [39]. Sobald die Populationsdichte zu hoch ist, wird die Besiedlung durch die Emission von hohen Mengen *exo*-Brevicomin und Frontalin aufgehalten. Diese Kombination signalisiert die Übervölkerung des Baumes und führt zur Besiedlung benachbarter Bäume [36]. Das Anti-Aggregationspheromon Frontalin ist ein bicyklisches Acetal, das über den Mevalonatweg hergestellt wird. Die genaue Synthese ist noch ungeklärt, aber es wird davon ausgegangen, dass entweder GDP oder FDP gespalten und zur Vorstufe 6-Methylhept-6-en-2-on isomerisiert werden kann [38, 40].

1.3.5 Pteromalidae

Ein Vertreter der Hautflügler ist die parasitische Wespe *Nasonia vitripennis*. Charakteristisch für die Lebensweise dieser Spezies ist die Ablage der Eier in die Puppen verschiedener Fliegen [41]. Zur Regulation der morphologischen Entwicklung ist eine IDS an der Bildung des Juvenilhormons beteiligt [13].

1.3.6 Aphididea

Die intraspezifische Informationsübermittlung erfolgt bei Insekten hauptsächlich über die Transmission von Botenstoffen [42]. Durch ihr geringes Molekulargewicht und einer einfachen räumlichen Struktur dienen sie der schnellen Signalisierung von Gefahren und dem Anlocken von Sexualpartnern [16, 43].

Bei Gefahren emittieren die Blattläuse über dorsal gelegene paarige Drüsen das Alarmpheromon E- β -Farnesen (EBF) [42]. Dieses Molekül ist ein FDP-Derivat und wurde bisher vor allem bei *Acyrtosiphon pisum*, *Megoura viciae* und *Myzus persicae* festgestellt, wobei EBF in *M. viciae* durch die Monoterpenderivate α -Pinen und β -Limonen ergänzt wird [16, 44].

Neben dieser Funktion dienen Monoterpene bei den Blattläusen auch zum Auffinden sexueller Fortpflanzungspartner. Zur Einleitung der Paarung werden aus glandulären Zellen der Hinterbeine die Sexpheromone (+)-(4aS, 7S, 7aR)-Nepetalacton und (-)-(1R, 4aS, 7S, 7aR)-Nepetalactol freigesetzt [16, 45].

1.3.7 Bombycidae

Zum umfassenden Vergleich der IDS in Insekten wurde auch die Ordnung der Schmetterlinge einbezogen. Ein Vertreter ist der Seidenspinner *Bombyx mori*. Dieser besitzt drei IDS, welche in verschiedenen Organen unterschiedlich stark exprimiert werden, allerdings nicht näher charakterisiert sind [17]. Obwohl *B. mori* drei IDS besitzt, gibt es keine Hinweise darauf, dass die Synthasen neben der Herstellung von Juvenilhormonen an weiteren isoprenoiden Molekülen in diesem Organismus beteiligt sind [13].

1.4 Zielstellung

In Anbetracht der Notwendigkeit von Monoterpenen im Sekundärmetabolismus des Borkenkäfers *D. ponderosae*, des Bockkäfers *T. fuscum* und der Blattläuse *A. pisum*, *M. persicae* sowie *M. viciae* wird in dieser Arbeit die Verbreitung der kofaktorabhängigen Produktspezifität, wie sie in *P. cochleariae* vorkommt, in diesen Spezien untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Transkripte der IDS aus den unterschiedlichen Insekten isoliert, kloniert und heterolog in *E. coli*-Zellen exprimiert. Abschließend wurde die Enzymaktivität in Bezug auf die Produkte unter dem Einfluss verschiedener Kofaktoren analysiert.

2 Material

2.1 Chemikalien

Acetonitril	HiPerSolv CHROMANORM [®] , VWR International GmbH
Agarose Broad Range	Roti [®] garose, Carl Roth GmbH & Co. KG
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Coomassie brilliant blue	R 250, Carl Roth GmbH & Co. KG
ddH ₂ O	destilliert und mikrofiltriert
Essigsäure	ROTIPURAN [®] , 100 %, Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethanol	EMSURE [®] 99%, vergällt, Merck KGaA
Ethidiumbromid- lösung 1% (v/v)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycerin	ROTIPURAN [®] , Carl Roth GmbH & Co. KG
Imidazol	PUFFERAN [®] , ≥ 99 %, Carl Roth GmbH & Co. KG
Methanol	HiPerSolv CHROMANORM [®] , VWR International GmbH
MgCl ₂	wasserfrei, ≥ 98 %, Sigma-Aldrich Co. LLC.
MOPSO-Natriumsalz	PUFFERAN [®] , ≥ 98 %, Carl Roth GmbH & Co. KG
NaCl	≥ 99,5 % p.a. ACS, ISO, Carl Roth GmbH & Co. KG
Nickel-NTA-Agarose	Qiagen N.V.
SDS	≥ 99 %, Sigma-Aldrich Co. LLC.
TRIS	PUFFERAN [®] , Carl Roth GmbH & Co. KG

2.2 Lösungen und Puffer

2.2.1 Lösungen zur Isolation des Proteins

Waschpuffer I	25 mM MOPSO, 10% Glycerol, 10 mM Imidazol
Waschpuffer II	25 mM MOPSO, 10% Glycerol, 25 mM Imidazol
Waschpuffer III	25 mM MOPSO, 10% Glycerol, 50 mM Imidazol
Waschpuffer IV	25 mM MOPSO, 10% Glycerol, 100 mM Imidazol
Elutionspuffer	25 mM MOPSO, 10% Glycerol, 250 mM Imidazol

2.2.2 Lösungen und Puffer zur Durchführung des Enzymaktivitätstest

	Molaritäten für 200 µl Reaktionsansätze
Enzymassaypuffer	25 mM MOPSO, 10% Glycerol, 100 mM NaCl
DMADP-Lösung	50 µM DMADP, Sigma-Aldrich Co. LLC.
IDP-Lösung	50 µM IDP, Sigma-Aldrich Co. LLC.
CoCl ₂	1 mM und 10 mM
MgCl ₂	1 mM und 10 mM

2.3 Kommerzielle Kits

RNA-Isolation	RNAqueous [®] , Life Technologies GmbH
Reverse Transkription	Invitrogen SuperScript [®] III Reverse Transcriptase, Life Technologies GmbH
Plasmidisolation	Invisorb [®] Spin Plasmid Mini <i>Two</i> , Invitex GmbH
Sequenzierung	BigDye [®] Direct Cycle Sequencing Kit, Life Technologies GmbH
Autoinduktion	Overnight Express [™] Autoinduction Systems 1, Merck KGaA

2.4 Vektor, Enzyme und Nukleotide

pET100/D-Topo [®] -Vektor	
Q5 [®] Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	Life Technologies GmbH
GoTaq [®] -Polymerase	Promega GmbH
Desoxynukleotidtriphosphate	2,5 mM ATP, 2,5 mM GTP, 2,5 mM CTP, 2,5 mM TTP

2.5 Bakterienstämme

Transformationszellen	One Shot [®] TOP10 chemisch-kompetente <i>E. coli</i> -Zellen, Life Technologies GmbH
Expressionszellen	BL21 Star [™] (DE3) One Shot [®] chemisch- kompetente <i>E. coli</i> -Zellen, Life Techno- logies GmbH

2.6 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden autoklaviert und nach Abkühlung auf etwa 55 °C mit 0,1% Carbenicillin versetzt.

SOC	2% Trypton, 0.5% Pilzextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ und 20 mM Glucose, Life Technologies GmbH, Darmstadt
LB-Flüssigmedium	10 g/l Bacto-Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
LB-Agarplatte	10 g/l Bacto-Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar

2.7 Molekulargewichtsstandards

DNA-Molekulargewichtstandard	1kb-DNA-Extension-Molekulargewichtstandard, Life Technologies GmbH
Protein-Molekulargewichtstandard	PageRuler Prestained Protein Ladder mit 10 gefärbten Proteinen definierter Molekulargewichte von 10 kDa bis 170 kDa, Thermo Fisher Scientific Inc.

2.8 Materialien

Disposable PD-10 Desalting Columns	GE Healthcare UK Limited
Glasperlen	0,25-0,50 mm, Carl Roth GmbH Co. KG
Parafilm	Carl Roth GmbH & Co. KG
Reaktionsgefäße	1.5 ml und 2,0 ml, Eppendorf AG
Separationssäule	ZORBAX Eclipse XDB-C-18 (1,8 µm, 50 mm x 4,6 mm), Agilent Technologies
Zentrifugationsröhrchen	15 ml und 50 ml, Eppendorf AG

2.9 Geräte

Blotter	Bio-RAD PowerPac™ HC
Elektrophoresekammer Agarosegel	i-MUPID-J Cosmo BIO Co. LTD
Elektrophoresekammer Polyacrylamidgel	Bio-RAD Mini-PROTEAN® Tetra System
Geldokumentationssystem	Gene Genious, Merck Eurolab
HPLC	Agilent 1260, Agilent Technologies
Inkubationsschüttelschrank	Centomat BS-1, B. Braun Biotech International
Massenspektrometer	API 5000 mit Triple-Quadropol, AB Sciex Instruments
pH-Messgerät	pH526 MultiCal®
Präzisionswaage	METTLER TOLED
Spektrophotometer	NanoDrop 2000c, ThermoScientific
Standzentrifuge	Avanti™-J-20 XP mit Rotro JA-25.50, Beckmann-Coulter™
Thermocycler	Biometra T-Personal Combie
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417R
Ultraschall-Homogenisator	Sonoplus HD-2070, Bandelin
Vortexer	Vortex Genie2, Scientific Industries
Wasserbad	Typ 1002, GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH

3 Methoden

3.1 Bioinformatische Auswertung

Zur Ermittlung homologer Isoprenyldiphosphat-Synthasen wurde die Nukleotidsequenz der *PcIDS1* mit publizierten Nukleotidsequenzen der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) sowie unpublizierten Sequenzen des Max-Planck-Instituts für chemische Ökologie Jena verglichen. Zur Ermittlung von mitochondrialen Signalsequenzen erfolgte weiterhin eine Analyse der Sequenzen mithilfe der Onlineanwendungen SignalP und TargetP des ExPASy-Portals des Schweizer Instituts für Bioinformatik.

3.2 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA erfolgte mit Hilfe des kommerziell erhältlichen RNAqueous[®] Kit, wobei die Durchführung nach dem Protokoll „Animal or Plant Tissue Sample Lysate Preparation“ des Herstellers erfolgte. Zur Isolation der Transkripte wurden mit Ausnahme der Blattkäfer adulte Käfer verwendet. Die Käfer wurden vollständig genutzt, wobei der Bockkäfer *T. fuscum* und der Schmetterling *B. mori* in Kopf-, Thorax- und Abdomenregion unterteilt wurde. Die Gewebe wurden mechanisch mit einer Mikropistille im Reaktionsgefäß zerkleinert.

3.3 Reverse Transkription

Zur Herstellung von cDNA wurde die isolierte RNA mit dem kommerziellen SuperScript[™] III Reverse Transcriptase Kit transkribiert. Die Durchführung der Synthese erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.4 Klonierung

Die cDNA des jeweiligen Insekts wurde mittels Q5[®] Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase unter Verwendung genspezifischer Primer (siehe Anhang) über eine PCR vervielfältigt und das amplifizierte Produkt zur Dokumentation gemeinsam mit einem 1kb-DNA-Molekulargewichtstandard in einem 1,2%igem Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Anschließend wurde der Gelbereich, welcher das PCR-Produkt enthält, ausgeschnitten und bei 16.000 g für 8 Minuten zentrifugiert. Das PCR-Produkt konnte auf diese Weise vom Agarosegel als Überstand separiert werden.

Die Klonierung erfolgte, indem der Überstand abgenommen und mit dem kommerziellen pET100/D-Topo[®]-Expressionsvektors nach den Angaben des Herstellers inkubiert wurde. Durch die Vektorligation wird außerdem eine Polyhistidinregion am 5'-Ende der Nukleotidsequenz angefügt, welcher dazu führt, dass der Aminosäuresequenz eine Oligohistidinanker am N-Terminus angefügt wird. Auf diese Weise wird die Isolierung und Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins erleichtert, indem die Oligohistidine an Agarose gebundene Nickelionen binden, bis sie durch einen Imidazol haltigen Puffer eluiert werden.

3.5 Transformation des Expressionsvektors

Zur Transformation des Klonierungsansatz wurde dieser in chemisch-kompetenten One Shot[®] TOP10 *E. coli*-Zellen nach den Vorgaben des Herstellers transformiert, woraufhin die Zellen auf Carbenicillin-haltiges LB-Medium ausplattiert wurden.

Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C wurden die positiven Transformanten in einem PCR-Reaktionsansatz lysiert und die Klonierungsregion unter Verwendung von T7-Promotor- und Terminationsprimer sowie unter Verwendung einer GoTaq[®]-Polymerase amplifiziert. Abschließend erfolgte gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte in einem 1,2%igem Agarosegel. Kolonien, welche aufgrund des gelelektrophoretischen Nachweises die Insertion der Nukleotidsequenz in den Vektor aufwiesen, wurden in 2 ml LB-Flüssigmedium überführt und über Nacht in einem Inkubationsschüttler bei 37 °C und 220 U/min inkubiert.

3.6 Plasmidisolierung und Sequenzierung

Nachdem eine Kultivierung der positiven Zellen im LB-Flüssigmedium über Nacht erfolgte, wurde die Plasmid-DNA der Klone mit dem kommerziell erhältlichen Präparationsset Invisorb® Spin Plasmid Mini *Two* nach den Angaben des Herstellers isoliert. Zur Überprüfung der in das Plasmid transformierten Sequenz auf Mutationen erfolgte die Sequenzierung der Klonierungsregion des Plasmids mit Hilfe des kommerziell erhältlichen BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit in einer PCR, wobei T7-Promotor- und Terminationsprimer zum Einsatz kamen. Die digital erfasste Sequenz wurde abschließend in der Software SeqMan von DNASTar ausgewertet.

3.7 Heterologe Expression des Fusionsproteins

Zur Expression des Proteins wurden die Plasmide in chemisch-kompetente BL21 Star™ (DE3) One Shot® *E. coli*-Zellen transformiert und über 48 h in einem Inkubationsschüttler bei 18 °C und 220 U/min inkubiert. Danach erfolgte die Induktion der Expressionszellen durch Zugabe des kommerziell erhältlichen Overnight Express™ Autoinduction System 1 und Inkubation in einem Schüttler bei 18 °C und 220 U/min über einen Zeitraum von 24 h. Diese *E. coli*-Zellen des DE3-Stammes beinhalten ein Gen, welches die T7-RNA-Polymerase codiert und unter Kontrolle des *lacUV5* Promotors steht. Durch Zugabe von IPTG wird die Expression der T7-RNA-Polymerase aktiviert, welche anschließend an den T7-Promotor des pET100/D-Topo®-Expressionsvektors bindet und die dahinter liegende heterologe Sequenz transkribiert.

3.8 Proteinextraktion

Nachdem die *E. coli*-Expressionszellen das heterologe Protein exprimiert haben, wurden die Zellen lysiert und das Protein isoliert. Dies erfolgte, indem die vollständige Flüssigkultur auf 50 ml Falconröhrchen aufgeteilt und für 20 min bei 2300 g zentrifugiert wurde. Nach Entfernung des Überstands wurden die sedimentierten Zellen in je 1 ml Waschwasser I resuspendiert. Daraufhin erfolgte die Vereinigung der aufgeteilten Zellsuspensionen in einem 15 ml Falconröhrchen und die Sonifizierung im Ultraschall-Homogenisator über einen Zeitraum von 4 min bei 60% und einem 2fachen Puls. Die auf diese Weise lysierten Zellen konnten

daraufhin auf 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und erneut für 20 min bei 4 °C und 17000 g zentrifugiert werden. Der resultierende Überstand wurde schließlich auf eine Qiagen-Säule aufgetragen. Diese beinhaltet 1,5 ml Ni-NTA-Agarose, welche mit 5 ml Waschpuffer I gewaschen wurde. Die Säulen wurden nachfolgend bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler über einen Zeitraum von 30 min inkubiert, nacheinander mit jeweils 5 ml des Waschpuffers II, III und IV gespült und abschließend mit dem Elutionspuffer versetzt.

Zur Entfernung des Imidazols erfolgte danach ein Pufferaustausch mit Hilfe der kommerziell erhältlichen PD-10 Gelfiltrationssäule nach dem Protokoll des Herstellers. Zur Eluierung der aufgetragenen Proteinlösung kam der Enzymassypuffer zur Verwendung, welcher 100 mM NaCl enthält.

Abschließend wurde Proteinkonzentration spektrophotometrisch über die Messung der Extinktion bei 280 nm am NanoDrop ermittelt.

3.9 Enzymaktivitätsnachweis

Zum Nachweis der Katalyseaktivität und der Syntheseprodukte der isolierten Proteine wurde ein Volumen des umgepufferten Proteineluates mit einer Proteinkonzentration von 2 bzw. 2,5 µg/ml und 10 µg/ml mit den Substraten IDP, DMADP (jeweils 50 µM) sowie einer CoCl₂- oder MgCl₂-Metallionenlösung als Kofaktor versetzt. Es wurden mehrere Reaktionsansätze hergestellt, welche auf eine Endkonzentration von 1 mM CoCl₂, 10 mM CoCl₂, 1 mM MgCl₂ oder 10 mM MgCl₂ eingestellt wurden. Abschließend wurden die Reaktionsansätze bei 30 °C über einen Zeitraum von 60 min inkubiert.

3.10 Chromatographische Vermessung

Die Analyse der Prenyldiphosphate wurde an einer Agilent 1260 HPLC (Agilent Technologies) durchgeführt, welche mit einem API 5000 Triple-Quadropol-Massenspektrometer (AB Sciex Instruments) gekoppelt war. Zur chromatographischen Trennung wurde eine ZORBAX Extended C-18 Säule (1,8 µm, 50 mm x 4,6 mm; Agilent Technologies) eingesetzt. Die mobile Phase beinhaltet 5 mM Ammoniumbicarbonat in Wasser als Lösungsmittel A und Acetonitril als Lösungsmittel B. Die Durchflussrate betrug 1,2 ml/min und die Trennsäule wurde auf 20 °C temperiert. Die Separation der Produkte erfolgte über einen Gradienten, welcher bei 0% mit dem

Lösungsmittel B startete und über einen Zeitraum von 3 min auf 90% anstieg. Nach 3,1 min erreichte der Gradient 100%, welcher über einen Zeitraum von 1 min gehalten wurde. Vor der nächsten Injektion sank der Gradient mit dem Lösungsmittel B in 0,5 min auf 0% und verblieb für 2,5 min auf dem Niveau. Das Injektionsvolumen der Proben sowie des Standards (GDP und FDP) betrug 1 μ l. Weiterhin betrug die Temperatur des Autosamplers 4 °C.

Die massenspektrometrische Untersuchung der Proben erfolgte über eine negative Elektronenspray Ionisation (EI), wobei eine Spannung von -4200 V anlag. Die Ionisationsgase 1 und 2 wurden auf einen Druck von 60 and 70 psi bei einer Temperatur von 700 °C eingestellt. Das Trocknungsgas besaß einen Druck von 30 psi und das Kollisionsgas hatte einen Druck von 7 psi. Bei allen Gasen handelte es sich um Stickstoff. Ein multiple reaction monitoring (MRM) diente der Analyse der Ionisationsprodukte: m/z 312,9/79 für GDP und m/z 380,9/79 für (E/E)-FDP. *Cisoid*e Produkte wie Neryldiphosphat, (Z,E)-FDP oder (Z,Z)-FDP wurden nicht festgestellt. Abschließend erfolgte die Datenanalyse mit Hilfe der Analyst Software 1.6 Build 3773 (AB Sciex).

4 Auswertung

4.1 Vergleich der Aminosäuresequenzen

Die Nukleotidsequenz der *PcIDS1* wurde mit Sequenzen der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) sowie unpublizierten Sequenzen, welche am Max-Planck-Instituts für chemische Ökologie Jena ermittelt wurden, verglichen [10]. Die Sequenzen wurden in Aminosäuresequenzen umgewandelt und mit Hilfe der ClustalW-Methode über ein multiples Alignment (Gap Penalty: 15; Gap Length Penalty: 6,66; Delay Divergent Seqs: 30%; DNA Transition Weight: 0,5) auf Unterschiede verglichen. Zur Visualisierung des Übereinstimmungsgrades der Aminosäuresequenzen wurde ein Baum erstellt (Abbildung 3).

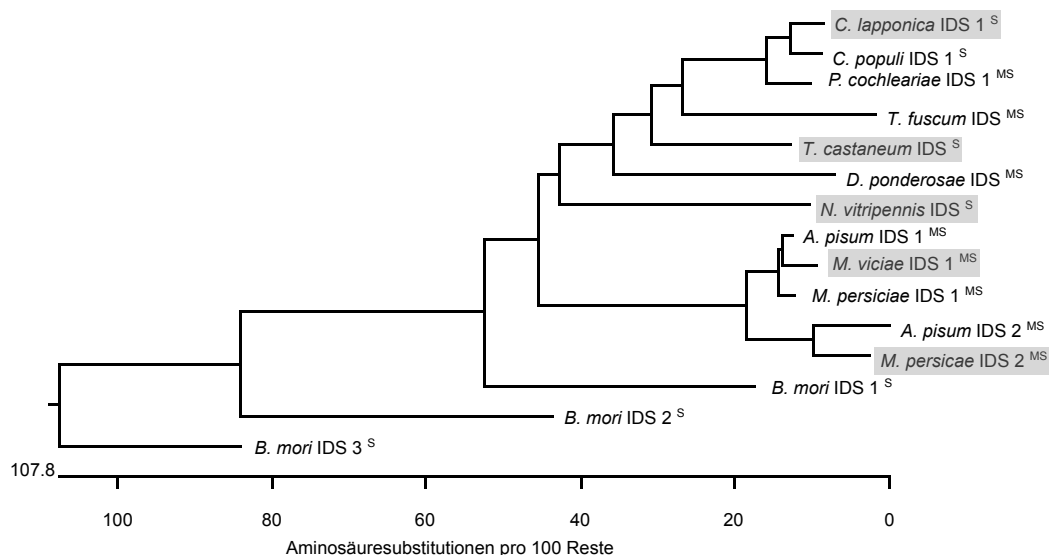


Abbildung 3: Darstellung der Ähnlichkeit verschiedener IDS-Aminosäuresequenzen in Form eines Baumes. Die in dieser Arbeit untersuchten IDS sind grau hinterlegt. Das Vorkommen von Mono- und Sesquiterpenen im Sekundärmetabolismus ist über hochgestellte Initialen gekennzeichnet: ^M Monoterpen, ^S Sesquiterpen; NCBI-Datenbankzugangsnummern der jeweiligen IDS im Anhang.

Der Baum verdeutlicht den engen Verwandtschaftsgrad der Blattkäfer, welche in Bezug auf ihre jeweiligen IDS eine hohe Sequenzidentität besitzen. Die *PcIDS1* stimmt zu etwa 88% mit den homologen IDS aus *C. lapponica* und *C. populi* überein.

Auch bei den Blattläusen *M. viciae*, *A. pisum* und *M. persicae* sind die einzelnen IDS untereinander sehr ähnlich. Während die IDS aus *M. viciae* zu etwa 95% mit der jeweiligen IDS 1 aus *A. pisum* und *M. persicae* übereinstimmt, haben die Aminosäuresequenzen der IDS 2 aus *A. pisum* und *M. persicae* einen Deckungsgrad von 85%. Allerdings ist auch eine hohe Sequenzverschiedenheit zu den Blattkäfern erkennbar. Die Sequenzen weisen nur eine Identität von etwa 50% auf.

Eine nähere Verwandtschaft zu den Blattkäfern stellt hingegen *T. fuscum* dar. Obwohl dieser der Spezies der Bockkäfer angehört, entspricht die Sequenz seiner IDS zu 69% der *PcIDS1*.

Ähnliche Unterschiede weisen sowohl die IDS von *T. castaneum*, von *D. ponderosae* als auch von *N. vitripennis* zu den Synthesen der Blattkäfer auf. Während 68% der IDS-Sequenz aus *T. castaneum* und 62% der IDS aus *D. ponderosae* mit der *PcIDS1* übereinstimmen, beträgt der Deckungsgrad der homologen IDS aus *N. vitripennis* nur 55% zur Synthese des Meerrettichblattkäfers.

Mit einer geringen Übereinstimmung der Nukleotidsequenzen von 50%, 42% und 40% stellen die drei IDS aus *B. mori* die entfernteste Verwandtschaft zu den Blattkäfern dar. Im Gegensatz zu diesen besitzen die Synthesen zudem untereinander mit einer Übereinstimmung von etwa 40% nur geringe Ähnlichkeiten.

Vor diesem Hintergrund ist anzunehmen, dass die Eigenschaft der kofaktorabhängigen Produktspezifität auch in den IDS der verwandten Blattkäfer vorkommt. Aufgrund des hohen Grades der Sequenzübereinstimmung zwischen den einzelnen IDS der Blattkäfer kann diese Charakteristik auch in den IDS von *C. lapponica* und *C. populi* konserviert sein, obwohl im Sekundärmetabolismus dieser Käfer selbst keine Monoterpene synthetisiert werden.

4.2 Klonierung

Die aus revers transkribierter RNA hervorgegangenen IDS-Nukleotidsequenzen der einzelnen Insekten wurden mit Ausnahme der IDS aus *D. ponderosae*, der IDS 1 aus *C. populi* und der IDS 1 aus *M. persicae* über eine Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von spezifischen Primern (siehe Anhang) in verschiedenen Fragmentgrößen vervielfältigt. Da bisherige Charakterisierungen zu den IDS der Blattkäfer *M. viciae* sowie *M. persicae* zeigen, dass die mitochondriale Signalsequenz mit dem RxxS-Motiv einen negativen Einfluss auf die katalytische Aktivität der Enzyme haben, wurden die IDS des Blattkäfers *C. lapponica* ohne diese Sequenz hergestellt [11]. Zu den IDS des Reismehlkäfers *T. castaneum* und der parasitischen Wespe *N. vitripennis* sind hingegen noch keine Charakterisierungen veröffentlicht, weshalb diese sowohl mit als auch ohne Translokationssequenz amplifiziert wurden. Die PCR-Produkte wurden danach in einen Expressionsvektor kloniert, wodurch eine N-terminale Verknüpfung mit einer Histidinanker-codierenden Sequenz erfolgte. Während die IDS 1 aus *C. populi* und die IDS 1 aus *M. persicae* aus zeitlichen Gründen nicht amplifiziert wurden, konnte die IDS aus *D. ponderosae* aufgrund des komplizierten Beschaffungsprozesses und des somit verspäteten Imports aus Kanada nicht mehr rechtzeitig bearbeitet werden (Tabelle 1).

Spezies	Klonierung	Sequenzierung	Expression	Isolation	Enzymaktivität v.U.	Enzymaktivität n.U.
<i>C. lapponica</i> IDS 1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>C. populi</i> IDS 1						
<i>T. fuscum</i> IDS	✓	✓	✓	✓		
<i>T. castaneum</i> IDS	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>D. ponderosae</i> IDS						
<i>N. vitripennis</i> IDS	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>A. pisum</i> IDS 1	✓	✓	✓	✓	✓	
<i>M. viciae</i> IDS 1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>M. persicae</i> IDS 1						
<i>A. pisum</i> IDS 2	✓	✓	✓	✓	✓	
<i>M. persicae</i> IDS 2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>B. mori</i> IDS 1	✓	✓	✓	✓		
<i>B. mori</i> IDS 2	✓	✓	✓	✓		
<i>B. mori</i> IDS 3	✓	✓	✓	✓		

Tabelle 1: Untersuchungsstand am Ende der praktischen Forschungsarbeit. Enzymaktivität v.U.: vor Umpufferung; Enzymaktivität n.U.: nach Umpufferung.

Beispielhaft für die Amplifikation wird hier die gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes der Isoprenyldiphosphat-Synthase aus *M. viciae* dargestellt. Die Auftrennung im 1,2%igem Agarosegel zeigt eine molekulare Größe von etwa 1100 bp (Abbildung 4).

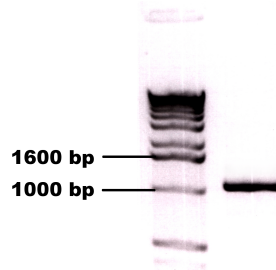


Abbildung 4: Elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes der Isoprenyldiphosphatsynthase aus *M. viciae* im 1,2%igem Agarosegel. 1 1kb-DNA-Extension-Molekulargewichtstandard von Life Technologies GmbH; 2 PCR-Produkt.

Die klonierten PCR-Produkte wurden nachfolgend und in chemisch-kompetente TOP10 *E. coli*-Zellen transformiert. Das Plasmid der gewachsenen Klone wurde zur Überprüfung auf korrekte Insertion und Mutationen isoliert und sequenziert, woraufhin eine Transformation der korrekten Plasmide in DE3 *E. coli*-Expressionszellen erfolgte.

4.3 Rekombinante Herstellung der Enzyme

Nachdem die induzierten Zellen das rekombinante Protein exprimierten, wurden diese lysiert und das Protein mittels Affinitätschromatographie über Nickelagarose gebunden. Die Reinigung und Eluierung erfolgte mit aufsteigender Imidazolkonzentration.

Zur Überprüfung der Reinigung und Isolation des Fusionsproteins wurde von jedem Waschschrift eine Fraktion mit einem Volumen von 0,5 ml aufgefangen und gemeinsam mit dem Eluat sowie dem resuspendiertem Zellsediment mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Zur Betrachtung des Elutionsprofils wurden hier beispielhaft die Eluate der isolierten Isoprenyldiphosphat-Synthase von *M. viciae* in mehreren Fraktion mit einem jeweiligen Volumen von 0,5 ml gesammelt und zur Durchführung der SDS-Gelelektrophorese verwendet.

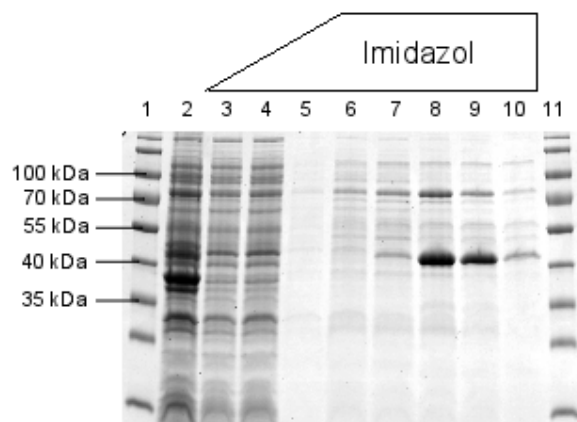


Abbildung 5: Elektrophoretische Trennung der mittels Nickelagarose isolierten Isoprenyldiphosphat-Synthase aus *M. viciae* in einem SDS-Polyacrylamidgel. Reinigung und Isolation erfolgte mit aufsteigender Imidazolkonzentration. P: Zellpellet, W: Waschfraktion, E: Eluat.

1 Protein Ladder; 2 P; 3 W₂₅ mM; 4 W₅₀ mM; 5 W₁₀₀ mM; 6 E₁; 7 E₂; 8 E₃; 9 E₄; 10 E₅; 11 Protein Ladder.

Die Auftrennung von *M. viciae* (Abbildung 5) zeigt das breite Spektrum an Proteinen des Zellsediments der *E. coli*-Zellen (P).

Die Reinigungsfraction, die aus der Zugabe des Waschpuffer I resultiert (W₂₅), stellt die unspezifisch gebundenen Komponenten dar, welche den Proteinen des Zellsediments ähneln. Auch nach Zugabe des Waschpuffer II sind die Verunreinigungen noch vorzufinden (W₅₀), wobei durch diese Zugabe eine annähernd vollständige Reinigung erfolgte, wie die Fraction bei Verwendung des Waschpuffer III veranschaulicht (W₁₀₀). Nach Zugabe des Elutionspuffers wird bei einem Elutionsvolumen von 1,0 ml ein Bande mit einer Größe von 45 kDa erkennbar wird, welche die rekombinant hergestellte IDS darstellt (E₂). Nach einem Volumen von 1,5 ml wird die höchste Menge des Fusionsproteins eluiert (E₃), weshalb die Banden in dem nachfolgenden Eluierungsvolumen zunehmend schwächer werden (E₄). Nach einem Volumen von 2,5 ml ist das Fusionsprotein vollständig von der Nickelagarose gelöst (E₅).

4.4 Enzymaktivitätstest

Nach der Isolation der Proteine wurde ein Imidazol-haltiges Eluat mit einem Volumen von 25 µl mit den Substraten DMADP und IDP in Gegenwart von den Metallionen auf Enzymaktivität getestet. Bis auf die verschiedenen IDS aus *B. mori* und *T. fuscum* zeigten die verbleibenden Fusionsproteine eine erkennbare Aktivität (Tabelle 1). Die enzymatische Aktivität der rekombinanten Proteine wurde ab einem Schwellenwert von 10000 ppm der Syntheseprodukte in der chromatographischen Vermessung vom Hintergrundrauschen durch IDS-Enzymaktivitäten der *E. coli*-Expressionszellen unterschieden.

Nach erfolgreicher Untersuchung wurde über die Entsalzungssäule PD-10 ein Pufferaustausch zur Entfernung des Imidazols vorgenommen und die Proteinkonzentration über die spektrophotometrische Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt. Anschließend erfolgte die dreimalige Durchführung der Enzymaktivitätstests eines Isolats, wobei verschiedene Proteinkonzentrationen bei einem Reaktionsvolumen von 200 µl verwendet wurden.

4.4.1 Aktivität der *PcIDS1* nach *Frick et al.*

Bisherige Untersuchungen zeigen, dass die *PcIDS1* ohne die Gegenwart von divalenten Metallionen keine Enzymaktivität besitzt. Erst unter Verwendung von metallionischen Kofaktoren sind die Enzyme funktionsfähig, wobei die Produktspezifität in Abhängigkeit von den Metallionen variiert [10]. Die Aktivität der IDS 1 wurde mit IDP und DMADP sowie GDP als Substrat unter Verwendung von Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} ermittelt. Die höchste Enzymaktivität konnte dabei in Gegenwart von Co^{2+} festgestellt werden.

In Bezug auf die Produktspezifität synthetisierte die *PcIDS1* mit DMADP und IDP als Substrat in Gegenwart von Co^{2+} und Mn^{2+} etwa zu 96% GDP und zu 4% FDP. Unter Verwendung von Mg^{2+} hingegen resultierte zu 18% GDP und zu 82% FDP. Da die spezifische Enzymaktivität der IDS mit Co^{2+} und Mg^{2+} am höchsten war, wurden diese Metallionen in dieser Arbeit ebenfalls als Kofaktor verwendet. Weiterhin wurden in bisherigen Untersuchungen zur Ermittlung der optimalen Ionenkonzentration die rekombinanten IDS mit DMADP als allylisches Substrat in einem Konzentrationsbereich von 0,001 mM bis 10 mM der beiden Kofaktoren getestet. Die Forschungsergebnisse ergaben, dass die höchste Enzymaktivität bei der Elon-

gation des Substrates DMADP bei einer optimalen Ionenkonzentration von 5 mM Mg^{2+} und 0,5 mM Co^{2+} besteht. Zur Betrachtung eines breiteren Wirkungsspektrums der Ionenkonzentration wurde in dieser Arbeit eine Molarität der metallionischen Kofaktoren von 1 mM und 10 mM gewählt. Weiterhin wurden zur Berücksichtigung des Einflusses der Proteinkonzentration auf das Produktspektrum verschiedene Proteinkonzentrationen verwendet. Die rekombinanten IDS aus *N. vitripennis* und *C. lapponica* wurde deshalb mit einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ getestet, während bei den Untersuchungen der Synthasen von *M. persicae*, *M. viciae* sowie *T. castaneum* eine Proteinkonzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$ zum Einsatz kam. Die Auswertung der Syntheseprodukte basiert auf der spezifischen Enzymaktivität, wobei die Ergebnisse prozentual in Relation zur Gesamtproduktion betrachtet werden (siehe Anhang).

4.4.2 Spezifische Enzymaktivität der IDS aus *C. lapponica*

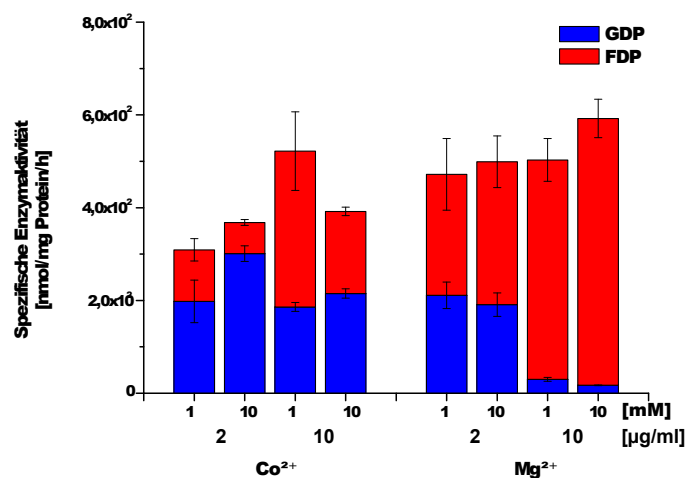


Abbildung 6: Spezifische Enzymaktivität der IDS 1 aus *C. lapponica* in Gegenwart von Co^{2+} sowie Mg^{2+} bei einer eingesetzten Proteinkonzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$.

Die IDS 1 aus *C. lapponica* tendiert in Gegenwart von Co^{2+} zur Synthese von GDP (Abbildung 6). Unter Verwendung einer Proteinkonzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ resultieren in Gegenwart von 1 mM Co^{2+} 64% GDP und 36% FDP. Mit 10 mM Co^{2+} bildet die IDS 1 hingegen 82% GDP und nur 18% FDP. Diese Tendenz spiegelt sich auch

bei der Verwendung der höheren Proteinkonzentration von 10 µg/ml wieder. Hierbei werden mit 1 mM Co²⁺ 35% GDP und 65% FDP hergestellt, wobei mit 10 mM Co²⁺ GDP und FDP zu annähernd gleichen Teilen synthetisiert werden.

In Gegenwart von 1 mM und 10 mM Mg²⁺ ergibt sich schließlich eine Verschiebung der Produktsynthese zur Herstellung von FDP. Während bei einer Proteinkonzentration von 10 µg/ml 40% GDP und 60% FDP hergestellt werden, erfolgt mit 2 µg/ml der IDS 1 eine annähernd vollständige Synthese von FDP mit etwa 95% , wobei nur 5% GDP resultieren.

4.4.3 Spezifische Enzymaktivität der IDS aus *T. castaneum*

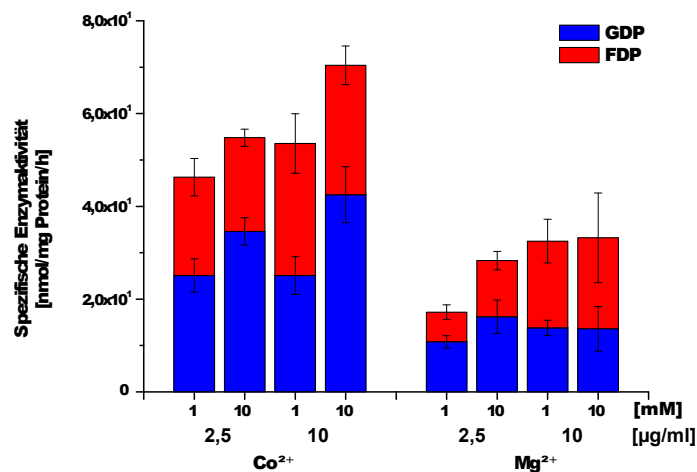


Abbildung 7: Spezifische Enzymaktivität des langen Fragments (F₁) der IDS aus *T. castaneum* in Gegenwart von Co²⁺ sowie Mg²⁺ bei einer eingesetzten Proteinkonzentration von 2,5 µg/ml und 10 µg/ml.

Die IDS aus *T. castaneum* wurde in zwei verschiedenen Fragmentlängen hergestellt. Während das lange Fragment (F₁) die *in vivo* vorkommende Translokationssequenz trägt, wurde das kurze Fragment (F₂) ohne diese Signalsequenz hergestellt.

Die Gesamttätigkeit des Enzymes ist in Gegenwart von Co²⁺ etwa doppelt so hoch als mit Mg²⁺ (Abbildungen 7). In Bezug auf die resultierenden Produkte wird mit beiden Proteinkonzentrationen bei 1 mM Co²⁺ zu gleichen Teilen GDP und FDP synthetisiert, wobei mit 10 mM Co²⁺ zu 60% GDP und zu 40% FDP hergestellt werden.

Die Verwendung von Mg^{2+} führt schließlich zu einer höheren FDP-Synthese bei der höheren Proteinkonzentration. Mit der Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ entstehen zu 40% GDP und zu 60% FDP, wobei sich dieses Verhältnis bei der geringeren Proteinkonzentration umkehrt. Sowohl mit 1 mM Mg^{2+} als auch mit 10 mM Mg^{2+} resultieren unter Verwendung von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ des Enzyms 60% GDP und 40% FDP. Die IDS 1 aus *T. castaneum* zeigt somit eine geringe Aktivität mit einer Produktsynthese beider Terpene zu gleichen Teilen.

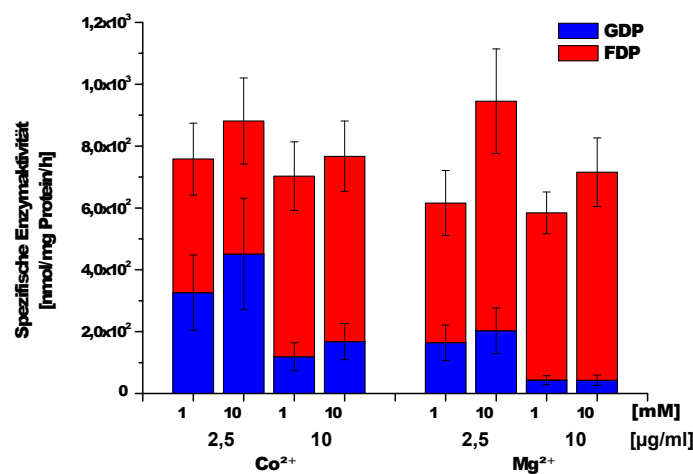


Abbildung 8: Spezifische Enzymaktivität des kurzen Fragments (F_2) der IDS aus *T. castaneum* in Gegenwart von Co^{2+} sowie Mg^{2+} bei einer eingesetzten Proteinkonzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$.

Im Vergleich dazu, besitzt das kurze Fragment der IDS (F_2) aus *T. castaneum* eine 10fach höhere Gesamtaktivität als das lange Fragment (F_1). Während bei einer Proteinkonzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ bei 1 mM und 10 mM Co^{2+} etwa zu gleichen Teilen FDP und GDP produziert werden, ist unter Verwendung von 10 $\mu\text{g/ml}$ des Enzyms eine deutlichere Tendenz zur FDP-Synthese erkennbar (Abbildung 8). In Gegenwart von 1 mM und 10 mM Co^{2+} wird dabei zu 20% GDP und zu 80% FDP hergestellt. Die überwiegende Synthese von FDP spiegelt sich auch in Gegenwart von Mg^{2+} wieder. Während bei einer Proteinkonzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ bei 1 mM Mg^{2+} etwa 25% GDP und 75% FDP resultieren, sinkt die Herstellung von GDP bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ auf etwa 6% , wobei FDP einen Anteil von 94% der Gesamtproduktion besitzt.

4.4.4 Spezifische Enzymaktivität der IDS aus *N. vitripennis*

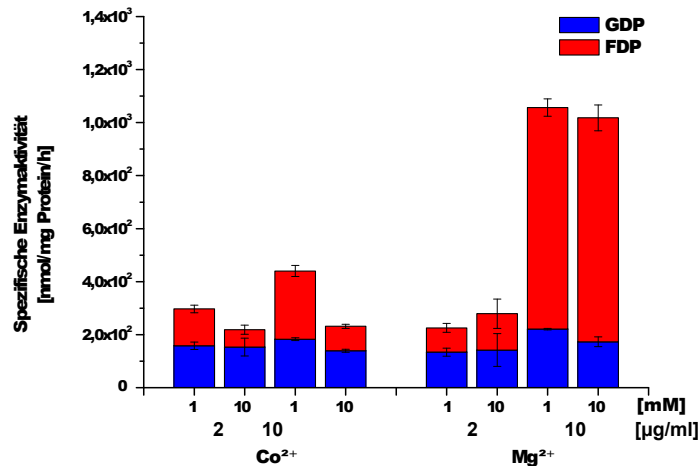


Abbildung 9: Spezifische Enzymaktivität des langen Fragments (F₁) der IDS aus *N. vitripennis* in Gegenwart von Co²⁺ sowie Mg²⁺ bei einer eingesetzten Proteinkonzentration von 2 µg/ml und 10 µg/ml.

Die IDS aus *N. vitripennis* wurde wie bei *T. castaneum* ebenfalls in zwei verschiedenen Fragmentlängen hergestellt, wobei das lange Fragment (F₁) das Signalpeptid trägt. Die Gesamtaktivität der IDS wird in Gegenwart von Co²⁺ tendenziell vermindert, wobei sich in Abhängigkeit von der verwendeten Molarität Unterschiede im Verhältnis der beiden Syntheseprodukte abzeichnen (Abbildung 9). Während bei 1 mM Co²⁺ mit beiden Proteinkonzentrationen zu 50% GDP und FDP entstehen, verändert sich der Anteil der Synthese des GDP auf 60% und des FDP auf 40% bei 10 mM Co²⁺. Unter Verwendung von 10 mM Mg²⁺ hingegen wird zu etwa 55% GDP und 45% FDP mit einem Einsatz von 2 µg/ml der IDS erreicht, während in den Reaktionsansätzen mit 10 µg/ml lediglich 20% GDP und 80% FDP resultieren.

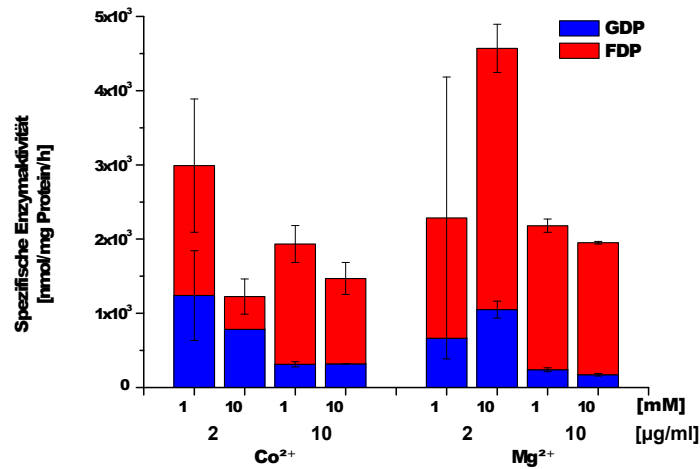


Abbildung 10: Spezifische Enzymaktivität des kurzen Fragments (F₂) der IDS aus *N. vitripennis* in Gegenwart von Co²⁺ sowie Mg²⁺ bei einer eingesetzten Proteinkonzentration von 2 µg/ml und 10 µg/ml.

Die Gesamtaktivität und das Verhältnis der Produkte des kurzen Fragments F₂ der IDS aus *N. vitripennis* ist im Vergleich zum langen Fragment F₁ ähnlich (Abbildung 10). Zudem treten die Unterschiede im Produktspektrum mit den verwendeten Proteinkonzentrationen auf.

Bei der Verwendung der höheren Proteinkonzentration von 10 µg/ml der IDS werden in Gegenwart von 1 mM und 10 mM Co²⁺ etwa 20% GDP und 80% FDP synthetisiert, während der Einsatz der geringen Proteinkonzentration mit 1 mM Co²⁺ zu 41% GDP und 59% FDP führt, wobei aus der Reaktion mit 10 mM Co²⁺ etwa 64% GDP und 36% FDP hervorgehen.

Die Nutzung von Mg²⁺ verstärkt hingegen die FDP-Synthese. Die Gegenwart von 1 mM und 10 mM Mg²⁺ führt mit der geringeren Proteinkonzentration zu etwa 25% GDP und 75% FDP, während bei der Verwendung von 10 µg/ml der IDS lediglich 10% GDP und 90% FDP entstehen.

4.4.5 Spezifische Enzymaktivität der IDS aus *M. viciae*

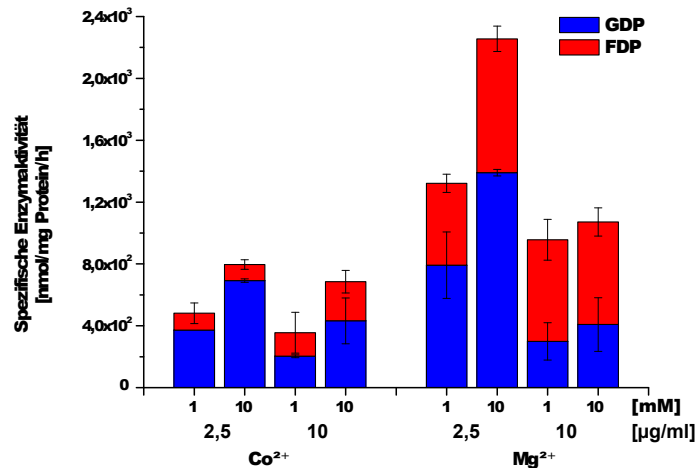


Abbildung 11: Spezifische Enzymaktivität der IDS 1 aus *M. viciae* in Gegenwart von Co²⁺ sowie Mg²⁺ bei einer eingesetzten Proteinkonzentration von 2,5 µg/ml und 10 µg/ml.

Die Gesamtaktivität der IDS 1 aus *M. viciae* ist durch die Gegenwart von Co²⁺ im Gegensatz zur Aktivität bei Mg²⁺ tendentiell vermindert, wobei die eingesetzten Proteinkonzentrationen geringe Unterschiede in Bezug auf die Produktverhältnisse verursachen (Abbildung 11). Allerdings überwiegt mit Co²⁺ als Kofaktor die Synthese von GDP. Unter Verwendung der geringen Proteinkonzentration von 2,5 µg/ml wird mit 1 mM und 10 mM Co²⁺ zu etwa 80% GDP und zu 20% FDP hergestellt, während mit 10 µg/ml des Enzyms etwa 60% GDP und 40% FDP entstehen.

Der Einfluss der Proteinkonzentration spiegelt sich auch unter Verwendung von Mg²⁺ als Kofaktor wieder, wobei die FDP-Synthese überwiegt. Während mit 2,5 µg/ml der Proteine mit 1 mM und 10 mM Mg²⁺ etwa 60% GDP und 40% FDP hergestellt werden, beträgt die Synthese mit 10 µg/ml der IDS etwa 35% GDP und 65% FDP. Die IDS 1 aus *M. viciae* zeigt somit in Gegenwart von Mg²⁺ eine Tendenz zur Synthese von FDP.

4.4.6 Spezifische Enzymaktivität der IDS aus *M. persicae*

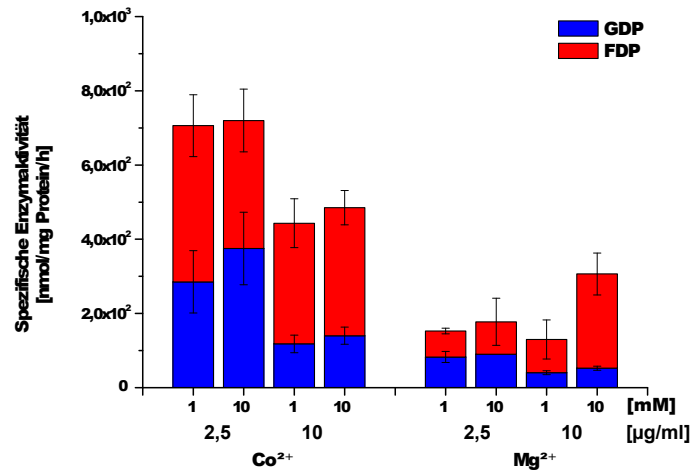


Abbildung 12: Spezifische Enzymaktivität der IDS 2 aus *M. persicae* in Gegenwart von Co^{2+} sowie Mg^{2+} bei einer eingesetzten Proteinkonzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ und 10 $\mu\text{g/ml}$.

Die Enzymaktivitäten der IDS 2 aus *M. persicae* ist mit Co^{2+} tendenziell erhöht (Abbildung 12). Bei einer Proteinkonzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ wird in Gegenwart von 1 mM Co^{2+} zu 40% GDP und 60% FDP hergestellt, während mit 10 mM Co^{2+} GDP und FDP zu gleichen Teilen aus der Reaktion hervorgehen. Bei der größeren Proteinkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ hingegen entstehen zu 30% GDP und 70% FDP mit 1 mM und 10 mM Co^{2+} (Abbildung 12).

In Gegenwart von 1 mM und 10 mM Mg^{2+} resultieren aus der Reaktion mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ der IDS die Produkte GDP und FDP zu jeweils 50%, während 10 $\mu\text{g/ml}$ der IDS aus *M. persicae* zu 31% GDP und 69% FDP bei 1 mM Mg^{2+} und zu 17% GDP und 83% FDP bei 10 mM Mg^{2+} führen. Somit wird auch eine hohe GDP-Synthese in Gegenwart von Mg^{2+} deutlich.

5 Diskussion

Ausgehend von der kofaktorabhängigen Produktspezifität der *PcIDS1* wird dieser Regulationsmechanismus in dieser Arbeit an homologen Enzymen verschiedener Insekten untersucht. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand hierbei die Frage nach der Verbreitung dieses Mechanismus über *P. cochleariae* hinaus oder allgemeiner Veranlagung verwandter Enzyme. Zu diesem Zweck wurde versucht, alle ermittelten homologen Enzyme der einzelnen Spezien zu exprimieren und auf diese Eigenschaft zu testen. Da jedoch nicht alle Synthesen rekombinant hergestellt werden konnten bzw. keine Aktivität vorwies, bezieht sich die Auswertung auf die erfolgreich exprimierte IDS 1 des Blattkäfers *C. lapponica*, der IDS des Reismehlkäfers *T. castaneum* und der parasitären Wespe *N. vitripennis* sowie der IDS 1 aus der Blattlaus *M. viciae* und der IDS 2 aus *M. persicae*.

5.1 Faktorabhängige Produktspezifität

Die kofaktorabhängige Produktspezifität ermöglicht die Synthese verschiedener Terpenvorstufen mit nur einem Enzym. Im Meerrettichblattkäfer *P. cochleariae* bildet die Promiskuitivität der IDS die Grundlage zur ausreichenden Bereitstellung von GDP, was zur *de novo*-Synthese von pentazyklischen Monoterpenen als Abwehrstoff dient [10]. Zwar basiert der Abwehrmechanismus von *C. lapponica* nicht auf der *de novo*-Synthese von Iridoiden, dennoch ist diese Veranlagung aufgrund der nahen taxonmischen Verwandtschaft erkennbar. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen verdeutlicht, dass die *PcIDS1* und *C. lapponica* eine Übereinstimmung von 88% der Sequenzen besitzen (Abbildung 3). Vor diesem Hintergrund bestehen auch in der enzymatischen Funktion der beiden Synthesen hohe Ähnlichkeiten. Entsprechend der kofaktorabhängigen Synthese der *PcIDS1* tendiert auch die IDS 1 aus *C. lapponica* von der annähernd vollständigen FDP-Synthese unter Mg^{2+} zur Produktion von FDP und GDP zu gleichen Teilen in Gegenwart von Co^{2+} (Abbildung 6). Die Fähigkeit des Blattkäfers *C. lapponica* GDP zu synthetisieren, obwohl dieser selbst keine Verwendung für Monoterpene besitzt, liegt in der hohen Sequenzbereinstimmung der Synthesen, welche auf den engen Verwandtschaftsgrad zu *P. cochleariae* zurückzuführen ist.

Da in allen Insekten FDP zur Synthese des Juvenilhormons notwendig ist [13], wird auch in dem Reismehlkäfer *T. castaneum* und in der parasitischen Wespe *N. vitri-*

pennis die Sesquiterpenvorstufe FDP synthetisiert. Da bisher aber keine Erkenntnisse über die Biosynthese von GDP oder deren Vorkommen in den jeweiligen Organismen bekannt sind, spiegelt die überwiegende Synthese von FDP die fehlende Notwendigkeit der Monoterpensynthese wider.

Auch in Blattläusen dient FDP zur Bereitstellung der Juvenilhormone, wobei dieses auch eine Vorstufe des Alarmpheromons E- β -Farnesens [42] darstellt. Die Monoterpenvorstufe GDP hingegen dient in Blattläusen vor allem der Synthese der Sexpheromone (+)-(4aS, 7S, 7aR)-Nepetalacton und (-)-(1R,4aS, 7S, 7aR)-Nepetalactols [16, 42]. Die spezifische Enzymaktivität der Blattlaus *M. viciae* zeigt, dass mit Mg^{2+} zwar neben FDP auch GDP hergestellt wird, aber unter Co^{2+} die GDP-Synthese überwiegt (Abbildung 11). Dies spiegelt die Notwendigkeit der Synthese des Sexpheromone sowie des Alarmpheromons (-)- α -Pinen wider [16].

Die Isoprenyldiphosphat-Synthase der Blattlaus *M. persicae* besitzt einen hohen Verwandtschaftsgrad zur Synthase aus *M. viciae* (Abbildung 3), was sich im Vorkommen ähnlicher Pheromone ausdrückt. Schließlich synthetisiert *M. persicae* ebenfalls GDP und FDP zu jeweils 50% in Gegenwart von Mg^{2+} , während Co^{2+} die Produktion von GDP tendenziell fördert (Abbildung 12). Denn aus FDP wird auch in *M. persicae* neben den Juvenilhormonen das Alarmpheromon E- β -Farnesen hergestellt [42], wobei das Monoterpenderivat GDP ebenfalls zur Synthese des Nepetalacton und des Nepetalactols genutzt wird [16].

Bereits in vergangenen Forschungsarbeiten konnte die Promiskuitivität der IDS in *M. persicae* über das Substrat festgestellt werden [11]. Eine ebenfalls heterolog exprimierte IDS aus *M. persicae* führte dabei über eine Erhöhung der Konzentration des allylischen Substrats DMADP zur gesteigerten GDP-Synthese, während die Verwendung von GDP als einziges allylisches Substrat die Synthese von FDP bewirkte.

Vor diesem Hintergrund stellt die Bildung von GDP und FDP in Abhängigkeit vom metallionischen Kofaktor, wie sie an der *PcIDS1* entdeckt wurde, einen weiteren Regulationsmechanismus dar, der auch in Blattläusen vorkommt.

5.2 Einfluss des Translokationspeptids

Die IDS aus *N. vitripennis* und aus *T. castaneum* wurden in verschiedenen Nukleotidlängen amplifiziert. Während das lange Fragment F₁ die ebenfalls *in vivo* vorkommende Translokationssequenz trägt, wurde das kurze Fragment F₂ ohne die Signalsequenz kloniert. In Bezug auf die Aktivität der jeweiligen Fragmente einer Synthese ergeben sich deutliche Unterschiede. Die langen Fragmente F₁ der IDS aus *T. castaneum* besitzen im Vergleich zu den kurzen Fragmenten F₂ eine um das 10fache geringere Aktivität (Abbildungen 7, 8). Es ist deshalb anzunehmen, dass die Translokationssequenz die Enzymaktivität inhibiert, indem es durch Wechselwirkungen mit dem Protein eine Konformationsänderung bewirkt oder die Stabilität vermindert. Weiterhin kann es auch den Zugang zum aktiven Zentrums des Enzyms oder die Bindung der Kofaktoren beeinflussen.

5.3 Betrachtung der Aminosäuresequenzen

Die Visualisierung der Aminosäureähnlichkeiten mithilfe eines Baumes lässt die Vermutung zu, dass die kofaktorabhängige Produktspezifität der *PcIDS1* aufgrund der hohen Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von 88% zu den einzelnen IDS der Blattkäfer *C. populi* und *C. lapponica* ebenfalls in diesen vorkommen kann (Abbildung 3). Diese Annahme bestätigt sich in Hinblick auf die spezifische Enzymaktivität der IDS 1 aus *C. lapponica*, welche von der FDP-Produktion unter Mg²⁺ zur Synthese von FDP und GDP zu gleichen Teilen in Gegenwart von Co²⁺ tendiert, obwohl im Sekundärmetabolismus dieses Blattkäfers keine Monoterpene vorkommen (Abbildung 6).

Im Gegensatz dazu ist die promiskuitive Eigenschaft der einzelnen IDS aus den Blattläusen *M. persicae* und *M. viciae* mit einem Deckungsgrad der Sequenzen von lediglich 50% zur *PcIDS1* nicht auf den Verwandtschaftsgrad zurückzuführen. Während die IDS aus *M. viciae* in Gegenwart von Co²⁺ überwiegend GDP herstellt, erhöht Co²⁺ die Enzymaktivität der IDS aus *M. persicae* und steigert die Synthese von GDP (Abbildung 11, 12). Dies zeigt, dass die faktorabhängige Produktspezifität kein individuelles Phänomen in *P. cochleariae* ist und sich in anderen Insekten speziellen wie den Blattläusen homolog entwickelt hat.

Vor diesem Hintergrund scheint der Einfluss von Metallionen auf die Enzymaktivität einen weiteren intrinsischen Regulationsmechanismus darzustellen. Durch diese Eigenschaft konnte sich im Laufe der Evolution ein Adaptationsmechanismus an wechselnde Umweltbedingungen etablieren, welcher die metabolischen Kosten zur Herstellung weiterer Enzyme vermeidet, indem vorhandene Ressourcen regulatorisch einwirken können.

5.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben eine Übersicht über die Verbreitung der Promiskuitivität verschiedener Isoprenyldiphosphat-Synthasen von Insekten. Im weiteren Verlauf der Forschung werden die Enzymaktivitätsuntersuchungen wiederholt, wobei eine gründlichere Aufreinigung die heterolog exprimierte Proteine erfolgt. Zudem müssen enzymkinetische Untersuchungen zur Ermittlung der Substrataffinitäten durchgeführt werden.

Dennoch zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die kofaktorabhängige Produktspezifität, welche bei *P. cochleariae* auftritt, über die Familie der Blattkäfer hinaus verbreitet ist. In Anbetracht der Tatsache, dass diese Eigenschaft auch bei der Gruppe der Blattläuse vorzufinden ist, müssen weitere Vergleiche mit den homologen Synthasen aus *A. pisum* und der IDS 2 aus *M. persicae* durchgeführt werden. Weiterhin sollten auch die verbleibenden Isoprenyldiphosphat-Synthasen im Mittelpunkt stehen, die mit Hilfe des Alignment der Nukleotidsequenzen ermittelt wurden. Vor allem die IDS der Spezies *T. fuscum* und *D. ponderosae* und die verbleibende IDS 1 aus *C. populi* können aufgrund ihrer hohen Übereinstimmung zu *P. cochleariae* wichtige Hinweise über die Verbreitung und homologe Entwicklung des Regulationsmechanismus liefern. Während die Promiskuitivität der IDS bei *C. lapponica* aus der hohen Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen resultiert und bei Blattläusen auf der Notwendigkeit beider Terpenvorstufen basiert, werden die Erkenntnisse aus weiteren Insekten wesentliche Hinweise zur Bedeutung und Herkunft dieser Eigenschaft liefern.

A Literatur

- [1] P Nuhn. *Naturstoffchemie - mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe; mit 80 Tabellen*. Hirzel S. Verlag, Stuttgart, 4. neu bearb. a. edition, 2006.
- [2] E Breitmaier. *Terpene - Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone*. John Wiley & Sons, New York, 2012.
- [3] Sophie Vandermoten, Benoit Charlotheaux, Sébastien Santini, Stephanie E Sen, Catherine Béliveau, Micheline Vandebol, Frédéric Francis, Robert Brasseur, Michel Cusson, and Éric Haubruge. Characterization of a novel aphid prenyltransferase displaying dual geranyl/farnesyl diphosphate synthase activity. *FEBS letters*, 582(13):1928–1934, 2008.
- [4] M Rohmer et al. Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. elucidation and distribution. *Pure and applied chemistry*, 75(2):375–388, 2003.
- [5] DJ McGarvey and R Croteau. Terpenoid metabolism. *The Plant Cell*, 7(7):1015, 1995.
- [6] KC Wang and SI Ohnuma. Isoprenyl diphosphate synthases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1529(1):33–48, 2000.
- [7] PH Liang, TP Ko, and AHJ Wang. Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *European Journal of Biochemistry*, 269(14):3339–3354, 2002.
- [8] K Ogura, T Koyama, and H Sagami. Polyprenyl diphosphate synthases. *Subcellular biochemistry*, 28:57, 1997.
- [9] A Joly and PA Edwards. Effect of site-directed mutagenesis of conserved aspartate and arginine residues upon farnesyl diphosphate synthase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 268(36):26983–26989, 1993.

- [10] S Frick, R Nagel, A Schmidt, RR Bodemann, P Rahfeld, G Pauls, W Brandt, J Gershenzon, W Boland, and A Burse. Metal ions control product specificity of isoprenyl diphosphate synthases in the insect terpenoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(11):4194–4199, 2013.
- [11] Sophie Vandermoten, Benoit Charlotheaux, Sébastien Santini, Stephanie E Sen, Catherine Béliveau, Micheline Vandebol, Frédéric Francis, Robert Brasseur, Michel Cusson, and Éric Haubruge. Characterization of a novel aphid prenyltransferase displaying dual geranyl/farnesyl diphosphate synthase activity. *FEBS letters*, 582(13):1928–1934, 2008.
- [12] J Gershenzon and N Dudareva. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature chemical biology*, 3(7):408–414, 2007.
- [13] HF Nijhout and DE Wheeler. Juvenile hormone and the physiological basis of insect polymorphisms. *Quarterly Review of Biology*, pages 109–133, 1982.
- [14] A Burse, S Frick, S Discher, K Tolzin-Banasch, R Kirsch, A Strauß, M Kunert, and W Boland. Always being well prepared for defense: The production of deterrents by juvenile *Chrysomelina* beetles (chrysomelidae). *Phytochemistry*, 70(15):1899–1909, 2009.
- [15] JD Allison, JH Borden, and SJ Seybold. A review of the chemical ecology of the cerambycidae (coleoptera). *Chemoecology*, 14(3-4):123–150, 2004.
- [16] JA Pickett, LJ Wadhams, CM Woodcock, and J Hardie. The chemical ecology of aphids. *Annual review of entomology*, 37(1):67–90, 1992.
- [17] T Kinjoh, Y Kaneko, K Itoyama, K Mita, K Hiruma, and T Shinoda. Control of juvenile hormone biosynthesis in *Bombyx mori*: Cloning of the enzymes in the mevalonate pathway and assessment of their developmental expression in the corpora allata. *Insect biochemistry and molecular biology*, 37(8):808–818, 2007.
- [18] P Laurent, JC Braekman, D Dalozé, and J Pasteels. Biosynthesis of defensive compounds from beetles and ants. *European Journal of Organic Chemistry*, 2003(15):2733–2743, 2003.

- [19] J Kuhn, EM Pettersson, BK Feld, A Burse, A Termonia, JM Pasteels, and W Boland. Selective transport systems mediate sequestration of plant glucosides in leaf beetles: A molecular basis for adaptation and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(38):13808–13813, 2004.
- [20] JM Pasteels, S Duffey, and M Rowell-Rahier. Toxins in chrysomelid beetles possible evolutionary sequence from de novo synthesis to derivation from food-plant chemicals. *Journal of chemical ecology*, 16(1):211–222, 1990.
- [21] J Kuhn, EM Pettersson, BK Feld, L Nie, K Tolzin-Banasch, SM M'Rabet, J Pasteels, and W Boland. Sequestration of plant-derived phenolglucosides by larvae of the leaf beetle *chrysomela lapponica*: Thioglucosides as mechanistic probes. *Journal of chemical ecology*, 33(1):5–24, 2007.
- [22] M Hilker and S Schulz. Composition of larval secretion of *chrysomela lapponica* (coleoptera, chrysomelidae) and its dependence on host plant. *Journal of chemical Ecology*, 20(5):1075–1093, 1994.
- [23] JM Pasteels, JC Braekman, D Daloze, and R Ottinger. Chemical defence in chrysomelid larvae and adults. *Tetrahedron*, 38(13):1891–1897, 1982.
- [24] D Daloze and JM Pasteels. Isolation of 8-hydroxygeraniol-8-o- β -d-glucoside, a probable intermediate in biosynthesis of iridoid monoterpenes, from defensive secretions of *plagioderma versicolora* and *gastrophysa viridula* (coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of chemical ecology*, 20(8):2089–2097, 1994.
- [25] M Veith, K Dettner, and W Boland. Stereochemistry of an alcohol oxidase from the defensive secretion of larvae of the leaf beetle *Phaedon armoraciae* (coleoptera: Chrysomelidae). *Tetrahedron*, 52(19):6601–6612, 1996.
- [26] M Veith, M Lorenz, W Boland, H Simon, and K Dettner. Biosynthesis of iridoid monoterpenes in insects: Defensive secretions from larvae of leaf beetles (coleoptera: chrysomelidae). *Tetrahedron*, 50(23):6859–6874, 1994.
- [27] JM Pasteels, M Rowell-Rahier, JC Braekman, D Daloze, and S Duffey. Evolution of exocrine chemical defense in leaf beetles (coleoptera: Chrysomelidae). *Experientia*, 45(3):295–300, 1989.

- [28] G Smith and JE Hurley. First north american record of the palearctic species *tetropium fuscum* (fabricius) (coleoptera: Cerambycidae). *The Coleopterists Bulletin*, 54(4):540–540, 2000.
- [29] F Schröder, R Fettköther, U Noldt, K Dettner, WA König, and W Francke. Synthesis of (3r)-3-hydroxy-2-hexanone,(2r, 3r)-2, 3-hexanediol and (2s, 3r)-2, 3-hexanediol, the male sex pheromone of hylotrupes bajulus and pyrrhidium sanguineum (cerambycidae). *Liebigs Annalen der Chemie*, 1994(12):1211–1218, 1994.
- [30] PD Mayo, PJ Silk, M Cusson, and C Béliveau. Steps in the biosynthesis of fuscumol in the longhorn beetles *tetropium fuscum* (f.) and *tetropium cinnamopterum kirby*. *Journal of chemical ecology*, pages 1–13, 2013.
- [31] FD BOYER, C Malosse, P Zagatti, and J Einhorn. Identification and synthesis of vesperal, the female sex pheromone of the longhorn beetle *vesperus xatarti*. *ChemInform*, 29(26), 1998.
- [32] WS Leal, JMS Bento, EF Vilela, and TMC Della Lucia. Female sex pheromone of the longhorn beetle *migdolus fryanus westwood*: N-(2 s)-methylbutanoyl 2-methylbutylamine. *Experientia*, 50(9):853–856, 1994.
- [33] S Richards, RA Gibbs, GM Weinstock, SJ Brown, R Denell, Richard W Beeman, R Gibbs, G Bucher, M Friedrich, CJP Grimmelikhuijzen, et al. The genome of the model beetle and pest *tribolium castaneum*. *Nature*, 452(7190):949–955, 2008.
- [34] KE Mock, BJ Bentz, EM O’neill, JP Chong, J Orwin, and ME Pfrender. Landscape-scale genetic variation in a forest outbreak species, the mountain pine beetle (*dendroctonus ponderosae*). *Molecular Ecology*, 16(3):553–568, 2007.
- [35] C I Keeling and J Bohlmann. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytologist*, 170(4):657–675, 2006.

- [36] DS Pureswaran, R Gries, JH Borden, and HD Pierce Jr. Dynamics of pheromone production and communication in the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* hopkins, and the pine engraver, *ips pini* (say)(coleoptera: Scolytidae). *Chemoecology*, 10(4):153–168, 2000.
- [37] G Gries, A Leufvén, JP Lafontaine, HD Pierce, JH Borden, D Vanderwel, and AC Oehlschlager. New metabolites of α -pinene produced by the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* (coleoptera: Scolytidae). *Insect Biochemistry*, 20(4):365–371, 1990.
- [38] GJ Blomquist, R Figueroa-Teran, M Aw, M Song, A Gorzalski, NL Abbott, E Chang, and C Tittiger. Pheromone production in bark beetles. *Insect biochemistry and molecular biology*, 40(10):699–712, 2010.
- [39] D Vanderwel, G Gries, SM Singh, JH Borden, and AC Oehlschlager. (e)- and (z)-6-nonen-2-one: Biosynthetic precursors of endo-andexo-brevicomin in two bark beetles (coleoptera: Scolytidae). *Journal of chemical ecology*, 18(8):1389–1404, 1992.
- [40] LS Barkawi, W Francke, GJ Blomquist, and SJ Seybold. Frontalin: De novo biosynthesis of an aggregation pheromone component by *Dendroctonus* spp. bark beetles (coleoptera: Scolytidae). *Insect biochemistry and molecular biology*, 33(8):773–788, 2003.
- [41] AR Whiting. The biology of the parasitic wasp *mormoniella vitripennis* [nasonia brevicornis](walker). *Quarterly Review of Biology*, pages 333–406, 1967.
- [42] S Vandermoten, MC Mescher, F Francis, E Haubruge, and FJ Verheggen. Aphid alarm pheromone: An overview of current knowledge on biosynthesis and functions. *Insect biochemistry and molecular biology*, 42(3):155–163, 2012.
- [43] FP Müller. Differential alarm pheromone responses between strains of the aphid *acyrthosiphon pisum*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 34(3):347–348, 1983.
- [44] JA Pickett and DC Griffiths. Composition of aphid alarm pheromones. *Journal of Chemical Ecology*, 6(2):349–360, 1980.

- [45] JA Tillman, SJ Seybold, RA Jurenka, and GJ Blomquist. Insect pheromones—an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect biochemistry and molecular biology*, 29(6):481–514, 1999.

B Anhang

Ergebnisse des BLASTN-Alignments über NCBI

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Phaedon cochleariae isoprenyldiphosphate synthase mRNA,complete cds	2327	2327	100%	0.0	100%	KC109782.1
Chrysomelina lapponica IDS 1	1269	1269	100%	0.0	84%	CL16143
Chrysomelina populi IDS 1	1306	1306	99%	0.0	85%	PBK34281
Tetropium fuscum putative farnesyldiphosphate synthase (FPPS)mRNA, complete cds	434	434	86%	5e-120	69%	JX308223.1
Tribolium castaneum farnesylpyrophosphate synthase (Fpps),mRNA	408	408	79%	2e-112	69%	NM_001170618.1
Dendroctonus ponderosae cloneDPO044_J12 isoprenyl diphosphatesynthase (IDS) mRNA, complete cds	304	304	71%	6e-81	68%	JQ855705.1
PREDICTED: Nasonia vitripennisfarnesyl pyrophosphate synthase-like(LOC100120871), mRNA	174	217	68%	7e-42	66%	XM_001604414.2
Phaedon cochleariae IDS 2	946	946	39%	0.0	100%	
Chrysomelina populi IDS 2	475	475	39%	1e-137	83%	PBKcontig3938
Chrysomelina lapponica IDS 2	464	464	39%	3e-134	83%	CL17926
Bombyx mori farnesyl pyrophosphatesyntase (Fps), mRNA>dbj AB072589.1 Bombyx moriBmFPS mRNA for farnesylpyrophosphate synthase, completecds	132	247	38%	2e-29	72%	NM_001043424.1
Megoura viciae putativemitochondrial isoprenyl diphosphatesynthase precursor, mRNA,complete cds; nuclear gene formitochondrial product	120	120	29%	1e-25	67%	AY968584.2

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Acyrthosiphon pisum mitochondrial isoprenyl diphosphate synthase (Ipps), mRNA	116	116	29%	2e-24	67%	NM_001126161.3
Myzus persicae bifunctional putative mitochondrial GPPS/FPPS isoprenyl diphosphate synthase precursor, mRNA, complete cds, alternatively spliced; nuclear gene for mitochondrial product	96.9	96.9	29%	2e-18	66%	AY968586.1
PREDICTED: Acyrthosiphon pisum farnesyl pyrophosphate synthase-like (LOC100166187), mRNA	73.4	73.4	14%	2e-11	69%	XM_001950388.2
Myzus persicae putative mitochondrial isoprenyl diphosphate synthase precursor, mRNA, complete cds; nuclear gene for mitochondrial product	73.4	73.4	11%	2e-11	71%	EU447786.1
Bombyx mori farnesyl diphosphate synthase 3 (Fpps3), mRNA>dbj AB274997.1 Bombyx mori FPPS3_Bm mRNA for farnesyl diphosphate synthase 3, complete cds	59.0	59.0	11%	4e-07	69%	NM_001099832.1
Bombyx mori farnesyl diphosphate synthase 2 (Fpps2), mRNA>dbj AB274996.1 Bombyx mori FPPS2_Bm mRNA for farnesyl diphosphate synthase 2, complete cds	50.0	50.0	10%	2e-04	70%	NM_001099831.1

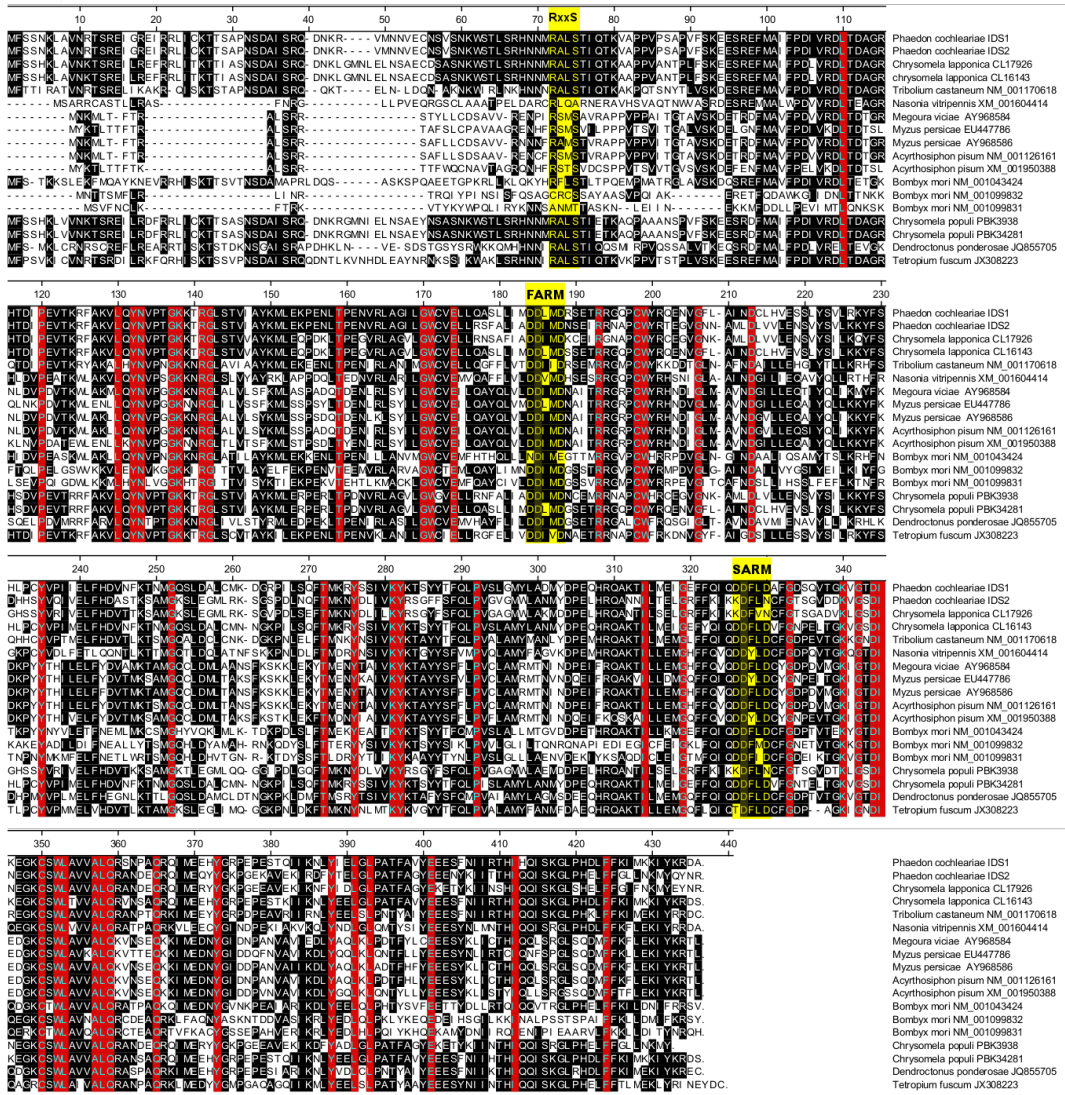
NCBI-Datenbankzugangsnummern

IDS	Accessionnumber
<i>P. cochleariae</i> IDS 1	KC109782
<i>T. fuscum</i> IDS	JX308223
<i>T. castaneum</i> IDS	NM001170618
<i>D. ponderosae</i> IDS	JQ855705
<i>N. vitripennis</i> IDS	XM001604414
<i>A. pisum</i> IDS 1	NM001126161
<i>M. viciae</i> IDS 1	AY968584
<i>M. persicae</i> IDS 1	AY968586
<i>A. pisum</i> IDS 2	XM001950388
<i>M. persicae</i> IDS 2	EU447786
<i>B. mori</i> IDS 1	NM001043424
<i>B. mori</i> IDS 2	NM001099832
<i>B. mori</i> IDS 3	NM001099831

Verwendete Primer

IDS	Primersequenz	Annealing-Temperatur
<i>A. pisum</i> NM001126161.3 F1	CACC AAC AAA ATG CTG ACT TTT AC	55 °C
<i>A. pisum</i> NM001126161.3 F2	CACC AGT ACA GTT CGT GCG CCT C	55 °C
<i>A. pisum</i> NM001126161.3 Reverse	TTA GAG TGT TCT CTT GTA AAT CTT TTC CAA G	55 °C
<i>A. pisum</i> XM01950388.2 F1	CACC TAC AAA ACA CTA ACT ACG TTC	55 °C
<i>A. pisum</i> XM01950388.2 F2	CACC AGC GTG GAT TGC TCG CCA CCG GTG AC	55 °C
<i>A. pisum</i> XM01950388.2 Reverse	TTA GAG GGT TCT CTT GTA AAT CTT CTC CAA GAA TGT G	55 °C
<i>B. mori</i> 1 NM0010434 F1	CACC TTC TCG ACA AAG AAA AGC TTA GAA AAG TTT ATG C	55 °C
<i>B. mori</i> 1 NM0010434 F2	CACC AGA TTC CTG TCG ACC CTG ACT CC	55 °C
<i>B. mori</i> 1 NM0010434 Reverse	TTA AAC GCT TCG CCT GAA GAT GTT GTC TAA GAT T	55 °C
<i>B. mori</i> 2 NM001099832 F1	CACC AAC ACC ACA TCG ATG TTT CTA CGA TTA	55 °C
<i>B. mori</i> 2 NM001099832 F2	CACC TGC AGG TGT AGT TCA GCA TAT GCA G	55 °C
<i>B. mori</i> 2 NM001099832 Reverse	TTA ATA ACT TCT CTT GAA TAT CAT ATC G	55 °C
<i>B. mori</i> 3 NM001099831 F1	CAAC AGT GTA TTT AAT TGT CTC AAA TTT ACC CG	55 °C
<i>B. mori</i> 3 NM001099831 F2	CACC GCA AAT ATG ACG ACA GCC TCA AAA AAT CTC G	55 °C
<i>B. mori</i> 3 NM001099831 Reverse	TTA ATG TTG CCT ATT GTA CGT AAT ATC CAA CAA C	55 °C
<i>C. lapponica</i> F1	CAAC TTT TCC TCA CAT AAA CTG GCC GTG	55 °C
<i>C. lapponica</i> F2	CACC AGA GCC CTC TCG ACC ATC CAG	55 °C
<i>C. lapponica</i> 17926 Reverse	TTA TCG ATT ATA TTC GTA CAT CTT GTT ATT	55 °C
<i>C. lapponica</i> 16143 Reverse	CTA AGA ATC GCG CTT ATA AAT TTT CTTC	55 °C
<i>D. ponderosae</i> JQ855705 F1	CACC TTT TCG ATG AAA TTG TGT CGC AAT C	
<i>D. ponderosae</i> JQ855705 F2	CACC AGG GCA TTG TCG ACC ATT CAG C	
<i>D. ponderosae</i> JQ855705 Reverse	CTA ACA CTC GCG CTT GTA AAT CTT CTC C	
<i>M. persicae</i> AY968586.1 F2	CACC AGT ACA GTT CGC GCA C	58 °C
<i>M. persicae</i> EU447786.1 F1	CACC TAC AAA ACG CTG ACT AC	58 °C
<i>M. persicae</i> EU447786.1 F2	CACC AGT GTT ATT CTG CCG CC	58 °C
<i>M. persicae</i> EU447786.1 Reverse	TTA AAG TGT TCT CTT GTA AAT CTT TTC CAA AAA TT	58 °C
<i>M. viciae</i> AY968584.2 F2	CACC AGT GCA GTT CGT GCG CCG CCA GTC C	58 °C
<i>M. viciae</i> AY968584.2 Reverse	TTA GAG TGT TCT CTT GTA AAT CTT TTC CAA GAA TTT G	58 °C
<i>N. vitripennis</i> XM001604414 F1	CACC TCC GCA CGA AGG TGT GCG TCG	55 °C
<i>N. vitripennis</i> XM001604414 F2	CACC CGA GCC GTG CAC TCG GTG GCC	55 °C
<i>N. vitripennis</i> XM001604414 Reverse	TTA GGC ATC TCT GCG ATA AAT CTT TTC GAG GAA TT	55 °C
T7-Promotorregion	TAATACGACTCACTATAGGG	
T7-Terminationsregion	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
<i>T. castaneum</i> NM0011706 F1	CACC TTT ACA ACA ATT AGA GCG ACA GTA AAT CG	55 °C
<i>T. castaneum</i> NM0011706 F2	CACC AGA GCT TTA TCA ACG ATC CAA ACA AAG G	55 °C
<i>T. castaneum</i> NM0011706 Reverse	CTA ACA GTC CCT CCG GTA AAT TTT CTC CAT	55 °C
<i>T. fuscum</i> JX308223 F1	CACC TTT CCT TCA GTC AAA ATA TGT GTT AAT CG	55 °C
<i>T. fuscum</i> JX308223 F2	CACC AGA GCT CTC TCT ACG ATC CAA ACG	55 °C
<i>T. fuscum</i> JX308223 Reverse	CTA ACA ATC ATA TTC ATT TAT TCT GTA C	55 °C

Alignment der Aminosäuresequenzen



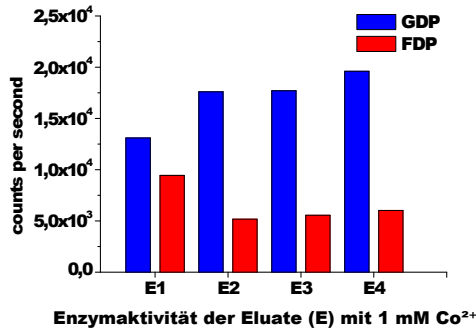
Alignment der Aminosäuresequenzen. Gelb: FARM- und SARM-Motive sowie Trennungsschnittstelle der mitochondrialen Translokationssequenz (RxxS). Rot: Nukleotidübereinstimmungen in allen Sequenzen. Schwarz: Nukleotidübereinstimmungen in über 50% der Sequenzen.

Spezifische Enzymaktivitäten

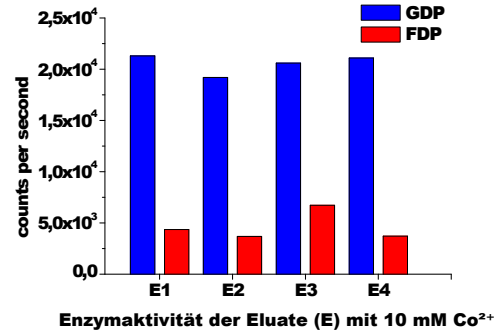
Spezies und IDS	Kofaktor [mM]	Protein [μ g]	GDP [nmol/mg Protein/h]	Stabw. [nmol/mg Protein/h]	FDP [nmol/mg Protein/h]	Stabw. [nmol/mg Protein/h]	GDP-Anteil	FDP-Anteil
<i>C. lapponica</i> IDS 1	1 Co ²⁺	0,4	198	46	111	24	64,00%	36,00%
<i>C. lapponica</i> IDS 1	10 Co ²⁺	0,4	301	17	67	6	81,79%	18,21%
<i>C. lapponica</i> IDS 1	1 Co ²⁺	2,0	186	9	336	85	35,61%	64,39%
<i>C. lapponica</i> IDS 1	10 Co ²⁺	2,0	215	10	177	9	54,85%	45,15%
<i>C. lapponica</i> IDS 1	1 Mg ²⁺	0,4	211	29	261	77	44,70%	55,30%
<i>C. lapponica</i> IDS 1	10 Mg ²⁺	0,4	191	25	308	56	38,32%	61,68%
<i>C. lapponica</i> IDS 1	1 Mg ²⁺	2,0	30	4	473	46	5,96%	94,04%
<i>C. lapponica</i> IDS 1	10 Mg ²⁺	2,0	17	1	575	41	2,92%	97,08%
<i>T. castaneum</i> IDS (F ₁)	1 Co ²⁺	0,5	25	4	21	4	54,16%	45,84%
<i>T. castaneum</i> IDS (F ₁)	10 Co ²⁺	0,5	35	3	20	2	63,08%	36,92%
<i>T. castaneum</i> IDS (F ₁)	1 Co ²⁺	2,0	25	4	28	6	46,90%	53,10%
<i>T. castaneum</i> IDS (F ₁)	10 Co ²⁺	2,0	42	6	28	4	60,36%	39,64%
<i>T. castaneum</i> IDS (F ₁)	1 Mg ²⁺	0,5	11	1	6	2	62,85%	37,15%
<i>T. castaneum</i> IDS (F ₁)	10 Mg ²⁺	0,5	16	4	12	2	57,23%	42,77%
<i>T. castaneum</i> IDS (F ₁)	1 Mg ²⁺	2,0	14	2	19	5	42,38%	57,62%
<i>T. castaneum</i> IDS (F ₁)	10 Mg ²⁺	2,0	14	5	20	10	40,96%	59,04%
<i>T. castaneum</i> IDS (F ₂)	1 Co ²⁺	0,5	326	122	432	116	42,98%	57,02%
<i>T. castaneum</i> IDS (F ₂)	10 Co ²⁺	0,5	451	180	430	139	51,22%	48,78%
<i>T. castaneum</i> IDS (F ₂)	1 Co ²⁺	2,0	119	45	584	111	16,93%	83,07%
<i>T. castaneum</i> IDS (F ₂)	10 Co ²⁺	2,0	168	58	599	114	21,88%	78,12%
<i>T. castaneum</i> IDS (F ₂)	1 Mg ²⁺	0,5	164	57	452	105	26,63%	73,37%
<i>T. castaneum</i> IDS (F ₂)	10 Mg ²⁺	0,5	203	74	742	169	21,51%	78,49%
<i>T. castaneum</i> IDS (F ₂)	1 Mg ²⁺	2,0	43	15	541	67	7,39%	92,61%
<i>T. castaneum</i> IDS (F ₂)	10 Mg ²⁺	2,0	43	17	673	111	5,97%	94,03%
<i>N. vitripennis</i> IDS (F ₁)	1 Co ²⁺	0,4	158	14	139	14	53,25%	46,75%
<i>N. vitripennis</i> IDS (F ₁)	10 Co ²⁺	0,4	153	34	66	17	69,86%	30,14%
<i>N. vitripennis</i> IDS (F ₁)	1 Co ²⁺	2,0	183	5	257	21	41,55%	58,45%
<i>N. vitripennis</i> IDS (F ₁)	10 Co ²⁺	2,0	139	6	93	8	59,94%	40,06%
<i>N. vitripennis</i> IDS (F ₁)	1 Mg ²⁺	0,4	134	15	92	17	59,40%	40,60%
<i>N. vitripennis</i> IDS (F ₁)	10 Mg ²⁺	0,4	142	62	137	55	50,89%	49,11%
<i>N. vitripennis</i> IDS (F ₁)	1 Mg ²⁺	2,0	221	3	836	33	20,93%	79,07%
<i>N. vitripennis</i> IDS (F ₁)	10 Mg ²⁺	2,0	173	18	845	49	17,01%	82,99%
<i>N. vitripennis</i> IDS (F ₂)	1 Co ²⁺	0,4	1237	604	1754	899	41,35%	58,65%
<i>N. vitripennis</i> IDS (F ₂)	10 Co ²⁺	0,4	785	328	442	237	63,99%	36,01%
<i>N. vitripennis</i> IDS (F ₂)	1 Co ²⁺	2,0	314	35	1620	250	16,23%	83,77%
<i>N. vitripennis</i> IDS (F ₂)	10 Co ²⁺	2,0	320	3	1148	215	21,79%	78,21%
<i>N. vitripennis</i> IDS (F ₂)	1 Mg ²⁺	0,4	665	578	1620	1905	29,10%	70,90%
<i>N. vitripennis</i> IDS (F ₂)	10 Mg ²⁺	0,4	1047	114	3524	326	22,90%	77,10%
<i>N. vitripennis</i> IDS (F ₂)	1 Mg ²⁺	2,0	240	26	1939	89	11,03%	88,97%
<i>N. vitripennis</i> IDS (F ₂)	10 Mg ²⁺	2,0	172	18	1782	17	8,78%	91,22%

Spezies und IDS	Kofaktor [mM]	Protein [μ g]	GDP [nmol/mg Protein/h]	Stabw. [nmol/mg Protein/h]	FDP [nmol/mg Protein/h]	Stabw. [nmol/mg Protein/h]	GDP-Anteil	FDP-Anteil
<i>M. viciae</i> IDS 1	1 Co ²⁺	0,5	372	54	109	66	77,38%	22,62%
<i>M. viciae</i> IDS 1	10 Co ²⁺	0,5	692	12	104	31	86,94%	13,06%
<i>M. viciae</i> IDS 1	1 Co ²⁺	2,0	203	9	152	132	57,18%	42,82%
<i>M. viciae</i> IDS 1	10 Co ²⁺	2,0	432	148	253	73	63,09%	36,91%
<i>M. viciae</i> IDS 1	1 Mg ²⁺	0,5	792	215	530	59	59,93%	40,07%
<i>M. viciae</i> IDS 1	10 Mg ²⁺	0,5	1391	21	866	82	61,64%	38,36%
<i>M. viciae</i> IDS 1	1 Mg ²⁺	2,0	299	121	658	132	31,24%	68,76%
<i>M. viciae</i> IDS 1	10 Mg ²⁺	2,0	408	173	664	91	38,07%	61,93%
<i>M. persicae</i> IDS 2	1 Co ²⁺	0,5	285	84	421	83	40,37%	59,63%
<i>M. persicae</i> IDS 2	10 Co ²⁺	0,5	375	98	345	85	52,08%	47,92%
<i>M. persicae</i> IDS 2	1 Co ²⁺	2,0	118	24	325	66	26,57%	73,43%
<i>M. persicae</i> IDS 2	10 Co ²⁺	2,0	140	23	345	46	28,79%	71,21%
<i>M. persicae</i> IDS 2	1 Mg ²⁺	0,5	83	15	70	8	54,19%	45,81%
<i>M. persicae</i> IDS 2	10 Mg ²⁺	0,5	90	54	87	63	50,88%	49,12%
<i>M. persicae</i> IDS 2	1 Mg ²⁺	2,0	40	5	89	53	31,11%	68,89%
<i>M. persicae</i> IDS 2	10 Mg ²⁺	2,0	52	5	254	56	17,12%	82,88%

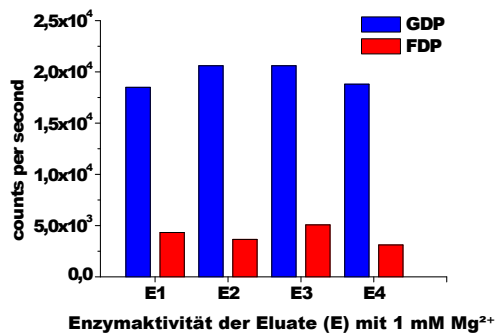
Enzymaktivität der IDS aus *A. pisum* (NM001126161) im Imidazolhaltigem Puffer



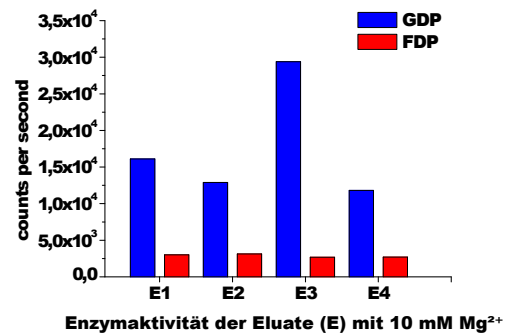
Spezifische Enzymaktivität einzelner Eluate der rekombinanten Isoprenyldiphosphat-Synthase aus *A. pisum* (NM001126161) in Gegenwart von 1 mM Co²⁺.



Spezifische Enzymaktivität einzelner Eluate der rekombinanten Isoprenyldiphosphat-Synthase aus *A. pisum* (NM001126161) in Gegenwart von 10 mM Co²⁺.

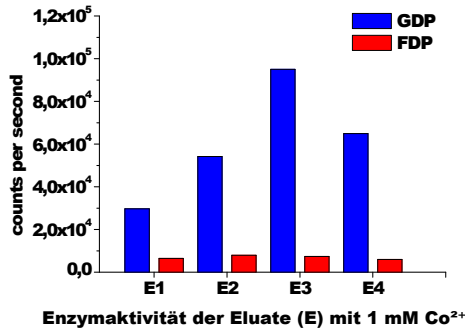


Spezifische Enzymaktivität einzelner Eluate der rekombinanten Isoprenyldiphosphat-Synthase aus *A. pisum* (NM001126161) in Gegenwart von 1 mM Mg²⁺.

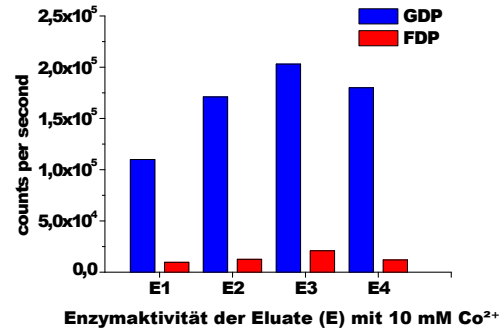


Spezifische Enzymaktivität einzelner Eluate der rekombinanten Isoprenyldiphosphat-Synthase aus *A. pisum* (NM001126161) in Gegenwart von 10 mM Mg²⁺.

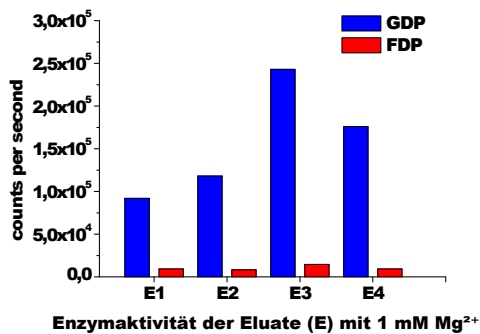
Enzymaktivität der IDS aus *A. pisum* (XM001950388) im Imidazolhaltigem Puffer



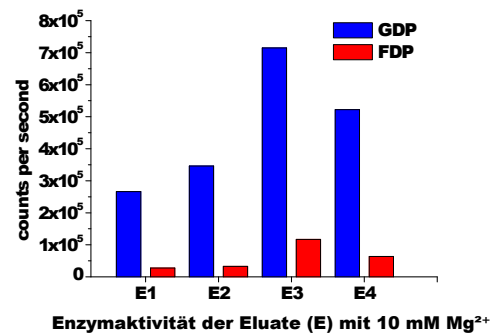
Spezifische Enzymaktivität einzelner Eluate der rekombinanten Isoprenyldiphosphat-Synthase aus *A. pisum* (XM001950388) in Gegenwart von 1 mM Co²⁺.



Spezifische Enzymaktivität einzelner Eluate der rekombinanten Isoprenyldiphosphat-Synthase aus *A. pisum* (XM001950388) in Gegenwart von 10 mM Co²⁺.



Spezifische Enzymaktivität einzelner Eluate der rekombinanten Isoprenyldiphosphat-Synthase aus *A. pisum* (XM001950388) in Gegenwart von 1 mM Mg²⁺.



Spezifische Enzymaktivität einzelner Eluate der rekombinanten Isoprenyldiphosphat-Synthase aus *A. pisum* (XM001950388) in Gegenwart von 10 mM Mg²⁺.

C Danksagung

Eine akademische Abschlussarbeit zu verfassen ist für niemanden eine leichte Aufgabe. Es braucht viel Zeit, Mühe, Disziplin und vor allem Menschen, die mit Rat und Tat zur Seite stehen. Ich hatte das Glück gleich mehrere kompetente Betreuer zur Bewältigung meiner Arbeit zu finden.

Daher möchte ich Prof. Dr. Wilhelm Boland für seine wertvolle Zeit danken, um die Ergebnisse meiner Untersuchungen zu begutachten sowie Prof. Dr. Jonathan Gershenzon für die Bereitstellung aller notwendigen Mittel.

Ein besonderer Dank gilt auch meinem Zweitgutachter sowie Betreuer Dr. Axel Schmidt für seine humorvolle, aber lehrreiche Beaufsichtigung meiner Tätigkeiten und seinem Engagement zur Beschaffung des Bockkäfers, des Borkenkäfers, und der parasitären Wespe. Auch Frau Dr. Antje Burse gebührt Dank für die unkomplizierte Hilfe bei allen Problemen, die während der Versuchsdurchführungen auftraten und der Bereitstellung des genetischen Materials der Blattläuse *C. populi* und *C. lapponica*, der Blattkäfer *A. pisum*, *M. persicae* und *M. viciae* sowie des Schmetterlings *B. mori* und des Schwarzkäfers *T. castaneum*.

Besonders danke ich auch Sindy Frick, deren Publikation zur kofaktorabhängigen Produktspezifität der PcIDS 1 den Grundstein dieser Arbeit legte. Mein Respekt gilt vor allem ihrem beeindruckendem Wissen auf diesem Fachgebiet und ihrer endlosen Geduld, mit der sie mich mühevoll auf den richtigen Weg geführt hat. Desweiteren danke ich auch Raimund Nagel für die freundliche Betreuung und insbesondere für die Beantwortung all meiner Fragen zum chemisch-physikalisch Hintergrund der angewandten Methoden.

Dank an Prof. Dr. Joachim Ruther von der Universität Regensburg, für die zur Verfügung gestellten parasitären Wespen *N. vitripennis*, an Dr. Jon Sweeny des Atlantic Forestry Centre, Kanada, für die Exemplare des Bockkäfers *T. fuscum* und an Prof. Brent W. Murray von der Universität Northern British Columbia für den Borkenkäfer *D. ponderosae*.

Abschließend möchte ich nicht darauf verzichten, meiner Freundin Anna für ihren tatkräftigen Beistand und meiner Mutter für die bestärkenden Ratschläge zu danken.

D Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, kenntlich gemacht sind und die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Studien – oder Prüfungsleistung war.

Jena, den 26. September 2013

.....

Stefan Elsner