

**Identifikation und Charakterisierung von ABCB Transportern im Blattkäfer**

***Chrysochus asclepiadeus* (Coleoptera, Chrysomelidea, Eumolpinae)**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Fachbereich Biologie

Der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Cäcilia Gisela Marianne Plate**

aus Bremen

Hamburg, Mai 2023

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Esther Diekhof

Mitglieder des Prüfungskomitees:

Prof. Dr. Susanne Dobler

Prof. Dr. Baris Tursun

Dr. Andrej Fabrizius

Datum der Disputation: 25.09.2023

# Inhaltsverzeichnis

i. <b>Zusammenfassung</b> .....	<b>vi</b>
ii. <b>Abstract</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Interaktion zwischen Pflanzen und herbivoren Insekten.....	1
1.2 Cardenolide: Vorkommen, Wirkung und Schutzmechanismen .....	1
1.3 <i>Chrysochus</i> Blattkäfer (Eumolpinaea), Lopatin 1984 .....	6
1.4 ABC-Transporter: Allgemein, Architektur und Transportzyklus.....	11
1.4.1 Unterfamilie B: .....	16
1.5 Zielsetzung.....	18
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
2.1 Bioinformatische Methoden .....	20
2.1.1 Transkriptomanalyse .....	20
2.1.1.1 Transkriptom vom <i>C. asclepiadeus</i> .....	20
2.1.1.2 Identifikation von Abcb-Genen mittels Blast-Suche.....	20
2.1.1.3 Vervollständigen der CascAbcb1-Sequenz mittels Mapping gegen die Rohdaten des <i>C. asclepiadeus</i> Transkriptom .....	21
2.1.1.4 Trimmen der Transkriptom Rohdaten.....	21
2.1.1.5 Zusammensetzen der Blasthits von CascAbcb1 mit CauAbcb1.....	22
2.1.1.6 Mapping der <i>Chrysochus</i> Abcb1 Sequenzen gegen das <i>C. asclepiadeus</i> Transkriptom .....	22
2.1.1.7 Slicen der gemappten Reads .....	22
2.1.1.8 Umschreiben der BAM-Datei in eine FASTA-Datei.....	22
2.1.1.9 Assemblieren der erhaltenen Reads .....	22
2.1.1.10 In silico Analyse der <i>C. asclepiadeus</i> ABCB-Sequenzen.....	23
2.1.2 Primerdesign.....	23
2.1.3 Phylogenetischer Stammbaum der verschiedenen ABCB Transporter .....	24
2.1.4 ABC-Scan.....	24
2.1.4.1 Identifikation von ABC-Sequenzen mittels ABC-Scan.....	24
2.1.4.2 Übersetzen des Transkriptom Datensatz mittels Bioedit.....	25
2.1.4.3 ABC-Scan Online Anwendung und Analyse .....	25
2.1.4.4 Ausschluss von Sequenzduplikaten.....	25
2.1.5 Qualitätsprüfung des Transkriptom des <i>C. asclepiadeus</i> .....	25
2.2 Molekularbiologische Methoden .....	26
2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden .....	26
2.2.1.1 Verwendete Versuchstiere .....	26
2.2.1.2 Präparation der Tiere .....	26

2.2.1.3	Gesamt RNA- Extraktion aus gesamtem Käfer, sowie verschiedenen Geweben mit RNAmagic und RNeasy plus Kit (Quiagen).....	26
2.2.1.4	Elektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren.....	27
2.2.1.5	Reverse Transkription (cDNA Synthese).....	28
2.2.1.6	Polymerasen Kettenreaktion (PCR).....	28
2.2.1.7	PCR von <i>CascAbcb1</i> und <i>CascAbcb2</i> .....	29
2.2.1.8	Aufreinigung der PCR-Produkte .....	29
2.2.2	Klonierung .....	29
2.2.2.1	Klonierung von <i>CascAbcb1</i> und <i>CascAbcb2</i> in pGEM-T (TA-Klonierung) .....	29
2.2.2.2	Anhängen von Adenosin an die PCR-Produkte (A-Tailing).....	29
2.2.2.3	Ligation der <i>CascAbcb</i> s in pGEM-T.....	30
2.2.2.4	Transformation der <i>CascAbcb</i> s in XL 10 Gold Zellen und in Stellar Zellen.....	30
2.2.2.5	Retransformation von vorhandenen Plasmiden .....	30
2.2.2.6	Blau-Weiß Selektion .....	31
2.2.2.7	Kolonie-PCR .....	31
2.2.2.8	Plasmid-DNA Isolation mittels alkalischer Lyse.....	32
2.2.2.9	Sequenzierung der pGEM-T <i>CascAbcb</i> s.....	33
2.2.2.9.1	Umklonierung der <i>CascAbcb</i> s aus dem pGEM-T Vektor in den pFastBacDual Expressionsvektor mittels InFusion-HD Klonierung .....	33
2.2.2.9.2	Amplifizierung der <i>CascAbcb</i> Gene mittels CloneAmp Hifi PCR Mix aus pGEM-T und Linearisierung der Expressionsvektoren .....	33
2.2.2.10	InFusion Klonierung mit Spin Column aufgereinigten PCR-Produkten .....	34
2.2.3	Bac-to-Bac Baculovirusystem (Invitrogen) .....	35
2.2.4	Transformation der <i>CascAbcb</i> s pFBD in DH 10 Bac-Zellen.....	35
2.3	Expressionsanalyse.....	36
2.3.1	cDNA Synthese der verschiedenen Gewebe-RNAs für die quantitative <i>Real time</i> PCR	36
2.3.2	Quantitative <i>Real time</i> -PCR (qRT-PCR) mittels dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen .....	36
2.3.3	Herstellung der Plasmidstandardreihe.....	37
2.3.4	Spezifitätstest der qRT-PCR Primer.....	38
2.3.5	Effizientestes der qRT-PCR .....	38
2.3.6	Durchführung der qRT-PCR mittels dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen .....	39
2.3.7	Auswertung der qRT-PCR .....	39
2.4	Zellbiologische Methoden .....	40
2.4.1	Kultivierung der Insektenzellen <i>Sf9</i> und Hi5 (BTI-Tn-5B1-4) .....	40
2.4.2	Transfektion der <i>Sf9</i> Zellen mit Bacmiden .....	41
2.4.3	Ernte und Herstellung der Baculoviren .....	41

2.4.4	Heterologe Expression der ABCB Transporterproteine in Insektenzellen .....	42
2.5	Proteinchemische Methoden .....	42
2.5.1	Immunzytochemische Detektion von ABCB1 und ABCB2 in Insektenzellen .....	42
2.5.2	Isolation und Präparation der Insektenzellmembranen .....	43
2.5.3	Gesamtproteinbestimmung nach Bradford .....	44
2.5.4	SDS-Page .....	45
2.5.5	Western-Blot .....	45
2.5.6	<i>Ponceau S</i> Färbung .....	45
2.5.7	Immundetektion und Farbreaktion mit 4-CN .....	46
2.6	Vanadat-sensitives ATPase-Assay .....	46
2.6.1	Auswertung des ATPase-Assays und erstellen der Aktivitätskurven .....	49
2.7	Verwendete Softwares für die Auswertung, grafischen Darstellungen, statistischen Auswertung und Bildbearbeitung .....	52
2.7.1	Allgemeine Auswertung und grafische Darstellung .....	52
2.7.2	Statistische Auswertung .....	52
2.7.3	Grubbs Ausreißer-Test .....	52
2.7.4	Bildbearbeitungsprogramm .....	53
2.7.5	Sequenzalignment und phylogenetische Stammbäume .....	53
2.7.6	Rechtschreib und Grammatikprüfung .....	53
3.	<b>Ergebnisteil</b> .....	<b>54</b>
3.1	Bioinformatik .....	54
3.1.1	Identifizierung möglicher ABCB-Sequenzen im Transkriptom des <i>C. asclepiadeus</i> .....	54
3.1.2	<i>Mapping</i> zur Vervollständigung der <i>CascAbcb1</i> -Sequenz .....	54
3.1.3	Charakterisierung der <i>in silico</i> identifizierten <i>CascABCB</i> -Sequenzen .....	55
3.1.4	Vorhersagemodell der Tertiärstruktur der ABCBs mittels Phyre2 .....	57
3.1.5	Sequenzalignment der <i>Chrysochus</i> -Arten, <i>Chysomela populi</i> , Mensch und Maus ABCB- Transporter zur Homologieanalyse der Transporterbindetasche .....	58
3.1.6	Sequenzalignment der Transmembrandomänen der untersuchten ABCB-Transporter .. .....	60
3.1.7	Identifikation der ABC-Unterfamilien im <i>C. asclepiadeus</i> Transkriptom über den ABC- Scan (Denecke et al. 2021) .....	63
3.1.8	Phylogenetischer Stammbaum der ABCB-Volltransporter .....	65
3.1.8.1	Phylogenie der ABCB-Halbtransporter vom <i>C. asclepiadeus</i> .....	67
3.1.9	Qualitätsprüfung des verwendeten Trinity Assembly des <i>C. asclepiadeus</i> .....	68
3.2	Molekularbiologie .....	68
3.2.1	Amplifizierung der <i>abcb</i> -Sequenzen und Bestätigung der bioinformatisch generierten Sequenzen .....	69
3.2.2	Klonierung der <i>abcb</i> -Gene in den pGEM-T Vektor .....	69

3.2.3	Umklonierung der Abcb-Gene aus dem Klonierungsvektor pGEM-T in den Expressionsvektor pFastBacDual .....	70
3.2.4	Herstellung der rekombinanten <i>C. asclepiadeus abcb1</i> und <i>abcb2</i> Bacmide .....	71
3.3	Gewebe-spezifische Expression der <i>C. asclepiadeus</i> Transporter mittels qRT-PCR.....	71
3.4	Proteinbiochemie .....	74
3.4.1	Rekombinante Expression von <i>CascABCB1</i> und <i>CascABCB2</i> in Insektenzellen.....	74
3.4.2	Immunzytochemie zur Überprüfung der Synthese der <i>C. asclepiadeus</i> ABCB-Transporter in Insektenzellen.....	75
3.4.3	Proteinbiochemischer Nachweis der isolierten ABCB-Proteine mittels Western-Blot .	77
3.5	Charakterisierung der <i>CascABCB</i> Transporter mittels ATPase-Assays.....	78
4.	<b>Diskussion</b> .....	<b>94</b>
4.1	Die ABC-Transporter im Transkriptom des <i>C. asclepiadeus</i> .....	94
4.2	Expressionspektrum der ABCB-Transporter in <i>C. asclepiadeus</i> .....	100
4.3	Überprüfung des Substratspektrum der ABCB-Transporter mittels ATPase-Assay .....	103
4.4	Der ATPase-Assay zur Bestimmung des Substratspektrums.....	108
4.5	Mögliche Evolution der Sequestration in der Gattung <i>Chrysochus</i> .....	113
4.5.1	Sequestration und die Wahl der Futterpflanze und andere trophische Ebenen .....	113
4.5.2	Das Darmgewebe als evolutionäre entscheidende Station der Sequestration und der mögliche Transportmechanismus mittels ABCB-Transporter .....	116
4.5.3	Was war zuerst da? Sequestration und die Na,K-ATPase .....	119
5.	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>122</b>
6.	<b>Anhang</b> .....	<b>139</b>
6.1	Abkürzungsverzeichnis .....	139
6.2	<i>C. asclepiadeus</i> ABCB-Sequenzen.....	141
6.3	Clusal Omega Alignment von verschiedenen ABCB-Transportern.....	145
6.4	Prozentuale Identitätsmatrix.....	148
6.5	ABC-Scan Sequenzen .....	149
6.6	OD-Werte der ATPase-Assays .....	160
7.	<b>Danksagung</b> .....	<b>170</b>
8.	<b>Eidstattliche Erklärung</b> .....	<b>173</b>

## i. Zusammenfassung

In der Blattkäfergattung *Chrysochus* haben sich die nordamerikanischen Vertreter *C. auratus* und *C. cobaltinus* auf Cardenolid-produzierende *Apocynaceae* spezialisiert. Die europäische Art *C. asclepiadeus* hingegen ernährt sich von *Vincetoxicum spp.*, einer *Apocynaceae* Art, die keine Cardenolide produziert. Cardenolide sind toxische sekundäre Pflanzenmetabolite, die die Natrium-Kalium-ATPase (Na,K-ATPase) blockieren. Insekten, die sich auf Cardenolid-produzierende Pflanzenarten spezialisiert haben, haben verschiedene Anpassungsmechanismen entwickelt. Bereits gut untersucht wurde die *target-site insensitivity*, bei der die Sensitivität der Na,K-ATPase durch Aminosäuresubstitutionen herabgesetzt wird. Diese Anpassung geht oft mit der Sequestration von Cardenoliden einher, die als selektive Aufnahme, Transport, Modifikation, (Ein-)Lagerung und der Einsatz der sekundären Pflanzenmetabolite zur eigenen Verteidigung beschrieben wird. Dabei ist der genaue Transportmechanismus noch unbekannt. Allgemein können apolare Cardenolide Membranen passiv überqueren, polare Cardenolide können nur über den parazellulären Transport oder durch Carrier-Mechanismen transportiert werden. Das apolare Cardenolid Digoxin gilt als Substrat für ABCB1-Proteine bei Insekten und Vertebraten. ABCB-Transporter gehören zur ATP-Binding-Cassette -Superproteinfamilie (ABC-). Die ABC-Proteine kommen in allen Bereichen des Lebens vor. Die Mehrheit der ABCB-Proteine fungiert als Efflux-Transporter und transportiert eine Vielfalt von Substraten unter dem Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) über die Zellmembranen. Jeder funktionale Transporter besteht aus zwei stark konservierten Nukleotidbindedomänen (NBD) und zwei Transmembrandomänen (TMD). Aufgrund der stark konservierten Bereiche der NBD kann die ABC-Proteinsuperfamilie in Arthropoden in neun Unterfamilien (A-I; I nur in *Anopheles*) unterteilt werden. Die Unterfamilie B steht vor allem im Zusammenhang mit dem Transport von Xenobiotika. Bisher wurden drei verschiedene ABCB-Transporterproteine mit einem substratspezifischen Aktivitätsspektrum gegenüber Cardenoliden und Gewebe-spezifischer Expression im *C. auratus* identifiziert. Da in *C. auratus* eine eindeutige Interaktion der ABCB-Transporter mit Cardenoliden vorliegt, sollten die ABCB-Transporter in der nicht auf Cardenolid-haltigen Pflanzen fressenden Art *C. asclepiadeus* identifiziert und charakterisiert werden, um so die mögliche Evolution der Sequestration im Genus näher beschreiben zu können und zu untersuchen inwieweit sich die Transportspezifität durch den Cardenolidgehalt in den Wirtspflanzen verändert hat. Über bioinformatische Methoden

(tblastx und ABC-Scan) konnte ich insgesamt 45 mögliche ABC-Proteine im Transkriptom von *C. asclepiadeus* identifizieren. *C. asclepiadeus* besitzt zwei ABCB-Volltransporter und vier Halbtransporter, die die charakteristischen Motive (Walker A, Walker B, ABC-Signatur und die Epitope des spezifischen C219-Antikörpers) und die typische Proteinstruktur besitzen. Die phylogenetische Untersuchung zeigte, dass beide ABCB-Transporter innerhalb der Coleoptera gruppierten und sich in die beiden Untergruppen ABCB1 und ABCB2/ ABCB3 aufteilen. Die ABCB1-Proteine von *C. auratus* und *C. asclepiadeus* sind homolog zueinander, während der zweite *C. asclepiadeus* ABCB-Transporter zu den ABCB2- und ABCB3-Proteinen von *C. auratus* gleich nah verwandt ist. Dies könnte auf eine Genduplikation in *C. auratus* als Anpassung an die Aufnahme von Cardenoliden in der Nahrung hindeuten. Beide *C. asclepiadeus* ABCB-Transporter weisen ein Gewebe-spezifisches Expressionsmuster auf, was auf verschiedene Funktionen innerhalb des Organismus hinweist. *CascABCB1* wird am stärksten im Nervengewebe exprimiert und ist überall außer in den Malpighischen Gefäßen stärker als *CascABCB2* exprimiert. Die starke Expression im Nervensystem lässt auf eine Schutzfunktion gegenüber Xenobotika schließen. Die nächsthöheren Expressionen sind in den Elytren und dem Darm von ABCB1 zu finden, was den Transport des Wehrsekrets des *C. asclepiadeus* gewährleisten könnte. *CascABCB2* wird am stärksten in den Malpighischen Gefäßen exprimiert, was eine Rolle für eine schnelle Exkretionsfunktion nahelegt. Beide *C. asclepiadeus* ABCB-Transporterproteine konnten erfolgreich in *Sf9*-Insektenzellen exprimiert werden. Die erwartete Lokalisation in den Zellmembranen konnte durch den spezifischen Antikörper C219 nachgewiesen werden und nach anschließender Isolation im Western-Blot die erwartete Länge von ~130 kDa detektiert werden. Anschließend wurde das Substratspektrum der beiden *C. asclepiadeus* ABCB-Transporterproteine durch einen ATPase-Aktivitäts-Assay unter Verwendung von Verapamil sowie Digoxin, Cymarin, Ouabain und Calotropin bestimmt. Die beiden ABCB-Transporter zeigten den erwarteten glockenförmigen Verlauf, der durch eine konzentrationsabhängige Stimulation durch Verapamil verursacht wurde. *CascABCB1* wurde jedoch durch keines der getesteten Cardenolide stimuliert. *CascABCB2* wurde dagegen leicht durch Digoxin und stärker durch Ouabain stimuliert. Die geringe Genexpression und geringe bis fehlende ATPase-Aktivität der beiden *C. asclepiadeus* ABCB-Transporterproteine im Vergleich zu *C. auratus* deuten darauf hin, dass diese keine Cardenolide transportieren können. Es könnte sich um einen sekundären Verlust handeln, der durch den Wechsel auf Pflanzen ohne Cardenolide entstanden ist.

## ii. Abstract

In the leaf beetle genus *Chrysochus*, the North American representatives *C. auratus* and *C. cobaltinus* are specialized on cardenolide-producing *Apocynaceae*. In contrast, the European species *C. asclepiadeus* feeds on *Vincetoxicum spp.*, an *Apocynaceae* that does not produce cardenolides. Cardenolides are toxic secondary plant compounds that inhibit the sodium-potassium ATPase (Na,K-ATPase). Insects that specialize on cardenolide-producing plant species have evolved several adaptive mechanisms. A well-studied phenomenon is *target-site insensitivity*, in which the sensitivity of Na,K-ATPase towards cardenolides is lowered by amino acid substitutions. This adaptation is often accompanied by sequestration of cardenolides, which is described as selective uptake, transport, modification, storage, and the use of secondary plant compounds for the insect's own defense. The exact transport mechanism for this is still unknown. In general, apolar cardenolides can passively cross membranes, whereas polar cardenolides can only be transported via paracellular transport or by carrier mechanisms. The apolar cardenolide digoxin is considered to be a substrate for ABCB1 proteins in insects and vertebrates. ABCB transporters belong to the ATP-binding cassette superprotein family (ABC-), which is found in all kingdoms of life. The majority of ABCB- proteins function as efflux transporters, transporting a variety of substrates across cell membranes with the consumption of adenosine triphosphate (ATP). Each functional transporter consists of two highly conserved nucleotide binding domains (NBD) and two transmembrane domains (TMD). Based on the highly conserved domains of the NBD, the ABC-protein superfamily in arthropods can be divided into nine subfamilies (A-I; I only in Anopheles). Subfamily B is mainly related to the transport of xenobiotics. To date, three different ABCB-transporter proteins with a substrate-specific spectrum of activity toward cardenolides and tissue-specific expression have been identified in *C. auratus*. Since there is a clear interaction of ABCB-transporters with cardenolides in *C. auratus*, the ABCB-transporters should be identified and characterized in *C. asclepiadeus*, a species that does not feed on cardenolide-containing plants, in order to further describe the possible evolution of sequestration in the genus and the extent to which transporter specificity has been altered by cardenolide content in the host plants. Using bioinformatic methods (tblastx and ABC-scan), I identified a total of 45 putative ABC proteins in the transcriptome of *C. asclepiadeus*. *C. asclepiadeus* possesses two ABCB full transporters and four half transporters, which have the characteristic motifs (Walker A, Walker B, ABC signature and the epitopes of the specific

C219 antibody) and the typical protein structure. Phylogenetic analysis revealed that both ABCB-transporters grouped within the Coleoptera ABCBs and divided into the two branches ABCB1 and ABCB2/ ABCB3. The ABCB1-proteins of *C. auratus* and *C. asclepiadeus* are homologous to each other, while the second *C. asclepiadeus* ABCB-transporter is equally distant to the ABCB2 and ABCB3 proteins of *C. auratus*. This may indicate a gene duplication in *C. auratus* as an adaptation to dietary cardenolide uptake. Both *C. asclepiadeus* ABCB transporters exhibit a tissue-specific expression pattern, indicating distinct functions within the organism. *CascABCB1* is most strongly expressed in nervous tissue and is more highly expressed than *CascABCB2* in all tested tissues except in Malpighian tubules. The strong expression in the nervous tissue suggests a protective function against xenobiotics. The next highest expressions are found in the elytra and gut of ABCB1, which may be related to transport into *C. asclepiadeus* defense secretions. *CascABCB2* is most highly expressed in the Malpighian tubules, suggesting a role for rapid excretory function. Both *C. asclepiadeus* ABCB-transporter proteins were successfully expressed in *Sf9*-insect cells. The expected localization in the cell membranes could be detected by the specific antibody C219 and after isolation Western blots revealed the expected length of ~130 kDa. Subsequently, the substrate spectrum of the two *C. asclepiadeus* ABCB-transporter proteins was determined by an ATPase activity assay using verapamil as well as digoxin, cymarin, ouabain and calotropin. Both ABCB-transporters showed the expected bell-shaped pattern caused by concentration-dependent stimulation by verapamil. However, *CascABCB1* was not stimulated by any of the cardenolides tested. In contrast, *CascABCB2* was slightly stimulated by digoxin and more strongly by ouabain. The low gene expression and low to absent ATPase activity of the two *C. asclepiadeus* ABCB-transporter proteins compared with *C. auratus* suggest that they cannot transport cardenolides. This could indicate a secondary loss resulting from the switch to plants lacking cardenolides.

# 1. Einleitung

## 1.1 Interaktion zwischen Pflanzen und herbivoren Insekten

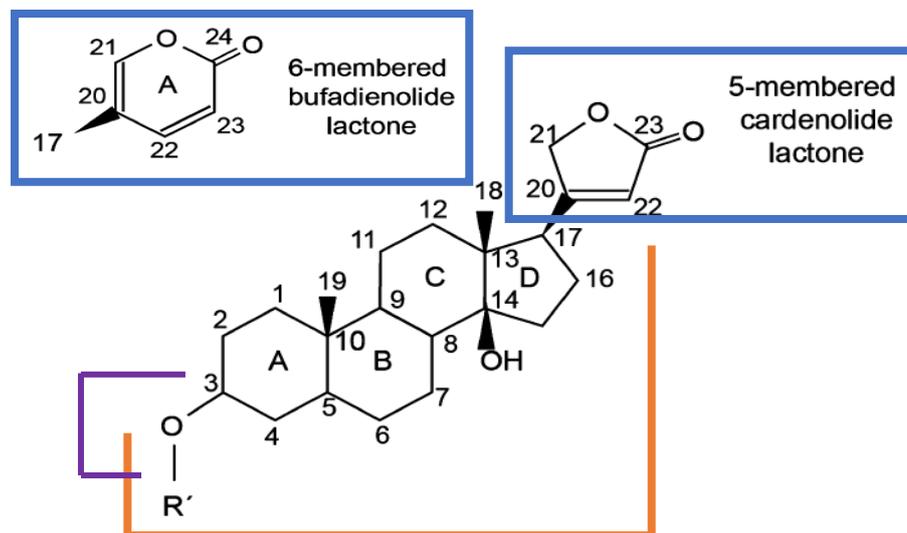
Pflanzen und Insekten leben schon seit mehr als 350 Millionen Jahren miteinander, daher sind ihre Interaktionen so divers wie beide Phyla reich an Arten sind (Gatehouse 2002). Pflanzen brauchen Insekten als Bestäuber, müssen sich aber zeitgleich auch vor herbivoren Insekten schützen (Opitz and Müller 2009). Aufgrund der langen Beziehung zwischen Pflanzen und Insekten ist es nicht verwunderlich, dass beide ein breites Bouquet an Verteidigungs- und Anpassungsstrategien entwickelt haben (Gatehouse 2002). Dabei gibt es grundsätzlich zwei verschiedene Arten von Verteidigungsstrategien: Eine, die stets aktiv ist, und eine, die durch einen Impuls von außen induziert wird. Diese beiden Grundstrategien unterteilen sich weiter in direkte und indirekte Verteidigung. Typische Verteidigungen, die sich direkt gegen Angreifer richten und stets vorhanden sind, sind Stacheln oder Dornen (Mithöfer and Boland 2012). Eine weitere wichtige Verteidigungsstrategie ist die Produktion von sekundären Pflanzenmetaboliten, die oft charakteristisch für bestimmte Pflanzentaxa sind (Schoonhoven, 2006). Innerhalb der Hundsgiftgewächse (*Apocynacea*) gibt es Pflanzenfamilien, die Cardenolide als sekundäre Metabolite produzieren, um sich vor herbivoren Insekten zu schützen (Anurag A. Agrawal et al. 2012). In einem ko-evolutionären Gegenzug entwickelten sich adaptive Insekten, die diese sekundären Metabolite sogar zu ihrem eigenen Vorteil nutzen (Matthew L. Aardema, Zhen, and Andolfatto 2012; Kowalski et al. 2020). In der Gattung *Chrysochus* innerhalb der Familie der Blattkäfer (*Chrysomelidea*) gibt es Arten, die adaptiert und nicht adaptiert sind (Dobler 2004; Kowalski et al. 2020; Estelle Labeyrie and Dobler 2004). Eine dieser Anpassungen ist die Sequestration (Duffey 1980). Somit bietet die Gattung *Chrysochus* nicht nur die Möglichkeit, die Ko-Evolution zwischen Pflanzen und Tieren zu beobachten, sondern auch die Frage, wie sich die Evolution der Sequestration als Anpassung an Cardenolide entwickelt haben könnte.

## 1.2 Cardenolide: Vorkommen, Wirkung und Schutzmechanismen

Zusammen mit den Bufadienoliden gehören Cardenolide zu den Herzglykosiden. Bislang wurden über 500 verschiedene Herzglykoside charakterisiert, die von Pflanzen und Tieren endogen produziert werden können (Agrawal et al., 2012; MALCOLM, 1991). In Pflanzen

zählen sie zu den sekundären Metaboliten und dienen der Pflanze als chemische Abwehr (Agrawal et al., 2012). Cardenolide werden seit Jahrhunderten in der Herztherapie eingesetzt oder in höheren Konzentrationen als Pfeilgifte bei der Jagd (MALCOLM 1991). Sie entfalten ihre toxische Wirkung, indem sie die Natrium-Kalium-ATPase (Na,K-ATPase) blockieren. Die Herzglykoside unterscheiden sich in der Struktur ihres Aglykons: Cardenolide besitzen einen 5-gliedrigen Lactonring am C17-Atom und Bufadienolide einen 6-gliedrigen Lactonring (Agrawal et al., 2012). Ein Herzglykosidemolekül setzt sich aus dem Steroidgerüst, dem Lactonring und dem Zuckerrest zusammen (Abbildung 1.1) (MALCOLM 1991). Der Zuckerrest und der Lactonring sind nicht notwendig für die physiologische Aktivität des Herzglykosids, beeinflussen diese aber dennoch, denn der Zuckerrest beeinflusst die Polarität des Moleküls und damit auch die Diffusionsgeschwindigkeit. Das Aglykon ist der reaktive Teil des Glykosids, der an die Na,K-ATPase bindet und dadurch die toxische Wirkung entfaltet (Repke 1985; Schönfeld et al. 1985). Bisher ist bekannt, dass zwölf verschiedene Pflanzenfamilien innerhalb der *Apocynacea* (Hundsgiftgewächsen) Cardenolide synthetisieren können (Agrawal et al., 2012). In dieser Arbeit werden vier verschiedene Cardenolide getestet: Digoxin, Ouabain, Cymarin und Calotropin. Alle vier Cardenolide unterscheiden sich in ihren chemischen Eigenschaften und bis auf Calotropin sind sie kommerziell erhältlich. Digoxin wird aus Fingerhut-Arten (*Digitalis*) gewonnen und gilt als eines der am häufigsten verschriebenen Herzmedikamente (Gozalpour et al. 2013). Es ist ein apolares Molekül (Permeabilitätskoeffizient: Xlog P3 1,3), das die Membran passiv überqueren kann und daher aktiv aus Zellen entfernt werden muss (Groen et al. 2017). Es agiert sowohl bei Insekten als auch bei Vertebraten als Substrat für ABCB1-Transporter (Gozalpour et al. 2013; Petschenka, Pick, et al. 2013). Ouabain ist ein polares Cardenolid (Xlog P3 -1,7), das nur sehr langsam über die Membran diffundiert oder aktiv transportiert werden muss (Meredith, Moore, and Scudder 1984). Es kann aus *Strophantus*- und *Acokanthera*-Arten gewonnen werden (Reichstein 1888). Im Laufe der Zeit haben sich Digoxin und Ouabain in der Forschung als häufig verwendete Cardenolide etabliert (Gozalpour et al. 2013; Tanigawara et al. 1992; Vaughan and Jungreis 1977). Cymarin (XlogP3: 0,8) wird aus Pflanzen der Gattungen *Apocymum* gewonnen (nähere Informationen finden Sie im Abschnitt *Chrysochus*). Calotropin kann aus Pflanzen (unter anderem *Calotropis*-Arten, *Asclepias currassavica*) oder dem Monarchfalter (*Danaus plexippus*) isoliert werden und besitzt einen XlogP3-Wert von 0,9 (Brower et al. 1984; Koch, Nieger, and Bräse 2020). Jedes Cardenolid hat unterschiedliche

physikalisch-chemische Eigenschaften, die auch die toxische Wirkung beeinflussen (Züst et al. 2019) Da apolare Cardenolide die Membranen passiv durchqueren können, steigt auch ihre Toxizität (Petschenka and Dobler 2009). Nachdem sie die Membran passiert haben, entfalten sie ihre toxische Wirkung durch die Hemmung der Na,K-ATPase (Agrawal et al., 2012).

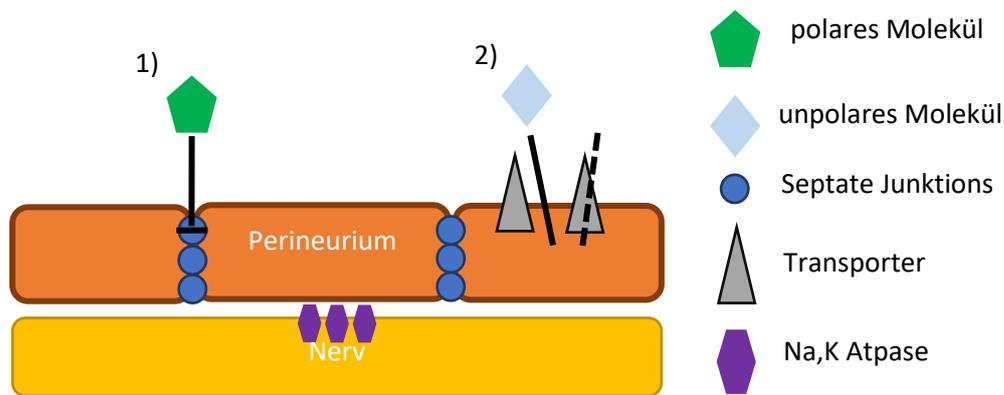


**Abbildung 1.1 Grundstruktur eines Herzglykosids.** In den blauen Kästen das Cardenolid (links) und das Bufadienolid (rechts). Das Herzglykosid besteht aus dem Aglykon (orange), dem Lactonring (blau) und dem Zuckerrest (lila). Verändert nach (Agrawal et al., 2012).

Die Na,K-ATPase ist ein heterodimeres Enzym, das aus der katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit (10 Transmembrandomänen und 5 extrazelluläre Helices) und der  $\beta$ -Untereinheit, die stark glykosyliert ist, besteht (Dalla et al. 2013; Dobler et al. 2012; Horisberger 2004). Sie bildet den größten Proteinkomplex innerhalb der P-Typ-Pumpen (Jorgensen, Håkansson, and Karlsh 2003). Unter Verbrauch von ATP hält die Na,K-ATPase den Ionengradienten aufrecht, der essenziell für den elektrochemischen Gradienten an Nervenzellen ist (Horisberger 2004; Jorgensen et al. 2003). Eine mögliche Anpassung an Cardenolide ist die Herabsetzung der Sensitivität der Na,K-ATPase, auch "*target site insensitivity*" genannt (A A Agrawal et al. 2012). Erstmals beschrieben wurde dies beim Monarchfalter (*Danaus plexippus*), der im Vergleich zu einer nicht adaptierten Schmetterlingsart eine insensitivere Na,K-ATPase gegenüber Ouabain zeigte (Vaughan and Jungreis 1977). Molekularbiologische Untersuchungen der Bindetasche der  $\alpha$ -Untereinheit zeigten zudem, dass der Monarchfalter an der Position 111 ein Histidin

statt Asparagin besitzt (Holzinger, Frick, and Wink 1992). Neben dem Monarchfalter konnte dieses Phänomen auch in anderen Arten, wie zum Beispiel Heteroptera (Moore and Scudder 1986), Heuschrecken (al-Robai 1993; Dobler et al. 2019), Coleoptera (Chrysomelidae) (Labeyrie & Dobler, 2004) und Diptera (Petschenka et al. 2017), beschrieben werden. Dies ist jedoch nicht die einzige Möglichkeit, die Toxizität der in der Nahrung enthaltenen Cardenolide zu überwinden (Heidel-Fischer and Vogel 2015).

Einige Schmetterlingsarten, die auf cardenolidhaltigen Pflanzen fressen, besitzen keine Substitution in der  $\alpha$ -Bindetasche der Na,K-ATPase, was zu einer Insensitivität führt (Dobler et al., 2015; Groen et al., 2017). Der Oleanderschwärmer (*Daphnis nerii*) frisst auf Oleander (*N. oleander*), der eine hohe Konzentration des Cardenolids Oleandrin aufweist. Die Na,K-ATPase des Schwärmers ist jedoch sehr sensitiv gegenüber Cardenoliden. Die Raupe schützt das hauptsächlich im Nervensystem exprimierte Enzym, indem sie es durch das Perineurium isoliert (Petschenka and Dobler 2009). Das Perineurium bildet in Insekten, ähnlich wie bei Säugetieren, die Blut-Hirn-Schranke (Mayer et al., 2009). Anders als bei Säugetieren schwimmt das Nervensystem bei Insekten in der Hämolymphe, daher ist "Hämolymphe-Hirn-Schranke" oder "*hemolymph-brain-barrier*" (HBB) der passendere Begriff (Limmer et al. 2014). Das gesamte Nervensystem ist von perineuralen Gliazellen umgeben. Darunter befindet sich eine weitere Schicht von Gliazellen, die dicht aneinanderliegen und *Septate Junctions* bilden, wodurch der Transport von Ouabain durch den Zellzwischenraum (parazelluläre Diffusion) verhindert wird (Limmer et al. 2014) (Abbildung 2). Neben dem isolierenden Perineurium im *D. nerii* konnten auch Pgp-Proteine im Nervensystem der Raupe nachgewiesen werden (Petschenka et al., 2013). Pgp-Proteine stehen ebenfalls im Zusammenhang mit dem Schutz der HBB vor Xenobiotika, indem sie apolare Moleküle aktiv zurückpumpen (Abbildung 1.2) (Pinsonneault et al. 2011). Sie konnten auch im Nervensystem mehrerer Insekten nachgewiesen werden (Favell et al., 2020; Kowalski et al., 2020; Mayer et al., 2009; Petschenka et al., 2013). Diese Efflux-Transporter wurden auch in anderen Geweben wie dem Darm (Dobler et al. 2015; Kowalski et al. 2020) und den Malpighischen Gefäßen (Murray et al. 1994) nachgewiesen. Näheres wird im Absatz "ABC-Transporter und Unterfamilie B" besprochen.



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der HBB von Insekten.** Es gibt zwei Formen, wie sich die HBB vor dem Eindringen von Giftstoffen schützt: 1) Ein polares Molekül (grünes Fünfeck) wird durch Septate Junctions am Eindringen gehindert. 2) Unpolare Moleküle (hellblaues Rechteck), die die Membran passiv durchqueren können, werden über Transporter herausgeschleust. Die Abbildung wurde angepasst nach (Baum 2016; Pinsonneault et al. 2011).

Eine weitere simple Anpassung des Mitteldarms von Insekten gegenüber Cardenoliden findet sich bei der amerikanischen Großschabe (*Periplaneta americana*) und der Wüstenheuschrecke (*Schistocerca gregaria*). Der Mitteldarm beider Tiere ist undurchlässig für Digitoxin (Scudder and Meredith 1982), obwohl Digitoxin ein apolares Cardenolid ist und Membranen passiv durchqueren kann. Arten wie der Schwarze Schwalbenschwanz (*Papilio polyxenes*) und die nordafrikanische Artischockenmotte (*Depressaria pastinacella*) produzieren Entgiftungsenzyme wie Cytochrome P450, um bestimmte Pflanzenmetabolite wie Cardenolide abzubauen oder zu verstoffwechseln (Heidel-Fischer and Vogel 2015). Insekten, die sich auf Cardenolide in ihrer Ernährung spezialisiert haben, sind sogar in der Lage, die Cardenolide zu ihrem eigenen Vorteil zu nutzen, indem sie diese sequestrieren (Duffey 1980; Opitz and Müller 2009). Die aus der Nahrung aufgenommenen Cardenolide werden recycelt und können über Transportmechanismen in zum Beispiel Wehrdrüsen gebracht und können bei einem Angriff abgegeben werden (Dobler et al., 1998). Aufgrund des bitteren Geschmacks von Cardenoliden wirken diese abschreckend (Agrawal et al., 2012; MALCOLM, 1991). Nicht nur der bittere Geschmack wirkt abschreckend, sondern auch die auffällige Färbung der Tiere (Bowers 1993) (Abbildung 1.3). Auch im Monarchfalter kann der Zusammenhang zwischen Aposematismus und Cardenolidsequestration gezogen werden (Blount et al. 2021). Der Falter fungiert auch als Modelbeispiel für Sequestration. Die Larve als

auch der adulte Schmetterling können die Cardenolide aus den Wirtspflanzen (Gattung *Asclepias*) generieren und im Körper anreichern und zur eigenen Verteidigung verwenden, auch wenn der Falter keine Wehrdrüsen besitzt (Malcolm and Brower 1989). Sequestration konnte in verschiedenen Insektenordnungen (Agrawal et al., 2012) unter anderem bei Blattkäfern innerhalb der *Chrysochus*-Arten nachgewiesen werden (Dobler, Daloz, and Jacques M Pasteels 1998; Kowalski et al. 2020). Dennoch sind die genauen Transportwege und Mechanismen nicht vollständig entschlüsselt (Beran and Petschenka 2022; Petschenka and Agrawal 2016).

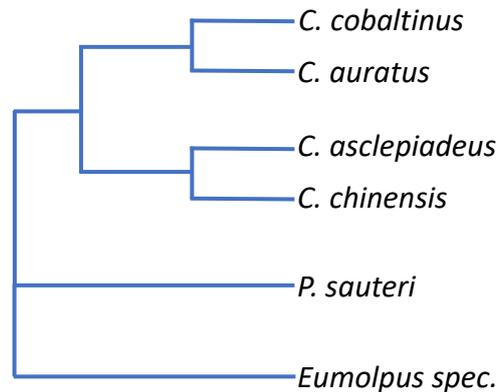


**Abbildung 1.3:** Habitatfoto eines *Platycorynus peregrinus*, Chrysomelidae, Eumolpinea, auf einer *Calotropis*-Art. Gezeigt ist ein *P. peregrinus* Blattkäfer mit deutlicher Signalfärbung, was auf Cardenolide in der Nahrung hindeutet (Fotoquelle: Susanne Dobler).

### 1.3 *Chrysochus* Blattkäfer (Eumolpinaea), Lopatin 1984

In der Gattung *Chrysochus* gibt es Arten (*C. auratus* und *C. cobaltinus*), die auf Cardenolid-haltigen Pflanzen fressen. Alle anderen Arten dieser Gattung ernähren sich von *Apocynaceae*, die keine Cardenolide enthalten (Labeyrie & Dobler, 2004). *C. auratus* ist monophag und ernährt sich von *Apocynum cannabinum*, während *C. cobaltinus* auf mindestens drei verschiedenen Arten (*Apocynum cannabinum*, *Asclepias speciosa* und *Asclepias eriocarpa*) frisst (Dobler & Farrell, 1999). Aus den genannten *Apocynaceae* können verschiedene Cardenolide isoliert werden, eines davon ist Cymaridin (Brower et al. 1984; Brower and Glazier 1975; Cohen and Brower 1983; Golab et al. 1959). Der in Europa

beheimatete *C. asclepiadeus* frisst auf *Vincetoxicum spp.* und anderen *Apocynaceae*, welche keine Cardenolide enthalten (Dobler et al., 1998). Blattkäfer der Gattungen *Chrysochares* (Lopatain, 1963) und *Platycorynus* aus der paläarktischen und orientalischen Region bilden die nächsten Verwandten zu den *Chrysochus* (Dobler 2004). *Chrysochares* und *Platycorynus* fressen auch auf *Apocynaceae*, die sowohl Cardenolide enthalten können als auch nicht (Jolivet and Verma 2008; Estelle Labeyrie and Dobler 2004). *Platycorynus peregrinus* aus Asien frisst auf *Calotropis procera* (Jolivet and Verma 2008)(Abbildung 1.3). Wie der Name schon verrät, kann unter anderem das Cardenolid Calotropin aus *Calotropis*-Arten (*Calotropis procera*, *Calotropis gigantia*) isoliert werden (Züst et al. 2019). Darüber hinaus kann Calotropin auch aus dem Monarchfalter gewonnen werden (Brower et al. 1984). Bisher gibt es jedoch noch keine detaillierten Studien zu möglichen Anpassungen an Cardenolide in der Ernährung von *Chrysochares*-Arten und *Platycorynus*-Arten (Jolivet and Verma 2008), dennoch lässt die auffällige Färbung die Fähigkeit zur Sequestration von Cardenoliden vermuten (Abbildung 1.3). Die nordamerikanischen *Chrysochus*-Käfer zeigen ebenfalls eine markante Färbung: *C. auratus* ist metallisch goldgrün und *C. cobaltinus* metallisch kobaltblau (Peterson et al. 2001). Auch der *C. asclepiadeus* ist blau gefärbt, wie der deutsche Arname "blauer Schwalbenwurzkafer" verrät. Phylogenetische Untersuchungen der mtDNA zeigen, dass die beiden nordamerikanischen Arten jeweils eine monophyletische Gruppe bilden und Schwesterarten zu den in Eurasien beheimateten *C. asclepiadeus* und *C. chinensis* sind. Als nächste Verwandte zu den *Chrysochus*-Arten wurde *Platycorynus sauteri* untersucht, und als Außengruppe dient ein unidentifizierter *Eumolpus spec.* aus Südamerika, (Abbildung 1.4) (Dobler & Farrell, 1999). Die *Chrysochus*-Arten (*C. auratus*, *C. cobaltinus* und *C. asclepiadeus*) besitzen zwei Isoformen der Na,K-ATPase (Dobler 2004; Labeyrie and Dobler 2004; Susanne Dobler unveröffentlichte Daten). Eine Isoform besitzt die ursprüngliche Aminosäureabfolge, und die andere besitzt Aminosäuresubstitutionen, die dem Monarchfalter ähnlich sind (Matthew L. Aardema et al. 2012; Estelle Labeyrie and Dobler 2004). Bisher ist nur bekannt, dass *P. sauteri* und der *C. chinensis* die ursprüngliche Na,K-ATPase-Isoform besitzen (Labeyrie & Dobler, 2004), möglicherweise blieb aber die resistente Kopie bisher unentdeckt. Es ist nicht eindeutig, ob sich die Anpassung an Cardenolide in *Chrysochus* durch den Wirtwechsel auf *Apocynaceae* mit Cardenoliden in den nordamerikanischen Arten entwickelt hat oder ob die eurasischen Arten die Fähigkeit zur Sequestration verloren haben, da sie keine Cardenolide in ihrer Nahrung ausgesetzt sind.



**Abbildung 1.4: Stark vereinfachter Parsimonius Stammbaum der *Chrysochus* Arten.** Dargestellt ist ein Parsimonius Stammbaum der mtDNA von den *Chrysochus* Arten, den nächsten Verwandten *Platycorynus* (*P. sauteri*) und *Eumolpus* als Außengruppe.(Labeyrie & Dobler, 2004)

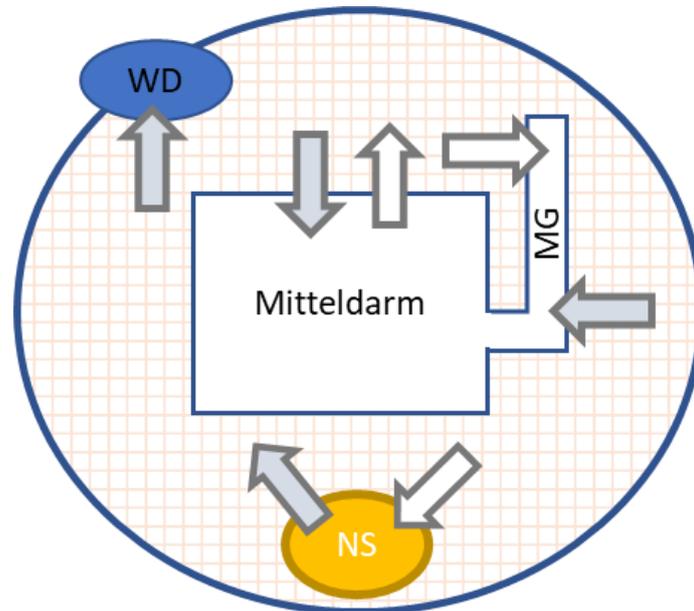
Neben der angepassten Na,K-ATPase können die beiden nordamerikanischen *Chrysochus*-Arten die Cardenolide sequestrieren (Dobler, Dalozé, and Jacques M Pasteels 1998; Kowalski et al. 2020). Bei der Sequestration müssen mehrere Hürden überwunden werden: Verhinderung der Selbstvergiftung (selektive Exkretion über die Malpighischen Gefäße und/oder selektiver endogener Metabolismus), Selektion des sekundären Stoffes (Aufnahme über den Darm) sowie die Aufnahme, der Transport und die Lagerung des Stoffes (Beran and Petschenka 2022; Duffey 1980; Opitz and Müller 2009). Es ist auch noch nicht gänzlich geklärt, ob der Transport, sowie die Einlagerung passiv oder aktiv geschieht (Dobler, Petschenka, and Pankoke 2011). Untersuchungen der Wehrsekrete der drei *Chrysochus*-Arten zeigten, dass *C. auratus* und *C. cobaltinus* Cardenolide enthalten, wobei im *C. asclepiadeus* ein Mix von verschiedenen Aminosäuren und anderen autogenen Produkten vorhanden ist (Dobler et al., 1998). Es konnten nur sehr geringe Cardenolidkonzentrationen im Körper des *C. asclepiadeus* nachgewiesen werden (Dobler et al., 1998). Auch wenn das Wehrsekret des *C. asclepiadeus* nicht giftig ist, besitzt es einen abwehrenden bitteren Geschmack (Dobler et al., 1998). Kommt es zu einem Angriff, gibt der *C. asclepiadeus* das Wehrsekret über kleine Poren über den gesamten Bereich des Pronotums und der Elytren ab. Bei den nordamerikanischen Vertretern wird es nur an den Seiten des Pronotums und der Elytren abgegeben. Außerdem entlässt *C. asclepiadeus* die dreifache Menge an Wehrsekret im Vergleich zu den nordamerikanischen *Chrysochus* Arten (Dobler et al., 1998). Weiterführende Versuche mit radioaktiv markierten

Ouabain sollten die Sequestrationskompetenz der Käfer prüfen. Das H<sup>3</sup>-Ouabain konnte im *C. cobaltinus* in der Hämolymphe und im Wehrsekret nachgewiesen werden, währenddessen es in *C. asclepiadeus* überwiegend im Kot detektiert wurde (Dobler, 2004). Ouabain ist ein polares Cardenolid und kann nur aktiv über das Darmepithel in die Wehrdrüsen transportiert werden. Das bedeutet, dass das Darmepithel des *C. cobaltinus* selektiv durchlässig für Ouabain ist, während der Darm des *C. asclepiadeus* undurchlässig sein könnte oder dass Ouabain aktiv über die Exkretionsorgane oder den Darm exkretiert werden müsste. Dies könnte ein Hinweis auf die Anpassung nordamerikanischer *Chrysochus*-Arten an Cardenolide sein. Die Permeabilität des Darmes gegenüber Cardenoliden wurde auch bei der sequestrierenden Milkrautwanze (*Oncopeltus fasciatus*) nachgewiesen (Scudder and Meredith 1982). Bei dieser Wanze wurden zwei Cardenolide mit verschiedenen physiochemischen Eigenschaften getestet: das polare Ouabain und das unpolare Digitoxin. Es stellte sich heraus, dass Ouabain langsamer als Digitoxin in der Hämolymphe nachgewiesen wurde, sich jedoch in hohen Konzentrationen im Wehrsekret befand, während Digitoxin in hohen Konzentrationen in der Hämolymphe vorkam (Scudder and Meredith 1982). Das in der Hämolymphe angesammelte Digitoxin wurde über die Malpighischen Gefäße ausgeschieden (Meredith et al. 1984). Die Forscher: innen vermuteten, dass der Transport der Cardenolide passiv erfolgt und dass unpolare Cardenolide bevorzugt werden. Obwohl die Fähigkeit zur Sequestration in einigen Insektenarten bekannt ist, gibt es noch wenig detaillierte Kenntnisse über die Evolution der Sequestration, sowie über die Transportmechanismen im Verdauungssystem zu den Wehrdrüsen und/oder den Schutz vor Selbstvergiftung (Abbildung 1.5) (Beran and Petschenka 2022; Petschenka and Agrawal 2016). Die einfachste Methode, sich gegen in der Nahrung enthaltene Cardenolide zu schützen, besteht darin, einen undurchlässigen Darm zu haben (Scudder and Meredith 1982), obwohl lipophile Cardenolide durch ihre passive Diffusion immer noch eine größere Gefahr darstellen können. Die Exkretion von unpolaren Cardenoliden wie Digoxin oder Digitoxin sind ebenfalls Hinweise auf einen selektiven Transportmechanismus zwischen Hämolymphe und Malpighischen Gefäßen (Meredith et al. 1984).

Vielversprechende Transporterproteine könnten Proteine aus der ATP-Binding-Cassette Proteinsuperfamilie (ABC-Transporterproteine) sein, insbesondere aus der Unterfamilie A, B, C und G (weitere Details zu den Transporterproteinen im Absatz 1.4) (Dermauw and Van Leeuwen 2014; Kowalski et al. 2020). Ein Signal für den Pgp (humanen-ABCB1)-spezifischen

Antikörper C219 konnte im Epithelgewebe des Mitteldarms des Oleanderschwärmers (*D. nerii*) und des Kartoffelkäfers (*L. decemlineata*) lokalisiert werden (Dobler et al. 2015). In dem Wehrsekret der Milchkrautwanze konnten ABCB-Transporter auch mit dem C219-Antikörper nachgewiesen werden (Dissertation Fee Meinzer, in Bearbeitung). Die Arbeitsgruppe Strauss et al. konnte erstmals einen Transporter der ATP-Binde-Cassette Proteinsuperfamilie (ABCC) im Zusammenhang mit der Sequestration im Blattkäfer *Chrysomela populi* identifizieren (Strauss et al. 2013). Später konnten in *C. auratus* drei verschiedene ABCB-Transporterproteine (ABCB1-3) nachgewiesen werden, und eine Interaktion mit Cardenoliden nachgewiesen werden. Der adulte Käfer ist in der Lage, polare und apolare Cardenolide zu sequestrieren (Kowalski et al. 2020). *CauABCB1* (*C. auratus*) und ABCB2 sind stark im Nervensystem exprimiert, und ABCB2 hat seinen Hauptexpressionsort in den Eyltren (wo sich die Wehrdrüsen befinden) und wird durch das in der Wirtspflanze vorhandene Cardenolid Cymaridin stimuliert. *CauABCB3* wird am stärksten im Verdauungstrakt exprimiert (Kowalski et al. 2020). Alle drei Proteine wurden in Insektenzellen überexprimiert, und das Substratspektrum wurde über einen ATPase-Assay bestimmt. Dabei interagieren ABCB1 und ABCB2 mit Digoxin, was eine Schutzfunktion des Nervensystems innerhalb der Hämolymphe vermuten lässt. Darüber hinaus scheint ABCB2 spezifisch Cymaridin in die Wehrdrüsen des Käfers zu transportieren. Alle drei ABCB-Proteine werden von Calotropin stimuliert (Kowalski et al. 2020). Calotropin ist ein Cardenolid, das in den Wirtspflanzen der nächsten Verwandten der *Chrysochus*-Arten vorhanden ist und einen XlogP-Wert von 0,9 hat (Herbertz, Dobler, and Lohr 2021; Züst et al. 2019). Für nicht adaptierte Tiere ist die in den Pflanzen vorhandene Cardenolidkonzentration relativ toxisch, wobei apolare Cardenolide einen stärkeren Einfluss auf die Tiere haben als polare Cardenolide (Akhtar and Isman 2004; Groen et al. 2017; Karowe and Golston 2006). Dies liegt vor allem daran, dass sie passiv über die Membranen diffundieren können und damit unkontrolliert in die Hämolymphe übergehen können und relativ weit in sensibles Gewebe vordringen können. Wie zuvor beschrieben, wird das Nervengewebe des Käfers von Hämolymphe umgeben und dort könnten sie das lebenswichtige Enzym Na,K-ATPase blockieren. Bisher ist nicht bekannt, wie viele ABCB-Transporter die nicht an Cardenolide-angepasste Käferart *C. asclepiadeus* besitzt. Es konnte bisher mit den ABCB-RT-PCR-Primern des *C. auratus* mittels PCR "ABCB2" sehr schwach in den Malpighischen Gefäßen und im Darm des Käfers detektiert werden (Baum 2016). Daher sollen in dieser Arbeit die ABCB-Transporter über bioinformatische und

molekularbiologische Methoden in *C. asclepideus* nachgewiesen und charakterisiert werden, näheres dazu im Absatz Zielsetzung.



**Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des möglichen Cardenolidtransports in *Chrysochus*-Arten im Nervensystem und im Mitteldarm mit Malpighischen Gefäßen.** Die über die Nahrung aufgenommenen Cardenolide können, wenn sie unpolar (Digoxin) sind, passiv die Darmwand durchqueren und in die Hämolymphe gelangen (orangenes Gitter) und bis ins Nervensystem (NS) vordringen (weißer Pfeil). Sind die Cardenolide polar (Ouabain), müssen sie aktiv mittels Efflux-Transporter über die Membranen transportiert werden (grauer Pfeil). Die Cardenolide können in den Wehrdrüsen (WD) gespeichert oder über die Malpighischen Gefäße (MG) ausgeschieden werden. Verändert nach (Anurag A. Agrawal et al. 2012; Baum 2016).

#### 1.4 ABC-Transporter: Allgemein, Architektur und Transportzyklus

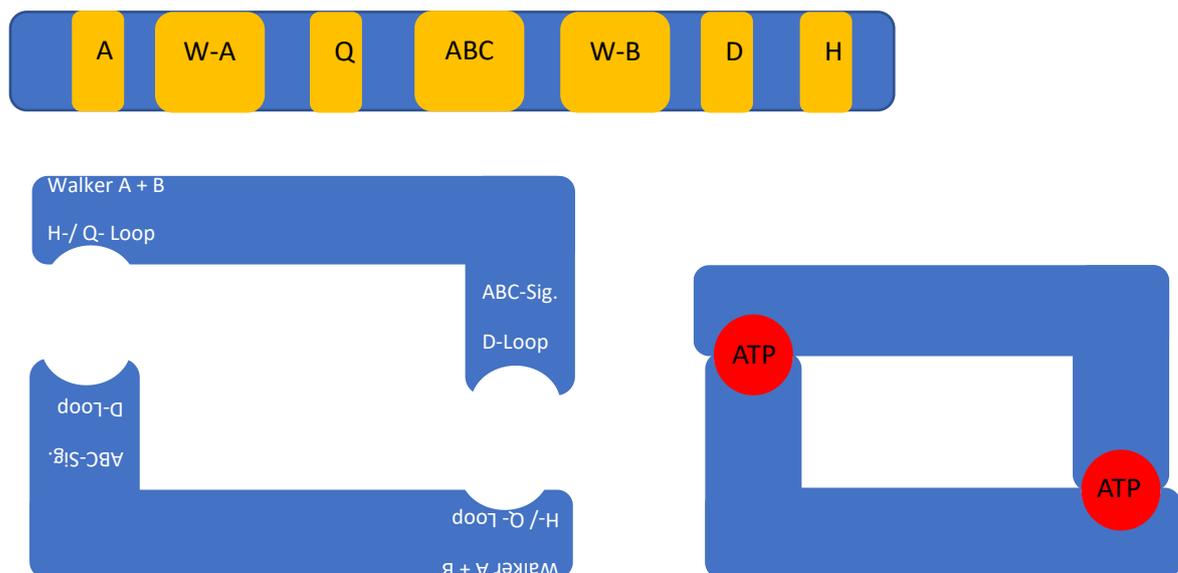
Alle Zellen und weiteren Organellen sind durch Lipidmembranen vom äußeren Milieu getrennt, daher sind Transporter unabdingbar für das Überleben der Zellen (Higgins 1992). Die ABC (ATP-Binding-Cassette) Proteinfamilie ist eine der größten Vertreter der Membranproteine und kommt in allen Bereichen des Lebens vor (Dermauw & Van Leeuwen, 2014). Typischerweise verbrauchen die ABC-Transporter ATP (Adenosintriphosphat), um Substrate entgegen dem Konzentrationsgradienten durch die Membran zu pumpen. Dabei können ABC-Transporter Substrate in die Zellen (Import) oder aus den Zellen (Efflux) schleusen. Bisher wurden noch keine ABC-Transporter identifiziert, die in beide Richtungen agieren (Higgins 1992; Loo and Clarke 2008). Eukaryotische ABC-Transporter koordinieren dabei nur den Transport aus der Zelle oder in andere Organellen, während prokaryotische

ABC-Transporter sowohl als Import- als auch als Efflux-Transporter dienen können (Dermauw & Van Leeuwen, 2014).

ABC-Transporter haben eine charakteristische Architektur, die aus vier Domänen besteht: zwei zytosolische Nukleotidbindedomänen (NBD), an denen das ATP bindet und hydrolysiert wird, sowie zwei integrale Transmembrandomänen (TMD) (Dermauw & Van Leeuwen, 2014; Higgins, 1992; Rees et al., 2009) (Abbildung 1.7a). Volltransporter werden als ABC-Transporter mit allen vier Domänen mit der Domänenorganisation von TMD-NBD-TMD-NBD oder NBD-TMD-NBD-TMD bezeichnet (Abbildung 1.7a). Halbtransporter bestehen aus einer TMD und einer NBD mit der Struktur TMD-NBD oder NBD-TMD (Higgins 1992, 2001; Rees et al. 2009). Die Proteinsuperfamilie teilt sich in neun Unterfamilien A-I auf, wobei die Zuordnung auf stark konservierte Sequenzen innerhalb der NBD basiert (Denecke et al., 2021; Dermauw & Van Leeuwen, 2014; Figueira-Mansur et al., 2020; Merzendorfer, 2014). Die Unterfamilie B besteht aus Halbtransporter (TMD-NBD) sowie Volltransporter (TMD-NBD-TMD-NBD) (Dermauw & Van Leeuwen, 2014). Die Unterfamilien A und C besitzt ausschließlich Volltransporter mit der Struktur TMD-NBD-TMD-NBD (Merzendorfer 2014). In der Unterfamilie G gibt es Halb- und Volltransporter mit der Organisation NBD-TMD und NBD-TMD-NBD-TMD (Xiong et al. 2015). Die Unterfamilie D besteht aus stark konservierten Halbtransportern, die funktionsfähige Heterodimere bilden (Wu et al. 2019). Die jüngst entdeckte Unterfamilie I besteht aus einer einzelnen NBD und ist bei der DNA-Reparatur sowie bei der Aufrechterhaltung der Chromosomenstruktur beteiligt und konnte bisher nur in *Anopheles* nachgewiesen werden (Figueira-Mansur et al. 2020). Auch Proteine der Unterfamilien ABCE und F agieren nicht als Transporterproteine, da sie nicht membranassoziiert sind (Theodoulou and Kerr 2015). Sie besitzen keine TMD und sind lösliche Proteine, die bei der Proteinbiosynthese beteiligt sind (Merzendorfer 2014; Xiong et al. 2015). Mitglieder der Unterfamilien A, B, C und G spielen eine Rolle beim Transport von Xenobiotika (Dermauw & Van Leeuwen, 2014). Bei ABCD Proteinen konnte eine Transportfähigkeit zu Peroxisomen nachgewiesen werden (Morita and Imanaka 2012). ABCH Proteine konnten bisher nur bei Arthropoden und im Zebrafisch nachgewiesen werden (Dean, Moitra, and Allikmets 2022; Popovic et al. 2013).

In der NBD befinden sich konservierte Sequenzen, darunter das Walker A Motiv (GXXGXGK(S/T)), das Walker-B-Motiv (XXXXD), die A-, Q-, D-(SALD)-, P- und H-Loop sowie die ABC-Signatur (LSGGQ) (Dermauw and Van Leeuwen 2014; Rees et al. 2009; Zolnerciks et al. 2011). Der D-, H- und Q-Loop sowie die ABC-Signatur sind signifikant für die ABC-Superfamilie

(Linton 2007). Das Walker A Motiv verbindet die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphatasen der Nukleotide. Das Walker B Motiv besteht hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren und koordiniert das Wassermolekül, das für die Hydrolyse von ATP benötigt wird. Der A-Loop interagiert mit dem Adeninring des ATPs (Kim et al. 2006). Der D-Loop bildet die Verbindung zwischen den NBD-Dimeren. Durch den Q-Loop wird die Verbindung zwischen den NBD und der TMD hergestellt. Der H-Loop bildet die Struktur der Domänen im prähydrolytischen Zustand (Merzendorfer 2014). Die NBD dimerisieren dabei in einer "head-to-tail"-Orientierung, (Abbildung 1.6 links) (Merzendorfer 2014; Sarkadi et al. 2006). Mutationen in diesen Motiven führen dazu, dass kein ATP gebunden werden kann (Zolnerciks et al. 2011). Für die Organisation der verschiedenen konservierten Bereiche der NBD und die Bildung eines NBD-Dimers (Abbildung 1.6).

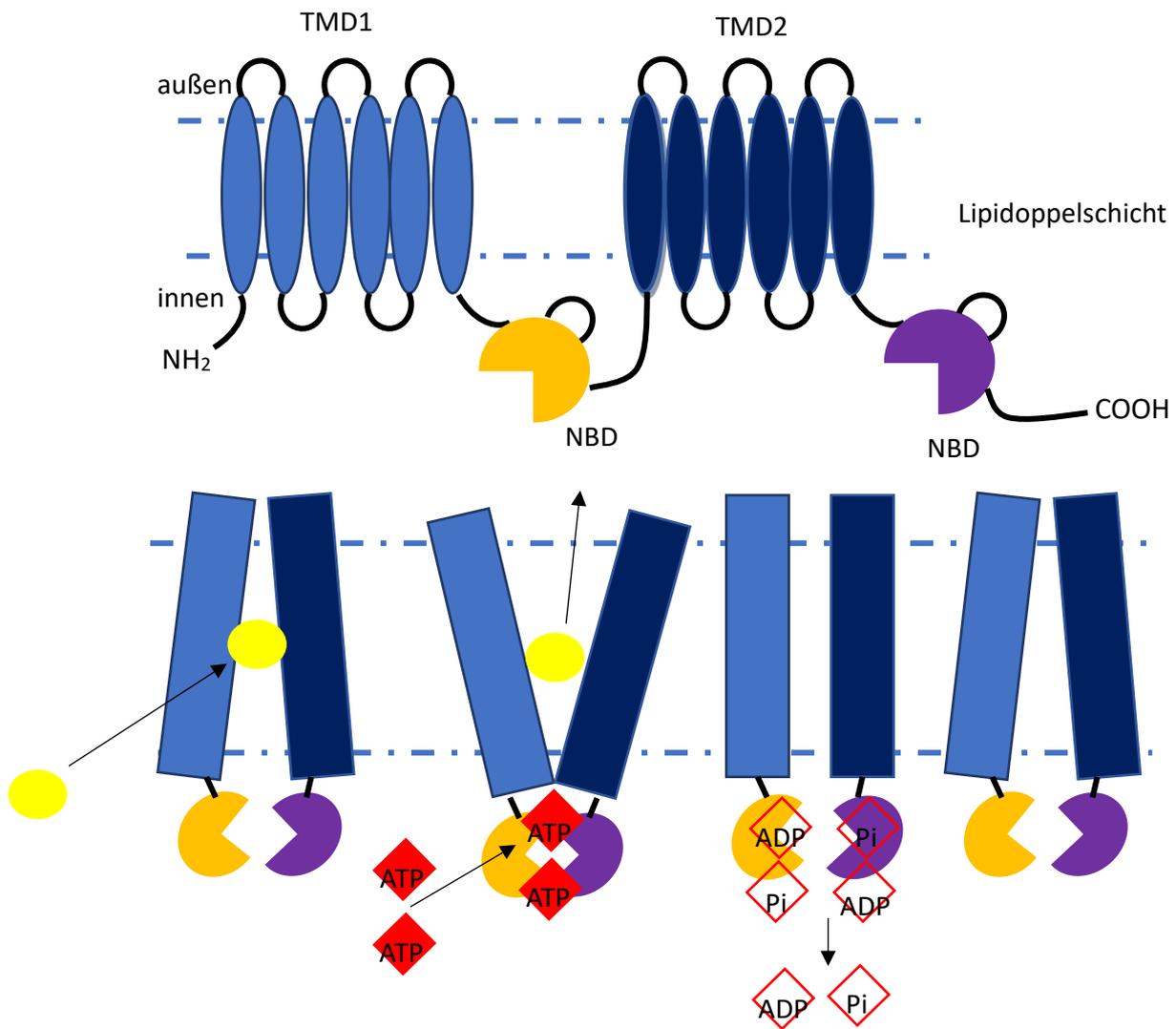


**Abbildung 1.6. Schematische Darstellung der Domänenorganisation und die monomeren NBDs mit den konservierten Bereichen sowie das NBD-Dimer verbunden über ATP.** Gezeigt ist die schematische Darstellung der Domänenabfolge der verschiedenen konservierten Sequenzen (Walker A (W-A) und B (W-B) Motiv, A-, H-, Q-, D-Loop, sowie die ABC Signatur (oben). Die NBD mit den konservierten Bereichen als Monomer (links) und die Dimerisierung der beiden Monomere über ATP (rechts) (verändert nach (Merzendorfer 2014).

Die TMD besteht aus mehreren (5-8) membranüberspannenden  $\alpha$ -Helices und bestimmt die Substratspezifität (Ter Beek, Guskov, and Slotboom 2014; Higgins 1992, 2001; Rees et al. 2009). Die Sequenzen der TMDs sind im Vergleich zu den NBDs relativ variabel und spiegeln damit auch das breite Substratspektrum wieder (Ter Beek et al. 2014). Die

Substratbindungsstelle kann zur extrazellulären oder intrazellulären Seite der Membran liegen (Rees et al. 2009). Halbtransporter müssen Heterodimere oder Homodimere bilden, um funktionsfähig zu werden (Higgins 1992, 2001; Rees et al. 2009; Theodoulou and Kerr 2015). Näheres zur Organisation der TMD-Bindetasche und zum Substratspektrum wird im Absatz 1.4.1, Unterfamilie ABCB, beschrieben.

Zurzeit wird das ATP-Switch-Modell (Abbildung 1.7b) für den Transportzyklus favorisiert. Der Transportmechanismus besteht aus vier verschiedenen Schritten. Initiiert wird der Zyklus durch das Binden des Substrats an die Bindetasche der TMD (1). Durch die Bindung des Substrats verändert sich die Affinität der NBD gegenüber ATP. Das ATP bindet und das NBD-Dimer bildet sich, was zu einer Konformationsänderung der TMD führt. Durch diese Konformationsänderung wird das Substrat freigegeben (Efflux) (2). Im dritten Schritt hydrolysiert das ATP und der geschlossene NBD-Dimer öffnet sich wieder. Im finalen Schritt geht der Transporter in seinen Ausgangszustand über (Dermauw and Van Leeuwen 2014; Linton 2007; Zolnerciks et al. 2011).



**Abbildung 1.7: Darstellung eines ABC Volltransporters und des ATP- Switch Transportzyklus.** Gezeigt wird ein ABC Volltransporter blau: TMD1 mit den 6  $\alpha$ -Helices, rot: NBD1, gelb: TMD2 mit den 6  $\alpha$  Helices, grün: NBD2 B) schematische Darstellung des ATP-switch Modells 1) Bindung des Substrats an die TMD 2) Veränderung der Affinität der NBDs und Bindung von ATP und NBDs, weitere Konformationsänderung des Proteins führt zur Freilassung des Substrats in den extrazellulären Raum 3) Hydrolyse des ATP zu ADP und anorganischen Phosphat (Pi) und Auflösung des NBD- Dimers 4) Transporter befindet sich im Ausgangszustand (Dermauw and Van Leeuwen 2014; Linton 2007).

Obwohl Arthropoden zu einem der artenreichsten Taxa gehören, ist im Vergleich zu Säugetieren und Bakterien wenig über die ABC-Proteinsuperfamilien bekannt (Denecke et al. 2021). Dabei bietet dieses Taxon aufgrund seiner Artenvielfalt die Chance, grundlegende Erkenntnisse über die Evolution zu gewinnen (Saier et al. 2021). Innerhalb der Arthropoden gibt es viele Schädlinge, die einen enormen Einfluss auf die Agrarwirtschaft haben (Buss and Callaghan 2008). In der Landwirtschaft werden verschiedene Giftstoffe als Schädlingsbekämpfungsmittel eingesetzt (Merzendorfer 2014), wobei vor allem die

Unterfamilien A, B, C und G für den Transport dieser xenobiotischen Mittel verantwortlich sind (Dermauw & Van Leeuwen, 2014). In den letzten Jahren konnten dank der Weiterentwicklung der Sequenzierungstechnologie immer mehr Arthropodengenome sequenziert und annotiert werden (Merzendorfer 2014). Dabei variiert die Anzahl der ABC-Gene je nach Art stark: Die menschliche Körperlaus besitzt beispielsweise 40 ABC-Gene, während die Spinnenmilbe 104 besitzt, die sich alle in die Unterfamilien A bis H einteilen lassen (Merzendorfer 2014). Die Identifizierung verschiedener ABC-Proteine in einem Genom/Transkriptom wurde durch die Entwicklung des ABC-Scans für Arthropoden erleichtert (Denecke et al. 2021). Der ABC-Scan ist eine Pipeline, die es ermöglicht, aus Proteomen mögliche ABC-Sequenzen zu identifizieren. Die Arbeitsgruppe Denecke et al. hat über 150 verschiedene Arthropodenspezies auf ihre ABC-Proteine mit dem Hidden-Markov-Modell (HMM) untersucht (Denecke et al. 2021). Allgemein ist zu sagen, dass ABC-Transporter bei Stoffwechselwegen von giftigen Metaboliten oder deren Zwischenprodukten beteiligt sind, sei es beim Transport oder bei der Ausscheidung (Barve et al. 2022). Kowalski et al. (2020) konnten bei *C. auratus* die Beteiligung von ABCB-Proteinen am Transport von apolaren und polaren Cardenoliden nachweisen, weshalb hier weiter auf die Unterfamilie B eingegangen wird.

#### 1.4.1 Unterfamilie B:

Diese Unterfamilie ist die am besten erforschte Familie der ABC-Proteine. Das liegt vor allem daran, dass der humane ABCB1 eine wichtige Rolle bei der Aufnahme und Ausscheidung von Medikamenten und/oder bei der Resistenz gegenüber Chemotherapien spielt. Aufgrund dieser Zusammenhänge werden diese Proteine auch als MDRs (*multidrug resistance proteins*) oder P-gps (*permeability glycoproteins*) bezeichnet (Dermauw and Van Leeuwen 2014; Editor n.d.; Merzendorfer 2014; Sarkadi et al. 2006). Die ABCB-Proteine bestehen aus Voll- und Halbtransportern (Dermauw & Van Leeuwen, 2014) mit der Domänenreihenfolge TMD-NBD-TMD-NBD für Volltransporter und TMD-NBD für Halbtransporter (Higgins 1992, 2001; Rees et al. 2009; Xiong et al. 2015). Phylogenetische Analysen der ABCB-Volltransporter von *D.puplex*, *H.sapiens*, *T.urticae* sowie von Insekten (*D. melanogaster*, *T. castaneum*, *A. gambia*, *A.mellifera*) zeigen eine frühe Aufspaltung der monophyletischen Gruppen durch stammbaumabhängige Genduplikation (Denecke et al. 2021; Dermauw and Van Leeuwen 2014; Sturm, Cunningham und Dean 2009). Anders verhält es sich bei den Halbtransportern, wo Ontologien zwischen den humanen ABCB-Halbtransportern und Arthropoden gefunden

wurden (Dermauw & Van Leeuwen, 2014; Merzendorfer, 2014). Die humanen Halbtransporter (HsABCB6-8 und 10) bilden Dimere mit verschiedenen Funktionen (Merzendorfer 2014). Sie stehen im Zusammenhang mit oxidativem Stress, der Eisenhomeostase in Mitochondrien sowie Transportfunktionen von Giftstoffen (Dermauw & Van Leeuwen, 2014; Jin et al., 2020; Merzendorfer, 2014; Xiong et al., 2015; Zutz et al., 2009). Es gibt keine orthologen Proteine zu den humanen Halbtransportern ABCB2 und 3 in Arthropoden (Merzendorfer 2014). Diese Halbtransporter schützen Menschen vor viralen Infektionen und werden auch TAP1 und TAP2 (transporter associated antigen processing) genannt (Loo and Clarke 2008). Da Arthropoden kein adaptives Immunsystem wie Säugetiere besitzen, ist es nicht erstaunlich, dass keine orthologen Gene vorhanden sind (Merzendorfer 2014). Der humane Halbtransporter ABCB9 ist TAP ähnlich aber die genaue Funktion ist noch unbekannt (Merzendorfer 2014). Neben dem Transport von xenobiotischen Molekülen können diese Transporter auch neutrale bis kationische sowie amphiphile Substrate über die Membranen transportieren. Über Mutationsversuche und Photoaffinitäts-Markierungen konnte eine polyspezifische Bindungsmöglichkeit in den TMDs der ABCB-Transporter nachgewiesen werden (Loo and Clarke 2008). Die Bindungsmöglichkeiten beruhen auf den Eigenschaften der R-Site (Rhodamin 123-Bindeseite), der H-Site (Hoechst 33342-Bindeseite) und der M-Site (Modulations-Bindeseite) innerhalb der Domänen (Loo and Clarke 2008, 2015). Die Arbeitsgruppe Aller et al. konnte die Kristallstruktur des ABCB1-Transporters aus der Maus gewinnen. Dieser ist zu 87% identisch mit dem des Menschen (Aller et al. 2009). Durch verschiedene Inhibitoren und Mutationsversuche innerhalb der TMDs konnten Aminosäuren identifiziert werden, die an der Substratbindung beteiligt sind (Aller et al. 2009; Tip W Loo, Bartlett, and Clarke 2006; Loo and Clarke 2008). Die Aminosäuren Ile306, Phe336, Ile340, Phe343, Phe728, Phe942, Thr945, Leu975 und Val982 innerhalb der Bindetasche des ABCB1-Transporters der Maus sind bei der Substratbindung beteiligt und stehen in Zusammenhang mit der Interaktion von Cardenoliden (Aller et al. 2009; Gozalpour et al. 2013). Anfang der 90er Jahre identifizierte die Arbeitsgruppe Wu et al. zwei dem humanen MDRs orthologe Gene in der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) (MDR 49 und MDR 65), die später durch Gerrad et al. um Dme MDR 50 erweitert wurden (Gerrard, Stewart, and Dean 1993; Wu et al. 1991). Bei späteren in vivo Experimenten der drei MDR-Gene konnten diese in Zusammenhang mit Cardenoliden gesetzt werden. Dabei stellte sich heraus, dass die in der Pflanze natürlich vorkommende Cardenolidkonzentration für nicht adaptierte

*Drosophila*-Stämme relativ toxisch sind und dass apolare Cardenolide einen höheren Schaden anrichten als polare. Außerdem weist der MDR-knockout-Stamm gegenüber dem Wildtyp eine kürzere Lebensspanne auf (Groen et al., 2017).

Der Pgp-spezifische Antikörper C219 (humaner ABCB1) bindet an stark konservierte Bereiche innerhalb der ABCB-Transporter (van Den Elsen et al. 1999). In verschiedenen Geweben des Oleanderschwärmers, im Mitteldarm des Kartoffelkäfers und im Wehrsekret der Milchkrautwanze konnten ABCB-Proteine nachgewiesen werden (siehe dazu auch Absatz 1.3). Der eindeutigste Beweis dafür, dass ABCB-Transporter auch Cardenolide transportieren können, konnte von Kowalski et al. 2020 im Blattkäfer *C. auratus* nachgewiesen werden. Der Käfer besitzt drei ABCB-Proteine (ABCB1-3). Der ABCB2-Transporter wird am stärksten in den Elytren exprimiert (Lokalisation der Wehrdrüsen) und wird von Cymaridin (einem Cardenolid der Wirtspflanze) stimuliert.

### 1.5 Zielsetzung

Innerhalb der Gattung *Chrysochus* gibt es Vertreter, die sich von Pflanzen ernähren, die Cardenolide enthalten, und in der Lage sind, diese Giftstoffe im Körper aufzunehmen und zu speichern (Sequestration). Der in Europa heimische *C. asclepiadeus* frisst hingegen auf Pflanzen, die keine Cardenolide enthalten, und scheidet die polaren Cardenolide größtenteils über den Kot wieder aus, dies könnte auf eine veränderte Darmpermeabilität hinweisen. Die bisher untersuchten *Chrysochus*-Arten besitzen zwei Isoformen der Na, K-ATPase, eine sensitive und eine weniger sensitive Form. Daher spielen Mechanismen, die die Resorption von Cardenoliden im Darm beeinflussen, eine bedeutende Rolle bei der Evolution der Sequestration. ABCB-Transporter werden normalerweise mit der Giftanpassung von Herbivoren in Verbindung gebracht. Daher soll in dieser Arbeit untersucht werden, wie viele ABCB-Transporter im nicht adaptierten *C. asclepiadeus* vorhanden sind (i). Dazu wird das Transkriptom von *C. asclepiadeus* mit verschiedenen bioinformatischen Methoden analysiert, um ABCB-Transporter zu identifizieren. Anschließend werden die identifizierten ABCB-Transporter mit molekularbiologischen Methoden charakterisiert. Die Gewebe-spezifische Genexpression der ABCB-Transporter wird mittels quantitativer *real-time*-PCR bestimmt (ii). Falls die verschiedenen ABCB-Transporter ein Gewebe-spezifisches Expressionsmuster aufweisen, könnte dies auf eine funktionale Genduplikation (neofunktionale oder subfunktionale Genduplikation) hindeuten. Für die

weitere Charakterisierung der Proteine sollen diese rekombinant exprimiert werden. Über das Bac-to-Bac-Expressionssystem wird ein rekombinanter Virus generiert, um das gewünschte Protein in Insektenzellen herzustellen. Die Expression der Proteine in den Insektenzellen wird mithilfe des Pgp-spezifischen monoklonalen Antikörpers C219 vorab überprüft. Eine weitere Prüfung des Proteins findet über den Western-Blot statt. Die Aktivität der isolierten ABCB-Proteine wird anschließend in Aktivitätsassays mit verschiedenen Substraten (Verapamil, Digoxin, Ouabain, Cymarin und Calotropin) bestimmt (iii). Der ATPase-Assay beruht darauf, dass das durch die ATP-Hydrolyse entstandene anorganische Phosphat photometrisch gemessen werden kann. Durch das Substratspektrum und das Erstellen von Homologie-Proteinalignments können die Bindetaschen der ABCB-Transporter analysiert und verglichen werden, um weitere Aminosäuren zu identifizieren, die am Cardenolidtransport beteiligt sein könnten. Abschließend sollen die Ergebnisse mit denen der Cardenolid-angepassten Art *C. auratus* verglichen werden, um Rückschlüsse auf mögliche Veränderung des ABCB-Transporterspektrum durch den Wechsel zu Cardenolid-haltigen Pflanzen zu ziehen und wie sich die Fähigkeit der Sequestration im Genus *Chrysochus* entwickelt haben könnte (iv).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Bioinformatische Methoden

#### 2.1.1 Transkriptomanalyse

##### 2.1.1.1 Transkriptom vom *C. asclepiadeus*

Das Transkriptom des *C. asclepiadeus* wurde von der Firma GENterprise Genomics mithilfe eines Illumina HiSeq2000-Sequenzierers erstellt. Es umfasst 250 Millionen Reads mit einer durchschnittlichen Länge von 300 bp und wurde über das Trinity-Assembly-Verfahren zusammengefügt. Das resultierende Transkriptom enthält 53.392 Fasta-Sequenzen (Susanne Dobler).

##### 2.1.1.2 Identifikation von Abcb-Genen mittels Blast-Suche

Mit Hilfe des NCBI Blast Programmpakets (blast 2.7.1+) (Ramsay et al. 2000) und den bekannten Abcb-Sequenzen des *Chrysochus auratus* (*Cau*) (Dissertation Michael Baum, 2016) wurde nach möglichen Abcb-Genen des *Chrysochus asclepiadeus* (*Casc*) in dessen Transkriptom gesucht. Dabei wurde die tblastx-Suche angewendet, da dieses Tool ermöglicht, die *Query* (Anfrage) als auch das Datenset (hier Transkriptom des *C. asclepiadeus*) von den Nukleotidsequenzen in die Proteinsequenzen und in alle möglichen Leserahmen zu übersetzen und einen blastp durchzuführen (Abbildung 2.1). Diese Blast-Suche bietet sich an, da Proteine eine sensitivere Vergleichbarkeit aufweisen als Nukleotidsequenzen. Außerdem ermöglicht der tblastx-Algorithmus einen sensitiveren Abgleich der Transkripte innerhalb des Transkriptoms, ohne die genaue Proteintranslation zu kennen. Die tblastx-Suche wurde mit einem E-Value von -20 durchgeführt, und es wurden nur Hits beibehalten, die einen E-Value von Null aufwiesen. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mittels des blastdbcmd-Blast-Befehls aus dem Datenset exportiert. Zur weiteren Kontrolle wurden diese Nukleotidsequenzen in das Alignment-Programm Sequencher importiert und mit den *C. auratus* Abcb-Sequenzen abgeglichen und auf ihre Vollständigkeit hin untersucht (Abbildung 2.2). Es stellte sich heraus, dass die *CascAbcb1*-Sequenz nicht vollständig von den Blast-Hits abgedeckt wurde (Abbildung 2.2b)

- a) C:\Program Files\NCBI\blast-2.7.1+\bin>tblastx -db lokale Blastdatenbank -query Sequenz der Anfrage/Abgleich -evalue 1e-20 -out Speicherort und Dateiname der Hits
- b) C:\Program Files\NCBI\blast-2.7.1+\bin\blastdbcmd -db lokale Blastdatenbank -entry Identifier der Blasthits -out Speicherort und Dateiname der Hits

**Abbildung 2.1: Eingabebefehle in Command für die Blastsuche.** Schematische Eingabe in Command für a) die lokale Blastsuche b) Exportieren der Blasthits.

**Tabelle 2.1 Blasthits aus dem *C. asclepiadeus* Transkriptom.** Aufgelistet sind die Blasthits mit der höchsten Abcb-Sequenz Ähnlichkeit und deren Sequenzlänge. C14789 steht für den Gencluster, g für Gen und das I für Isoform

Hit-Name	Sequenzlänge
c14789_g2_i1	1307
c19676_g1_i5	4391
c19676_g1_i1	4867
c19676_g1_i2	4928
c19676_g1_i4	2008
c19676_g1_i3	1677
c19553_g2_i4	1563
c19553_g2_i1	1638
c28097_g1_i1	870

#### 2.1.1.3 Vervollständigen der CascAbcb1-Sequenz mittels Mapping gegen die Rohdaten des *C. asclepiadeus* Transkriptom

Da der *CascAbcb1*-Transportergen nicht vollständig von den erhaltenen Blasthits abgedeckt worden ist, wurden die *CascAbcb1* Blasthits und die *CauAbcb1* Sequenz nochmal auf die Rohdaten des *C. asclepiadeus* Transkriptoms zugeordnet (*gemappt*). Dieses *Mapping* wurde mit verschiedenen bioinformatischen Protokollen über den *Galaxy-Server* der Universität Hamburg durchgeführt. Wurde nichts anderes beschrieben, wurde die voreingestellten Parameter, des jeweiligen Tools verwendet.

#### 2.1.1.4 Trimmen der Transkriptom Rohdaten

Verwendet wurde das *Trimmomatic flexibel trimming tool for Illumina NGS Data* (Galaxy Version 0.36.6). Es wurde der initiale ILLUMINACLIP Schritt verwendet und alle Vorabereinstellungen verwendet. Die Trimmomatic Optionen waren SLDINGWINDOW (number of bases to average across: 4, Average quality requier: 20) und MILEN (Minimum length of reads tob e kept: 75). Wenn nicht anders beschrieben, wurden die voreingestellten Parameter verwendet.

#### 2.1.1.5 Zusammensetzen der Blasthits von *CascAbcb1* mit *CauAbcb1*

Es wurden die Blasthits *c14789\_g2\_i1* und *c28097\_g1\_i1* mit der *CauAbcb1* Sequenz über das Concatenta dataset tail to head (cat) (Galaxy Version 0.1.0) Tool zu einem Datenset zusammengesetzt, sodass jede Sequenz einzeln gemappt wird, aber als eine Datei in den *Mapper* eingebracht werden konnte.

#### 2.1.1.6 Mapping der *Chrysochus Abcb1* Sequenzen gegen das *C. asclepiadeus* Transkriptom

Angewendet wurde der Bowtie2- *Mapper* (Galaxy Version 2.3.4.2). Dieser *Mapper* bot sich an, da er *ultrafast mappt*, als Ausgabe einen Bam-File generiert, der in *IGV* visualisiert werden kann und mit vielen Protokollen, die in Galaxy zur Verfügung stehen kompatibel ist. Als *Library* wurden die getrimmten Daten verwendet.

#### 2.1.1.7 Slicen der gemappten Reads

Um die Anzahl der *Reads* vorab zu reduzieren, wurde das Slice BAM by genomic region Tool (Galaxy Version 2.0.1) verwendet. Dadurch werden nur die gewünschten *Reads*, die zu den *Chrysochus Abcb* Sequenz passen aus dem BAM File gezogen. Genaue Auflistung der verwendeten Parameter siehe Bildschirmfoto im Anhang.

#### 2.1.1.8 Umschreiben der BAM-Datei in eine FASTA-Datei

Für nachfolgende *in silico* Bearbeitung der *Reads* muss die erhaltene BAM-Datei in eine FASTA-Datei umgeschrieben werden, dies wurde mit dem SamToFastq Tool (Galaxy Version 2.18.2.1) durchgeführt. Die erhaltenen *Reads* im FASTA-Format, können nun über einen *Assembler* zusammengefügt werden, sodass die *CascAbcb1* Sequenz vervollständigt werden konnte. Genaue Auflistung der verwendeten Parameter siehe Bildschirmfoto im Anhang.

#### 2.1.1.9 Assemblieren der erhaltenen Reads

Die *Reads*, die im FASTA- Format vorlagen, wurden über das *Trinity de novo assembly or RNA-Seq data* (Galaxy Version 2.8.4) zusammengesetzt. Durch den *Assembler* werden die *Reads* durch Sequenzalignments zu längeren Fragmenten zusammengefügt. Die erhaltenen assemblierten Fasta-Dateien wurden heruntergeladen und in Sequenzer abermals importiert

und mit der *CauAbcb1* Sequenz abgeglichen (Abbildung 2.1). Mit Hilfe des Programms Sequencher konnte die Consensus-Sequenz des *CascAbcb1* exportiert und als FASTA-Datei gespeichert werden.

#### 2.1.1.10 In silico Analyse der *C. asclepiadeus* ABCB-Sequenzen

Die bioinformatisch erhaltenen *C. asclepiadeus* Abcb Nukleotidsequenzen (Abcb1, Abcb2), wurden über das *Online-Tool Expasy*<sup>1</sup> in den Aminosäurecode übersetzt und mit zugehörigen Leserahmen angezeigt. Die aus dem *Open Reading Frame* (ORF) erhaltene Proteinsequenz wurde in das Online Tool Expasy Prosite<sup>2</sup> eingegeben. Expasy Prosite ermöglicht es die Proteinstruktur und das Vorhandensein der charakterlichen Domänen der ABC-Transporter (Transmembrandomäne und Nukleotidbindedomäne) zu ermitteln.

Die *in silico* generierten *C. asclepiadeus* Abcb1 und Abcb2 Sequenzen, dienen als Grundlage für die nachfolgenden molekularbiologischen Versuche und sollten auch mit beziehungsweise über diesen verifiziert werden.

#### 2.1.2 Primerdesign

Als Grundlage für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Primer (Klonierungsprimer, Sequenzierungsprimer, qRT-PCR-Primer) dienen die vorab *in silico* hergestellten *C. asclepiadeus* ABCB Nukleotidsequenzen. Generiert und geprüft wurden die Primer mit folgenden Programmen: Snap Gene Viewer und OligoCalc<sup>3</sup>. Für die Klonierung wurde das spezielle TAKARA Klonierungsprimer Tool verwendet<sup>4</sup>. Für die Expressionsanalyse mittels qRT-PCR ist entscheidend die Primerpaare so zu setzen, dass die Exon und Intron Regionen überspannen. Um dies gewährleisten zu können, dienen die qRT-PCR Primer des *C. auratus* als Vorlage (Kowalski et al. 2020). Es wurden zunächst die *Chrysochus* ABCB Gensequenzen in das Online Tool *Mafft*<sup>5</sup> eingelesen und miteinander aligniert, über die Suchfunktion wurden die Primersequenzen eingegeben, die gefundenen Primersequenzen wurden aus der *CascAbcb* Sequenz kopiert.

---

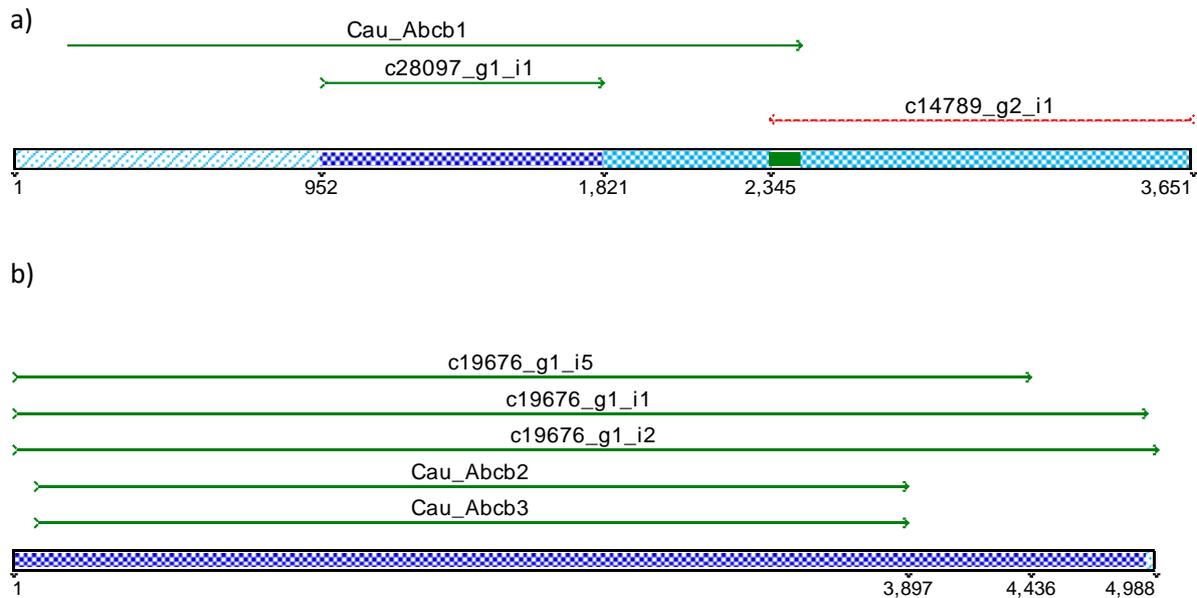
<sup>1</sup> <https://web.expasy.org/translate/> 13.10.2021

<sup>2</sup> <https://prosite.expasy.org/> 14.03.2022

<sup>3</sup> <http://biotoools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html> 13.10.2021

<sup>4</sup> [https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/primer-design-and-other-tools?gclid=CjwKCAjwh5qLBhALEiwAioods01j2f7rHuMpOy6xq0kmFxELRKvQdCj\\_4SzDxQCelrU-FOWxpW\\_rBoCq34QAvD\\_BwE](https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/primer-design-and-other-tools?gclid=CjwKCAjwh5qLBhALEiwAioods01j2f7rHuMpOy6xq0kmFxELRKvQdCj_4SzDxQCelrU-FOWxpW_rBoCq34QAvD_BwE) 13.10.2021

<sup>5</sup> <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/> 13.10.21



**Abbildung 2.2: Sequencher Alignments der Blasthits aus dem *C. asclepiadeus* Transkriptom gegen die Abcb Sequenzen des *C. auratus*.** a) Contigs c19676\_g1\_i1,2, 5, gegen *CauAbcb* 1 und 2 b) Blasthits des *CascAbcb1*, die die *CauAbcb1* Sequenz nur minimal abdecken

### 2.1.3 Phylogenetischer Stammbaum der verschiedenen ABCB Transporter

Zu dem bestehenden Datensatz aus der Publikation Kowalski et al. 2020 wurden die beiden *Casc* ABCB Proteinsequenzen hinzugefügt. Die 45 Sequenzen wurden über ClustalW in MegaX aligniert, entstandene Lücken wurden entfernt. Der Maximum likelihood Stammbaum basierenden auf dem JTT-Model wurde ebenfalls in MegaX generiert. Als Außengruppe wurden ABCC Sequenzen verwenden.

### 2.1.4 ABC-Scan

#### 2.1.4.1 Identifikation von ABC-Sequenzen mittels ABC-Scan

In dem Jahr 2021 veröffentlichte die Arbeitsgruppe Denecke et al. eine Pipeline, die es ermöglicht potentielle ABC-Sequenzen aus Proteindatensätze zu identifizieren. Um den ABC-Scan anwenden zu können musste zunächst das *C. asclepiadeus* Transkriptom in die Proteinsequenzen aller Leserahmen übersetzt werden.

#### 2.1.4.2 Übersetzen des Transkriptom Datensatz mittels Bioedit

Der Transkriptom Datensatz wurde in das Bioedit Programm geladen und konnte in alle 6 Leserahmen übersetzt werden und als FASTA Datensatz gespeichert werden.

#### 2.1.4.3 ABC-Scan Online Anwendung und Analyse

Über die Online-Anwendung<sup>6</sup> konnten die verschiedenen Leserahmen hochgeladen werden und der Scan gestartet werden. Als Ergebnis wurde eine Tabelle mit einer Übersicht über die identifizierten Sequenz-IDs, die ABC-Familie (A-H), die Anzahl der ABC-Motive sowie die Walker-A- und -B-Sequenzen generiert. Die identifizierten Sequenz-IDs wurden aus dem Transkriptom extrahiert. Die erhaltenen Sequenzen (107) wurden über die Expsy Prosite-Website auf ihre ABC-Eigenschaften hin überprüft.

#### 2.1.4.4 Ausschluss von Sequenzduplikaten

Um mögliche Duplikate unter den 107 Sequenzen ausschließen zu können, wurde über die Online-Anwendung Clustal Omega ein Alignment mit ClustalW erstellt und eine Identitätsmatrix in Excel 2010 generiert. Alle Sequenzen mit einer Übereinstimmung von 98-100 % wurden aus dem Datensatz entfernt.

#### 2.1.5 Qualitätsprüfung des Transkriptom des *C. asclepiadeus*

Um die Qualität des Transkriptoms des *C. asclepiadeus* zu überprüfen, wurde das Galaxy-Tool Bowtie2 verwendet. Bowtie2 ermöglicht es, die Reads des Transkriptoms zu alignieren und die Anzahl der korrekt gepaarten sowie ungepaarten oder inkorrekten Reads zu zählen. Über verschiedene Methoden, wie die Blast-Suche und den ABC-Scan, wurde das Transkriptom des *C. asclepiadeus* auf ABCB- und ABC-Sequenzen hin untersucht. Beide Methoden führten zum Nachweis von zwei ABCB-Volltransportern, während die Schwesternart *C. auratus* drei solcher Volltransporter besitzt.

---

<sup>6</sup> [http://chrysalida.imbb.forth.gr:3838/ABC\\_scan/](http://chrysalida.imbb.forth.gr:3838/ABC_scan/) 09.06.2022

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Verwendete Versuchstiere

Die in dieser Arbeit verwendeten adulten blauen Schwalbenwurzkäfer (*Chrysochus asclepiadeus*), Pallas, 1773 wurden im Juli und August 2020/21 in der Nähe von Cervio Karton Tessin in der Schweiz gesammelt und bis zur Verwendung in flüssigen Stickstoff eingelagert.

#### 2.2.1.2 Präparation der Tiere

Die in flüssigen Stickstoff gelagerten Tiere, wurden in eine Sezierschale, die auf Eis lag, überführt. Zunächst wurden die Beine, Elytren und Flügel mit Pinzetten entfernt (Elytren für RNA-Isolation in ein eisgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt). Danach wurde der Käfer mit 1x PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) bedeckt und dorsal geöffnet. Es wurden folgende Gewebe frei präpariert Darm (von Kropf bis Mitteldarm und Mitteldarm bis Rektum), Malpighische Gefäße, Reproduktionsorgane, Muskel und Nervengewebe herausoperiert und in vorgekühlten Reaktionsgefäße überführt und bis zur RNA-Isolation bei -80 °C gelagert. Für die spätere Expression der ABC-B Proteine, wurde der gesamte Käfer verwendet und für die gewebespezifische Expressionsanalyse mittels qRT-PCR wurden Gewebe von drei Tieren gepoolt.

#### 2.2.1.3 Gesamt RNA- Extraktion aus gesamtem Käfer, sowie verschiedenen Geweben mit RNAmagic und RNeasy plus Kit (Quiagen)

Die Arbeiten wurden in einem RNasen freien Umfeld und unter dem Abzug durchgeführt. Der adulte Käfer wird in den eiskalten Mörser gegeben, mit flüssigem Stickstoff übergossen und mit einem Pistel zerstoßen, bis ein Pulver entsteht. Dieses Pulver wurde mit 500 µl RNAmagic bei Raumtemperatur (RT) gemischt. Den verschiedenen Geweben wurden mit einem Pistel im Reaktionsgefäß homogenisiert und regelmäßig im flüssigen Stickstoff gekühlt, danach wurden 500 µl RNAmagic mit dem Homogenisat vermischt. Die Proben wurden für 15 Minuten inkubiert. Danach folgt eine 10-minütige Zentrifugation bei maximaler G-Kraft und bei RT. Nach der Zentrifugation entstehen drei Phasen: eine obere Fettschicht, die Interphase und das

untere Zellpellet. Es wurde nur die mittlere Interphase verwendet, diese wurde mit 100 µl Chloroform versetzt und für 30 Sekunden gemixt mit dem Vortexer (Vortexgenie 2, Scientific industries). Das Gemisch wird für 10 Minuten bei RT inkubiert, es folgt eine Zentrifugation bei 4 °C und bei maximaler G-Kraft für 10 Minuten. Die obere, wässrige Phase wird auf die gDNA *Eliminator spin column* überführt und bei 8000 G-Kraft für 10 Sekunden zentrifugiert. Zu dem Durchfluss wird das gleiche Volumen 70 % EtOH- DEPC- Wasser gegeben, gemischt und direkt auf eine *RNeasy spin column* gegeben. Abermals wird bei 8000 g für 15 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nun folgen verschiedene Waschschriffe, als erstes wurden 700 µl RW1 Puffer auf die Säule gegeben und für 15 Sekunden bei 8000 G-Kraft zentrifugiert, danach wurde 500 µl RPE Puffer auf die Säule gegeben und bei 8000 G-Kraft für 15 Sekunden zentrifugiert, dieser Schritt wird wiederholt. Die Säule wird in ein neues Sammeltube gestellt und bei maximaler G-Kraft für zwei Minuten zentrifugiert, dieser Schritt dient zum Trocknen der Säule. Nun wird die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Eluiert wurde mit 30 µl vorgewärmten (50 °C) Nuklease freien Wasser und für eine Minute bei RT die Membran inkubiert, danach folgt eine Zentrifugation bei 8000 G-Kraft für 45 Sekunden. Um die RNA-Ausbeute zu erhöhen, wird dieser Schritt mit dem Durchfluss wiederholt. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch am Nanodrop2000 (Peqlap Biotechnologie GmbH) bestimmt, dabei gilt dass reine Nukleinsäuren ein Verhältnis OD-280/ OD 260 von 1,8-2,1 aufweisen. Außerdem wurde die Qualität gelelektrophoretisch geprüft. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.1.4 Elektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren

Die Gelelektrophorese ermöglicht DNA und RNA Molekulargewicht und Ladung zu trennen. Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgt in Agarosegelen. Um die Fragmentgrößen bestimmen zu können, wird ein Größenstandard mit bekannter Größe, als Marker verwendet, dieser wird ebenfalls mit auf das Gel aufgetragen (1 kb GeneRuler Marker, Thermo Scienfitic). Um die Qualität der mRNA zu beurteilen zu können wurde diese gelelektrophoretisch aufgetrennt. Wenn es nicht anders beschrieben wurde, wurden 1 % Agarosegele verwendet, die Auftrennung fand bei 100 Volt für 45 Minuten statt. Die Integrität der RNA wird anhand der ribosomalen 28S rRNA- bestimmt. Zeigt sich die Bande klar abgegrenzt, kann von einer nicht denaturierter RNA ausgegangen werden. Dazu werden ~ 100 ng RNA mit 1 Volumen 2x Formaid angesetzt. Das Gemisch wurde für eine Minute bei 70 °C erhitzt, danach auf Eis

gekühlt und auf das Gel aufgetragen. Um die Moleküle später unter UV-Licht detektieren und dokumentieren zu können, wurde Ethidiumbromid (EtBr 0,1%) zu der aufgekochten Agarose TBE-Puffer Lösung gegeben.

#### 2.2.1.5 Reverse Transkription (cDNA Synthese)

Die Reverse Transkription ermöglicht es aus den RNA-Teilbereiche Gene zu amplifizieren, dazu muss die einzelsträngige RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Durch das Enzym Reverse Transkriptase erfolgt diese Umschreibung. Als Primer dient ein T-17 Primer, dieser bindet an den Poly-A- Schwanz der mRNA, sodass ein unspezifisches Umschreiben aller mRNAs stattfindet. Für die Amplifikation und Klonierung der Abcb Gene wurden 1 µg RNA für die Synthese eingesetzt. Folgender Ansatz wurde auf Eis unter der Verwendung des RT-(Superscript III) Kits (Invitrogen) angesetzt: X µl RNA in 11 µl, dazu kommen 2 µl T-17 Primer (100 mM) und 1 µl dNTPs-Mix (10 mM *each*). Das Gemisch wurde kurz gemixt und bei 65°C für 5 Minuten inkubiert, danach wird es für eine Minute auf Eis heruntergekühlt und das Kondensat kurz herunter zentrifugiert. Es folgt die Zugabe von: 4 µl 5x RT-Puffer und jeweils 1 µl DTT (100 mM) und 1 µl Superscript III (Reverse Transkriptase). Der Ansatz wird vorsichtig mit der Pipette auf und ab pipettiert, danach folgen mehrere Inkubationen: 5 Minuten bei Raumtemperatur, 3 Stunden bei 50 °C und 15 Minuten bei 70 °C. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C gelagert

#### 2.2.1.6 Polymerasen Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Der PCR-Zyklus kann in drei Abschnitte unterteilt werden. In dem ersten Schritt kommt es zur thermischen Denaturierung des DNA-Doppelstrangs, durch eine 90-95°C heizen Aufschmelzung. Dadurch entstehen zwei Einzelstränge, an denen Primer binden können, dies ist der zweite Schritt, auch Annealing genannt. Die Annealing Temperatur ist von der Primerschmelztemperatur abhängig. Dadurch wird die Amplifikation der dazwischenliegenden Sequenzabschnitte eingeleitet. Die Elongation findet durch die Temperatur aktive DNA-Polymerase Enzym statt. Der Reaktionszyklus wiederholt sich dabei zwischen 30-40-mal, wahlweise kann am Ende noch eine Final-Elongation vollzogen werden.

### 2.2.1.7 PCR von *CascAbcb1* und *CascAbcb2*

Für den Ansatz werden folgende Zutaten zusammen pipettiert: 5 µl (5x Star GXL Buffer), 4 µl dNTP Mix, jeweils 0,5 µl Primer (Primer *for* und Primer *rev*), 1 µl Prime Star Polymerase, X µl (cDNA 200 ng) und mit Millipore Wasser auf 25 µl aufgefüllt.

**Tabelle 2.2 PCR-Programm.** Zur Amplifikation von *CascAbcb1* und -*Abcb2*

Reaktionsschritt	Temp. [°C]	Dauer [sek]	Zyklus
Denaturierung	98	10	30
Annealing	55	15	
Elongation	68	240	

**Tabelle 2.3 Primertabelle.** Aufgeführt sind die Amplifizierung und Klonierungsprimer für *Abcb1* und *Abcb2*

Primernamen	Sequenz 5' → 3'
<i>Casc Abcb1</i> IFP for	AGGCCTACGTCGACGATGAAAAATTCTATAATGACAGATG
<i>Casc Abcb1</i> IFP rev	CGGCCGCGACTAGTGTTAATTGTGGCCAGTTTGTAATC
<i>Casc Abcb2</i> IFP for	AGGCCTACGTCGACGATGGACAACAAGGAAATTATAAAT
<i>Casc Abcb2</i> IFP rev	CGGCCGCGACTAGTGCTATTGTTTCTGAGTTTGTAATTT

### 2.2.1.8 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung dient dazu überschüssige Nukleotide, Primer, Salzionen und DNA-Polymerase-Reste zu entfernen. Die PCR Produkte wurde mit dem *XS-NucleoSpin Gel and PCR Clean up* Kit von Macherey-Nagel nach deren Angaben aufgereinigt. Lag das PCR Produkt als reine einzel Bande vor, konnte dieses direkt aufgereinigt werden, waren mehrere Banden zu erkennen wurde das PCR Produkt über eine Gelextraktion aufgereinigt.

## 2.2.2 Klonierung

### 2.2.2.1 Klonierung von *CascAbcb1* und *CascAbcb2* in pGEM-T (TA-Klonierung)

### 2.2.2.2 Anhängen von Adenosin an die PCR-Produkte (*A-Tailing*)

Um die PCR-Produkte in den pGEM-T Vektor klonieren zu können, müssen sie zunächst mit einem Adenosin- Schwanz versehen werden. Für den Ansatz wurden ~ 100 ng aufgereinigtes PCR-Produkt mit 1 µl 10x Taq-Puffer (-MgCl<sub>2</sub>), 0,35 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,2 µl dATPs (10 mM), 1

µl Taq-Polymerase (5 Units), ThermoFisher auf 10 µl mit Millipore Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wird für 20 min bei 70 °C inkubiert, bei zeitnaher Verwendung im Kühlschrank gelagert oder bei – 20 °C (ein-)gelagert.

#### 2.2.2.3 Ligation der *CascAbcbs* in pGEM-T

Durch die Ligation können zwei unterschiedliche DNA-Fragmente (PCR-Produkt und Vektor) miteinander verbunden werden. Der Ligationsansatz setzt sich wie folgt zusammen: 1 µl pGEM-T (50 ng), 1 µl 10x T4-Ligase Puffer, 1 µl T4 Ligase (ThermoFisher) 2 µl Insert und wird auf 5 µl mit Millipore Wasser aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C im Kühlschrank für zwei Tage.

#### 2.2.2.4 Transformation der *CascAbcbs* in XL 10 Gold Zellen und in Stellar Zellen

Die Transformation beschreibt die Aufnahme von Fremd-DNA, in kompetente Zellen, dadurch kann die Plasmid-DNA in großen Mengen hergestellt werden. Das Einbringen der Plasmid-DNA erfolgt über einen Hitzeschock. Es wurden zwei verschiedene kompetente Zellen verwendet zu 50 µl XL 10 Gold Zellen Zellen wurden 5 µl Plasmid DNA (~ 1000 ng) gegeben. Wurden Stellar Zellen verwendetet wurden davon 10 µl mit 1 µl Plasmid DNA (~200 ng) verwendet. Der Ansatz wird für 30 min auf Eis inkubiert, danach folgt der Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden mit anschließendem Abkühlen auf Eis für zwei Minuten. Dem Ansatz werden 400 µl vorgewärmtes (37°C) SOC-Medium hinzugefügt und für 90 min im Schüttelinkubator (225 rpm) bei 37°C inkubiert. Es werden 100 bis 250 µl des Ansatzes auf vorgewärmten (37°C) Agar Platten (Agar, LB-Medium, 100 µg/ml Ampicilin, X-Gal und Iptg) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Transformationsansatz der Stellar Zellen wurde nochmal 1:200 verdünnt und dann ausplattiert.

#### 2.2.2.5 Retransformation von vorhandenen Plasmiden

Wurden weiteren Mengen von den bestehenden Plasmiden benötigt wurden diese retransformiert. Es wurden 10 – 50 ng Plasmid DANN zu 25- 50 µl kompetente Zellen gegeben. Der Hitzeschock wurde genauso wie bei der herkömmlichen Transformation durchgeführt. Danach werden 60 µl des Transformationsansatzes in 4 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator (225 rpm) inkubiert.

### 2.2.2.6 Blau-Weiß Selektion

Der pGEM-T Vektor besitzt zwei Markergene die, die Blau-Weiß Selektion ermöglichen. Das erste Markergen ist Amp<sup>r</sup> und kodiert das Enzym  $\beta$ -Lactamase, dadurch entsteht eine Resistenz gegenüber Ampicillin und es können nur Amp-Resistente Kolonien auf der Agarplatte wachsen. Das zweite Markergen verschlüsselt das Lac-Z Gen mit dem  $\beta$ -Galactosidase-Enzym. Dieses Enzym wandelt das farblose X-Gal in einem Indigoblauen Farbstoff um. Plasmide, die das PCR-Produkt tragen, unterbrechen den C-terminalen Abschnitt der  $\beta$ -Galactosidase und somit findet kein Farbumschlag statt. Die weißen Kolonien werden gepickt und in 4 ml LB Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin überführt und bei 37°C im Schüttelinkubator (225 rpm) über Nacht inkubiert.

### 2.2.2.7 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine vorab Überprüfung des eingebrachten Gens. Es werden 15  $\mu$ l aqua dest. in ein Eppi vorgelegt und die gepickte Kolonie darin für eine Stunde bei RT inkubiert. Für die Überprüfung der Klonierung in das jeweilige Plasmid wurden plasmid-spezifische Primer (pGEMT: T7 und SP6, pFBD Polyhydrin for und rev,) und gen-spezifische Primer verwendet. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: 1,25  $\mu$ l 10x Taq-Puffer (-MgCl<sub>2</sub>), 0,5  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1  $\mu$ l dNTPs (10 mM), 0,25  $\mu$ l Primer (Primer *for*, Primer *rev*), 0,25  $\mu$ l DMSO, 0,005 Taq-Polymerase (5 Units), 2,5  $\mu$ l Template (gelöste Kolonie) und mit Millipore Wasser auf 12,5  $\mu$ l aufgefüllt.

**Tabelle 2.4 PCR-Programm.** Kolonie-PCR der beiden ABCB-Gene des *C. asclepiadeus*

Reaktionsschritt	Temp. [°C]	Dauer [min]	Zyklus
Initiale-Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	95	1	30
Annealing	50	0,5	
Elongation	72	1,5	
Final-Elongation	72	8	1

**Tabelle 2.5 Genspezifische Primer:** verwendete genspezifische Primer zur Überprüfung der Kolonie PCR

Primernamen	Primersequenz 5'→3'
Cas_ABCB1_S_CP_for	TACCGTTTGTTCATCTACTCAAC
Cas_ABCB1_E_CP_rev	TGCGTTGTCTAGAGCTTCTTG
Cas_ABCB2_S_CP_for	TGGATCTGAAGATATGTTAGATGA
Cas_ABCB2_3_M2_CP_rev	ACATAAACAACCTCCAGCAATAAC
<i>Casc</i> _Abcb1_PISeq3	CCTTTTGGAAAGAATTCCGCTC
<i>Casc</i> _Abcb2_PISeq2	CTTAGAGCTGCTAGAAACATCAAAC

#### 2.2.2.8 Plasmid-DNA Isolation mittels alkalischer Lyse

Die hier angewendete alkalische Lyse beruht auf dem Prinzip von Birnboim und Doly, 1979. Es werden 1,5 ml Bakterienlösung für zwei Minuten bei maximale g zentrifugiert, der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wird mit 200 µl des I. Puffers (50 mM Tris/HCL, 10 mM EDTA, pH 8) versetzt, dazu werden 2,5 µl RNase (100 ug/ml) gegeben und das Pellet durch durch mixen auf dem Vortexer (Vortexgenie 2, Scientific industries) resuspendiert. Danach folgt die Zugabe von 200 µl des II. Puffers (200 mM NaOH, 1% SDS), die Lösung wird mehrere Male invertiert und für zwei Minuten bei RT inkubiert. Als letztes werden 200 µl des III. Puffers (3M Kaliumacetat, pH 5,5) dazu gegeben, es ist darauf zu achten möglichst schnell die Lösung zu invertieren. Danach folgt eine 15-minütige Zentrifugation bei maximale G-Kraft. In dieser Zeit können Reaktionsgefäße für die Präzipitation vorbereitet werden, es werden 800 µl Isopropanol in diesen vorgelegt. Der Überstand wird in Isopropanol überführt und vorsichtig gemischt. Es folgt eine Zentrifugation bei maximaler G Kraft für 25 Minuten. Der Überstand wird durch vorsichtiges abpipettieren verworfen. Es folgt ein Waschschriff mit eiskaltem 70% Ethanol, dieser wird vorsichtig hineingegeben, um das DNA-Pellet nicht abzuspülen. Abermals wird für zwei Minuten bei maximaler G-Kraft zentrifugiert. Der Überstand wird wieder durch vorsichtiges abpipettieren verworfen, die Plasmid-DNA ist als helles Pellet zu erkennen. Das Pellet wird in der SpeedVac bei 60°C für 20 Minuten getrocknet und mit 30 µl vorgewärmten (50°C) nukleasenfreien Wasser resuspendiert. Die Konzentrationsmessung fand über den Nanodrop statt.

### 2.2.2.9 Sequenzierung der pGEM-T *CascAbcbs*

Sequenzierung ermöglicht sowohl die bioinformatisch vorhergesagten *CascAbcb* Nukleotidsequenzen als auch den Klonierungserfolg zu überprüfen. Die Sequenzierung wurde von dem kommerziellen Anbieter GATC Eurofins durchgeführt und nach Angaben des Herstellers angesetzt. Die spätere DNA-Sequenz Analyse fand mit dem Programm *Sequencher* statt. Sequenzierungs-Ansatz: ~ 100 ng/ µl Plasmid-DNA, 2,5 µl Primer (10 mM) mit Millipore Wasser auf 10 µl auffüllen.

**Tabelle 2.6 Sequenzierungsprimer:** Verwendete Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der *Abcb* Sequenzen

Primername	Primersequenz 5'→3'
Cas_ABCB1_S_CP_for	TACCGTTTGTTTCATCTACTCAAC
<i>Casc_Abcb1_PISeq1</i>	GATGAAAAGGAGCTAGCATCAGATG
<i>Casc_Abcb1_PISeq2</i>	GAGTGCAACAACAATTATCGTA GC
<i>Casc_Abcb1_PISeq3</i>	CCTTTTGGAAAGAATTCCGCTC
<i>Casc_Abcb2_PISeq1</i>	GAA GCT TAT GGC GAA GCA GG
Cas_ABCB2_S_CP_for	TGGATCTGAAGATATGTTAGATGA
<i>Casc_Abcb2_PISeq2</i>	CTTAGAGCTGCTAGAAACATCAAAC

#### 2.2.2.9.1 Umklonierung der *CascAbcbs* aus dem pGEM-T Vektor in den pFastBacDual Expressionsvektor mittels InFusion-HD Klonierung

Für die spätere Proteinexpression ist es unabdingbar die *Casc Abcb* Gene aus den Klonierungsvektor in die Expressionsplasmide: pFastBacDual Donorplasmid zu klonieren. Die Klonierung fand mit Hilfe des InFusions-HD Cloning Kits von TaKaRaBio statt. Zur Amplifizierung wurde schon das Amplicon mit den Klonierungsprimer amplifiziert und über das sogenannte A-Tailing in pGEM-T kloniert.

#### 2.2.2.9.2 Amplifizierung der *CascAbcb* Gene mittels CloneAmp Hifi PCR Mix aus pGEM-T und Linearisierung der Expressionsvektoren

Per PCR wurden *CascAbcb* Gene aus dem pGEM-T Vektor wieder herausgeschnitten und amplifiziert. Beide Expressionsvektoren wurden per PCR linearisiert. Spätere Aufreinigung fand mittels *XS-NucleoSpin Gel and PCR Clean up* Kit von Macherey-Nagel statt. Primersequenzen ist der Tabelle 5 zu entnehmen. Der PCR- Ansatz setzt sich wie folgt

zusammen: 12,5 µl CloneAmp PCR Premix (TaKaRa), 0,5 µl Primer (10 mM) (Primer *for* und Primer *rev*), ~ 100 ng Template und mit Millipore Wasser auf 25 µl auffüllen.

**Tabelle 2.7 PCR- Programm.** Linearisierung des Expressionsvektor und der Amplifikation der ABCB-Gene

Reaktionsschritt	Temp. [°C]	Dauer [sek]	Zyklus
Denaturierung	95	30	30
Annealing	55/68	20	
Elongation	72	20	

**Tabelle 2.8 Primertabelle.** Primersequenzen zur Linearisierung der Expressionsvektoren und der Abcbgene

Primernamen	Primersequenz 5' → 3'
IF_P_pFBD_fw	CACTAGTCGCGGCCGCTT
IF_P_pFBD_rev	CGTCGACGTAGGCCTT
IF_P_Abcb1_for	AGGCCTACGTCGACGATGAAAAATTCTATAATGACAGATG
IF_P_Abcb1_rev	CGGCCGCGACTAGTGTTAATTGTGGCCAGTTTGTAAATC
IF_P_Abcb2_for	AGGCCTACGTCGACGATGGACAACAAGGAAATTATAAAT
IF_P_Abcb2_rev	CGGCCGCGACTAGTGCTATTGTTTCTGAGTTTGTAAATT

#### 2.2.2.10 InFusion Klonierung mit Spin Column aufgereinigten PCR-Produkten

Die Klonierung mit Hilfe des InFusion HD Klonierungs Kits weist eine enorme Zeit und Material Ersparnis auf, da sie weder eine DNA-Polymerase benötigt noch das Enzym Ligase und die einhergehende Ligation. Das Insert-Vektor Verhältnis wurde mit dem von TaKaRa empfohlenen Online-Tool<sup>7</sup> bestimmt. Nach Angaben des Herstellers (TaKaRaBio) ergab sich folgender Ansatz: 1 µl 5x InFusion HD Enzym Premix, 50 ng PCR-Produkt, 150 ng linearisierter Vektor und mit Millipore Wasser auf 5 µl auffüllen. Der Ansatz wurde für 15 Minuten bei 50 °C inkubiert. Der Ansatz konnte bei -20 °C gelagert werden oder es wurde gleich die Transformation in kompetenten *E. coli* 10 XL Goldzellen oder Stellarzellen vollzogen. Positive Klone wurden mittels Kolonie PCR identifiziert und schließlich über Nacht kultiviert. Die Isolation des Plasmids erfolgte per alkalischen Lyse.

<sup>7</sup> <https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/primer-design-and-other-tools/in-fusion-molar-ratio-calculator> 13.10.2021

### 2.2.3 Bac-to-Bac Baculoviursystem (Invitrogen)

Das Baculovirus-Expressionssystem ermöglicht es Fremdproteine in Insektenzellen zu vermehren. Die Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda* (Sf9) und oder BTI-Tn-5B1-4 (Hi5)) werden mit einem rekombinanten Baculovirus infiziert, der Virus stammt aus *Autographa californica nuclear polyhedrosis*, dadurch wird eine hohe Expression des Gens und der darauffolgenden Proteinexpression ermöglicht.

Nach erfolgreicher Klonierung der *CascAbcb* Gene in den pFastBacDual Vektor, wird das entstandene rekombinante Plasmid in die DH10 Bac Zellen transformiert. Es folgt die Transposition der *CascAbcb* Gene in das Bacmidgenom. Über ein Antibiotikum und Blau/Weiss Selektion können positive rekombinante Bacmide identifiziert werden. Es folgt die Isolation der der Bacmid-DNA per alkalischen Lyse und die Kontrolle per PCR. Liegen die Bacmide in reiner Form vor, können die Insektenzellen mit diesen transfiziert werden.

### 2.2.4 Transformation der *CascAbcbs* pFBD in DH 10 Bac-Zellen

Zu 50 µl kompetenten DH 10 Bac Zellen werden 5 µl Plasmid-DNA gegeben und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Danach folgt der Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für zwei Minuten, danach das Abkühlen auf Eis für zwei Minuten. Zu dem Transformationsansatz werden 500 µl vorgewärmtes (37°C) SOC-Medium gegeben und für vier Stunden im Schüttelinkubator (225 rpm) bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde 1:5 und 1:10 mit SOC Medium verdünnt und jeweils 100 µl auf vorgewärmte Agarplatten (Agar, LB-Medium, Gentamycin 7 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml, Tetracyclin 4 µg/ml, IPTG 40 µg/ml und X-Gal 100 µg/ml) ausplattiert. Die Inkubation erfolgt für 48 Stunden bei 37°C.

Nur weiße Kolonien wurden gepickt und in 4 ml LB-Medium mit Gentamycin 7 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml, Tetracyclin 4 µg/ml über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator hochgezogen. Am folgenden Tag werden die Bacmide über alkalische Lyse isoliert und bei -20°C gelagert. Die Bacmide wurden per PCR kontrolliert. Als Primer dienten spezifische Bacmid Primer, die die mini-attTn7 Region des Bacmids flankieren. Die Bacmide wurden auf 100 ng verdünnt. Der PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen: 2,5 µl 10x Taq-Puffer (-MgCl<sub>2</sub>), 0,75µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1,25 µl dNTPs (10 mM), 0,75 µl Primer (10 mM) (Primer *for* und Primer *rev*), 0,625 µl DMSO, 0,5 µl Taq-Polymerase (5 Units) (ThermoFisher), 100 ng Template (Bacmid) und mit Millipore Wasser auf 17 µl auffüllen.

**Tabelle 2.9 PCR-Programm.**Überprüfung der *C. asclepiadeus* ABCB Bacmide

Reaktionsschritt	Temp. [°C]	Dauer [min]	Zyklus
Initiale-Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	95	1	30
Annealing	57	1	
Elongation	72	6,5	
Final-Elongation	72	8	1

## 2.3 Expressionsanalyse

### 2.3.1 cDNA Synthese der verschiedenen Gewebe-RNAs für die quantitative *Real time* PCR

Für die cDNA Synthese für die qRT-PCR wurde neben dem T17 Primer auch der Random Hexamer Primer für die Umschreibung verwendet. Es wurden 500 ng RNA für die Synthese eingesetzt. Folgender Ansatz wurde auf Eis unter der Verwendung des RT-(Superscript III) Kits (Invitrogen) angesetzt: X µl RNA in 11 µl, 1 µl T-17 Primer (100 mM), 1 µl Random Hexamer Primer (100 mM) und 1 µl dNTPs-Mix (10 mM each). Das Gemisch wurde kurz gemixt und bei 65°C für 5 Minuten inkubiert, danach wird es für eine Minute auf Eis heruntergekühlt und das Kondensat kurz herunter zentrifugiert. Es folgt die Zugabe von: 4 µl 5x RT-Puffer und jeweils 1 µl DTT (100 mM) und 1 µl Superscript III (Reverse Transkriptase). Der Ansatz wird vorsichtig mit der Pipette auf und ab pipettiert, danach folgen mehrere Inkubationen: 5 Minuten bei Raumtemperatur, 2 Stunden bei 50 °C und 15 Minuten bei 70 °C. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C gelagert

### 2.3.2 Quantitative *Real time*-PCR (qRT-PCR) mittels dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen

Das Ziel der qRT-PCR ist es aus der Anzahl der amplifizierten PCR-Produkte auf die Menge an eingesetztem DNA-Template schließen zu können. Dadurch kann auf die Transkriptmenge der Zielgene geschlossen werden. Es gibt verschiedene Möglichkeiten die PCR-Produkte während der Echtzeit (*real time*) zu detektieren. In dieser Arbeit wurde sich für die kostengünstige Detektion mittels dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff *EvaGreen* entschieden. Die genaue Quantifizierung der Zielgene wird durch die Fluoreszenz in jedem einzelnen Reaktionszyklus gemessen. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei in jedem Zyklus direkt

proportional zum amplifiziertem PCR-Produkt, dadurch kann auf die Menge an eingesetztem Zielgen geschlossen werden.

Es wurden die absoluten Kopienzahlen der Zielgene ermittelt. Zur Bestimmung der absoluten Quantifizierung wird ein externer Standard verwendet. Als Standard dienen die linearisierten pFBD Abcb1 und Abcb2 Plasmide. Von diesen Plasmiden wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt.

### 2.3.3 Herstellung der Plasmidstandardreihe

Zur Herstellung der Standardreihe für die qRT-PCR zur Bestimmung der absoluten Kopienzahlen wurde zunächst eine Verdünnungsreihe der pFBDAbcb1 und 2 Plasmide angefertigt. Die Standardreihe wird aus einer 1:10 Verdünnung der Plasmidlösung hergestellt, die Verdünnungsstufen reichen von  $10^8 - 10^2$ . Durch die Länge der DNA (pFastBacDual 5238 bp, Abcb1 3771 bp, Abcb2 3779 bp), die Konzentration der Plasmidlösung (ermittelt über den NanoDrop (Thermofisher), Abcb1: 360 ng/ $\mu$ l, Abcb2: 278 ng/ $\mu$ l) und durch das durchschnittliche Molekulargewicht einer Base, kann die Kopienzahl berechnet werden. Die folgende Formel wurde zur Berechnung der Kopienzahl angewandt.

Gesamtlänge des rekombinanten Plasmids in g/mol  $\times$  330 g/mol ( $\emptyset$  Molekulargewicht einer Base)  $\times$  2 (Doppelstrang)  $\rightarrow Y \times 10^6$  g/mol

Durchschnittliches Molekulargewicht einer Base		
Da doppelsträngige DNA		
Gesamtlänge Plasmid + Integrat		
	$330 \text{ g/mol} \cdot 2 \cdot X = Y \cdot 10^6 \text{ g/mol}$	
$\rightarrow Y \cdot 10^6 \text{ g/mol}$	entsprechen	$6,022 \cdot 10^{23} \text{ Kopien/mol} : Y$
$\rightarrow 10^6 \text{ g}$	entsprechen	$Z \cdot 10^{23} \text{ Kopien} \quad   \text{ Umrechnung von g auf ng}$
$\rightarrow 10^{15} \text{ ng}$	entsprechen	$Z \cdot 10^{23} \text{ Kopien} \quad   : 10^{15}$
$\rightarrow 1 \text{ ng}$	entsprechen	$Z \cdot 10^8 \quad   \cdot \text{ die Plasmidkonz. } Q \text{ ng}/\mu\text{l}$
$\rightarrow x \text{ ng}/\mu\text{l}$	entsprechen	$Z \cdot 10^8 \cdot Q \text{ Kopien}/\mu\text{l}$

#### Abbildung 2.2 Schematische Darstellung zur Berechnung der Kopienzahl

Jeder Plasmidansatz wurde mehrmals stark gemischt (Vortexer) und abzentrifugiert, bevor eine weitere Verdünnung angesetzt wurde. Die Verdünnungsreihe wurde bis zur Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  weggefroren.

### 2.3.4 Spezifitätstest der qRT-PCR Primer

Um die generelle Spezifität der verwendeten Primer für die qRT-PCR zu testen, wurde zunächst eine herkömmliche PCR angesetzt. Für den Ansatz werden 2 µL 5x HF Puffer, 0,2 µL dNTPs (10 mM), 0,5 µL Primer (0,5 mM) (Primer *for* und Primer *rev*), 0,1 µL Phusion Polymerase, ~ 20 ng Template (cDNA/ Plasmid) mit Millipore Wasser auf 10 µL aufgefüllt.

**Tabelle 2.10 PCR-Programm.** qRT-PCR Primer Spezifitätstest

Reaktionsschritt	Temp. [°C]	Dauer [sek]	Zyklus
Initiale-Denaturierung	98	30	1
Denaturierung	98	10	35
Annealing	55	30	
Elongation	72	60	
Final-Elongation	72	10	1

**Tabelle 2.11 Primertabelle der qRT-Primer.** Primersequenzen der Abcbgene zur Expressionsanalyse in verschiedenen Geweben des *C. asclepiadeus*

Primernamen	Primersequenz 5' → 3'
<i>CascAbcb1_qPCR_f</i>	CACAAACATAAAGACGTTGGCA
<i>CascAbcb1_qPCR_r</i>	TAAGGGACCTCAACATCTGGC
<i>CascAbcb2_qPCR_f</i>	CTAAAGGAAGAGGTCAAAAACT
<i>CascAbcb2_qPCR_r</i>	AAGAATTGGAACATCTTTTCGAG

### 2.3.5 Effizientestes der qRT-PCR

Zur Überprüfung der Primer Effizienz und dem PCR Programm wurde vorab ein Effizientstest durchgeführt. Zur Überprüfung wurde die Standardreihe verwendet. Dadurch das die Ct-Werte linear zu den logarithmierten Werten der DNA Menge sind, kann über die Steigung der Gradengleichung die PCR-Effizienz bestimmt werden. Dabei sollte die Effizienz  $\geq 85\%$  sein. Der PCR Ansatz sowie der das PCR Programm ist dem folgendem aufgeführt.

### 2.3.6 Durchführung der qRT-PCR mittels dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen

Um später einen Vergleich der Expressionsrate der Zielgene bestimmen zu können wurde immer die gleiche Menge an cDNA (30 ng/ Well) eingesetzt. Für jedes Gen, biologisches Replikat (BR) und für die Standardreihe wurde ein Mastermix angesetzt. Als negativ Kontrolle diente ein Ansatz ohne cDNA. Die Proben und die Standardreihe wurden als Duplikate aufgetragen. Nachdem die 48 Wellplatte beladen wurde, wurde diese mit einer Folie versiegelt und abzentrifugiert. Das PCR-Programm ist in zwei Abschnitte unterteilt, die PCR-Reaktion und die darauffolgende Schmelzpunktanalyse. Die Schmelzpunktanalyse dient dazu mögliche Artefakte oder Primerdimere zu detektieren, da der interkalierende Farbstoff nicht genspezifisch bindet. Der Ansatz setzt sich aus 4 µL 5x EvaGreen, 0,5 µL Primer (0,5 mM) (Primer *for* und Primer *rev*), ~ 30 ng Template (cDNA/ Standardplasmidverdünnung) und mit nuclease freien Wasser auf 20 µL auffüllen.

**Tabelle 2.12 PCR Programm.** Gewebespezifische qRT-PCR der *CascABCB*-Gene

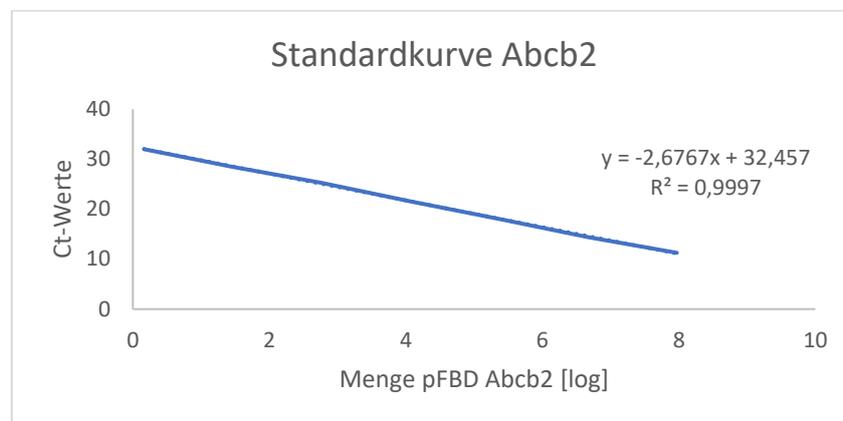
Reaktionsschritt	Temp. [°C]	Dauer	Zyklus
Initiale-Denaturierung	90	15 min	1
Denaturierung	95	15 sek	40
Annealing	60	20 sek	
Elongation	70	20 sek	
Erstellung der Schmelzkurve			Schritt
	95	15 sek	1
	60	1 min	2
	95	15 sek	3

### 2.3.7 Auswertung der qRT-PCR

Alle gemessenen Daten wurden in der StepOne Software v2.2.2 vor dem exportieren in Excel bearbeitet. Um alle Platten miteinander vergleichen zu können, wurde der Threshold aller Proben auf 0,5 herab- oder heraufgesetzt, damit dieser im linearen Amplifikationsbereich lag.

Um später die Daten grafisch darstellen zu können wurden die Daten in Excel exportiert und bearbeitet. Ziel ist es die Kopienzahl der Zielgene pro µg RNA bestimmen zu können. Zunächst wurde für jedes BR und Gewebe der Ct- Mean (Mittelwert der Ct-Werte) berechnet. Durch das Erstellen der Standardreihe ist bekannt, wie die Menge der Standardprobe [log] zu einem

bestimmten Ct-Wert ist. Durch das Umstellen der Gradengleichen von  $Ct = m(\log \text{quantity}) + b$  zu  $10^{((Ct-b)/m)}$ , kann die Menge der Zielgene (Quantity Mean) bestimmt werden (Abbildung 2.4). Zum Vergleich aller Platten wurden die Standardreihen jeder Platte zur Bestimmung des Quantity Mean gemittelt. Nachdem der Quantity Mean für die Zielgene und Gewebe bestimmt wurde, muss noch die Kopienzahl pro  $\mu\text{g}$  RNA berechnet werden. Eingesetzt wurden 30 ng cDNA/ Well, dadurch ergibt sich der Faktor 33,33 (1000/30) mit dem der Quantity Mean multipliziert wurde. Die sich ergebene Werte konnten in Excel 2010 grafisch dargestellt werden und die statistische Auswertung fand in OriginPro21b statt.



**Abbildung 2.3** Beispiel der qRT- PCR Kinetik. Reaktionskinetik der Standardreihe von *Casc Abcb2*

## 2.4 Zellbiologische Methoden

### 2.4.1 Kultivierung der Insektenzellen *Sf9* und Hi5 (BTI-Tn-5B1-4)

Für die rekombinante Expression der *CascAbcbs* wurden die immortalen *Sf9* (*Spodoptera frugiperda*) und Hi5 (BTI-Tn-5B1-4) Zellen verwendet. Die Insektenzellen wurden in einer T25 beziehungsweise T75 mit 5 ml beziehungsweise 10 ml InsectXpress Medium + Gentamycin (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für *Sf9*-Zellen oder ExpressFive-Medium SFM + Gentamycin (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und L-Glutamin (16 mM/ml) für Hi5-Zellen bei 27°C im Inkubator kultiviert. In zwei bis vier Tagesabständen wurden die Zellen unter der Sterilbank passagiert. Dazu wurde das alte Medium abgesogen, die adhären wachsenden Zellen durch klopfen der Flasche vorabgelöst und dann mit neuem Medium mit Zusätzen resuspendiert. Die Zelllösung wurde in eine neue Kultivierungsflasche überführt (Verhältnis von Medium zur Zelllösung ist abhängig von der Zelldichte). Für die nachfolgende Transfektion sowie zur Proteinexpression wird eine bestimmte Zelldichte

benötigt. Die Zellen werden wie bei den Passagieren vereinzelt. Es werden 90 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau versetzt, Trypanblau ermöglicht es tote (blau) von lebenden Zellen zu unterscheiden. Von dieser Lösung werden jeweils 10 µl in eine Neubauer Zählkammer gegeben und die Anzahl der lebenden Zellen am Durchlichtmikroskop (Olympus IX50, Durchlicht Olympus TH3) bestimmt.

#### 2.4.2 Transfektion der *Sf9* Zellen mit Bacmiden

Über die kationische Lipofektion mit *Cellfection II* (Invitrogen) wurden die *Sf9* Zellen mit den Bacmiden transfeziert. Zunächst werden in 6 Wells  $8 \times 10^6$  Zellen in 2 ml Medium ohne Zusätze (MOZ) ausgesät und für 2 Stunden bei 27°C inkubiert. Nach der Hälfte der Inkubationszeit kann der Transfektionsansatz vorbereitet werden. Für den Transfektionsansatz werden zwei Lösungen benötigt. Lösung 1 besteht aus 1,5 µg Bacmid-DNA in 100 µl MOZ (die in dieser Arbeit verwendeten Bacmide wurden auf eine Arbeitslösung von 100 ng/µl in Millipore Wasser verdünnt), Lösung 2 besteht aus 12 µl *Cellfectin II* und 88 µl MOZ. Es wird Lösung 2 tropfenweise zu Lösung 1 gegeben und der Ansatz 45 min bei RT inkubiert, anschließend werden 800 µl MOZ zu dem Ansatz gegeben. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen mikroskopisch auf ihr adhärentes Wachstum überprüft und das Medium (MOZ) abgezogen, danach wird der Transfektionsansatz (~ 1 ml) tropfenweise, um ein Abspülen der Zellen zu vermeiden, in jedes Well gegeben. Die Platte wird nun für 5 Stunden bei 27°C inkubiert. Der Transfektionsansatz wird nach der Inkubationszeit abgenommen und durch 2 ml Medium mit Zusätzen (30 µg/ml Gentamycin bei InsectXpress) ersetzt. Die Platte wird drei Tage bei 27°C inkubiert.

#### 2.4.3 Ernte und Herstellung der Baculoviren

Um die ersten Viruspassage (VP1) ernten zu können, wird der Überstand (~ 2ml) aus den Wellplatten in ein 15 ml Falcon überführt und für 5 Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Die Viruslösung wird abgenommen und in ein neues Falcon überführt, zur Lagerung wird dieses lichtgeschützt bei 4°C verpackt. Für das weitere generieren von Viruspassagen werden  $12 \times 10^6$  Zellen in 10 ml Medium mit Zusätzen (InsectXpress Medium + Gentamycin (30 µg/ml) für *Sf9*-Zellen in einer T75 Flasche ausgesät und mit 1 ml VP1 angeimpft. Es folgt eine Inkubation von 5 Tagen bei 27°C. Mit dieser Methode können weitere Viruspassagen hergestellt werden oder die Viruskonzentration verschiedener Konstrukte durch Anpassen des Volums der

Animpflösung ausgeglichen werden. Geerntet werden die Viruspassagen durch Zentrifugation bei 500 x g für 5 Minuten.

#### 2.4.4 Heterologe Expression der ABCB Transporterproteine in Insektenzellen

Im Laufe der Arbeit stellte sich heraus, dass ABCB1 nur schwach in den *Sf9* Zellen exprimiert werden konnte, daher fand ein Wechsel zu den Hi5 (BTI-Tn-5B1-4) Insektenzellen statt, da diese in vorherigen Studien eine höhere Expression aufzeigten (Wilde et al. 2014). Die Herstellung der ersten Viruspassagen fand in *Sf9* Zellen statt, die finale Proteinexpression fand in Hi5 Zellen statt. Es werden  $80 \times 10^6$  Zellen in 50 ml Medium mit Zusätzen (ExpressFive-Medium SFM + Gentamycin (30 µg/ml) und L-Glutamin (16 mM/ml)) in 300 ml Kolben vorgelegt und mit 5 ml der jeweiligen Viruspassage angeimpft. Um die Membranen durch das Schütteln im Inkubator zu schützen werden noch 0,5 ml Poloxamer (Zellwandschutz) zu der Lösung gegeben. Die Kolben werden 72 Stunden bei 27°C und 110 rpm inkubiert. Da sich die Hi5-Zellen nicht dauerhaft kultivieren ließen, wurde wieder auf die *Sf9*-Zellen gewechselt.

### 2.5 Proteinchemische Methoden

#### 2.5.1 Immunzytochemische Detektion von ABCB1 und ABCB2 in Insektenzellen

Um die Expression der ABCB-Membrantransporter in den Insektenzellen überprüfen zu können, wurden diese einem immunologischen Nachweis unterzogen. Die Methode beruht auf einer spezifischen Antigen-Antikörper Bindung. Für den spezifischen Nachweis wurde der monoklonale Primärantikörper C219 (Anti P- Glykoprotein mouse mAb) und der polyklonale fluoreszierende Sekundärantikörper Cy3 IgG (Goat-Anti-Mouse Antibody IgG) eingesetzt.

Bevor der immunologische Nachweis durchgeführt werden kann, wurden runde Deckgläschen in 12 *Well*-Platten ausgelegt und mit  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 1 ml Medium mit Zusätzen bedeckt. Danach wurden die Zellen mit 150 µl Virusstock (ABCB1 VP 8, ABCB2 VP2) angeimpft und 72 Stunden bei 27°C inkubiert, als Kontrollen dienten *Mock* Zellen (untransfizierte Insektenzellen) und Zellen die ebenfalls mit 150 µl Virusstock von einem Leerbacmid VP2 angeimpft wurden. Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen durch 500 µl eiskaltes Aceton Methanol Gemisch (20% Aceton, 80% Methanol) für 20 min bei -20°C abgedunkelt fixiert. Das Fixierungsgemisch wurde abgenommen und die Zellen dreimal für 5 Minuten mit 500 µl TBS-T Puffer (TBS-Puffer, 0,025% Tween 20) bei RT gewaschen. Es folgt die Permeabilisierung der

Zellmembranen durch 0,2% Triton X 100 in TBS für 5 Minuten bei RT. Es folgen wieder drei Waschschrte. Um unspezifische Hintergrundsignale zu minimieren findet ein einstündiges Blocken mit 500 µl 5% BSA in TBS-T bei RT statt. Die Primärantikörperlösung (C219) hat eine Endkonzentration von 5 µg/ml in 1% BSA in TBST. Es werden 250 µl der Primärantikörperlösung pro Well eingesetzt, bei den negativen Kontrollen werden 250 µl 1% BSA in TBST verwendet. Es findet eine Inkubation über Nacht (mindestens 16 Stunden) bei 4 °C statt. Am folgenden Tag wird die Primärantikörperlösung abgenommen und es folgen drei Waschschrte für 5 Minuten mit 500 µl TBST bei RT. Während des letztes Waschschrts wird die Sekundärantikörper angesetzt. Dafür wird der polyklonale Cy3 IgG Zweitantikörper mit einer Endkonzentration von 3,75 µg/ml in 1% BSA TBST angesetzt. Es werden 250 µl der Sekundärantikörperlösung in die Wells gegeben und für zwei Stunden bei RT im dunklem inkubiert. Die Lösung wurde abgenommen und abermals folgen drei Waschschrte mit TBST für 5 Minuten bei RT im dunklem. Für die folgenden fluoreszenzmikroskopische Analyse werden 15 µl DAPI (4,6 Diamidino-2-phenyllindol) auf die Deckgläschen gegeben, mit DAPI werden die Zellkerne der Insektenzellen angefärbt. Die Deckgläschen werden mit der Oberseite (fixierte Zellen) in die DAPI- Tropfen gegeben und im Dunkeln bei RT angetrocknet. Abschließen wurden die Deckgläschen mit Klarlack versiegelt, dunkel gelagert und fluoreszenzmikroskopische ausgewertet. Dokumentiert und ausgewertet wurde am *Olympus BX51* Fluoreszenzmikroskop mit der Lampe *X-Cite serie 120* und der Kamera *Olympus DS71* unter der Verwendung der Fluoreszenzsoftware Cell<sup>^</sup>F. Für die Detektion von Dapi wurden die Proben bei einer Wellenlänge von 359 nm angeregt und für den Sekundärantikörper bei einer Wellenlänge von 550 nm. Für die Dokumentation und Analyse wurde für Dapi eine Belichtungszeit von 15 ms und für Cy3 200 ms gewählt, aufgenommen wurde bei einer 200x oder 400x Vergrößerung. Die aufgenommenen Bilder wurden mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware GIMP (2.10.22) übereinandergelegt.

### 2.5.2 Isolation und Präparation der Insektenzellmembranen

Nach einer 72 stündigen Inkubation in den Kolben wurde die Zellsuspension in 50 ml Falcons überführt und bei 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wurde bei -80°C für mindestens eine Nacht weggefroren.

Als Grundpuffer dient TEM (50 mM Tris, 50 mM Mannitol, 2 mM EGTA, pH 7), durch die Zugabe von Proteaseinhibitoren (cComplete Roche 1 Tablette auf 50 ml, und 25 µl PMSF 0,1g/ml in

DMSO) wird der Resuspendierungspuffer TEMP erhalten. Um den Homogenisierungspuffer herstellen zu können, werden 40 ml TEMP-Puffer mit 800 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT) versetzt.

Das Pellet wird auf Eis angetaut und mit 5 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer (TEMP-DTT) mit einer serologischen Pipette resuspendiert, danach in einen Glashomogenisator überführt und für 10 Minuten durch auf und ab bewegen des Pistels homogenisiert. Das Homogenisat wurde in 50 ml Zentrifugenröhren überführt. Es fand eine Zentrifugation bei 4°C, 500 x g für 10 min statt. War der Überstand nach diesem Zentrifugationsschritt noch trüb, wurde dieser wiederholt. Um die Proteinausbeute zu erhöhen, konnte das entstandene Pellet nochmals in 5 ml Homogenisierungspuffer gelöst und *gepottert* werden. Der Überstand wird dann in die Ultrazentrifuge überführt. Es wird bei 32600 *rounds per minute* (rpm) und 4°C für 70 min ultrazentrifugiert (Modell: J2-21L80), der Überstand wird verworfen. Mit einem Einwegspatel wird das Proteinpellet in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml TEMP-Puffer resuspendiert. Die Proteinlösung wurde für die Gesamtproteinbestimmung nach Bradford vorbereitet. Die Proteinlösungen werden bei -80°C gelagert.

### 2.5.3 Gesamtproteinbestimmung nach Bradford

Mittels des Bradford-Assays wurde die Gesamtproteinkonzentration nach der Membranisolation bestimmt. Zunächst wird eine Proteineichgerade mit bekannter BSA (Rinderserumalbumin) Konzentration angesetzt. Die BSA Verdünnungen (BSA in Millipore Wasser) wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und nach 10-minütiger Inkubationszeit bei RT bei einer Wellenlänge von 595 nm am Photometer gemessen. Die Proteinproben wurden 1:10 mit Millipore Wasser verdünnt, es wurde 1 ml Bradfordreagenz zu den Lösungen gegeben. Die Proben wurden ebenfalls 10 Minuten bei RT inkubiert und bei einer Wellenlänge von 595 nm am Photometer gemessen. Die Gesamtproteinkonzentration konnte mit Hilfe der Gradengleichung aus der Standardproteinmessreihe berechnet werden. Die biologischen Replikate wurden mit TEMP Puffer ohne DTT auf 5 µg/µl für den ATPase-Assay verdünnt und in 100 µL Aliquots abgefüllt. Für den Western Blot wurden zwei Aliquots des unverdünnten Proteins hergestellt. Alle Proben wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 2.5.4 SDS-Page

Um die Proteine ihrer Größe nach auftrennen zu können wurden SDS-Gele gegossen und eine gelelektrophoretische Auftrennung vorgenommen. Die so getrennten Proteine konnten im Anschluss über den Western Blot immunologisch nachgewiesen werden. Es wurde ein 10 % Trenngel (1 M Tris HCL pH 8,8, 40% AA-Bisacrylamid, 10% SDS, 10% APS und 0,1% TEMED), sowie ein 5% Sammgel (1 M Tris HCL pH 6,8, 40% AA-Bisacrylamid, 10% SDS, 10% APS und 0,01% TEMED) angesetzt. Es wurden 50 µg Protein für die PAGE eingesetzt und mit 4x *Laemmli*- Puffer versetzt. Die Denaturierung der Proteine fand im Anschluss bei 50°C für 5 min im Hitzeblock statt. Als Größenmarker diente der *Spectra Multicolor High Range Protein Ladder* (12 µl). Das Gel lief für eine Stunde bei 100 Volt, in 1X SDS Laufpuffer.

#### 2.5.5 Western-Blot

Beim Western Blot werden Proteine durch das Anlegen einer Spannung auf eine Membran transferiert und anschließend über eine Nachweis-Reaktion detektiert.

Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf die nitrozellulose Membran findet nach dem *wet* Verfahren in dem *Blotting* Apparatur statt. Der Aufbau des *Blotting Sandwiches* lautet wie folgt Kunststoffgitter schwarz (Anode) – Schwamm – 6x Filterpapier– Polyacrylamidgel – Nitrozellulose Membran – 6x Filterpapier - Schwamm – Kunststoffgitter weiß (Katode). Die Schwämme, das Filterpapier und die Membran werden in Transferpuffer (0,7 M Glycin, 25 mM Tris, 20% Methanol) äquiliert. Die zusammengesetzten Bestandteile und ein Kühlblock werden in die Apparatur eingelegt und mit Transferpuffer bedeckt. Der Blotting-Tank wird in den Kühlschrank gestellt und eine Spannung von 100 V für eine Stunde angelegt.

#### 2.5.6 Ponceau S Färbung

Die Proteine werden mit dem roten Azorfarbstoff *Ponceau S* reversible angefärbt und auf der Membran fixiert. Dazu wird die *Ponceau S* Farbe (0,1 % (w/v) *Ponceau S*, 5% Essigsäure (v/v)) auf die Membran gegeben, bis ein Signal zu erkennen ist. Die überschüssige Farbe wird mit einer Pipette abgenommen und anschließend mit Millipore Wasser gespült. Das Ergebnis wurde mit einer der Handkamera dokumentiert.

### 2.5.7 Immundetektion und Farbreaktion mit 4-CN

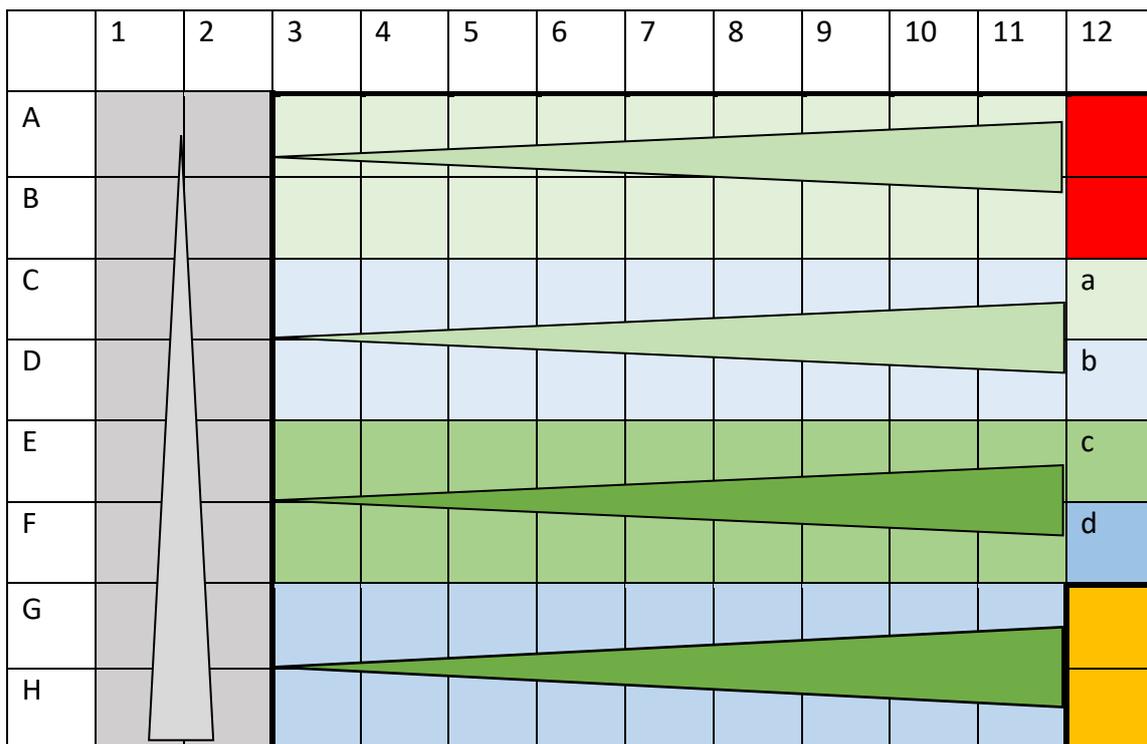
Für die immunologische Färbung wurde die Membran in ein Falcon überführt und dreimal für 5 Minuten mit TBST-Puffer (TBS-Puffer, 0,005% Tween20) auf einem Rotationsmischer gewaschen, danach folgt das abblocken unspezifischer Proteine für eine Stunde mit 5% BSA in 1x TBST auf dem Rotationsmischer. Die Nachweisreaktion findet über die spezifische Bindung des Primärantikörpers statt. Verwendet wird der spezifischer Antikörper C219 in einer Konzentration von 2 µg/ml in 1% BSA TBST. Die Inkubation findet bei 4°C über Nacht im Rotationsmischer statt. Danach folgt wieder dreimaliges Waschen der Membran für 5 min in TBST-Puffer. Im Anschluss erfolgt die Detektion des Primärantikörpers mit dem Sekundärantikörper (*HRP*- konjugierter Goat-anti mouse IgG, 4 µg/ml in 1% BSA TBST). Die Membran wird dreimal mit TBST für 5 Minuten im Rotationsmischer bei RT gewaschen. Vor der Visualisierung wird die Membran in Tris HCL (50 mM pH 7,5) dreimal für 5 min äqualibriert. Die Visualisierungslösung setzt sich aus Tris HCL (50 mM, pH7,5), 4- Chloro-1-Naphthol (4-CN) und 30 % Wasserstoffperoxid im Verhältnis zu 1000:10:1 zusammen. Die Lösung wird direkt auf die Membran pipettiert, nach dem ein Signal zu erkennen ist wird die Reaktion durch Wasser gestoppt. Die getrocknete Membran wird per Handykamera dokumentiert.

### 2.6 Vanadat-sensitives ATPase-Assay

Der ATPase-Aktivitätsassay nach Sakardi et al. 1992 ermöglicht die Bestimmung des Substratspektrums der ABCB Transporter des blauen Schwalbenwurz. Der Assay basiert auf dem Zusammenhang zwischen der ATP-Hydrolyse und dem Substrattransport. Im Transportzyklus eines ABC-Volltransporters werden 2 ATP beim Transport verbraucht. Bei der ATP-Hydrolyse entstehen ADP und anorganisches Phosphat (Pi), das freigesetzte Pi wird photometrisch quantifiziert. Die Aktivität des Proteins wird durch die Differenz zwischen dem freigesetzten Pi des Proteins ohne und mit Inhibitor (Orthovanadat) bestimmt, weshalb auch von einer vanadate-sensitiven ATPase-Aktivität gesprochen wird (Dermauw and Van Leeuwen 2014). Der in dieser Arbeit verwendete Assay beruht auf der Publikation von Kowalski et al. (2020) und wurde in unserer Arbeitsgruppe etabliert. Folgende Cardenolide wurden getestet: Digoxin (Sigma, Hamburg), Cymarín (Phytolab, Vestenbergsgreuth), Ouabain (Sigma, Hamburg) und Calotropin. Vorab wurden die Substrate in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Der Assay wird in einer 96-Well-Mikrotiterplatte in technischen Duplikaten á 50 µl durchgeführt. Der

Assaypuffer besteht aus folgenden Komponenten: 0,1 M MOPS-Tris, pH 7,0, Endkonzentration 50 mM, 1 M KCl, Endkonzentration 50 mM, 0,1 M Na-azide Endkonzentration 5mM, 0,1 M DTT Endkonzentration 2mM, 0,1 M EGTA-Tris pH 7,0, Endkonzentration 0,1mM, Millipore Wasser ad 8ml. Das im Assaypuffer verwendete Mg-ATP (Merk) besitzt die Endkonzentration von 3 mM. Ein Ansatz setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: nicht inhibiert (5 µg Membran in 10 µl Assay-Puffer + 20 µl X µM Cardenolidkonzentration + 20 µl MgATP) und inhibiert (5 µg Membran in 10 µl Assay-Puffer (500 µM Orthovanadate) + 20 µl X µM Cardenolidkonzentration + 20 µl MgATP). Um das freigesetzte Pi bestimmen zu können, wird eine Standardreihe Phosphat pro Platte angesetzt. Die Pi-Standardreihe wird aus einer Dikaliumhydrogenphosphat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) -Stammlösung (0,1 M) hergestellt und ebenfalls in Duplikaten (50 µl) aufgetragen, mit einer Endkonzentration von 0–20 nmol. Die verwendete Membrankonzentration beträgt 5 µg Protein pro Well. Als Kontrollen für den Assay dienen die basale ATPase-Aktivität (10 µl Membran (0,5 µg/µl) + 40 µl Assay-Puffer, ohne Mg-ATP), die Autohydrolyse des Mg-ATP (30 µl Assay-Puffer, 20 µl Mg-ATP, ohne Membran) und die Hintergrundaktivität (10 µl Assay-Puffer, 20 µl höchste Substratkonzentration (mit und ohne Inhibitor), 20 µl MgATP, keine Membran). Vor dem Assay wurde die Membranlösung auf eine Arbeitskonzentration von 0,5 µg/µl verdünnt (10 µl Membranextrakt pro Well). Jedes der drei biologischen Replikate des Transporters wurde in Anwesenheit von 500 µM Ortho-Vanadat und Abwesenheit dessen mit einer Substratkonzentration von 5-800 µM gemessen. Der Phosphatstandard, die Kontrollen und das Substrat wurden entsprechend der Konzentration in der Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wurde das eisgekühlte Membranextrakt mit und ohne Inhibitor gemäß dem Pipettierschema verteilt (siehe Abbildung 10). Nach einer Präinkubation auf dem Plattenschüttler für 5 Minuten bei 27°C und 300 rpm wurde Mg-ATP (Endkonzentration 3 mM) zugegeben, kurz bei 1000 rpm gemischt und die Hauptreaktionszeit bei 27°C für 20 Minuten auf dem Plattenschüttler durchgeführt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 20 µl 5%iger SDS-Lösung gestoppt und die Platte kurz geschüttelt. Anschließend werden folgende Reagenzien den Wells hinzugefügt, um das freigesetzte Pi bestimmen zu können: 50 µl P-Reagenz (2,5 M Schwefelsäure, 1% Ammonium Molybdat (Carl Roth), 0,014% Kaliumantimonyltartrat (Merk)), das zu einer Komplexbildung zwischen dem freigesetzten Pi und dem Molybdat führt und das Molybdatblau reduziert. Danach wird 30 µl 20%ige Essigsäure zugegeben und die Platte wird bei 1000 rpm für 10 Sekunden geschüttelt. Die Ascorbinsäure dient als

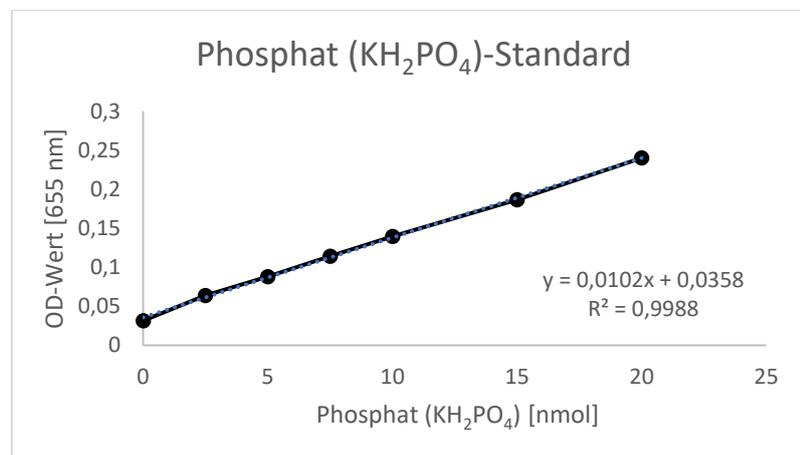
Reduktionsmittel und wird zum Schluss durch Zugabe von 25 µl 1%iger Ascorbinsäure ergänzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wird die Platte in den Mikroplatten-Reader (Modell 680, Bio Rad) gegeben und bei einer Wellenlänge von 655 nm gemessen. Das freigesetzte Pi und die vanadatsensitive ATPase-Aktivität werden über die Pi-Standardreihe berechnet. Das freigesetzte Pi wird für jeden Absorptionswert durch Umstellen der Geradengleichung ( $x=((y-b)/m)$ ) aus der Pi-Standardreihe berechnet, wie in Abbildung 12 dargestellt. Der Mittelwert der technischen Duplikate wird bestimmt und die Differenz zwischen nicht inhibiert und inhibiert gebildet, wie in Abbildung 11 beschrieben. Die endgültige vanadatsensitive ATPase-Aktivität wird berechnet, indem der ermittelte Wert des freigesetzten Pi durch die Reaktionszeit (20 Minuten) und die eingesetzte Proteinmenge (0,005 mg) dividiert wird (vanadatsensitive Aktivität = freigesetztes Pi [nmol] / Protein [mg] / Zeit [min]). Wie die Aktivität und die Kurven erstellt wurden, wird im nächsten Absatz beschrieben.



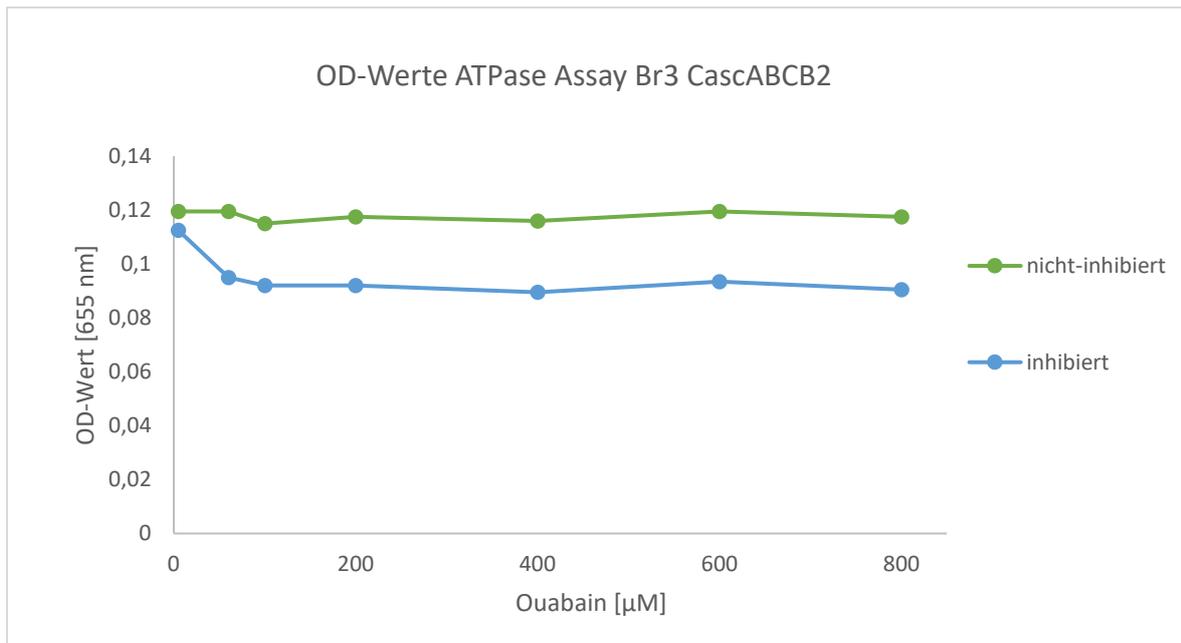
**Abbildung 2.4 Pipettierschema für den vanadate sensitiven ATPase Aktivitäts Assay für ein biologisches Replikat und zwei verschiedene Substrate.** Gezeigt ist das Pipettierschema einer 96 Wellplatte für den Assay, die Keile zeigen eine steigende Konzentration an. Grau: Pi Standard [nmol], hellgrün: Substrat 1 [µM] hellblau: Membranextrakt mit 500 µM Vanadate + Substrat 1, grün: Substrat 2 [µM] blau: Membranextrakt mit 500 µM Vanadate + Substrat 2, rot: Autohydrolyse des ATPs, orange: basale ATPase Aktivität, a-d: Hintergrundaktivität, schwarzumrandet: Zugabe von Mg-ATP

### 2.6.1 Auswertung des ATPase-Assays und erstellen der Aktivitätskurven

Das Erstellen der ATPase Aktivitäts Assay wurde in Excel 2010 durchgeführt. Die OD-Werte aus den photometrischen Messungen wurden in Excel 2010 exportiert. Die Aktivität der verschiedenen Transporter wurde über die Geradengleichung des Phosphatstandards (Abbildung 2.5) bestimmt. Die Abbildung 2.6 zeigt die OD-Werte des dritten biologischen Replikats des *CascABC2* getestet mit Ouabain, in schwarz ist inhibierte Proteinmix und in blau der nicht inhibierte Proteinmix dargestellt. Über das Umstellen der Geradengleichung aus Abbildung 11 kann das freigesetzte anorganische Phosphat der Proteinmixe bestimmt werden. Die Aktivität der Transporter wird durch folgende Formel berechnet: vanadat sensitive Aktivität= freigesetztes Pi [nmol]/ Protein [mg] / Zeit [min] (Abbildung 2.7 und 2.8).

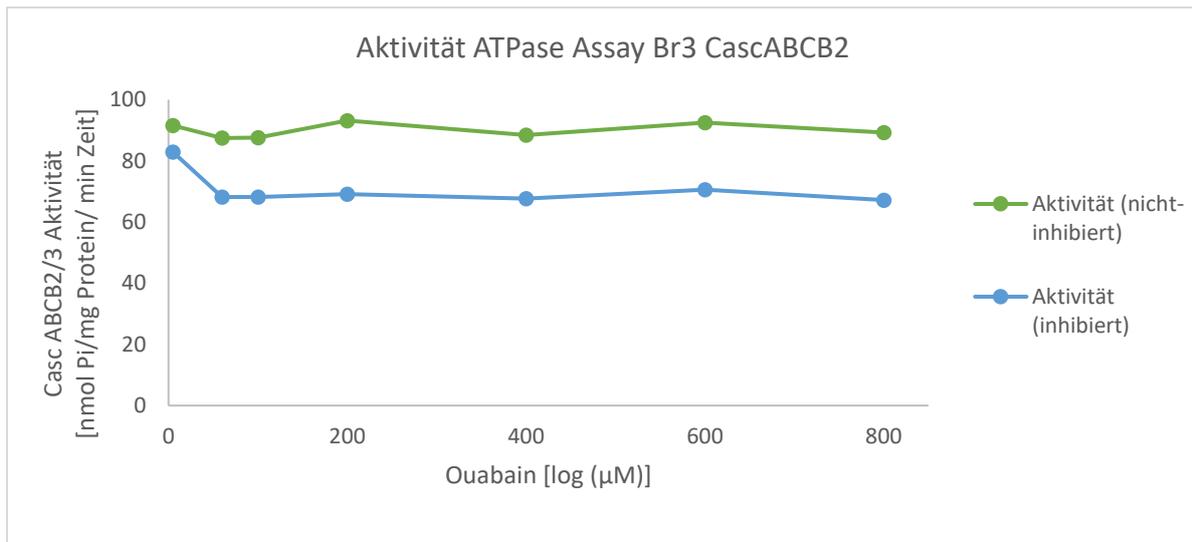


**Abbildung 2.5 Phosphat Standard der Platte des dritten biologischen Replikat von *Casc ABC2*.** Abgebildet ist der Phosphat Standard mit der Konzentration des Phosphat auf der x-Achse und auf der y-Achse die OD-Werte der verschiedenen Konzentration, ebenfalls ist die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) mit aufgeführt.

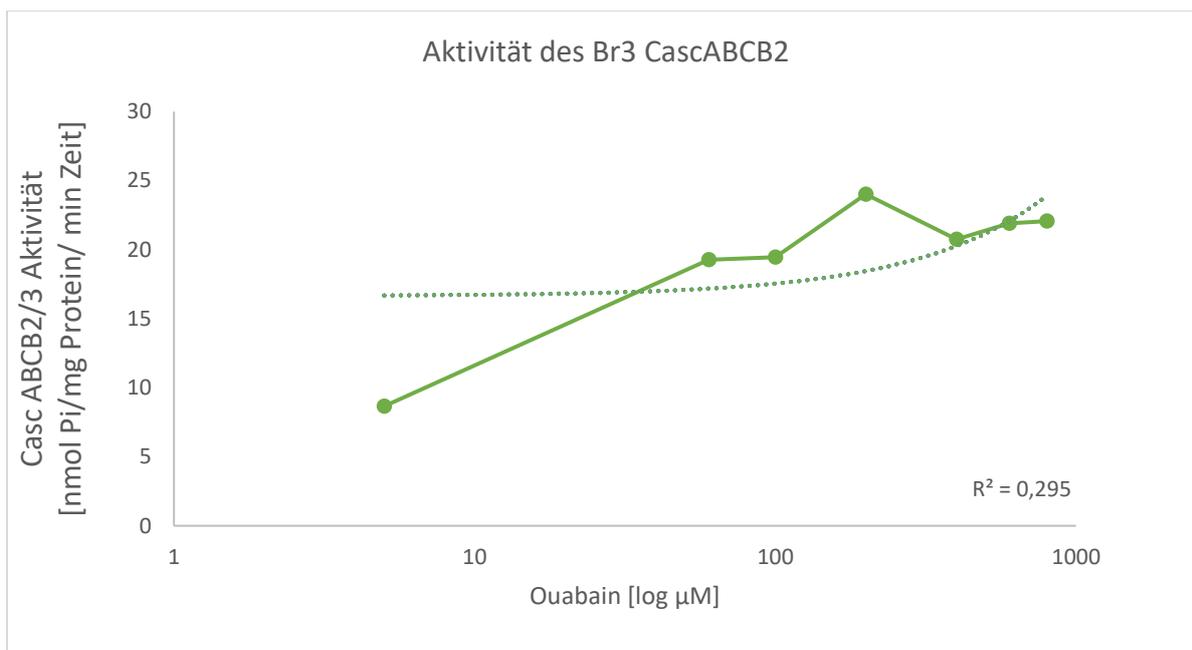


**Abbildung 2.6 OD- Werte des dritten biologischen Replikats des *Casc ABCB2/3* Transporter getestet mit Ouabain.** Dargestellt sind die nicht-inhibierten OD-Werte (hellgrün) und die mit Orthovanadat inhibierten OD-Werte (hellblau) des dritten biologischen Replikats des *Casc ABCB2* auf der y-Achse und auf der x-Achse die Ouabain Konzentration.

Nachdem die Aktivität der Proteinmixturen von nicht inhibiert (blau) und inhibiert (hellblau) bestimmt wurde (Abbildung 2.6). Die endgültige Aktivität der Transporter wurde durch die Differenz der nicht inhibierten Werte und der inhibierten Werte gebildet, (Abbildung 2.7) dazu. Für jeden Transporter und getestete Cardenolid wurden die Mittelwerte der drei getesteten biologische Replikate verwendet.



**Abbildung 2.7** Aktivitäten des dritten biologischen Replikats des *Casc ABCB2/3* Transporter getestet mit Ouabain. Dargestellt sind die nicht-inhibierten Aktivität (hellgrün) und die mit Orthovanadat inhibierten Aktivitäts Werte (hellblau) des dritte biologische Replikats des *Casc ABCB2* auf der y-Achse und auf der x-Achse die Ouabain Konzentration.



**Abbildung 2.8** Aktivität des dritten biologischen Replikats des *Casc ABCB2/3* Transporter getestet mit Ouabain. Dargestellt ist die Aktivität des dritten biologischen Replikats. Gebildet wird die Aktivität durch die Differenz der nicht-inhibierten Aktivität (hellgrün) und die mit Orthovanadat inhibierten Aktivitäts Werte (hellblau) das dritte biologische Replikats des *Casc ABCB2* (Abbildung 2.7). Auf der y-Achse ist die Aktivität abgebildet und auf der x-Achse die logarhytmische Ouabainkonzentration. Die Trendlinie soll die steigende Aktivität durch die steigende Ouabainkonzentration wiedergeben, es ist ebenfalls das Bestimmtheitsmaß der Messwerte mit angeben.

## 2.7 Verwendete Softwares für die Auswertung, grafischen Darstellungen, statistischen Auswertung und Bildbearbeitung

### 2.7.1 Allgemeine Auswertung und grafische Darstellung

Die in dieser Arbeit generierten Daten der qRT-PCR und der ATPase Aktivitäts-Assays wurden vor der statistischen Auswertung in Origin Pro 2021b in Excel Microsoft Office 2019 zusammengefasst und bearbeitet. Die grafische Darstellung der Ergebnisse der qRT-PCR und des ATPase Aktivitäts-Assays wurde ebenfalls in Microsoft Excel Microsoft Office 2019 durchgeführt.

### 2.7.2 Statistische Auswertung

Die in Excel 2019 zusammengefassten Dateien der qRT-PCR und des ATPase-Aktivitätsassays wurden in Origin 2021b geladen. Zur Auswertung der qRT-PCR-Daten wurde eine 2-faktorielle ANOVA angewendet, um mögliche Unterschiede zwischen den beiden *C. asclepiadeus* ABCB-Transportern und den verwendeten Geweben zu untersuchen, sowie eine ANOVA, um Unterschiede zwischen den beiden Genen in jedem einzelnen Gewebe zu testen. Zur Auswertung des ATPase-Aktivitätsassays wurde eine ANOVA verwendet, um die Aktivitätskurven der beiden *C. asclepiadeus* und *C. populi* ABCB-Transporter gegenüber der Substratkonzentration zu testen. Ein Signifikanzniveau von 0,05 wurde für alle verwendeten statistischen Analysen gewählt.

### 2.7.3 Grubbs Ausreißer-Test

Um mögliche Ausreißer in den ATPase Assay identifizieren zu können, wurde der Ausreißer-Test nach Grubbs angewendet. Der Test beruht auf folgender Formel:

$$G = \frac{\text{max. Wert} - \text{Mittelwert}}{\text{Standardabweichung}}$$

Durch den Abgleich des G Wertes mit Tabellenwerten kann die Wahrscheinlichkeit von Ausreißern bestimmt werden.

## test values according to Grubbs

N	90 %	95 %	99 %	N	90 %	95 %	99 %
3	1,148	1,153	1,155	10	2,036	2,176	2,410
4	1,425	1,463	1,492	11	2,088	2,234	2,485
5	1,602	1,672	1,749	12	2,134	2,285	2,550
6	1,729	1,822	1,944	13	2,175	2,331	2,607
7	1,828	1,938	2,097	14	2,213	2,371	2,659
8	1,909	2,032	2,221	15	2,247	2,409	2,705
9	1,977	2,110	2,323	16	2,279	2,443	2,747

Abbildung 2.9 Auflistung der Wahrscheinlichkeit von Ausreißer bestimmt durch den Grubbs Test.

### 2.7.4 Bildbearbeitungsprogramm

Die verschiedenen Illustrationen wurden in Microsoft PowerPoint 2019, SnapGene Viewer oder der freizugänglichen Software GIMP 2.10.22 erstellt und oder bearbeitet.

### 2.7.5 Sequenzalignment und phylogenetische Stammbäume

Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden mit ClustalW oder MUSCLE in MEGA X aligniert. Die phylogenetischen Stammbäume wurden ebenfalls in MEGA X erstellt, indem die Maximum-Likelihood Methode unter Verwendung des JTT-Modells angewendet wurde.

### 2.7.6 Rechtschreib und Grammatikprüfung

Aufgrund einer Lese-Rechtschreibschwäche wurden die Absätze dieser Dissertation mithilfe von ChatGPT<sup>8</sup> auf Rechtschreibung und Grammatik überprüft.

---

<sup>8</sup> <https://chat.openai.com/c/6704af46-ec52-4c70-aa51-dd0855056c23>

## 3. Ergebnisteil

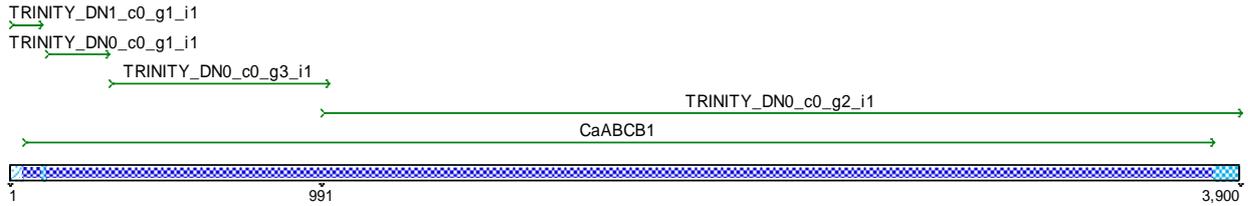
### 3.1 Bioinformatik

#### 3.1.1 Identifizierung möglicher ABCB-Sequenzen im Transkriptom des *C. asclepiadeus*

Um mögliche ABCB-Sequenzen im Transkriptom von *C. asclepiadeus* (*Casc*) zu finden, wurde der tblastx-Algorithmus mit den vorhandenen ABCB-Sequenzen von *C. auratus* (*Cau*) (*C. auratus* ABCB1: 3768 Basenpaare, 1255 Aminosäuren; ABCB2: 3777 Basenpaare, 1258 Aminosäuren; ABCB3: 3780 Basenpaare, 1259 Aminosäuren) durchgeführt (Dissertation Michael Baum, 2015). Die resultierenden Nukleotidsequenzen wurden in einem Alignment mit den ABCB-Sequenzen von *C. auratus* verglichen. Dabei wurden Hits mit den folgenden Transkript-Identifizierungen gefunden: c19676\_g1\_i1, i2 und i5 passend zu *CauAbcb2* und 3, sowie c14789\_g2\_i1 und c28097\_g1\_i1, welche dem *Abcb1* von *C. auratus* zugeordnet werden konnten. Die vermutete *CascAbcb1*-Sequenz konnte nicht vollständig von den Blasthits abgedeckt werden (Abbildung 2.2). Die restlichen Blasthits (c19553\_g2\_i4, i1) konnten keiner *C. auratus*-Sequenz zugeordnet werden, aber der Blasthit c19553\_g2\_i4 konnte durch den ABC-Scan (Denecke et al., 2021) der ABCH-Unterfamilie zugeordnet werden (Absatz 3.1.9), während c19553\_g2\_i1 als Duplikat anhand der prozentualen Identitätsmatrix identifiziert wurde.

#### 3.1.2 Mapping zur Vervollständigung der *CascAbcb1*-Sequenz

Um die *CascAbcb1*-Sequenz zu vervollständigen, wurden die ermittelten Blasthits (c19553\_g2\_i1, c28097\_g1\_i1) und die *CauAbcb1*-Sequenz mithilfe des Cat-Tools auf Galaxy zusammengeführt. Anschließend wurde das Bowtie2-Tool (Galaxy) verwendet, um die Rohdaten des *C. asclepaideus* Transkriptoms gegen die *Abcb1*-Sequenz zu mappen. Die erhaltenen Reads wurden mithilfe des Trinity *de novo assembly* RNA Seq data-Tools assembliert und erneut mit der *CauAbcb1*-Sequenz abgeglichen. Wie in Abbildung 3.1 zu erkennen ist, konnten die Contigs aus dem Mapping die unvollständige *CascAbcb1* Sequenz komplett abdecken. Die aus Sequencher erhaltene Consensus-Sequenz wurde für die weiteren Analysen exportiert. Die potenziellen ABCB-Transporter-Sequenzen wurden mithilfe des Online-Tools Expsy Prosite sowie des TMHMM-Web2-Servers (Tied Mixture Hidden Markow Modell -Web2) auf ihre Proteinarchitektur analysiert (Abbildung 3.2).



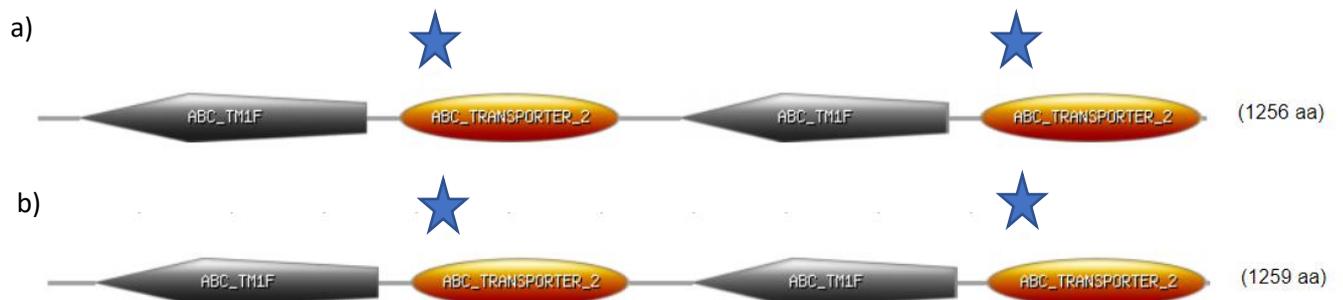
**Abbildung 3.1: Sequencher *Casc-Abcb1* und *Cau-Abcb1* Alignment.** Gezeigt sind die über Trinity assemblierten *CascAbcb1* Reads aus den über Bowtie2 gemappten Daten im Vergleich zu der *CauAbcb1* Sequenz.

### 3.1.3 Charakterisierung der *in silico* identifizierten *CascABCB*-Sequenzen

Die Nucleotidsequenzen der beiden potenziellen ABCB-Transporter wurden mithilfe des Online-Tools *ExPASy Translate* in die jeweiligen Aminosäuresequenzen (AS-Sequenzen) übersetzt, um den *Open Reading Frame* (ORF) vorab zu identifizieren. Ein typischer ABC- Volltransporter besteht aus vier Domänen: zwei Transmembrandomänen (TMD) und zwei cytoplasmatischen Nucleotidbindedomänen (NBD), mit folgender Domänenfolge TMD-NBD-TMD-NBD (Linton, 2007; Zolnerciks et al., 2011). Die ExPASy Prosite-Analyse ergab, dass alle typischen Domänen in dem *in-silico* vorhergesagten ORF-Bereich der ABCB-Sequenzen vorhanden sind. Die Transmembrandomänen wurden in grau und die Nucleotidbindedomänen in orange dargestellt. Die ABC-Signatur ist durch grüne Balken gekennzeichnet (Abbildung 3.2). Für *CascABCB1* liegen die Transmembrandomänen an den AS-Positionen 47-355 und 692-979 und die Nucleotidbindedomänen an den AS-Positionen 390-626 und 1013-1251. Die Transmembrandomänen von *CascABCB2* befinden sich an den AS-Positionen 53-358 und 700-985 und die Nucleotidbindedomänen an den AS-Positionen 395-631 und 1019-1257 (Tabelle 3.1 und Abbildung 3.2). Eine Übersicht über die einzelnen Transmembranhelices, Motive und Antikörperepitope ist dem Proteinalignment im Anhang zu entnehmen.

**Tabelle 3.1 Übersicht der ABCB Motivposition.** Aufgeführt sind die spezifischen ABCB-Motive, sowie die Epitope des spezifischen Antikörpers C219 in der AS-Sequenz der NBD der beiden Membranproteine des *C. ascleipadeus*.

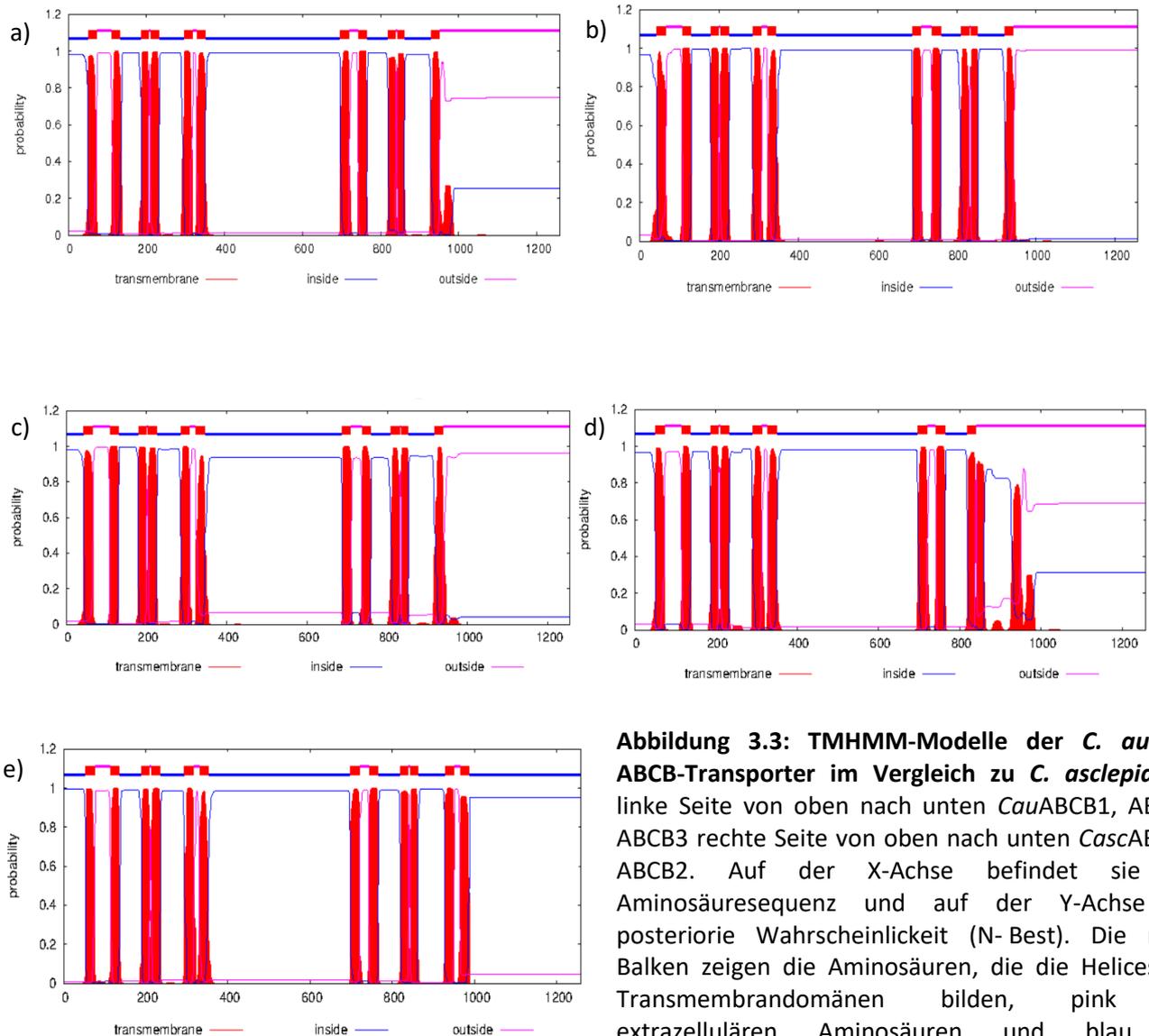
Konserviertes Motiv	NBD1		NBD2	
	ABCB1	ABCB2	ABCB1	ABCB2
<b>Walker A</b> GxxGxGK(S/T)	425-432 GNSGCGKS	430-437 GGSGCGKS	1048-1056 GSSGCGKS	1054-1061 GASGCGKS
<b>Walker B</b> xxxxDE	549-554 ILLLDE	554-559 ILLLDE	1174-1179 ILLLDE	1180-1185 ILLLDE
<b>Signatur</b> LSGGQ	529-533 LSGGQ	534-538 LSGGQ	1154-1158 LSGGQ	1160-1164 LSGGQ
<b>C219 Epitope</b> N-Terminal: VQEALD C-Terminal: VQAALD	567-572 VQTALD	572-577 VQDALD	1192-1197 VQEALD	1197-1203 VQEALD



**Abbildung 3.2: Expsy Prosite Proteinstrukturanalyse.** a) *CascABCB1* mit 1256 Aminosäuren b) *CascABCB2* mit 1259 Aminosäuren. Grau: Transmembrandomäne, orange: Nukleotidbindedomäne, blaue Sterne: ABC-Signatur.

Die weitere Charakterisierung der Transmembrandomänen wurde mittels des TMHMM WebServers2 durchgeführt, der mittels des Hidden-Markov-Modells die Topologie von Membranproteinen vorhersagen kann. Die roten Balken markieren dabei die Aminosäuresequenzen, die die Helices der Transmembrandomänen bilden. Die pinken Linien repräsentieren die Aminosäuren, die sich extrazellulär befinden, und die blauen Linien die intrazellulären Aminosäuren. Beide *CascABCB* Sequenzen besitzen mindestens 11 TMD-Helices. Die roten Balken zeigen einen N-best Wert >1 der posterioren Wahrscheinlichkeit. Der N-Wert beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der der N-Terminus auf der zytoplasmatischen Seite befindet. Je näher sich der Wert der 1 nähert, desto besser ist die Vorhersage. Zum Vergleich der *CascABCBs* sind ebenfalls die TMHMM-Modelle der ABCBs des

*C. auratus* aufgeführt. Alle fünf Abbildungen der TMHMM-Modelle weisen dabei ähnliche Eigenschaften auf (Abbildung 3.3).

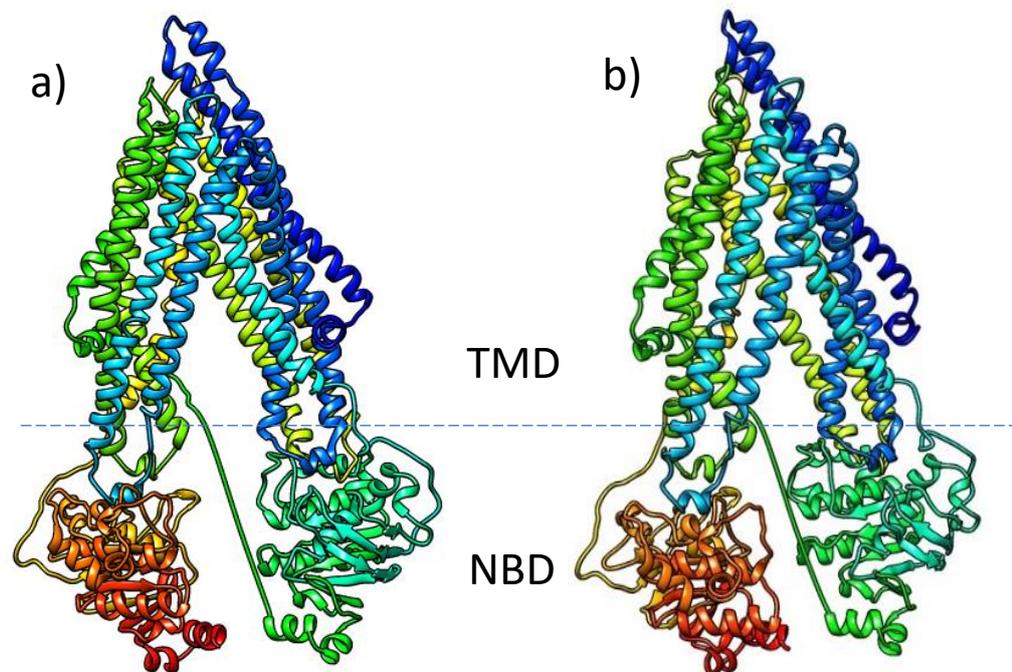


**Abbildung 3.3: TMHMM-Modelle der *C. auratus* ABCB-Transporter im Vergleich zu *C. asclepiadeus*** linke Seite von oben nach unten *Cau*ABCB1, ABCB2, ABCB3 rechte Seite von oben nach unten *Casc*ABCB1, ABCB2. Auf der X-Achse befindet sie die Aminosäuresequenz und auf der Y-Achse die posteriore Wahrscheinlichkeit (N-Best). Die roten Balken zeigen die Aminosäuren, die die Helices der Transmembrandomänen bilden, pink die extrazellulären Aminosäuren und blau die intrazellulären Aminosäuren. (Aminosäuresequenz von *C. auratus* aus der Dissertation Michael Baum, 2015)

### 3.1.4 Vorhersagemodell der Tertiärstruktur der ABCBs mittels Phyre2

Um Vorhersagemodelle für die Tertiärstrukturen der beiden ABCB-Proteine zu erstellen, wurden die AS-Sequenzen mithilfe des Online-Tools Phyre2 (Kelley & Sternberg, 2009) analysiert. Dabei wurden die AS-Sequenzen mit der vorhandenen Protein-Datenbank abgeglichen und auf Grundlage von Homologien in den Sequenzen modelliert. Basierend auf der Vorlage c3g5uB (*Mus musculus*) konnten 94% der ABCB1-Sequenz und 93% der ABCB2-

Sequenz mit 100% Übereinstimmung modelliert werden. Die in Abbildung 3.4 dargestellten Tertiärstrukturen beruhen ebenfalls auf der c3g5uB-Vorlage und wurden mit der frei erhältlichen Software Chimera grafisch dargestellt.



**Abbildung 3.4: Vorhersagemodel der Proteinstruktur von *CascAbcb1* und *CascAbcb2*.** a) Model von *Casc ABCB1* b) Model von *Casc ABCB2*, beide wurden mittels Phyr2 erstellt und mit Chimera visualisiert (Petersen et al. 2004). TMD: Transmembrandomäne und NBD: Nukleotidbindedomäne

### 3.1.5 Sequenzalignment der *Chrysochus*-Arten, *Chysomela populi*, Mensch und Maus ABCB-Transporter zur Homologieanalyse der Transporterbindetasche

Um Homologien zu anderen Arten in den Transporterproteinen der *Chrysochus*-Arten zu identifizieren, wurde mit ClustalOmega ein Proteinalignment erstellt, das als Vergleich die ABCB-Sequenz *Chysomela populi* (*Cpop*) sowie die ABCB1 der Maus und des Menschen umfasste. Die Transmembrandomänen bilden die Bindungstasche für die Substrate, und durch den Abgleich der Sequenzen können Unterschiede lokalisiert werden, die Rückschlüsse auf das Substratspektrum ermöglichen. Dieses Proteinalignment soll zunächst einen Gesamtüberblick der ABCB-Transporter geben. Die Transmembrandomänen der einzelnen Transporter werden in den nächsten Absätzen näher beschrieben. Wie bereits geschildert stehen die ABCB-Transporter im Zusammenhang mit der Ausschleusung von Medikamenten, Fungiziden, Insektiziden und auch Cardenoliden aus den Zellen (Kowalski et al., 2020; Pauchet

et al., 2016). Der humane ABCB1-Effluxtransporter interagiert zum Beispiel mit Digoxin (de Lannoy & Silverman, 1992). Basierend auf der Aminosäuresequenz der ABCB1-Bindetasche der Maus konnten neun AS (Ile306, Phe336, Ile340, Phe343, Phe728, Phe942, Thr945, Leu975, Val982) identifiziert werden, die im Zusammenhang mit dem Cardenolidtransport stehen könnten (Aller et al., 2009; Gozalpour et al., 2013). Um Aussagen über die Proteinhomologie der verschiedenen ABCB-Transporter und deren Bindetasche treffen zu können, wurde ein ClustalOmega-Alignment erstellt. Für *CascABCB1* stimmt nur eine der neun AS mit der der Maus und des Menschen überein. Für *CascABCB2* stimmen vier AS überein. Die beiden ABCB1-Proteine der *Chrysochus*-Arten sind für diese neun AS homolog zueinander. Der ABCB1 der *C. populi* unterscheidet sich an der Position 972. *CascABCB2* zeigt starke Ähnlichkeit zu *CauABCB2* und *ABCB3*, aber alle unterscheiden sich an den Positionen 340 und 343 (Tabelle 3.2). Der ABCB2 von *C. populi* unterscheidet sich von *CascABCB2* an der Position 340. Der *CauABCB3* ist für diese neun AS dem *CpopABCB2* homolog. Der Vergleich der neun Aminosäuren, die möglicherweise am Cardenolidtransport beteiligt sind, lässt vermuten, dass das Substratspektrum der beiden *Chrysochus*-Arten ähnlich sein könnte.

**Tabelle 3.2 Übersicht der Aminosäuren, die potentiell bei dem Cardenolidtransport beteiligt sein könnten.** Gezeigt sind die potentiellen AS, aus dem Proteinalignment (ClustalW in MegaX) der Maus, des Menschen und der *Chrysochus*-Arten, die im Zusammenhang mit dem Cardenolidtransport stehen könnten. In blau sind die identischen AS der Käfer ABCB1 markiert, gelblich sind die AS die in allen Käfern identisch sind, rötlich sind die AS von ABCB2 und 3 dargestellt die identisch sind. In grün ist die Position markiert, die in allen Arten identisch ist.

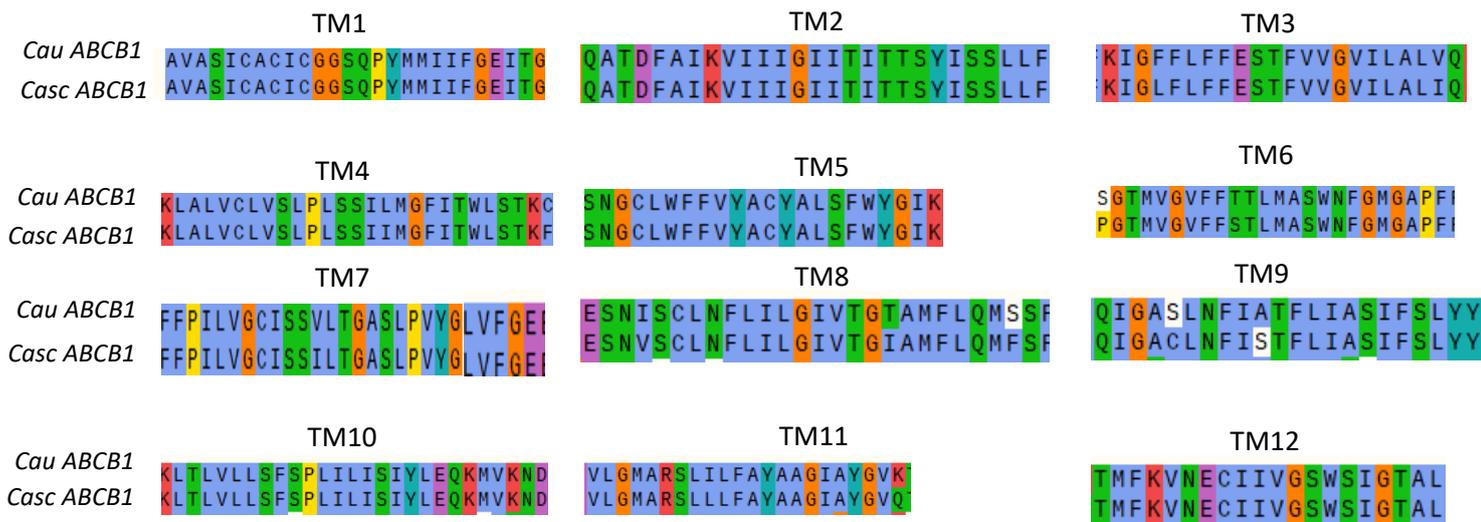
	Aminosäure und Position								
	306	336	340	343	728	942	945	975	982
<i>MmusABCB1</i>	Ile	Phe	Ile	Phe	Phe	Phe	Thr	Leu	Val
<i>HsapABCB1</i>	Ile	Phe	Ile	Phe	Phe	Phe	Thr	Leu	Val
<i>CascABCB1</i>	Val	Phe	Met	Trp	Tyr	Leu	Ala	Phe	Ile
<i>CascABCB2</i>	Ile	Phe	Ser	Met	Phe	Phe	Ser	Phe	Ile
<i>CauABCB1</i>	Val	Phe	Met	Trp	Tyr	Leu	Ala	Phe	Ile
<i>Cau ABCB2</i>	Asn	Phe	Thr	Ala	Phe	Phe	Ser	Phe	Ile
<i>Cau ABCB3</i>	Ile	Phe	Asn	Met	Phe	Phe	Ser	Phe	Ile
<i>CpopABCB1</i>	Val	Phe	Val	Trp	Tyr	Leu	Ala	Ile	Ile
<i>CpopABCB2</i>	Ile	Phe	Asn	Met	Phe	Phe	Ser	Phe	Ile

### 3.1.6 Sequenzalignment der Transmembrandomänen der untersuchten ABCB-Transporter

Um weitere Aufschlüsse über Unterschiede der Transmembrandomänen zu erhalten, wurde ein Alignment der Transmembranhelices der ABCB Transporter der *Chrysochus*-Arten mit ClustalOmega erstellt und im SnapGene Viewer visualisiert. Von den 293 Aminosäuren, die die zwölf Transmembranhelices bilden, unterscheiden sich die beiden *Chrysochus*-Arten bei ABCB1 an vierzehn Positionen (Tabelle 3.3, Abbildung 3.5). Abbildung 3.5 zeigt das ClustalW-Alignment der zwölf Transmembranhelices mit dem jeweiligen ClustalW- Aminosäurencode, der für die Eigenschaft der Aminosäure und ihre Konservierung steht. Die Aminosäuren an den Positionen 768, 775 (TM8), 837, 841 (TM9) und 979 (TM11) unterscheiden sich in ihren physikochemischen Eigenschaften. Die Aminosäure 768 (Threonin) in *Cau*-ABCB1 ist polar und unterscheidet sich von Isoleucin (hydrophob) in *Casc*ABCB1, Position 775 (Serin) von *Cau*ABCB1 ist polar und unterscheidet sich von *Casc*ABCB1 Phenylalanin (hydrophob), *Cau*ABCB1 837 (Serin) ist polar und unterscheidet sich von *Casc*ABCB1 Cystein (hydrophob), *Cau*ABCB1 841 (Alanin) ist hydrophob und unterscheidet sich von *Casc*ABCB1 Serin (polar), *Cau*ABCB1 979 (Lysin) ist positiv geladen und unterscheidet sich von *Casc*ABCB1 Glutamin (polar).

**Tabelle 3.3 Übersicht der nicht identischen Aminosäuren der Transmembrandomänen von ABCB1 von den *Chrysochus*-Arten.** Gezeigt sind die Aminosäuren und die Positionen der Aminosäuren, die nicht identisch sind. Die Positionen beziehen sich auf das Homologiealignment mit dem humanen ABCB1. Die fettgedruckten Positionen beschreiben die Aminosäuren, die sich in ihren Eigenschaften unterscheiden.

	Aminosäure und Position													
	192	209	228	239	328	337	719	754	<b>768</b>	<b>775</b>	<b>837</b>	<b>841</b>	949	<b>979</b>
<i>Cau</i> ABCB1	Phe	Val	Leu	Cys	Ser	Thr	Val	Ile	<b>Thr</b>	<b>Ser</b>	<b>Ser</b>	<b>Ala</b>	Ile	<b>Lys</b>
<i>Casc</i> ABCB1	Leu	Ile	Ile	Phe	Pro	Ser	Ile	Val	<b>Ile</b>	<b>Phe</b>	<b>Cys</b>	<b>Ser</b>	Leu	<b>Glu</b>

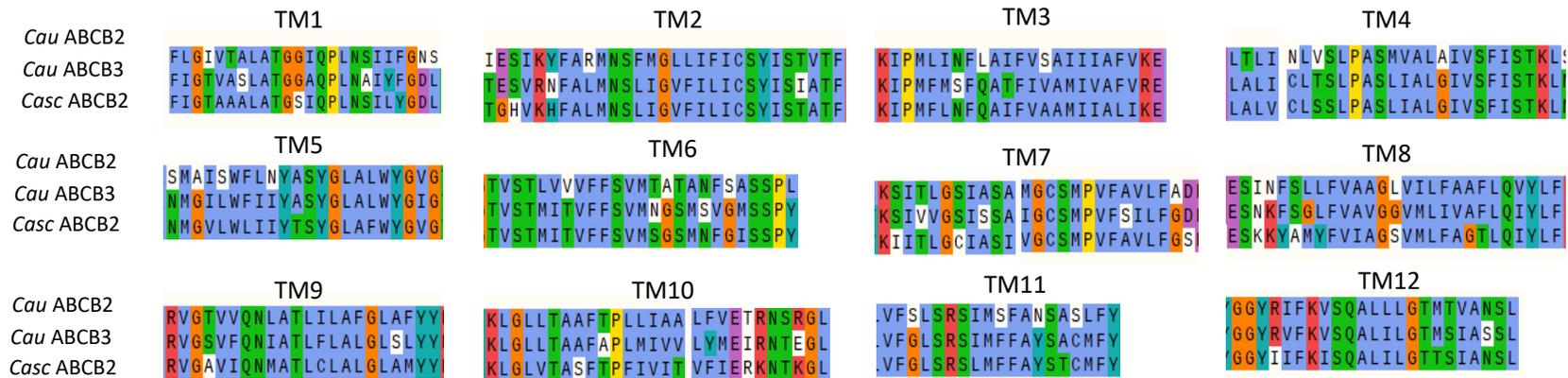


**Abbildung 3.5: ClustalW Proteinalignment der TMs von ABCB der beiden *Chrysochus* Arten mit dem ClustalW Aminosäuren Eigenschaften Farbcode.** Gezeigt sind die zwölf Transmembranhelices der ABCB1 Transporter von *C. auratus* und *C. asclepiadeus* mit dem jeweiligen Farbcode aus ClustalW der die Eigenschaften der Aminosäuren darstellt. Blau: hydrophob, grün: polar, magenta: negativ geladen, rot: positiv geladen, pink: Cystein, orange: Glycerin, gelb: Proline, cyan: aromatisch und weiß: wenn keines der vorherigen Kriterien zutrifft.

Da bisher nur zwei ABCB-Volltransporter in dem *C. asclepiadeus* Transkriptom identifiziert werden konnten, (siehe dazu Absatz 3.1.1 und 3.1.9), ist nicht eindeutig zu sagen, ob der zweite *Casc*ABCB-Transporter näher mit dem *Cau*ABCB2 oder 3 verwandt ist (siehe Absatz 3.1.8). Daher sind von diesen beide Transmembrandomänen aufgeführt (Abbildung 3.6). Die drei Sequenzen der ABCB2 und 3 Transporter unterscheiden sich in 18 Aminosäuren, wobei sie sich alle an Position 753 in ihren physiochemischen Eigenschaften unterscheiden. *Cau*ABCB2 Isoleucin (apolar), *Cau*ABCB3 Asparagin (polar) und *Casc*ABCB2 Lysin (positiv geladen (Tabelle 3.4, Abbildung 3.6).

**Tabelle 3.4 Übersicht der verschiedenen Aminosäuren der Transmembrandomänen von ABCB2 und ABCB3 der untersuchten *Chrysochus*- Arten.** Gezeigt sind die Aminosäuren und die Positionen der Aminosäuren, die nicht identisch sind, der beiden *Chrysochus*-Arten. Die Positionen beziehen sich auf das Homologiealignment mit dem humanen ABCB1. Die fettgedruckten Zahlen, beschreiben die Aminosäuren, die sich in ihren Eigenschaften unterscheiden.

	Aminosäure und Position																		
	71	113	194	202	220	340	347	721	<b>753</b>	757	764	835	837	840	844	870	878	876	880
<i>Cau</i> ABCB2	Ile	Tyr	Ile	Ser	Val	Thr	Ala	Met	<b>Iso</b>	Leu	Thr	Val	Ile	Phe	Leu	Ala	Ala	Thr	Arg
<i>Cau</i> ABCB3	Tyr	Asn	Met	Val	Thr	Asn	Met	Ile	<b>Asn</b>	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Met	Val	Val	Ile	Glu
<i>Casc</i> ABCB2	Leu	His	Leu	Ala	Ser	Ser	Ile	Val	<b>Lys</b>	Met	Asn	Ile	Cys	Met	Ile	Ile	Thr	Arg	Lys



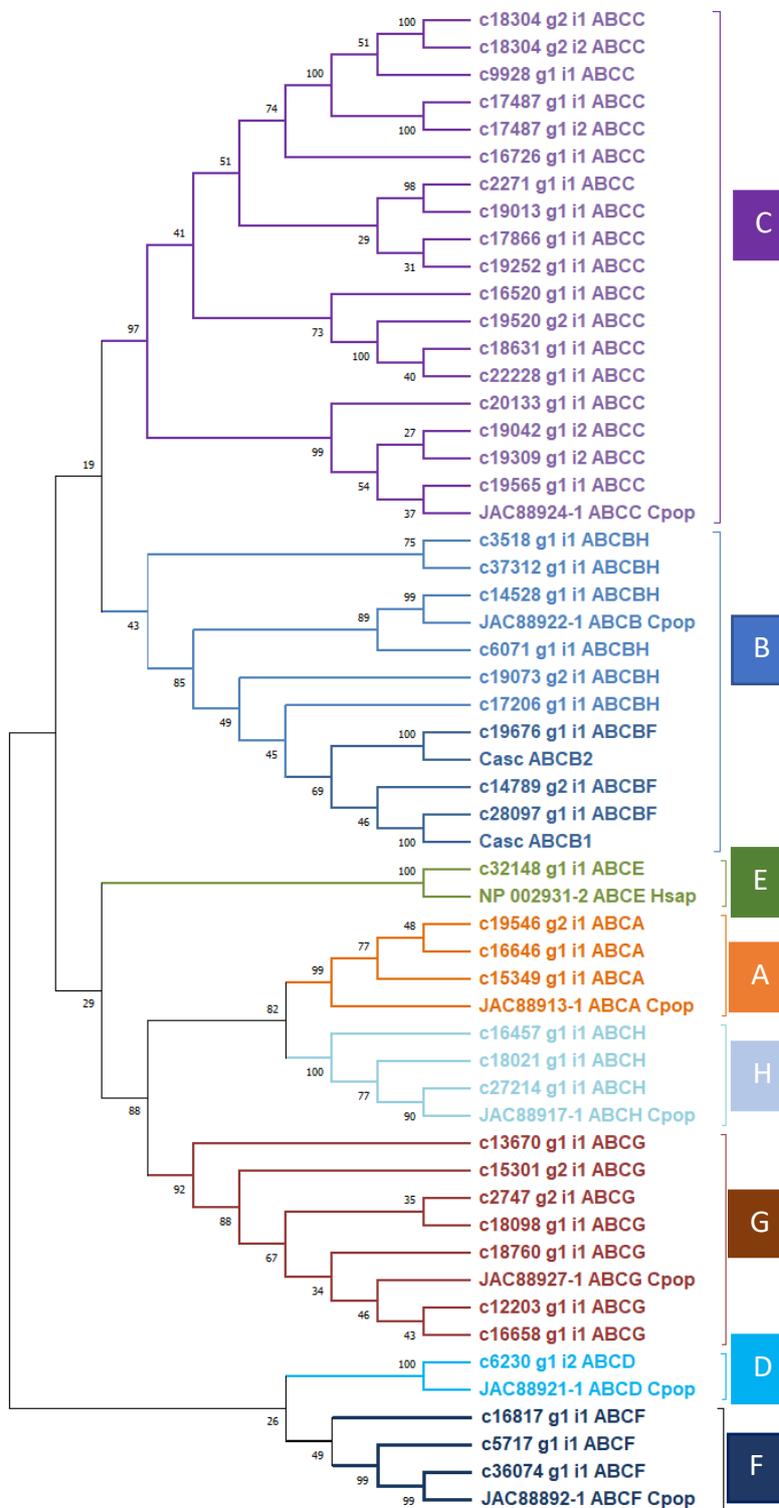
**Abbildung 3.6: ClustalW Proteinalignment der TMs von ABCB der beiden *Chrysochus*-Arten mit dem ClustalW Aminosäuren Eigenschaften Farbcode.** Gezeigt sind die zwölf Transmembranhelices der beiden ABCB Transporter von *C. auratus* und *C. asclepiadeus* mit dem jeweiligen Farbcode aus ClustalW der die Eigenschaften der Aminosäuren darstellt. Blau: hydrophob, grün: polar, magenta: negativ geladen, rot: positiv geladen, pink: Cystein, orange: Glycerin, gelb: Proline, cyan: aromatisch und weiß: wenn keines der vorherigen Kriterien zutrifft.

### 3.1.7 Identifikation der ABC-Unterfamilien im *C. asclepiadeus* Transkriptom über den ABC-Scan (Denecke et al. 2021)

Zur Identifikation aller ABC-Unterfamilien im *C. asclepiadeus* Transkriptom sowie zur Überprüfung der über Blast-Suche gefundenen ABCB-Sequenzen wurde der ABC-Scan (Denecke et al., 2021) verwendet. Außerdem sollte mit dieser Methode ein potentiell dritter ABCB-Transporter gesucht werden. Um den ABC-Scan verwenden zu können, wurde das Transkriptom in die Proteinsequenz übersetzt (alle 6 Leserahmen). Der ABC-Scan ordnete die geladenen Proteinsequenzen mithilfe des Hidden-Markov-Modells den ABC-Unterfamilien zu. Alle möglichen Sequenzduplikate wurden über eine prozentuale Identitätsmatrix aus dem Datensatz eliminiert (Anhang). Zur weiteren Kontrolle der Unterfamilien wurden ABC-Sequenzen von *C. populi* (Strauss et al., 2014) für das Alignment hinzugefügt. ABC-Sequenzen von *C. populi* wurden verwendet, da es keinen "ABC-Komplettsatz" von *C. auratus* gibt. Das Proteinalignment (MUSCLE) und der phylogenetische Baum (Maximum-Likelihood-Methode) wurden in MEGA X erstellt.

Es konnten 45 mögliche ABC-Transportersequenzen identifiziert werden. Die 45 erhaltenen Sequenzen konnten den acht typischen ABC-Unterfamilien (A-H) zugeordnet werden (Abbildung 18). Für die ABCA- Unterfamilie konnten drei mögliche Transporter identifiziert werden (Abbildung 18, orange). Anders als bei der Blastsuche ermöglichte der ABC-Scan die Unterfamilie B in Halbtransporter (BH) und Volltransporter (BF) zu unterteilen (Abbildung 18, dunkelblau). Die aus dem Scan identifizierten Sequenz-IDs stimmten mit den Blasthits überein, und es konnten über diese Methode ebenfalls zwei ABCB-Volltransporter identifiziert werden. Die beiden Transkripte c14789g2i1 und c28097g1i1 entsprechen dem *Casc* ABCB1-Transporter. Über diese Methode konnte kein dritter ABCB-Volltransporter identifiziert werden. Mit 18 möglichen Mitgliedern zeigt die Unterfamilie C die größte Gruppe innerhalb der Unterfamilien des *C. asclepiadeus* (Abbildung 3.7, lila). Von den Unterfamilien D und E konnten jeweils ein möglicher Transporter identifiziert werden (Abbildung 3.7, hellblau Unterfamilie D, grün Unterfamilie E). Den Unterfamilien F und H konnten jeweils drei Sequenzen zugeordnet werden (Abbildung 3.7, F schwarzblau, H hellblau). Mit der Unterfamilie G gruppieren sich sieben mögliche ABC-Transportersequenzen (Abbildung 3.7, braun). Die aus dem ABC-Scan identifizierten Sequenz-IDs clustern ebenfalls mit den Referenzsequenzen von *C. populi* beziehungsweise ABC-E des Menschen. Verglichen mit

anderen Arthropodenarten ähnelt die Anzahl der ABC-Sequenzen des *C. asclepiadeus* denen der Fruchtfliege (*D. melanogaster*), welche 56 besitzt, und denen des *C. populi* mit 65 ABC-Sequenzen (Strauss et al., 2014)



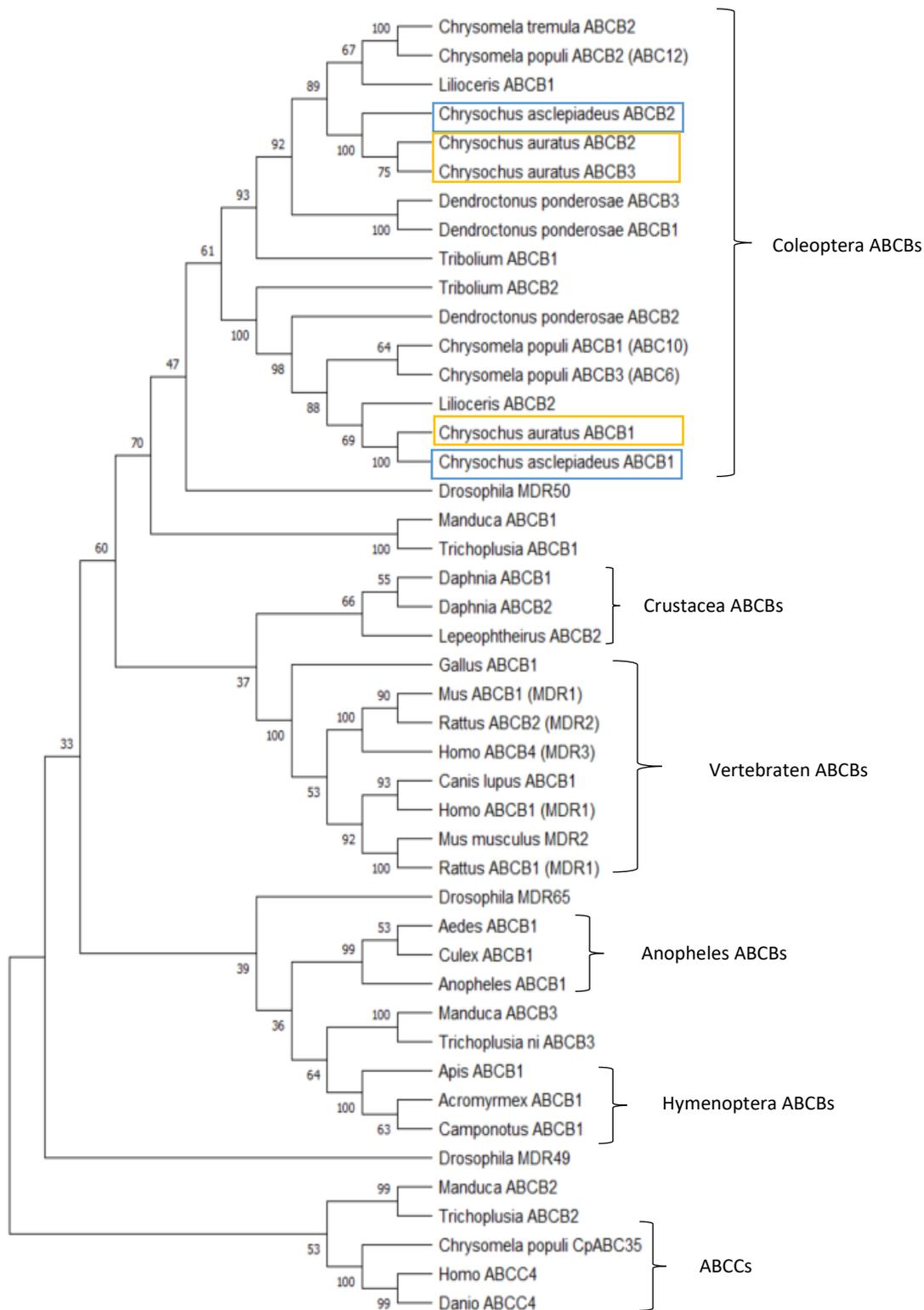
**Abbildung 3.7:** Der phylogenetische Stammbaum der ABC Transporter Sequenzen wurde mit der Maximum-Likelihood-Methode und der JTT-Methode erstellt. Für das Alignment wurden 55 Sequenzen der NBD- Domäne verwendet, Lücken wurden entfernt und es wurden 301 Positionen für

den finalen Datensatz verwendet. Der Stammbaum mit der höchsten Wahrscheinlichkeit (ln- 20122,59) wird dargestellt. Die Zahlen zeigen den Bootstrap-Wert bei 1000 Wiederholungen an. Das Muscle-Alignment und der Stammbaum wurden mit MEGA X erstellt. Die Farben und Buchstaben zeigen die jeweilige Unterfamilie an. Die ABCB- Transporter sind in Halbtransporter (BH) und Volltransporter (BF) unterteilt. Bei den Volltransportern wurde nur die N-terminale NBD-Sequenz verwendet.

### 3.1.8 Phylogenetischer Stammbaum der ABCB-Volltransporter

Für die Analyse der Verwandtschaft der ABCB-Volltransporter wurden die beiden ABCB- Aminosäuresequenzen des *C. asclepiadeus* dem bestehenden Datensatz von Kowalski et al. 2020 hinzugefügt. In diesem Datensatz wurden die vollständigen Proteinsequenzen verwendet (TMD-NBD-TMD-NBD). Es wurde ein ClustalW Alignment in MEGA X erstellt und Lücken sowie fehlende Daten wurden entfernt. Der Maximum-Likelihood-Stammbaum wurde ebenfalls in MEGA X mit dem Jones-Taylor-Thornton (JTT)-Modell erstellt. Als Außengruppe dienten ABCC-Sequenzen.

Alle *C. asclepiadeus* ABCB Sequenzen gruppieren innerhalb der Coleoptera-ABCBs (Käfer ABCBs), mit Ausnahme des DmeMDR50, der die einzige Fliegen-Art ist. Die ABCB Käfergruppe teilt sich in zwei Äste auf, ABCB1 und ABCB2/3. Die beiden *C. asclepiadeus* Transporter sind in den unterschiedlichen Ästen vertreten. Die beiden *Chrysochus* ABCB1-Transporter sind homolog zueinander. *Casc*ABCB2 gruppiert mit den *Cau*ABCB2- und *Cau*ABCB3-Sequenzen. Die Nähe der beiden ABCB2- und ABCB3-Transporter des *C. auratus* deutet auf eine Genduplikation hin, die auch bei den ABCB Transportern des Bergkieferkäfers (*Dendroctonus ponderosae*) und des Pappelblattkäfers (*Chrysomela populi*) entstanden sein könnte. Auffällig ist, dass die meisten Käfer drei ABCB-Transporter besitzen. Durch eine BLAST-Suche und den ABC-Scan (Denecke et al., 2021) konnten jedoch nur zwei ABCB-Volltransporter im Transkriptom des *C. asclepaideus* identifiziert werden. Aufgrund der Anzahl (2) der erhaltenen Sequenzen und der relativ eindeutigen Zuordnung der einen Sequenz zum *Cau*ABCB1 (Abbildung 17) wurde die zweite Sequenz (vorläufig) als *Casc*ABCB2 bezeichnet. Die ABCB-Transporter der Vertebraten bilden eine monophyletische Gruppe. Die Hymenoptera und Anopheles gruppieren innerhalb ihrer eigenen Gruppe miteinander, während die Crustacea eine Schwestergruppe zu den ABCB Transportern der Vertebraten bilden (Abbildung 3.8).

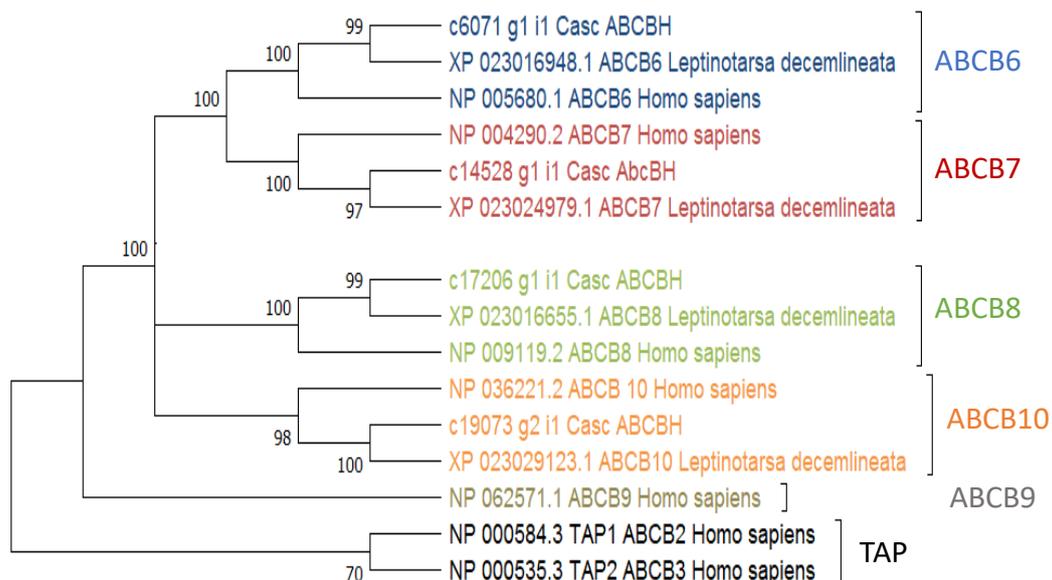


**Abbildung 3.8: Phylogentischer Stammbaum der ABCB- Volltransporter Sequenzen mit Maximum Likelihood basierend auf dem JTT-Modell.** Die *Casc*ABCs sind in blau markiert und die *Cau*ABCs in Gelb, gezeigt ist der Stammbaum mit der höchsten Wahrscheinlichkeit (ln -20608,86). Für das Alignment wurden 45 Sequenzen verwendet, Positionen mit Lücken wurden gelöscht, es wurden 441 Positionen für den finalen Datensatz verwendet. Die Zahlen zeigen den Bootstrap-Wert bei 1000 Wiederholungen. Das ClustelW Alignment sowie der Stammbaum wurden mit MEGAX erstellt.

### 3.1.8.1 Phylogenie der ABCB-Halbtransporter vom *C. asclepiadeus*

Die ABCB-Unterfamilie besteht aus Volltransportern (TMD-NBD-TMD-NBD) und Halbtransportern (TMD-NBD) (Zolnerciks et al. 2011). Die Halbtransporter bilden Homodimere oder Heterodimere, um als Transporter voll funktionsfähig zu sein (Dermauw & Van Leeuwen, 2014). Über phylogenetische Analysen konnten Ontologien zwischen den Halbtransportern der Wirbeltiere und der Arthropoden gezogen werden (Merzendorfer 2014). Dazu wurde ein Proteinalignement (MUSCLE) und der anschließende phylogenetische Stammbaum in Mega X erstellt. Für die Zuordnung wurden humane ABCB-Halbtransporter und die des Kartoffelkäfers verwendet (Abbildung 3.9).

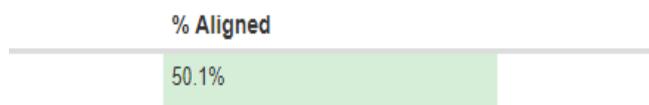
Nach näheren Analysen stellte sich heraus, dass die Sequenzen c3518g1i1 und c37322g1i1 nicht alle Domänen eines Halbtransporters besitzen und gingen daher nicht in diese Analyse mit ein. Die restlichen vier Sequenzen konnten den Halbtransportern 6-8 und 10 des Menschen und des Kartoffelkäfers zugeordnet werden. Nur dem humanen Halbtransporter 9 konnte keine Käfersequenz zugeordnet werden. Die humanen Halbtransporter ABCB2 (TAP1) und 3 (TAP2) dienten als Außengruppe, da sie zum adaptiven Immunsystem des Menschen gehören und es keine Ontologie-Gene in Arthropoden dazu gibt (Merzendorfer 2014).



**Abbildung 3.9: Phylogenetischer Stammbaum der ABCB-Halbtransporter Sequenzen mit Maximum Likelihood basierend auf dem JTT-Modell.** In blau sind ABCB6 dargestellt, in dunkelrot ABCB7, grün ABCB8, ABCB9 in grau und ABCB10 in orange, als Außengruppe dienten die humanen TAP Proteine.

### 3.1.9 Qualitätsprüfung des verwendeten Trinity Assembly des *C. asclepiadeus*

Um die Qualität des verwendeten Trinity-Assemblies (von Susanne Dobler) prüfen zu können, wurde das Assembly mithilfe des Bowtie2 Mappers in Galaxy evaluiert. Auf diese Weise können alle Reads bestimmt und gezählt werden, um festzustellen, ob diese korrekt gepaart sind oder nicht. Das MultiQC-Tool von Galaxy ermöglicht es, dass Bowtie2-Ergebnis durch einen Farbcode leichter zu bewerten. Der MultiQC-Report des Bowtie2-Ergebnisses zeigt bei einer Gesamt-Alignmentrate von 50,1%, dass bedeutet das 50,1 % der Reads in dem Assembly gemappt wurden sind. Der Farbcode des MultiQC-Reports zeigt die Farbe grün an, damit wurde das Assembly noch als ausreichend bewertet.



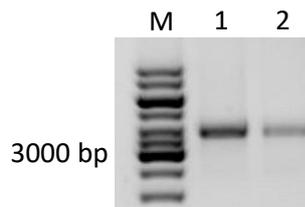
**Abbildung 3.10: Ergebnis der Qualitätsprüfung des Trinity Assembly des *C. asclepiadeus*.** Gezeigt ist das MultiQC Ergebnis der Qualitätsüberprüfung des Trinity Assembly (Susanne Dobler) mittels Bowtie2.

## 3.2 Molekularbiologie

Über verschiedene bioinformatische Methoden (Blast-Suche und ABC-Scan (Denecke et al. 2021)) konnten im Transkriptom des *C. asclepiadeus* zwei ABCB-Volltransporter und 43 mögliche weitere ABC-Proteine identifiziert werden. Mithilfe des Online-Tools ExPASy Prosite konnten für beide ABCB-Volltransporter charakteristische Merkmale dieser Proteingruppe nachgewiesen werden (ABC-Signatur, Walker-A- und -B-Motive, C219-Antikörper-Epitope). Die erhaltenen Sequenzen wurden im Folgenden mittels molekularbiologischer und proteinbiochemischer Methoden validiert und dienten als Grundlage für eine weitere Charakterisierung der ABCB-Volltransporter ABCB1 und ABCB2.

### 3.2.1 Amplifizierung der *abcb*-Sequenzen und Bestätigung der bioinformatisch generierten Sequenzen

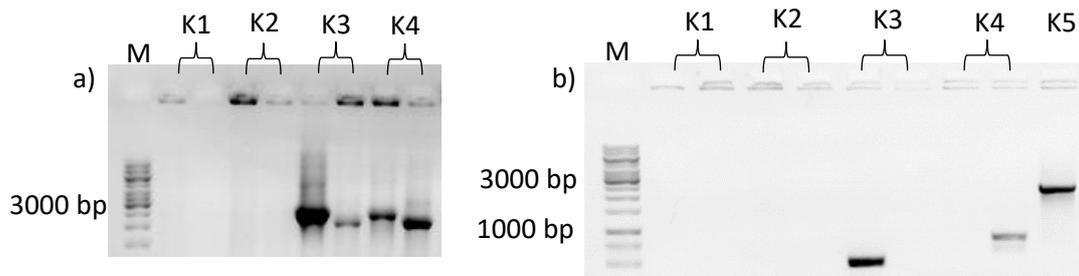
Die *in silico* generierten Sequenzen ABCB1- und ABCB2- Volltransporter des *C. asclepiadeus* konnten mittels spezifischer Primer erfolgreich per PCR amplifiziert werden (Abbildung 3.11) und wurden anschließend mit dem Transkriptomdatensatz des *C. asclepiadeus* abgeglichen. Die Amplikone zeigen die erwartete Höhe von ~ 3,7 kb.



**Abbildung 3.11: Gelelektrophoretische Analyse der Amplifikations-PCR von *CascAbcb1* und *CascAbcb2*.** 1: PCR-Produkt von Abcb1, 2: PCR-Produkt von Abcb2, beide Produkte sind auf der erwarteten Größe von ~3,7 kb zu sehen. M: 1 kb Leiter.

### 3.2.2 Klonierung der *abcb*-Gene in den pGEM-T Vektor

Nachdem die Gensequenzen einen A-Überhang erhalten haben, wurden sie erfolgreich in den pGEM-T Vektor kloniert. Potenziell positive Kolonien wurden mittels einer Kolonie-PCR mit plasmid- und genspezifischem Primern überprüft, die das Amplikon der beiden Gene ungefähr halbieren. Wie in Abbildung 3.12 a beziehungsweise b zu erkennen ist, zeigen die Kolonien 3 und 4 für *Cascabcb1* und *Cascabcb2* Bänder mit einer Größe von ungefähr 2,4 kb. Diese drei Kolonien wurden wie im Material- und Methodenteil beschrieben erfolgreich kultiviert, isoliert, mittels Sanger-Sequenzierung (GATC) überprüft und mit den *in silico* generierten *abcb*-Sequenzen abgeglichen.



**Abbildung 3.12: Gelelektrophoretische Analyse der Kolonie- PCR von pGEM-T *Cascabcb1* und pGEM-T *Cascabcb2*.** a) XL10-Gold Klone von *abcb1* (K1 – K4) b) XL10Gold Klone von *Abcb2* (K1-K5). M: 1 kb GeneRuler Marker. Die Klone K3 und K4 von pGEM-T *abcb1* und Klon K5 pGEM-T von *abcb2* wurden für Übernachtskultur und spätere Isolation verwendet, der übersichtshalber wurde das Gelbild mit der anderen Hälfte der K5 des *abcb2* nicht mit aufgeführt.

### 3.2.3 Umklonierung der *Abcb*-Gene aus dem Klonierungsvektor pGEM-T in den Expressionsvektor pFastBacDual

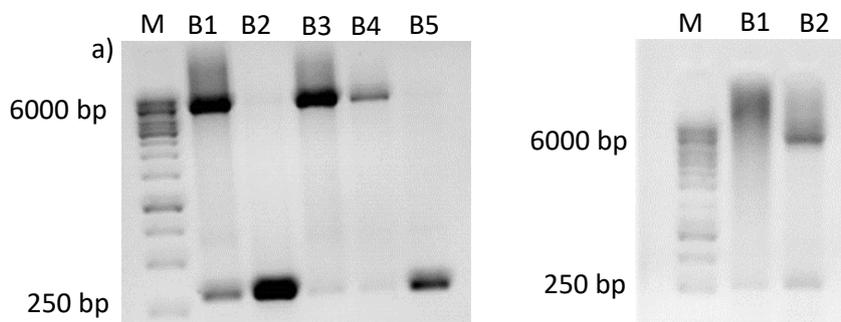
Die Umklonierung der *C. asclepiadeus abcb*-Gene in den pFastBacDual (pFBD)- Expressionsvektor für die spätere Proteinexpression fand unter Verwendung des InFusion Klonierungskits der Firma TaKaRa statt. In Abbildung a) sind die PCR zur Linearisierung des pFBD mittels PCR und die Amplikone der *abcb*-Gene aus pGEM-T zu sehen. Die positiven Klone K9 von *abcb1* (b) und K5 von *abcb2* (c) wurden mittels genspezifischer und vektorspezifischer Primer amplifiziert und zeigten die erwartete Größe von etwa 2,5 kb (Abbildung 3.13). Aus diesen Kolonien wurden Übernachtskulturen angelegt und die Plasmide über eine alkalische Lyse isoliert.



**Abbildung 3.13: Gelelektrophoretische Analyse der Umklonierung aus pGEM-T in den pFastBacDual via InFusion Klonierung** a) 1- Linearisierung des pFBD, 2- Amplifikat von *Abcb1*, 3- Amplifikat von *Abcb2* b) XL10Gold Klone von *abcb1* (K7.2-K9), c) XL10Gold Klone von *abcb2* (K1-K5) M: 1 kb GeneRuler Marker. Die Klone K9 und K5 wurden für Übernachtskultur und spätere Isolation verwendet.

### 3.2.4 Herstellung der rekombinanten *C. asclepiadeus abcb1* und *abcb2* Bacmide

Die pFBD *C. asclepiadeus abcb1*- und *abcb2*-Plasmide wurden in DH10Bac kompetente Zellen transformiert. Die rekombinanten Bacmide wurden mittels alkalischer Lyse isoliert und per PCR überprüft. Die gelelektrophoretische Analyse zeigt für die *abcb*-Sequenzen eine Bande in der erwarteten Höhe von ~6,2 kb, welche sich aus der Amplikon-Größe von ~3,7 kb und der Mini-attTn7-Region (~2,5 kb) des Bacmids zusammensetzt. Eine Bande auf der Höhe von 300 bp lässt auf ein leeres Bacmid schließen. Für die Transfektion der *Sf9*-Zellen wurde für das *Abcb1*-Gen das Bacmid Nr.4 gewählt und für das *Abcb2*-Gen Bacmid Nr.2 (Abbildung 3.14a und b).

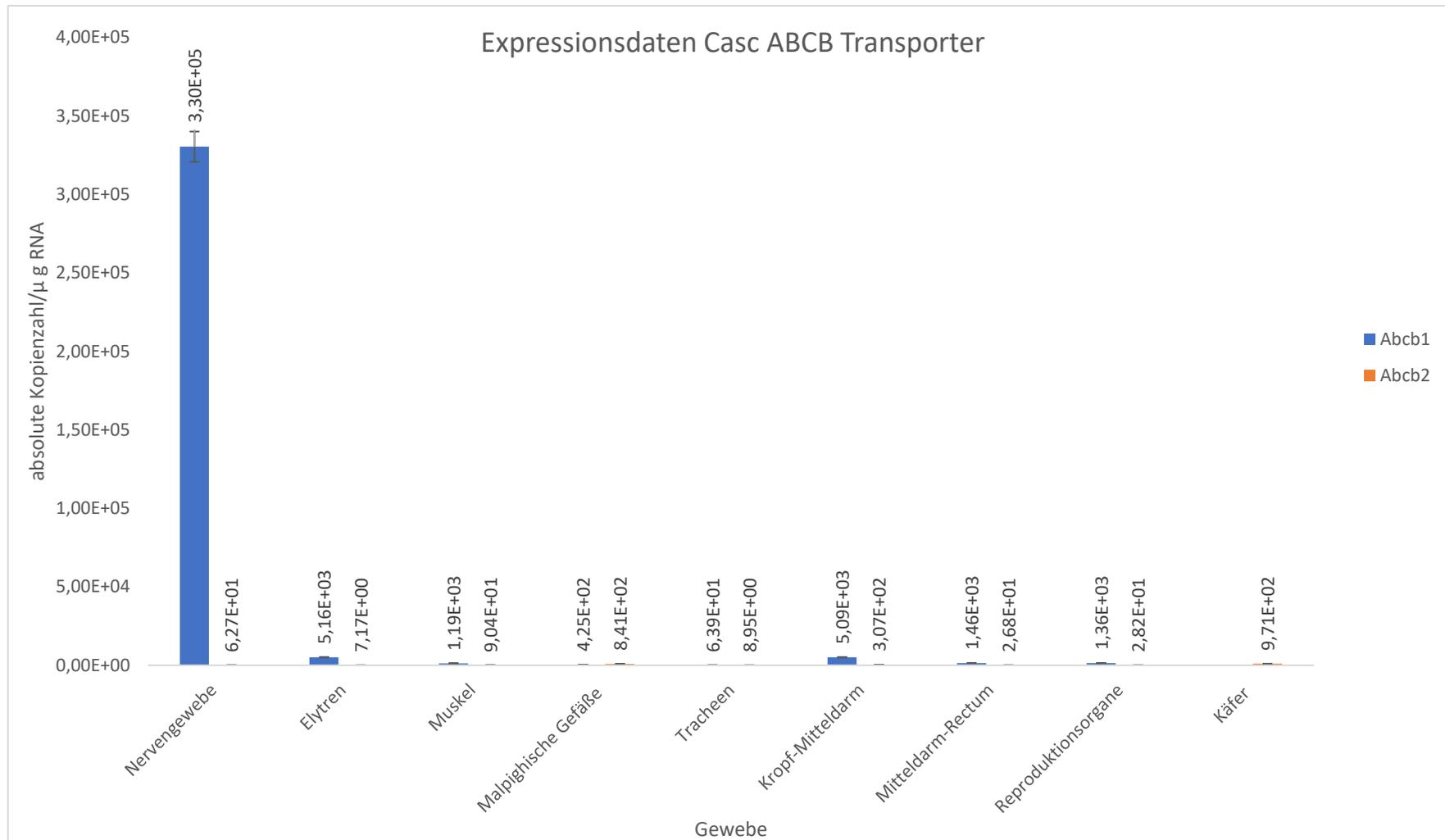


**Abbildung 3.14 Gelelektrophoretische Analyse der Bacmid-PCR von *Abcb1* und *Abcb2*.** a) Bacmide 1-5 von *abcb1* b) Bacmide von *abcb2*. M: 1 kb GeneRuler Marker. Für die Transfektion der *Sf9* Zellen wurde *Abcb1* B4 und von *abcb2* B2 verwendet.

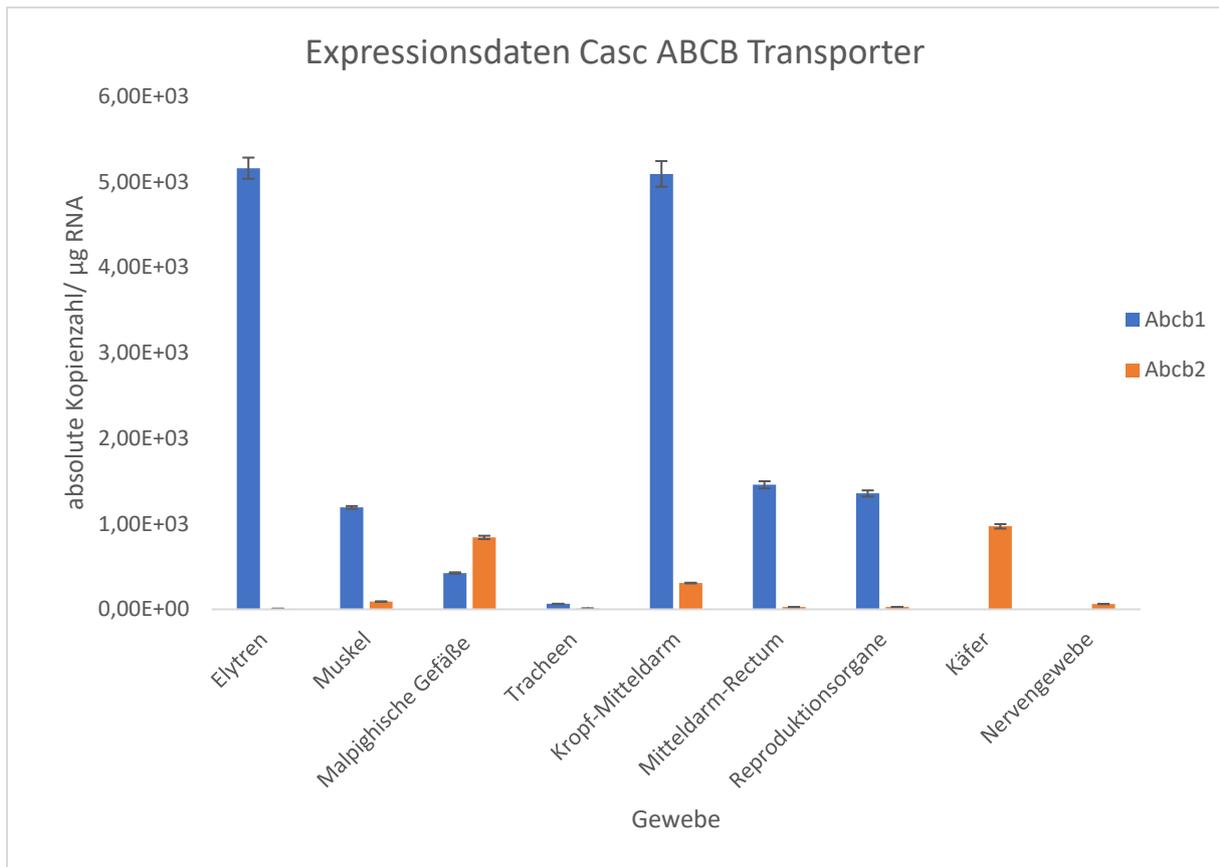
### 3.3 Gewebe-spezifische Expression der *C. asclepiadeus* Transporter mittels qRT-PCR

Um mögliche genspezifische Expressionsmuster der beiden Transporterproteine innerhalb des *C. asclepiadeus* zu identifizieren, wurden acht verschiedene Gewebe mittels qRT-PCR untersucht. Ein biologisches Replikat (BR) bestand aus einem Pool von drei adulten Käfern. Die absolute Kopienzahl wurde mittels einer Standardreihe bestimmt. *abcb1* wurde in allen Geweben außer den Malpighischen Gefäßen stärker als *abcb2* exprimiert. Der Hauptexpressionsort von *abcb1* lag im Nervengewebe (~ 330.000 absolute Kopien/  $\mu$ g RNA), gefolgt von den Elytren und dem Abschnitt vom Kropf bis Mitteldarm. In den Muskeln, dem Abschnitt Mitteldarm bis Rektum und in den Reproduktionsorganen hatte *abcb1* jeweils eine ähnliche Expressionsstärke (~ 1000- 1500 absolute Kopien/  $\mu$ g RNA) und wurde in den Tracheen am wenigsten exprimiert. *Abcb2* hatte seinen Hauptexpressionsort in den Malpighischen Gefäße (~840 absolute Kopien/  $\mu$ g RNA), gefolgt von der Kropf-Mitteldarm

Region. In den restlichen Geweben zeigte *abcb2* eine sehr geringe Expressionsstärke und konnte vernachlässigt werden. Aufgrund der geringeren Expression von *abcb2* in verschiedenen Geweben wurde auch die Gesamtexpression von *abcb2* im Käfer überprüft. Die RNA wurde von zwei Käferindividuen separat isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Expression von *abcb2* im gesamten Käfer ähnelt sich mit der Expressionsstärke von *abcb2* verglichen mit den getesteten Geweben. Dies deutet darauf hin, dass kein Gewebe innerhalb des Käfers vergessen wurde, indem *abcb2* noch exprimiert werden könnte. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Expression zwischen den beiden Genen und den verschiedenen Geweben (ANOVA 2-Way DF=7,  $p=0,05$ , post hoc Tukey-Test  $p=0,05$ ). Ebenfalls gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Geweben für jedes einzelne Gen (ANOVA DF=7,  $p=0,05$ , post hoc Tukey-Test  $p=0,05$ ) (Abbildung 3.15 und 3.16).



**Abbildung 3.15** Expressionsmuster der beiden ABCB Transporter acht verschieden Geweben des adulten *C. asclepiadeus* und der gesamte Käfer. Die Balken zeigen die absolute Kopienzahl der Transkripte pro µg RNA von drei biologischen Replikaten mit ±SE, in blau *CascABCB1* und orange *CascABCB2*. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden *C. asclepiadeus* ABCB Transporter und den getesteten Geweben (ANOVA 2Way DF=7, p=0,05, mit post hoc Tukey Test p = 0,05.)



**Abbildung 3.16 Expressionsmuster der beiden ABCB Transporter ohne Nervengewebe ABCB1.** Die Balken zeigen die absolute Kopienzahl der Transkripte pro µg RNA von drei biologischen Replikate mit  $\pm$ SE, in blau *Casc*ABCB1 und in orange *Casc*ABCB2. Es besteht kein signifikanter Unterschied (ANOVA 1Way DF=7,  $p=0,05$ , ANOVA 2Way DF=7,  $p=0,05$ , mit post hoc Tukey Test  $p=0,05$ .)

### 3.4 Proteinbiochemie

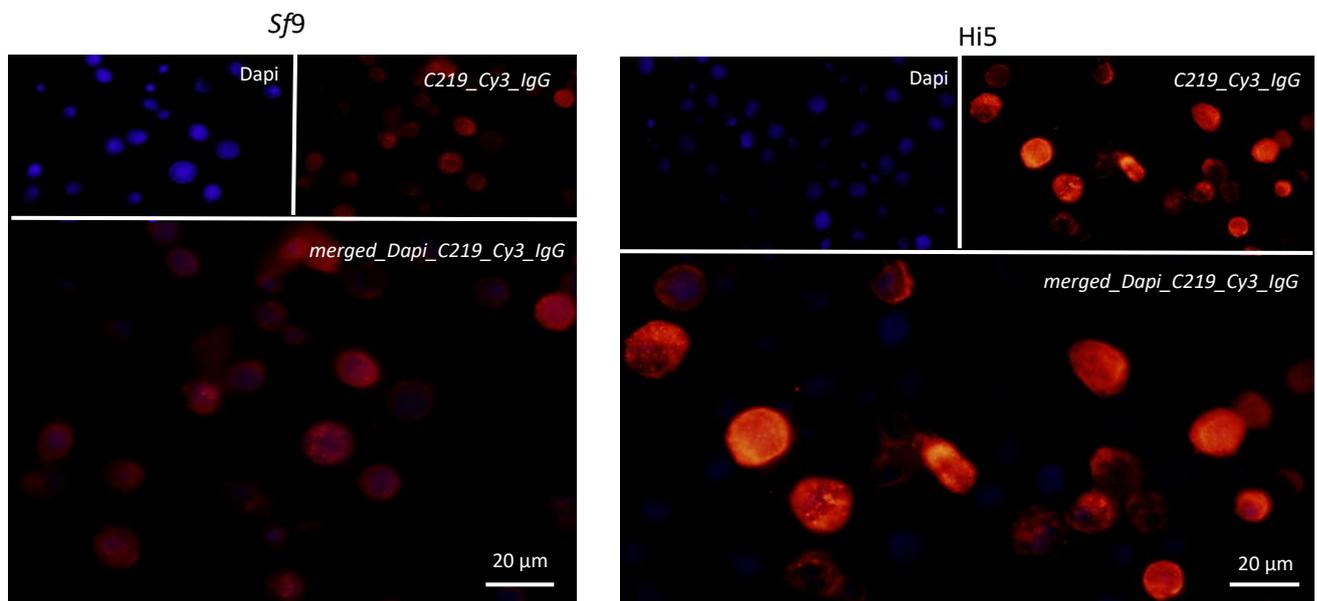
#### 3.4.1 Rekombinante Expression von *Casc*ABCB1 und *Casc*ABCB2 in Insektenzellen

Mit dieser Methode sollten die Expression sowie die Lokalisation der Transmembranproteine überprüft werden. Die Expression von ABCB1 in *Sf9*-Zellen erwies sich als sehr gering. Das Protein zeigte sich als nur schwach in der Membran lokalisiert und eher punktuell oder im Zellinneren (Abbildung 3.17). Für ABCB2 hingegen war ein deutliches Signal in der Zellmembran zu erkennen, was sich in dem sonnenartigen Bild der Zellen zeigte (Abbildung 3.18). Da zunächst die Expression von ABCB1 in *Sf9*-Zellen schwächer als die von ABCB2 war, wurden auch die Expression beider Transporter in Hi5-Zellen getestet. Die Hi5-Zellen können mit den in *Sf9*-Zellen generierten Baculoviren infiziert werden (Wilde et al., 2014). Die Hi5-

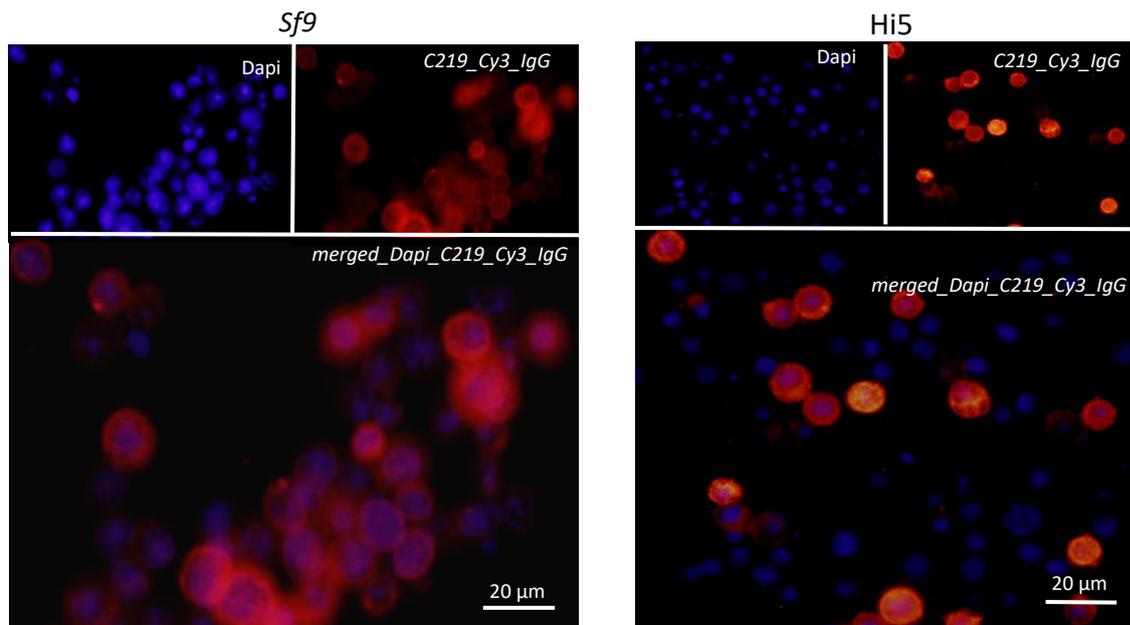
Zellen ließen sich nicht dauerhaft kultivieren, daher wurde wieder auf die *Sf9*-Zelllinie zurückgegriffen.

### 3.4.2 Immunzytochemie zur Überprüfung der Synthese der *C. asclepiadeus* ABCB-Transporter in Insektenzellen

Zur Überprüfung der Genexpression und der Lokalisation der beiden ABCB-Transporter des *C. asclepiadeus* wurden die *Sf9*- und Hi5-Zellen mit spezifischen Antikörpern (C219 und Cy3) angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Um alle Proben miteinander vergleichen zu können, wurden sie mit der gleichen Belichtungszeit (200 ms) und Vergrößerung (200x oder 400x) aufgenommen. Zusätzlich wurden alle Proben mit dem gleichen Volumen (300 µl) Virusstock behandelt. Die Bilder wurden in GIMP 2.10.22 bearbeitet und übereinandergelegt.

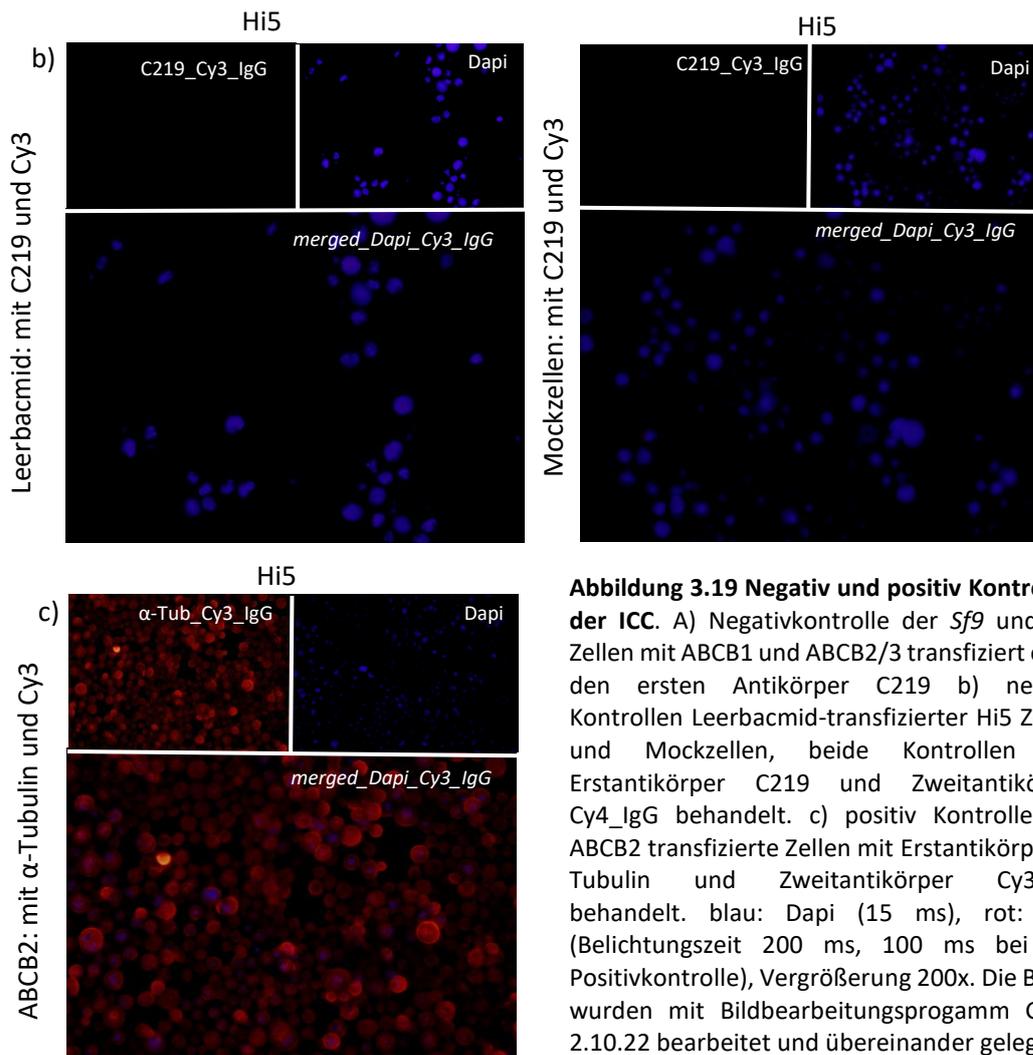


**Abbildung 3.17: Mit ABCB1-produzierenden Baculoviren infizierte Insektenzellen.** Links: Mit 300 µL Viruslösung infizierte *Sf9*- Zellen. Rechts: Mit 300 µL Viruslösung infizierte Hi5- Zellen. In beiden Zelllinien wurde ABCB1 produziert und in der Zellmembran eingebaut. Die Zellkerne sind Blau: Dapi (15 ms), rot: Cy3 (200 ms), Vergrößerung 200x und rechts 400x, Bildbearbeitung mit GIMP 2.10.22



**Abbildung 3.18: Mit ABCB2-produzierenden Baculoviren infizierte Insektenzellen.** Links: Mit 300 µL Viruslösung infizierte Sf9- Zellen. Rechts: Mit 300 µL Viruslösung infizierte Hi5- Zellen. In beiden Zelllinien wurde ABCB1 produziert und in der Zellmembran eingebaut. Die Zellkerne sind Blau: Dapi (15 ms), rot: Cy3 (200 ms), Vergrößerung 200x und rechts 400x, Bildbearbeitung mit GIMP 2.10.22

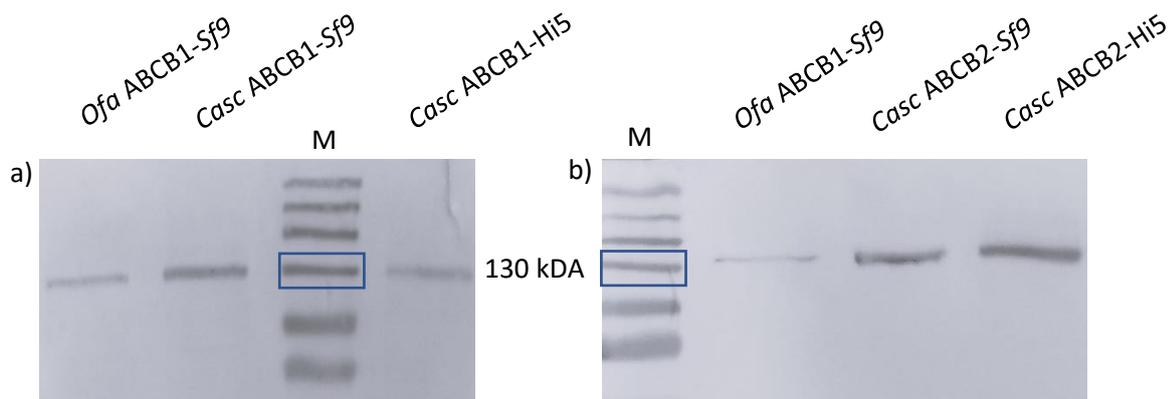
Als Negativkontrollen dienten untransfizierte Insektenzellen (*Mock-Zellen*) und Insektenzellen, die mit leerem Bacmid transfiziert wurden. Eine technische Negativkontrolle ist das Weglassen des Erstantikörpers, dies wurde ebenfalls bei diesem Versuch durchgeführt. Als Positivkontrolle für den Zweitantikörper wurde  $\alpha$ -Tubulin als Erstantikörper verwendet. Es konnte kein rotes Signal in den Mock-Zellen und den mit leerem Bacmid transfizierten Zellen nachgewiesen werden, aber das DAPI-Signal der angefärbten Zellkerne war sichtbar. Auch bei der dritten Negativkontrolle ohne Erstantikörper wurde kein Signal detektiert, was darauf schließen lässt, dass keiner der Antikörper unspezifisch bindet. Die Positivkontrolle mit dem  $\alpha$ -Tubulin-Erstantikörper zeigte ebenfalls ein rotes Signal, was darauf hinweist, dass die Permeabilisierungszeit der Membran sowie die Belichtungszeit ausreichend gewählt wurde und der Cy3\_IgG-Zweitantikörper korrekt konjugiert wurde. Insgesamt scheint die hier gewählte Färbemethode effizient zu sein. Abbildung 3.19 fasst alle Kontrollen zusammen.



**Abbildung 3.19 Negativ und positiv Kontrollen der ICC.** A) Negativkontrolle der *Sf9* und Hi5 Zellen mit ABCB1 und ABCB2/3 transfiziert ohne den ersten Antikörper C219 b) negativ Kontrollen Leerbacmid-transfizierter Hi5 Zellen und Mockzellen, beide Kontrollen mit Erstantikörper C219 und Zweitantikörper Cy4\_IgG behandelt. c) positiv Kontrolle Hi5 ABCB2 transfizierte Zellen mit Erstantikörper  $\alpha$ -Tubulin und Zweitantikörper Cy3\_IgG behandelt. blau: Dapi (15 ms), rot: Cy3 (Belichtungszeit 200 ms, 100 ms bei der Positivkontrolle), Vergrößerung 200x. Die Bilder wurden mit Bildbearbeitungsprogramm GIMP 2.10.22 bearbeitet und übereinander gelegt.

### 3.4.3 Proteinbiochemischer Nachweis der isolierten ABCB-Proteine mittels Western-Blot

Die gesamte Proteinkonzentration der isolierten Insektenzellenmembranen wurde mittels der Bradford-Methode bestimmt. Für den Vergleich der Proteinexprimierung in *Sf9*- und Hi5-Zelllinien wurden 50  $\mu$ g der Proben aufgetragen. Als positive Kontrolle diente *Ofa*-ABCB1 (Bruch, 2018). In Abbildung 3.20 ist zu sehen, dass alle Proben die erwartete Höhe von  $\sim$  130 kDa aufweisen. Da es nicht möglich war, die Hi5-Zellen dauerhaft zu kultivieren, wurden die nachfolgenden Assays mit den Proteinen durchgeführt, die in *Sf9*-Insektenzellen exprimiert wurden.



**Abbildung 3.20 Proteinbiochemischer Nachweis der *Casc ABCB* Proteine exprimiert in Insektenzellen.** A) Immunologischer Nachweis von *Casc ABCB1* durch 4-CN in Insektenzellen. B) Immunologischer Nachweis von *Casc ABCB2* durch 4-CN in Insektenzellen. Verwendete Antikörper: C219 und HRP, Kontrolle *OfaABCB1* (Bruch, 2018) M: Spectra Multicolor High Range Protein Ladder.

### 3.5 Charakterisierung der *CascABC*B Transporter mittels ATPase-Assays

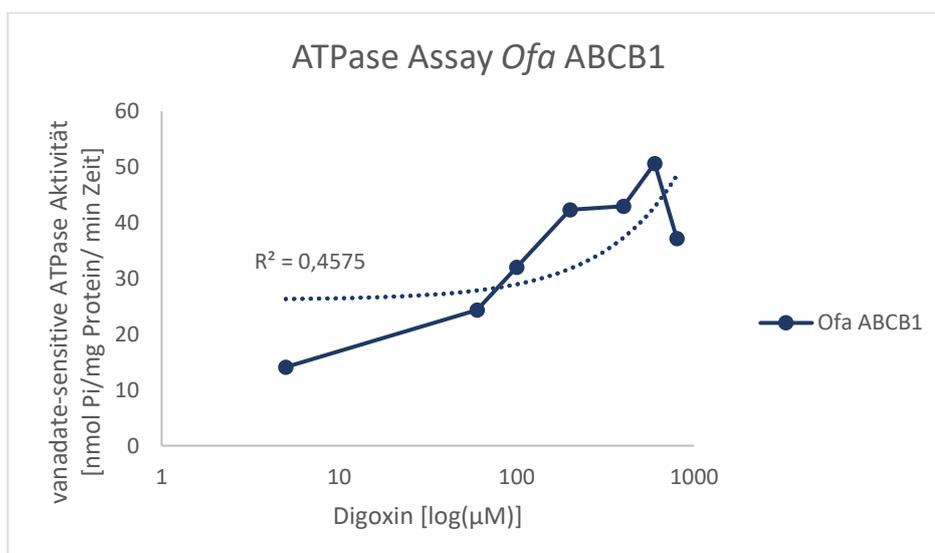
Die isolierten ABCB-Transporter, die in *Sf9*-Insektenzellen überexprimiert wurden, wurden durch verschiedene Zentrifugationsschritte isoliert und die Gesamtproteinkonzentration mittels der Bradford-Methode bestimmt. Bei dem isolierten Material handelt es sich um einen Membranproteinmix, und die Konzentrationsbestimmung mittels Bradford erfolgt nicht spezifisch für den Transporter. Um eine messbare Differenz zwischen den Membranlösungen (inhibiert und nicht-inhibiert) zu schaffen, wurde der ABCB-Transporter-spezifische Inhibitor Orthovanadat (Konzentration 500  $\mu\text{M}$ ) hinzugefügt. Der Assay-Puffer enthält auch weitere ATPase-Inhibitoren und ein Farbreagenz, um das freigesetzte anorganische Phosphat photometrisch messen zu können. Das anorganische Phosphat wird bei der Hydrolyse von ATP freigesetzt, wobei ein aktiver ABC-Transporter zwei ATP verbraucht (Higgins 2001). Drei biologische Replikate pro Protein wurden verwendet. Zur Überprüfung der Spezifität der ABCB-Transporter wurde Verapamil als weiteres Substrat von ABCB-Proteinen verwendet. Als negative Kontrollen wurden *Sf9*-Zellen, die mit einem leeren Bacmid transfiziert wurden, verwendet. Als Kontrollgruppe dienten ABCB1 und ABCB2 des Pappelblattkäfers (*C. populi*). Zur Charakterisierung wurden vier verschiedene Cardenolide verwendet: Digoxin, da es ein Substrat für ABCB1-Transporter in Vertebraten und Invertebraten ist (Petschenka, Pick, et al. 2013); Cymarín, ein Cardenolid aus der Wirtspflanze der nah verwandten Art *C. auratus*,

Ouabain, ein stark polarer Cardenolid, das aktiv über die Membranen transportiert werden muss; und Calotropin, da es in der Wirtspflanze der nahen Verwandten von *C. asclepaideus* zu finden ist. Digoxin, Cymarinn und Ouabain können kommerziell erworben werden, Calotropin jedoch nicht. Das in dieser Arbeit verwendete Calotropin wurde aus Blattmaterial der *A. cannabinum* gewonnen, und uns wurden 1 mg davon zur Verfügung gestellt (A. Anurag). Mit dieser Menge konnte der Assay mit einer Cardenolidkonzentration von 5-200  $\mu\text{M}$  statt von 5-800  $\mu\text{M}$  durchgeführt werden.

Um den Assay zu validieren, wurde als Positivkontrolle ABCB1 der Milchkratzwanze (*Oncopeltus fasciatus*) hergestellt und der Assay mit Digoxin durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit den Daten aus der Masterarbeit von Stefanie Bruch (2018) verglichen (Tabelle 3.5). Dabei zeigte der *Ofa*ABCB1 eine erhöhte Aktivität bei steigender Digoxinkonzentration, die jedoch bei der höchsten getesteten Konzentration (800  $\mu\text{M}$ ) wieder abfiel. Abgesehen von diesem Abfall verhielt sich der *Ofa*ABCB1 ähnlich wie in den Daten aus der Masterarbeit von Stefanie Bruch 2018 (Abbildung 3.21).

**Tabelle 3.5: Positiv Kontrolle des vanadate sensitiven ATPase Assays durch ABCB1 Transporter der Milchkratzwanze (*Oncopeltus fasciatus*).** Aktivität von einem biologischen Replikat der *Ofa*ABCB1 um den Assay zu überprüfen.

Digoxin [ $\mu\text{M}$ ]	5	60	100	200	400	600	800
<i>Ofa</i> ABCB1 [nmol Pi/mg Protein/min]	14,10	24,36	32,05	42,31	42,95	50,65	37,18

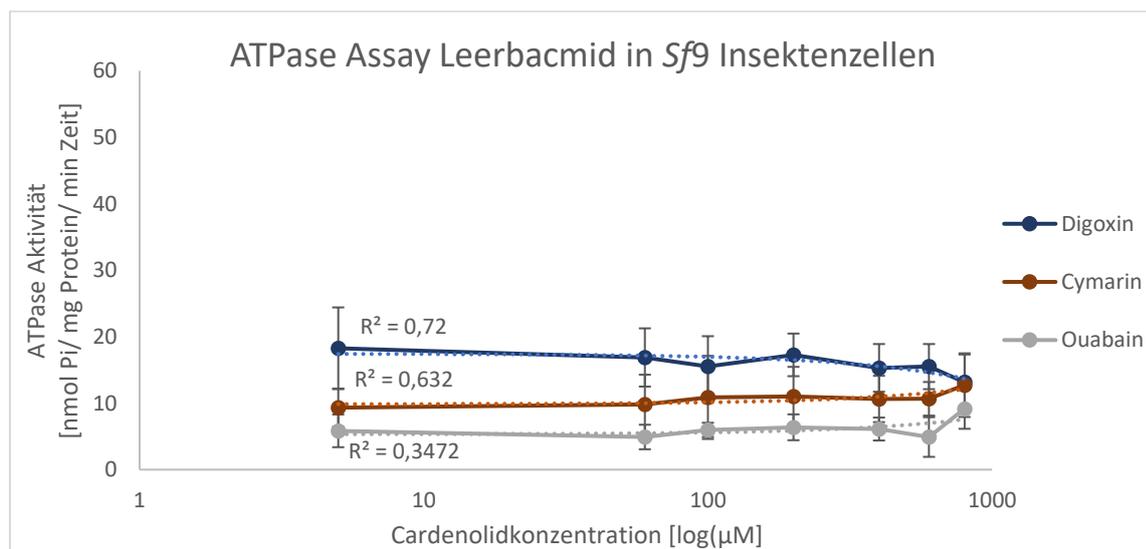


**Abbildung 3.21 Effekt von Digoxin auf *Ofa*ABCB1.** Abgebildet ist die Aktivität des *Ofa*ABCB1 Transporter bei steigender Digoxinkonzentration. Auf der y-Achse ist die Aktivität und auf der x-Achse die logarithmische Substratkonzentration aufgetragen.

Als Negativkontrolle wurden die Auswirkungen der Cardenolide auf *Sf9*-Zellen getestet, die mit Leerbacmid transfiziert wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 und Abbildung 29 dargestellt. Das Leerbacmid zeigt bei allen drei getesteten Cardenoliden eine geringere Aktivität im Vergleich zur Grundaktivität der Transporter. Ouabain bewirkt die geringste Aktivität und Digoxin die höchste Aktivität. Bei Erhöhung der Substratkonzentration ist keine Aktivität bei dem Leerbacmid festzustellen. Aufgrund der geringen Menge von Calotropin wurde es nicht für diese Kontrolle verwendet (Abbildung 3.22).

**Tabelle 3.6: Mittelwerte der Vanadat- sensitiven ATPase-Aktivität der biologischen Replikate der Kontrolle *Sf9*-Zellen mit Leerbacmid transfiziert ihrer Dosis-Wirkungsabhängigkeit gegenüber den getesteten Substraten.** Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten.

Digoxin [ $\mu\text{M}$ ]	5	60	100	200	400	600	800
Leerbacmid [nmol Pi/mg Protein/min]	18,25	16,87	15,5	17,26	15,30	15,5	13,15
SE	6,15	4,34	4,5	3,2	3,59	3,39	4,16
Cymarin [ $\mu\text{M}$ ]	5	60	100	200	400	600	800
Leerbacmid [nmol Pi/mg Protein/min]	9,33	9,83	10,86	11,02	10,65	10,63	12,71
SE	2,75	4,45	6,25	4,43	3,48	2,53	4,79
Ouabain [ $\mu\text{M}$ ]	5	60	100	200	400	600	800
Leerbacmid [nmol Pi/mg Protein/min]	5,38	4,91	5,98	6,37	6,10	4,9	9,16
SE	2,46	1,84	1,06	1,94	1,72	2,98	3,02

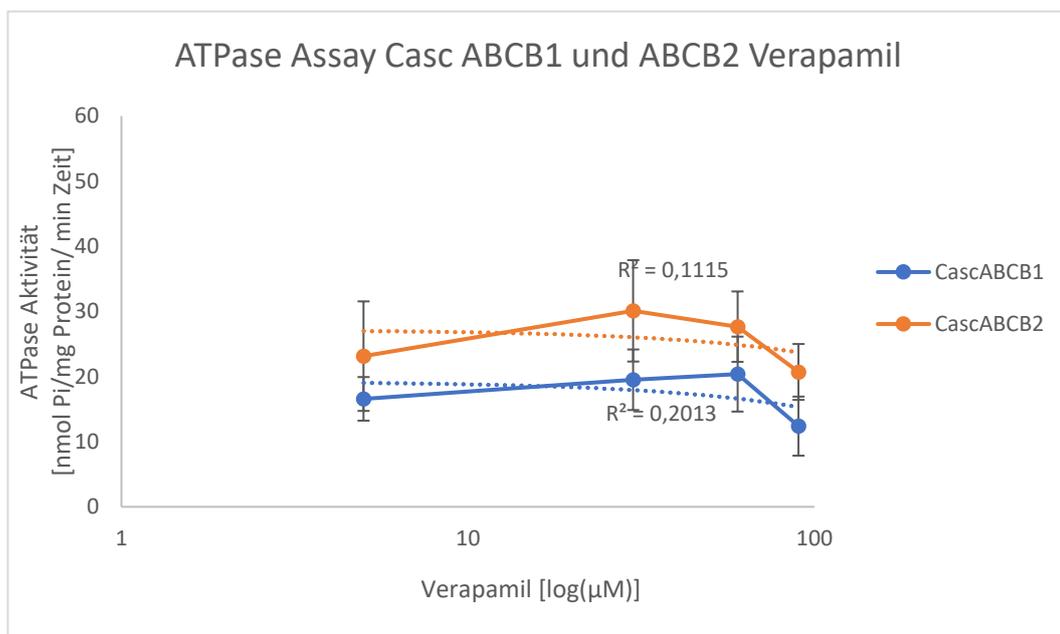


**Abbildung 3.22: Effekt der Cardenolide auf das Leerbacmid expremiert in *Sf9*-Zellen.** Abgebildet sind die isolierten Membranen des Leerbacmids getestet mit den Cardenoliden Digoxin (blau), Cymarin- (dunkelbraun) und Ouabain (grau) bei einer Konzentration von 5- 800  $\mu\text{M}$ . Auf der y-Achse ist die Aktivität dargestellt und auf der x-Achse die logarithmierte Cardenolidkonzentration. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Substraten (ANOVA DF1,  $p = 0,05$  post hoc Tukey Test  $p = 0,05$ )

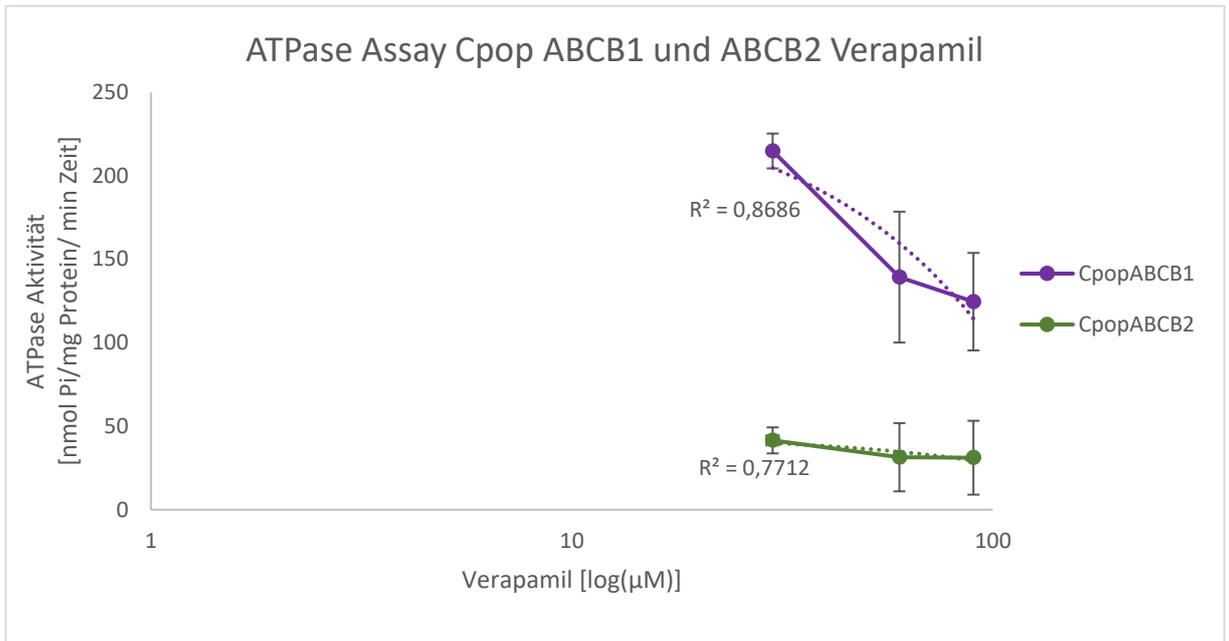
Zur Bestimmung der Funktionalität der ABCB-Transporter wurde Verapamil verwendet, da es ein Standardsubstrat von ABCB Transportern ist und je nach Konzentration eine aktivierende (geringe Konzentration) oder hemmende Wirkung (hohe Konzentration) besitzt (Glavinas et al. 2008). Bei einer Verapamilkonzentration von 60  $\mu\text{M}$  zeigt der *CascABCB1*-Transporter die höchste Aktivität mit  $20,38 \pm 5,75$  nmol Pi/mg Protein/min und die geringste Aktivität bei der höchsten Verapamilkonzentration von 90  $\mu\text{M}$  mit  $12,39 \pm 4,53$  nmol Pi/mg Protein/min, (Tabelle 3.7 und Abbildung 3.23). Der *CascABCB2*-Transporter hat die höchste Aktivität bei einer Verapamilkonzentration von 30  $\mu\text{M}$  mit  $30,1 \pm 8,4$  nmol Pi/mg Protein/min und ebenfalls die geringste Aktivität bei der höchsten Verapamilkonzentration. Die *C. asclepiadeus* ABCB-Transporter haben den erwarteten glockenförmigen Verlauf. Im Vergleich der beiden ABCB Transporter zeigt ABCB2 eine höhere Aktivität als ABCB1. Die Transporter der Kontrollgruppe *C. populi* wurden ebenfalls auf ihre Funktionalität getestet. *CpopABCB1* hat bei einer Verapamilkonzentration von 30  $\mu\text{M}$  die höchste Aktivität mit  $214,86 \pm 10,43$  nmol Pi/mg Protein/min und ist damit deutlich höher als die anderen getesteten Transporter. Bei Erhöhung der Verapamilkonzentration fällt auch die Aktivität von *CpopABCB1*. Für den ABCB2 von *C. populi* liegt die höchste Aktivität bei  $41,51 \pm 7,8$  nmol Pi/mg Protein/min (Verapamilkonzentration 30  $\mu\text{M}$ ) und fällt bei der höchsten Verapamilkonzentration (90  $\mu\text{M}$ ) auf  $20,43 \pm 22,11$  nmol Pi/mg Protein/min. Für die Kontrollgruppe *C. populi* wurde keine Messung bei einer Verapamilkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  durchgeführt, da die Assays zu verschiedenen Zeit- und Wissenstandpunkten durchgeführt wurden. Aus zeitlichen Gründen wurde keine weitere Expression von *C. populi* ABCB-Transportern durchgeführt (Abbildung 3.24).

**Tabelle 3.7: Mittelwerte der Vanadate-sensitiven ATPase-Aktivität der ABCB-Transporter zur Bestimmung der Funktionalität mit dem ABCB-Substrat Verapamil.**

Verapamil [ $\mu\text{M}$ ]	5	30	60	90
<b>Casc ABCB1</b> [nmol Pi/mg Protein/min]	16,85	19,51	20,38	12,39
<b>SE</b>	3,35	4,65	5,75	4,53
<b>Cpop ABCB1</b> [nmol Pi/mg Protein/min]	-	214,86	139,31	124,58
<b>SE</b>	-	10,43	39,19	29,20
<b>Casc ABCB2</b> [nmol Pi/mg Protein/min]	23,14	30,1	27,67	20,71
<b>SE</b>	8,4	7,79	5,41	4,29
<b>Cpop ABCB2</b> [nmol Pi/mg Protein/min]	-	41,51	31,44	20,43
<b>SE</b>	-	7,8	31,15	22,11



**Abbildung 3.23: Effekt von Verapamil auf *Casc*ABCB1 und *Casc*ABCB2 *Sf9*-Zellen.** Abgebildet ist die Differenz zwischen den Vanadate-inhibierten ( $500 \mu\text{M}$ ) und nicht-inhibierten Membranen der ABCB Transporter des *C. asclepiadeus* getestet mit den Verapamil bei einer Konzentration von 5, 30, 60 und  $90 \mu\text{M}$ . Auf der y-Achse ist die Aktivität dargestellt und auf der x-Achse die logarithmierte Verapamilkonzentration. In hellblau ist ABCB1 dargestellt und in orange ABCB2. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den dem gesamten Kurvenverlauf beider Transporter (ANOVA DF1,  $p = 0,05$  post hoc Tukey Test  $p = 0,05$ )



**Abbildung 3.24: Effekt von Verapamil auf in *Sf9*-Zellen produzierten *Cpop*ABCB1 und *Cpop*ABCB2.** Abgebildet ist die Differenz zwischen den Vanadate-inhibierten (500 µM) und nicht-inhibierten Membranen der ABCB Transporter des *C. asclepiadeus* getestet mit den Verapamil bei einer Konzentration von 30, 60 und 90 µM. Auf der y-Achse ist die Aktivität dargestellt und auf der x-Achse die logarithmierte Verapamilkonzentration. In lila ist ABCB1 dargestellt und in grün ABCB2. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den dem gesamten Kurvenverlauf beider Transporter (ANOVA DF1, p= 0,05 post hoc Tukey Test p= 0,05)

Um die Grundaktivität der getesteten Transporter bestimmen zu können, wurden alle biologischen Replikate bei einer Cardenolidkonzentration von 0 µM (DMSO 2%) gemessen, siehe dazu Tabelle 3.8. Die beiden ABCB-Transporter zeigen eine höhere Grundaktivität im Vergleich zu den *C. asclepiadeus* ABCB-Transportern. Die Grundaktivität der verschiedenen Transporter wurde in den Grafiken als Punkt auf der y-Achse dargestellt.

**Tabelle 3.8: Mittelwerte der Vanadat-sensitiven ATPase-Aktivität der biologischen Replikate bei einer Cardenolidkonzentration von 0 µM (DMSO 2%) zur Bestimmung der Grundaktivität.**

	BR1 [nmol Pi/mg Protein/min]	BR2 [nmol Pi/mg Protein/min]	BR3 [nmol Pi/mg Protein/min]	Mittelwert [nmol Pi/mg Protein/min]	SE
<b><i>Casc</i> ABCB1</b>	22,54	23,77	22,13	22,81	0,49
<b><i>Casc</i> ABCB2</b>	20,49	20,90	18,85	20,8	0,62
<b><i>Cpop</i> ABCB1</b>	30,32	29,09	28,27	29,23	1,03
<b><i>Cpop</i> ABCB2</b>	34,01	32,38	30,73	32,37	0,94

In Tabelle 3.9 sind die Mittelwerte und Standardfehler der Aktivität der drei biologischen Replikate der verschiedenen Transporter aufgeführt. Um mögliche Ausreißer in dem Datensatz zu identifizieren, wurde der Grubbs-Test zur Ausreißer-Erkennung angewendet, wie in Tabelle 3.10 dargestellt.

**Tabelle 3.9: Mittelwerte der Vanadate-sensitiven ATPase-Aktivität biologischen Replikate der getesteten ABCB Transporter gegenüber den getesteten Substraten.** Mittelwerte der drei biologischen Replikate.

<b>Digoxin [µM]</b>	<b>5</b>	<b>60</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>400</b>	<b>600</b>	<b>800</b>
<b>Casc ABCB1</b> [nmol Pi/mg Protein/min]	21,64	19,53	13,65	11,86	14,88	28,08	15,93
SE	8,77	7,72	8,67	5,71	5,69	19,2	6,49
<b>Cpop ABCB1</b> [nmol Pi/mg Protein/min]	42,16	38,80	12,18	20,52	24,83	17,35	25,47
SE	7,97	4,14	14,51	8,43	5,02	5,33	5,00
<b>Casc ABCB2</b> [nmol Pi/mg Protein/min]	25,35	24,42	15,49	12,82	24,84	27,33	27,75
SE	18,07	8,99	15,05	13,46	6,53	5,96	3,35
<b>Cpop ABCB2</b> [nmol Pi/mg Protein/min]	17,81	53,33	80,90	84,58	104,08	107,42	98,95
SE	13,81	12,16	10,38	9,78	16,10	15,87	5,48
<b>Cymarin [µM]</b>	<b>5</b>	<b>60</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>400</b>	<b>600</b>	<b>800</b>
<b>Casc ABCB1</b> [nmol Pi/mg Protein/min]	12,5	8,91	13,27	9,78	12,51	19,98	15,07
SE	0,97	4,42	4,46	2,77	1,8	2,91	2,26
<b>Cpop ABCB1</b> [nmol Pi/mg Protein/min]	17,75	8,50	12,09	10,41	9,52	8,64	6,66
SE	3,03	5,73	2,12	1,72	3,35	2,13	1,90
<b>Casc ABCB2</b> [nmol Pi/mg Protein/min]	4,19	5,55	3,67	6,17	5,63	5,16	6,62
SE	1,77	1,77	2,99	1,99	0,98	1,4	0,99
<b>Cpop ABCB2</b> [nmol Pi/mg Protein/min]	38,37	48,28	24,22	43,88	43,62	50,14	93,02
SE	5,62	15,37	10,72	6,43	5,86	27,98	8,82
<b>Ouabain [µM]</b>	<b>5</b>	<b>60</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>400</b>	<b>600</b>	<b>800</b>
<b>Casc ABCB1</b> [nmol Pi/mg Protein/min]	14,47	10,86	8,08	16,18	5,29	11,71	12,44
SE	7,03	1,78	2,18	5,2	0,7	3,26	0,85
<b>Cpop ABCB1</b> [nmol Pi/mg Protein/min]	21,72	16,11	16,55	20,44	15,48	19,97	11,34
SE	2,01	0,85	1,85	4,65	1,77	4,33	5,11
<b>Casc ABCB2</b> [nmol Pi/mg Protein/min]	8,54	18,9	19,08	23,54	20,37	21,45	21,60
SE	5,75	2,57	2,8	2,49	3,07	2,02	2,66
<b>Cpop ABCB2</b> [nmol Pi/mg Protein/min]	28,09	14,63	20,74	28,37	16,90	19,33	18,16
SE	7,12	9,02	3,91	4,38	4,41	10,97	10,20
<b>Calotropin [µM]</b>	<b>5</b>	<b>30</b>	<b>60</b>	<b>100</b>	<b>200</b>		
<b>Casc ABCB1</b> [nmol Pi/mg Protein/min]	23,97	23,21	13,92	23,21	23,20		
SE	2,16	1,02	4,25	0,41	1,48		
<b>Cpop ABCB1</b> [nmol Pi/mg Protein/min]	14,65	15,98	16,88	17,96	12,51		
SE	1,06	4,78	5,52	3,00	3,41		
<b>Casc ABCB2</b> [nmol Pi/mg Protein/min]	17,76	9,27	13,3	16,12	18,15		
SE	5,87	5,52	1,65	0,94	1,25		
<b>Cpop ABCB2</b> [nmol Pi/mg Protein/min]	15,62	13,06	11,86	15,61	16,51		
SE	1,73	2,38	1,77	3,27	1,97		

**Tabelle 3.10: Zur Lokalisierung von Ausreißer in dem Aktivitätsassay aus der Tabelle XXX über den Grubbs Ausreißer -Test.** Gelistet sind die G-Werte ( $G = (\text{Max.} - \text{Mittelwert}) / \text{Standardabweichung}$ ) aus dem Grubbs Ausreißer Test.

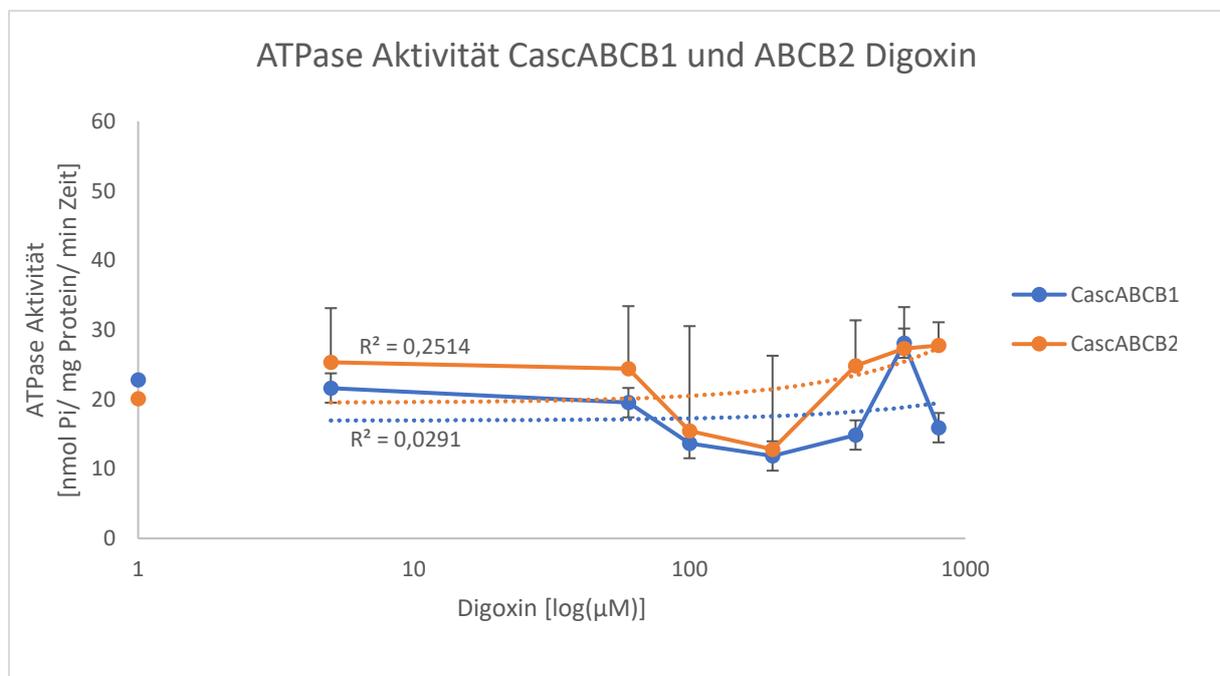
Protein	G-Wert				
	Verapamil	Digoxin	Cymarin	Ouabain	Calotropin
<i>Casc</i> ABCB1	0,67	1,81	0,97	0,86	0,58
<i>Casc</i> ABCB2	0,81	0,87	0,33	0,91	0,88
<i>Cpop</i> ABCB1	1,14	1,48	2,00	1,21	1,15
<i>Cpop</i> ABCB2	1,15	0,91	2,08	1,39	1,00

Die Mittelwerte der drei biologischen Replikate der verschiedenen Transporter mit dem Standardfehler sind in Tabelle 3.9 aufgeführt. Zur Lokalisierung möglicher Ausreißer wurde der Grubbs-Ausreißertest angewendet, wie in Tabelle 3.10 dargestellt. Nach Abgleich der Werte mit der Grubbs-Wahrscheinlichkeitstabelle (2.7.3 MMTeil) wurden alle Datenpunkte beibehalten, obwohl bei *Cpop*ABCB1 und 2 mit Cymarin Ausreißer mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% im Datensatz vorhanden sind. Für *Casc*ABCB1 ist der G-Wert von 1,81 sehr knapp an der Grenze zu einer 90%igen Wahrscheinlichkeit von Ausreißern im Datensatz, aber es konnten keine Ausreißer identifiziert werden.

Für die graphische Darstellung der Assay-Daten aus Tabelle 3.9 wurden eine halblogarithmische Skalierung gewählt (ab Abbildung 3.25). Die Transporter wurden mit verschiedenen Cardenoliden getestet (Digoxin, Cymarin, Ouabain und Calotropin), und die Aktivität wurde als Differenz des freigesetzten anorganische Phosphats in An- oder Abwesenheit von 500  $\mu\text{M}$  Vanadat (einem spezifischen ABCB-Inhibitor) bestimmt. Für jeden Assay wurden drei biologische Replikate verwendet.

Bei einer Digoxin-Konzentration von 0 und 5  $\mu\text{M}$  zeigte *Casc*ABCB1 eine ähnliche Aktivität von  $\sim 22 \pm 8,77$  nmol Pi/mg Protein/min. Danach fiel die Aktivität bei den Cardenolid-Konzentrationen 60, 100, 200 und 400  $\mu\text{M}$  unter die Grundaktivität und stieg dann bei einer Konzentration von 600  $\mu\text{M}$  auf  $28,08 \pm 19,2$  nmol Pi/mg Protein/min und fiel bei 800  $\mu\text{M}$  Digoxin wieder auf eine Aktivität von  $15,93 \pm 6,49$  nmol Pi/mg Protein/min. Bei steigender Digoxinkonzentration konnte für *Casc* ABCB1 keine erhöhte Aktivität beobachtet werden, mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,0291$ . Im Vergleich zum *Casc*ABCB1 zeigte der *Casc*ABCB2-Transporter eine minimal höhere Aktivität, die Grundaktivität betrug  $20,8 \pm 0,65$  nmol Pi/mg Protein/min und stieg bei einer Digoxin-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  auf  $25,35 \pm 18,07$  nmol Pi/mg Protein/min. Ähnlich wie beim ABCB1-Transporter fiel die Aktivität bei den

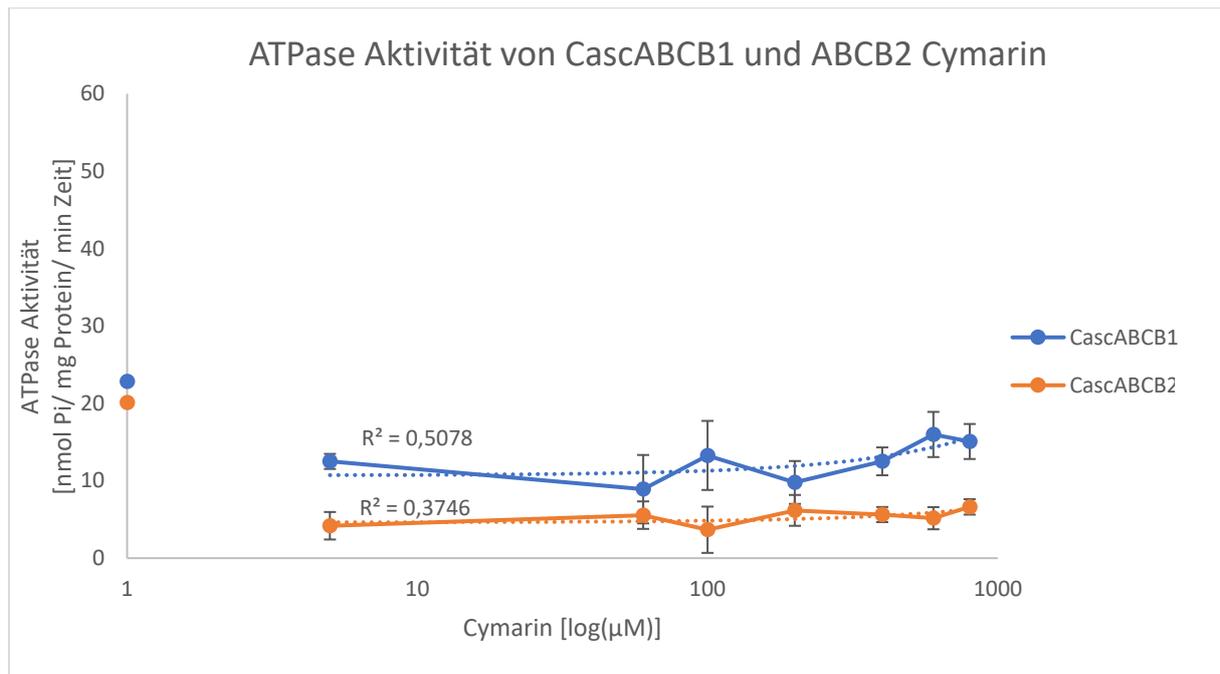
Konzentrationen von 60, 100 und 200  $\mu\text{M}$  unter die Grundaktivität und stieg dann wieder ab einer Konzentration von 400  $\mu\text{M}$  auf  $24,84 \pm 6,35$  nmol Pi/mg Protein/min. Die Aktivität von *CascABC2* war bei der höchsten Digoxin-Konzentration mit  $27,75 \pm 3,35$  nmol Pi/mg Protein/min am stärksten ausgeprägt. Die Trendlinie des *CascABC2* zeigt eine steigende Tendenz, was darauf hindeuten könnte, dass eine Interaktion zwischen *CascABC2* und Digoxin vorliegt. Das Bestimmtheitsmaß beträgt  $R^2 = 0,2514$ , was allerdings auf keinen Zusammenhang der ATPase Aktivität und der Cardenolid-Konzentration hindeutet. Im Vergleich zu *ABC1* zeigt *CascABC2* eine höhere Streuung bei den getesteten biologischen Replikaten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf eine negative Darstellung des Standardfehlers bei *CascABC2* verzichtet (Abbildung 3.25).



**Abbildung 3.25: Effekt von Digoxin auf in *Sf9*-Zellen produzierte *CascABC1* und *CascABC2*.** Abgebildet ist die Differenz zwischen den Vanadate-inhibierten (500  $\mu\text{M}$ ) und nicht-inhibierten Membranen der ABCB Transporter des *C. asclepiadeus* getestet mit Digoxin (5-800  $\mu\text{M}$ ). Auf der y-Achse ist die Aktivität dargestellt und auf der x-Achse die logarithmierte Digoxinkonzentration. In hellblau ist *ABC1* dargestellt und in orange *ABC2*, mit jeweiliger Trendline und dem Bestimmtheitsmaß. Die beiden Punkte auf der y-Achse zeigt die jeweilige Grundaktivität der Transporter an. Es besteht kein signifikanten Unterschied im Kurvenverlauf.

Es findet keine Stimulation der beiden Transporter durch Cymarin statt. Beide Transporter zeigen eine deutlich verminderte Aktivität im Vergleich zur Grundaktivität der Transporter.

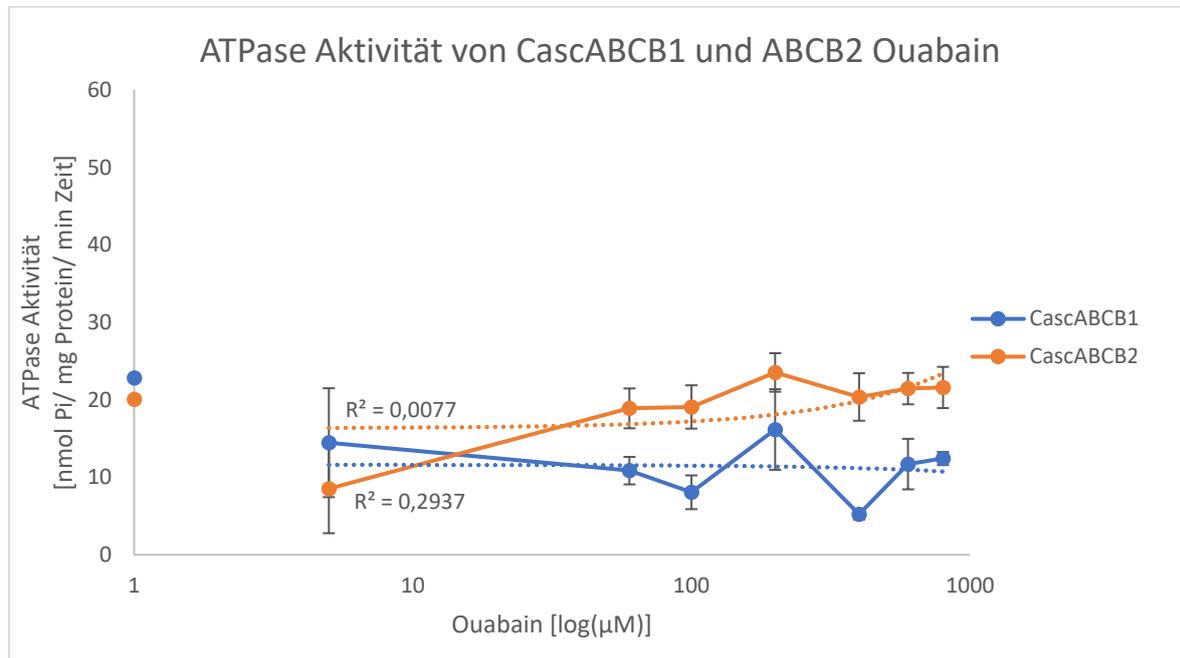
Trotz Erhöhung der Cymarinkonzentration fand keine erhöhte Aktivität statt. ABCB1 zeigt eine Aktivität von etwa 10 nmol Pi/ mg Protein/ min Zeit mit einem  $R^2$ -Wert von 0,50, dies deutet auf keinen Zusammenhang zwischen der Cardenolid-Konzentration und der ATPase Aktivität hin während ABCB2 eine Aktivität von etwa 5 nmol Pi/ mg Protein/ min Zeit mit einem  $R^2$ -Wert von 0,37 zeigt, auch hier besteht kein Zusammenhang zwischen der ATPase Aktivität und der Erhöhung der Cardenolidkonzentration (Abbildung 3.26).



**Abbildung 3.26: Effekt von Cymarin auf in *Sf9*-Zellen produzierte *CascABCB1* und *CascABCB2*.** Abgebildet ist die Differenz zwischen den Vanadate-inhibierten (500 µM) und nicht-inhibierten Membranen der ABCB Transporter des *C. asclepiadeus* getestet mit Cymarin (5-800 µM). Auf der y-Achse ist die Aktivität dargestellt und auf der x-Achse die logarithmierte Digoxinkonzentration. In hellblau ist ABCB1 dargestellt und in orange ABCB2, mit jeweiliger Trendline und dem Bestimmtheitsmaß. Die beiden Punkte auf der y-Achse zeigt die jeweilige Grundaktivität der Transporter an. Es besteht kein signifikanten Unterschied im Kurvenverlauf.

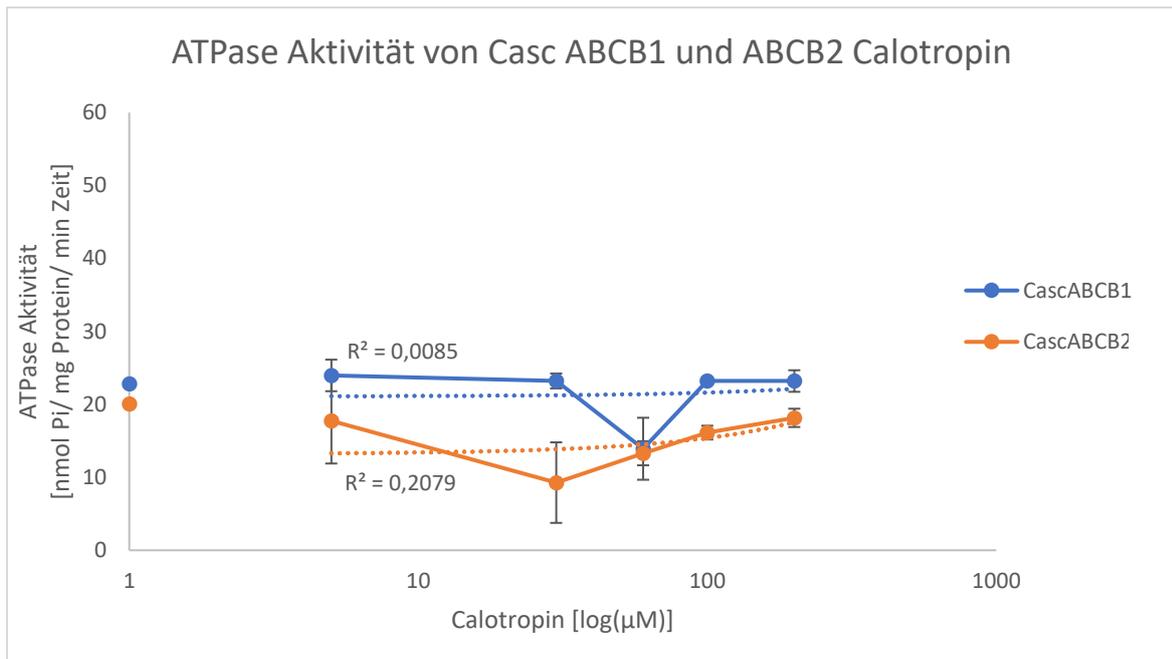
*CascABCB1* zeigt keine Aktivitätserhöhung bei Erhöhung der Konzentration von Ouabain, das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  beträgt 0,0077, damit besteht kein Zusammenhang zwischen der ATPase-Aktivität und der Cardenolid-Konzentration. Im Vergleich dazu zeigt ABCB2 eine anfängliche Abnahme der Aktivität bei Zugabe von Ouabain, bei einer Konzentration von 5 µM fällt die Aktivität auf  $8,5 \pm 5,75$  nmol Pi/ mg Protein/ min Zeit im Vergleich zur Grundaktivität von 20 nmol Pi/ mg Protein/ min Zeit. Danach steigt die Aktivität wieder an, erreicht aber erst bei einer Konzentration von 200 µM die höchste Aktivität von  $23,5 \pm 2,94$  nmol Pi/ mg Protein/

min Zeit. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von ABCB2 beträgt hier 0,29, was auf keine Korrelation zwischen der Cardenolid-Konzentration und der ATPase Aktivität hindeutet (Abbildung 3.27).



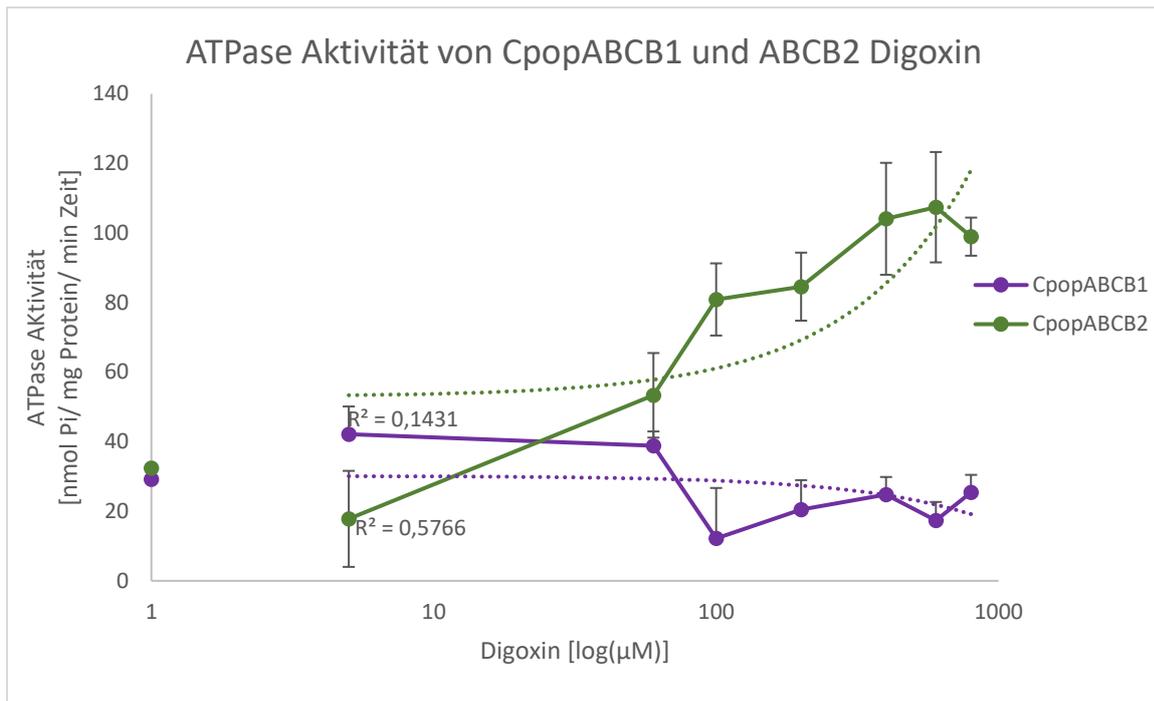
**Abbildung 3.27: Effekt von Ouabain auf in *Sf9*-Zellen produzierte *CascABCB1* und *CascABCB2*.** Abgebildet ist die Differenz zwischen den Vanadate-inhibierten (500 µM) und nicht-inhibierten Membranen der ABCB Transporter des *C. asclepiadeus* getestet mit Ouabain (5-800 µM). Auf der y-Achse ist die Aktivität dargestellt und auf der x-Achse die logarithmierte Digoxinkonzentration. In hellblau ist ABCB1 dargestellt und in orange ABCB2, mit jeweiliger Trendline und dem Bestimmtheitsmaß. Die beiden Punkte auf der y-Achse zeigt die jeweilige Grundaktivität der Transporter an. Es besteht kein signifikanten Unterschied im Kurvenverlauf.

Aufgrund der geringen Menge von Calotropin, die uns zur Verfügung stand, konnte der Assay nur bei einer Konzentrationsreihe von 5-200 µM statt bis zu 800 µM durchgeführt werden. Beide Transporter zeigten keine Stimulation bei der Erhöhung der Calotropinkonzentration (Abbildung 3.28).



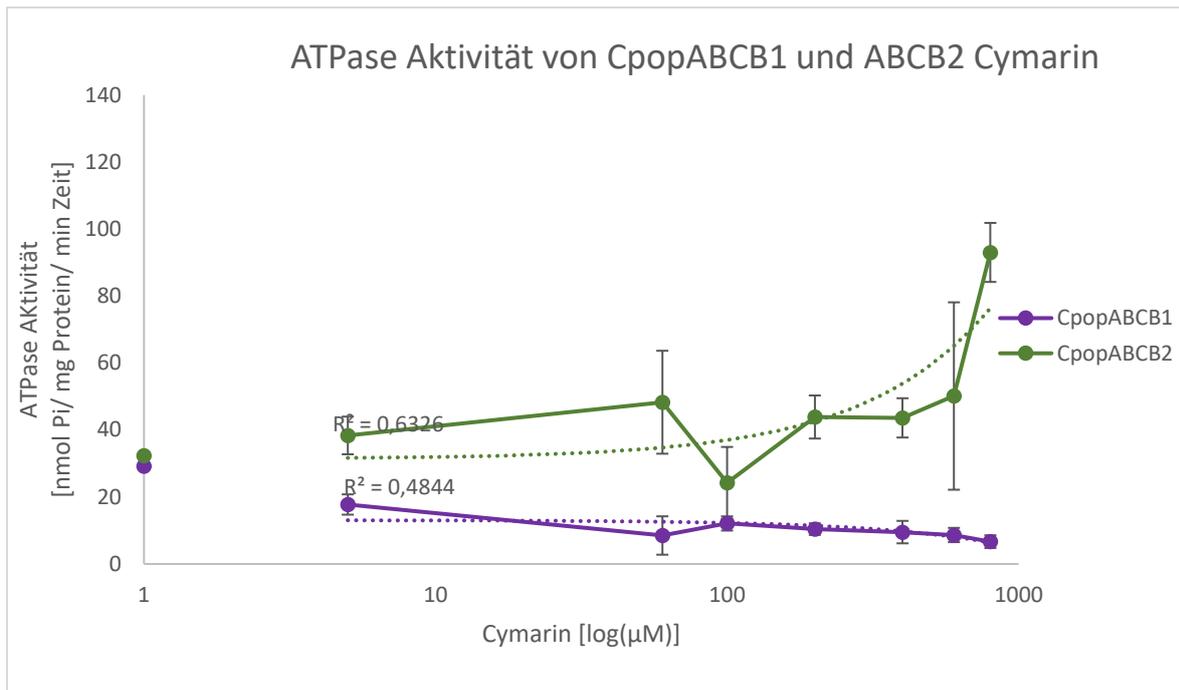
**Abbildung 3.28: Effekt von Calotropin auf in *Sf9*-Zellen produzierte *CascABC1* und *CascABC2*.** Abgebildet ist die Differenz zwischen den Vanadate-inhibierten (500 μM) und nicht-inhibierten Membranen der ABCB Transporter des *C. asclepiadeus* getestet mit Calotropin (5-200 μM). Auf der y-Achse ist die Aktivität dargestellt und auf der x-Achse die logarithmierte Digoxinkonzentration. In hellblau ist ABCB1 dargestellt und in orange ABCB2, mit jeweiliger Trendline und dem Bestimmtheitsmaß. Die beiden Punkte auf der y-Achse zeigt die jeweilige Grundaktivität der Transporter an. Es besteht kein signifikanten Unterschied im Kurvenverlauf.

Als Kontrollgruppe wurden auch zwei ABCB-Volltransporter aus *C. populi* in *Sf9*-Zellen überexprimiert und isoliert. Das Substratspektrum dieser Transporter wurde ebenfalls mit den vier verwendeten Cardenoliden getestet. *CpopABC1* zeigt zunächst eine erhöhte Aktivität bei steigender Digoxinkonzentration, diese fiel dann bei einer Konzentration von 100 μM ab und steigt dann wieder etwas an bei den folgenden Konzentrationen. Insgesamt ist eine verminderte Aktivität bei steigender Digoxinkonzentration zu beobachten. Bei *CpopABC2* zeigte sich durch die Zugabe von höherer Digoxin-Konzentration eine Stimulation. Die stärkste Aktivität zeigte *Cpop-ABC2* mit  $107,42 \pm 15,87$  nmol Pi/ mg Protein/ min Zeit bei einer Digoxinkonzentration von 600 μM. Im Vergleich zu den beiden ABCB Transportern des *C. asclepiadeus* ist die Aktivität deutlich höher, und für *CpopABC2* ist eine konzentrationsabhängige Reaktion zu beobachten (Abbildung 3.29).



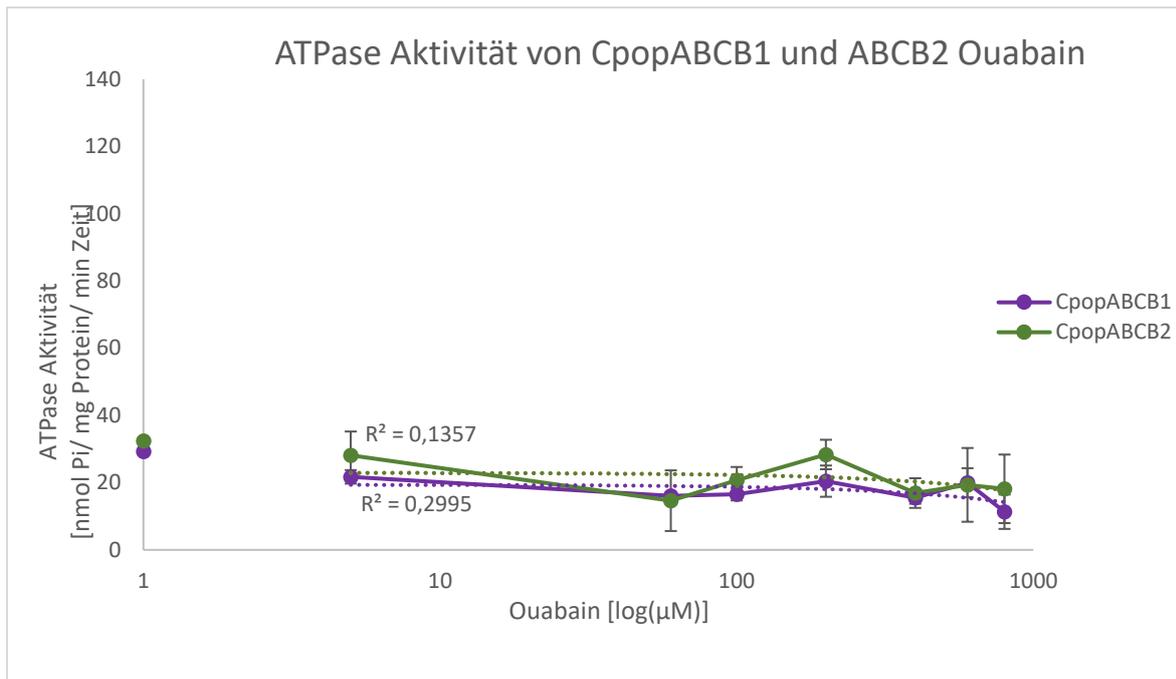
**Abbildung 3.29: Effekt von Digoxin auf in *Sf9*-Zellen produzierte *CpopABC1* und *CpopABC2*.** Abgebildet ist die Differenz zwischen den Vanadate-inhibierten (500 μM) und nicht-inhibierten Membranen der ABCB Transporter des *C. populi* getestet mit Digoxin (5-800 μM). Auf der y-Achse ist die Aktivität dargestellt und auf der x-Achse die logarithmierte Digoxinkonzentration. In lila ist ABCB1 dargestellt und in grün ABCB2, mit jeweiliger Trendline und dem Bestimmtheitsmaß. Die beiden Punkte auf der y-Achse zeigt die jeweilige Grundaktivität der Transporter an. Es besteht ein signifikanten Unterschied im Kurvenverlauf.

Wie auch bei Digoxin, zeigte *CpopABC1* für Cymarin eine abfallende Aktivität bei steigender Konzentration. Bei *CpopABC2* konnte hingegen eine konzentrationsabhängige Stimulierung durch Cymarin nachgewiesen werden. Die höchste Aktivität für *CpopABC2* wurde mit  $93,02 \pm 8,82$  nmol Pi/ mg Protein/ min Zeit bei der höchsten Cardenolidkonzentration (800 μM) erreicht. Die Aktivität war zwar geringer als bei Digoxin, jedoch ist im Vergleich zu den beiden ABCB-Transportern des *C. asclepiadeus* eine Aktivität erkennbar (Abbildung 3.30).

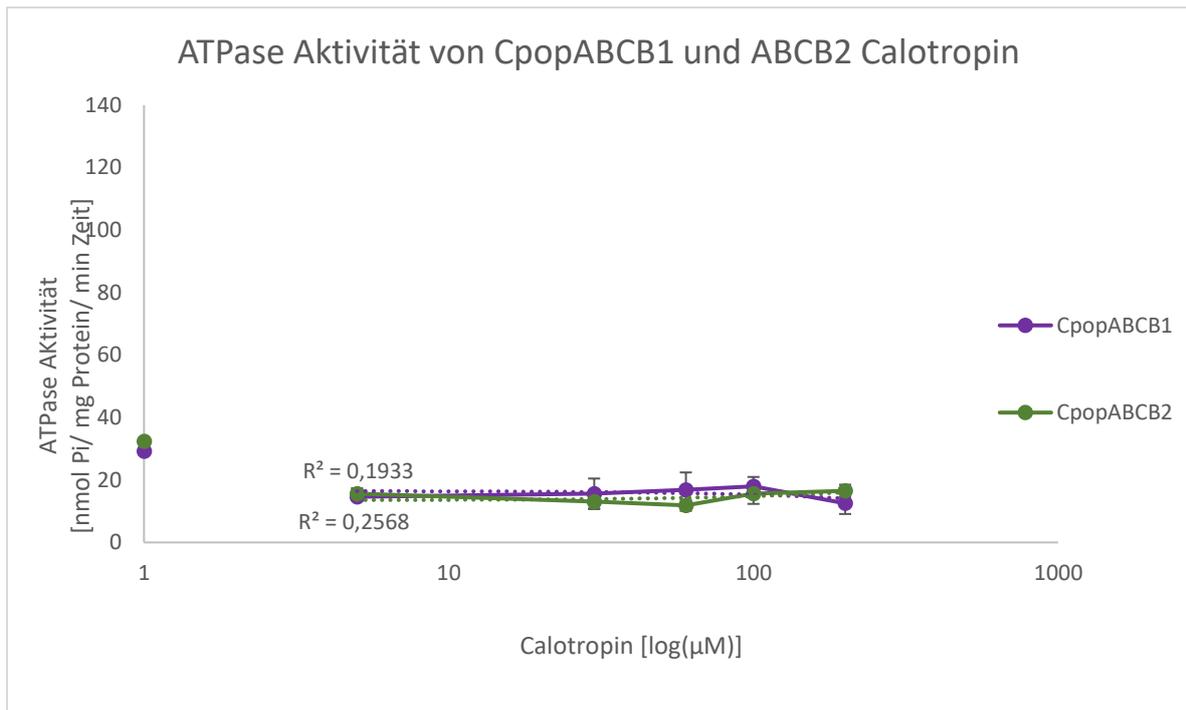


**Abbildung 3.30: Effekt von Cymarin auf in *Sf9*-Zellen produzierte *CpopABC1* und *CpopABC2*.** Abgebildet ist die Differenz zwischen den Vanadate-inhibierten (500 μM) und nicht-inhibierten Membranen der ABCB Transporter des *C. populi* getestet mit Cymarin (5-800 μM). Auf der y-Achse ist die Aktivität dargestellt und auf der x-Achse die logarithmierte Digoxinkonzentration. In lila ist ABCB1 dargestellt und in grün ABCB2, mit jeweiliger Trendline und dem Bestimmtheitsmaß. Die beiden Punkte auf der y-Achse zeigt die jeweilige Grundaktivität der Transporter an. Es besteht ein signifikanten Unterschied im Kurvenverlauf.

Beide *C. populi* ABCB Transporter zeigten keine Stimulation durch die Erhöhung von Ouabain (Abbildung 3.31). Wie auch für die beiden ABCB-Transporter des *C. asclepiadeus*, konnte keine Interaktion mit Calotropin für die getesteten ABCB-Transporter des *C. populi* nachgewiesen werden (Abbildung 3.32).



**Abbildung 3.31: Effekt von Ouabain auf in *Sf9*-Zellen produzierte *CpopABC1* und *CpopABC2*.** Abgebildet ist die Differenz zwischen den Vanadate-inhibierten (500  $\mu$ M) und nicht-inhibierten Membranen der ABCB Transporter des *C. populi* getestet mit Ouabain (5-800  $\mu$ M). Auf der y-Achse ist die Aktivität dargestellt und auf der x-Achse die logarithmierte Digoxinkonzentration. In lila ist ABCB1 dargestellt und in grün ABCB2, mit jeweiliger Trendline und dem Bestimmtheitsmaß. Die beiden Punkte auf der y-Achse zeigt die jeweilige Grundaktivität der Transporter an. Es besteht kein signifikanten Unterschied im Kurvenverlauf.



**Abbildung 3.32: Effekt von Calotropin auf in *Sf9*-Zellen produzierte *CpopABC1* und *CpopABC2*.** Abgebildet ist die Differenz zwischen den Vanadate-inhibierten (500 µM) und nicht-inhibierten Membranen der ABCB Transporter des *C. populi* getestet mit Calotropin (5-200 µM). Auf der y-Achse ist die Aktivität dargestellt und auf der x-Achse die logarithmierte Digoxinkonzentration. In lila ist ABCB1 dargestellt und in grün ABCB2, mit jeweiliger Trendline und dem Bestimmtheitsmaß. Die beiden Punkte auf der y-Achse zeigt die jeweilige Grundaktivität der Transporter an. Es besteht kein signifikanten Unterschied im Kurvenverlauf.

Alle getesteten Transporter (*CascABC1* und *ABCB2*, *CpopABC1* und *ABCB2*) konnten durch Verapamil stimuliert werden. Die *ABCB1*-Transporter beider Käferarten reagieren jedoch nicht auf Digoxin, während *CascABC2* eine leichte Tendenz zur Aktivitätssteigerung bei steigender Digoxinkonzentration aufwies und auch durch Ouabain leicht stimuliert wurde. *CpopABC2* zeigte eine konzentrationsabhängige Stimulation durch Digoxin und Cymarin. Keiner der vier *ABCB* Transporter zeigte jedoch eine erhöhte Aktivität durch die Zugabe von Calotropin.

## 4. Diskussion

### 4.1 Die ABC-Transporter im Transkriptom des *C. asclepiadeus*

Die ABC-Transporterproteine gehören zu einer der größten Proteinfamilien und bilden daher eine solide Grundlage für die Untersuchung der Evolution verschiedener ABC-Unterfamilien (Annilo et al. 2006). Genduplikations- und Deletionsereignisse innerhalb der ABC-Proteine wurden bei verschiedenen Vertebraten beobachtet, was darauf schließen lässt, dass sie aktiven Anpassungsprozessen unterliegen (Annilo et al. 2006; Moitra and Dean 2011). Genduplikationen können zu vier verschiedenen Ergebnissen führen: 1) Funktionsverlust, bei dem das Gen durch eine Deletionsmutation seine Funktion verliert, 2) Neofunktionalisierung, bei der Mutationen der Genkopie eine neue Funktion verleihen und das ursprüngliche Gen seine Funktion behält, 3) Subfunktionalisierung, bei der Mutationen zu einer Spezialisierung der Genkopie basierend auf der ursprünglichen Funktion des Paralogs führen, und 4) Superfunktionalisierung, bei der die Genkopien dieselbe Funktion haben (Merzendorfer 2014). Diese genetischen Mechanismen können aufgrund der Verbindung von ABC-Transportern mit Insektizidtoleranz und Anpassungsmechanismen an sekundäre Pflanzenmetabolite auch für die Entstehung von Resistenz- und Anpassungsmutationen verantwortlich sein, die sich häufig nach mehreren Generationen in lokalen Insektenpopulationen etablieren (Merzendorfer 2014). Ein Beispiel dafür ist in der Baumwoll-Kapseleule (*Helicoverpa armigera*) zu beobachten. Durch den langfristigen Anbau von genveränderter Baumwolle, die Gene des Bakterium *Bacillus thuringiensis* besitzt (BT-Baumwolle) haben zwei *H. armigera*-Stämme eine Resistenz gegen das Cry2Ab-Gift unabhängig voneinander entwickelt. Diese Anpassung ist durch unterschiedliche Deletionsmutationen in verschiedenen Exons desselben ABCA2-Gens entstanden (Tay et al. 2015). Durch evolutionäre Analysen ist es möglich, orthologe ABC-Gene in verschiedenen Organismen zu erkennen. Aufgrund dieser Ähnlichkeit können Hypothesen über die möglichen Funktionen von ABC-Proteinen aufgestellt werden (Moitra and Dean 2011). ABC-Transporter in Eukaryoten befinden sich in der Plasmamembran sowie in den intrazellulären Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER), des Golgi-Apparats, der Lysosomen, Peroxisomen und Mitochondrien (Zutz et al. 2009). ABC-Transporter können grob in zwei Klassen unterteilt werden: ABC-Exporter, die beispielsweise für die Ausscheidung von

toxischen Substanzen verantwortlich sind, und ABC-Importer (bisher nur in Prokaryonten), die hauptsächlich als Aufnahmesysteme für Nährstoffe (Stoffwechsel) dienen (Dassa and Bouige 2001).

Innerhalb der Arthropoden sind neun ABC-Transporter Unterfamilien bekannt A-I (I nur in *Anopheles*) (Dermauw and Van Leeuwen 2014; Figueira-Mansur et al. 2020; Xiao et al. 2022). Durch den ABC-Scan (Denecke et al. 2021) konnten potentiellen ABC-Proteine im Transkriptom des *C. asclepiadeus* identifiziert werden. Zusätzlich konnte das Ergebnis der Blast-Suche bestätigt werden, die zuvor durchgeführt wurde, um die ABCB-Volltransporter zu finden. Mithilfe des ABC-Scans konnten 45 mögliche ABC-Transporter den acht Unterfamilien A-H zugeordnet werden. Die Anzahl der ABC-Proteine variiert je nach untersuchtem Organismus, von 43 in der Honigbiene und bis zu 104 beim *Asbolus verrucosus*, der Mensch besitzt 48 ABC-Proteine (Dean et al., 2001; Liu et al., 2011; Xiao et al., 2022).

In anderen Käferarten konnten in der Unterfamilie A vier bis 13 verschiedene Transportergene identifiziert werden, während im *C. asclepiadeus* drei Kopien identifizieren werden konnte. Diese Unterfamilie besteht aus Volltransportern, die am zellulären Lipidtransport beteiligt sind (Peelman et al. 2003). Versuche mit RNAi zeigten bei dem rotbraunen Reismehlkäfer (*Tribolium castaneum*) Fehlbildungen der Flügel und Elytren (Broehan et al. 2013).

Die Unterfamilie B teilt sich in Voll- und Halbtransporter auf. Bisher konnten im *C. asclepiadeus* zwei Volltransporter mittels tBlastx-Suche und darüber hinaus noch vier Halbtransporter durch den ABC-Scan identifiziert werden. Die Anzahl von ABCB-Transportern innerhalb der Arthropoden liegt unter zehn (Denecke et al. 2021), was sich ebenfalls mit meinen Ergebnissen deckt. Die erhaltenen Sequenzen besitzen typische Motive und Topologien für ABCB-Transporter. Sowohl *CascABCB1* als auch *CascABCB2* haben die Proteinstruktur TMD-NBD-TMD-NBD, die typisch für diese Unterfamilie ist. In der NBD beider Proteine konnten die stark konservierten Motive Walker A, Walker B und die ABC-Signatur identifiziert werden (Dermauw and Van Leeuwen 2014; Linton 2007; Sarkadi et al. 2006; Zolnerciks et al. 2011). Auch die beiden Epitope des ABCB-Antikörpers C219 sind vorhanden, sodass die spätere Expression, Lokalisation und Isolation der Proteine in molekularbiologischen Versuchen erfolgreich bestätigt werden konnte. *C. auratus* besitzt drei ABCB-Volltransporter, auch in anderen Käferarten konnten drei ABCB-Volltransporter identifiziert werden (Favell et al. 2020; Kowalski et al. 2020; Strauss et al. 2014). Wie im *C. asclepiadeus* besitzt *T. castaneum*

zwei ABCB-Volltransporter (Broehan et al. 2013). Durch phylogenetische Analyse der gesamten Proteinsequenz der *Chrysochus* ABCB-Volltransporter wurde festgestellt, dass die beiden ABCB1-Transporter homolog zueinander sind. Der zweite ABCB-Transporter von *C. asclepiadeus* ist jedoch gleich nah mit den ABCB2- und ABCB3-Transportern von *C. auratus* verwandt. Dadurch dass der ABCB2 des *C. auratus* eine substratspezifische Aktivität gegenüber dem in der Wirtspflanze anzutreffenden Cardenolid Cymarin zeigt und am stärksten in den Elytren dem Ort der Wehrdrüsen exprimiert wird, könnte dies ein möglicher Hinweis auf eine Genduplikation mit Neofunktionalisierung innerhalb der Gattung *Chrysochus* sein, die sich aufgrund der Anpassung an Cardenolide in der Wirtspflanze entwickelt hat. Näheres zu den möglichen Funktionen der *C. asclepiadeus* ABCB-Volltransporter wird in den nächsten Absätzen besprochen. Die orthologen Gene MDR49, 50 und 65 der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) zeigten durch *Knock outs* und Assay-Versuche ebenfalls einen Zusammenhang mit der Detoxifikation von Cardenolide (Groen et al., 2017). Das Ergebnis der Arbeitsgruppe Denecke et al. 2021 zeigte für *Coleoptera* ABCB-Volltransporter eine Anzahl von zwei bis vier mit einem Mittelwert von drei. Es gibt keine eindeutigen orthologe Gene der humanen ABCB-Volltransporter 4, 5 und 11 in Arthropoden (Annilo et al. 2006). Neben den beiden ABCB-Volltransportern konnten noch vier ABCB-Halbtransporter im *C. asclepiadeus* Transkriptom identifiziert werden. Diese vier ABCB-Halbtransporter konnten den orthologen menschlichen ABCB-Halbtransportern (Dean et al. 2001) und denen des Kartoffelkäfers (Favell et al. 2020) (ABCB6, 7, 8 und 10) als Orthologe zugeordnet werden. ABC-Transporter, die den menschlichen ABCB6-8 und 10 ortholog sind, gelten als mitochondrial und spielen eine wichtige Rolle bei der Biogenese von Eisen-Schwefel-Clustern im Zytoplasma, der Häm-Synthese, der Aufrechterhaltung der Eisen-Homöostase sowie dem Schutz vor oxidativem Stress (Cavadini et al. 2007; Zutz et al. 2009). In der Baumwoll-Kapseleule (*H. armigera*) wurde eine Beteiligung des ABCB6-Transporters bei der Entgiftung von Gossypol (einem sekundären Metaboliten der Baumwollpflanze) nachgewiesen (Jin et al. 2020). Ähnliche Funktionen könnten auch von den ABCB-Halbtransportern des *C. asclepiadeus* übernommen werden. Die humanen ABCB2 und ABCB3-Proteine, werden auch TAP1 und TAP2 (*transporter-associated with antigen processing*) genannt. TAP1 und TAP2 bilden ein Heterodimer und pumpen Antigenproteine aus dem Cytosol in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums auf die MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse I Moleküle (Bangert, Tumulka, and Abele 2011). Die Immunantwort bei Insekten besteht aus drei Hauptkomponenten: Phagozytose,

Knötchenbildung und Einkapselung (Carton, Poirié, and Nappi 2008; Smilanich et al. 2009). Da Arthropoden kein adaptives Immunsystem besitzen, wurden die menschlichen ABCB2 und 3 oder TAP1 und TAP2 als Außengruppe verwendet (Merzendorfer 2014) und daher konnten auch keine orthologe Gene im Transkriptom des *C. asclepiadeus* gefunden werden. Es konnte auch keine ABCB9-Kopie im Transkriptom des *C. asclepiadeus* gefunden werden, dieser Halbtransporter ist den TAP-Proteinen ähnlich und könnte beim Menschen eine lysosomale Funktionen übernehmen (Bangert et al. 2011). In der polyphagen Gemeinen Spinnenmilbe (*Tetranychus urticae*) konnten ebenfalls keine orthologe Gene der humanen ABCB-Halbtransporter ABCB2,3 und 9 identifiziert werden (Dermauw et al. 2013). Wie viele Halbtransporter in *C. auratus* vorhanden sind, ist bisher nicht bekannt.

Innerhalb der Coleoptera ABC-Superfamilie bilden die Unterfamilien C und G den größten Anteil (Broehan et al. 2013; Strauss et al. 2014; Xiao et al. 2022), dies deckt sich ebenfalls mit meinen Ergebnissen. Üblicherweise sind in Insektengenomen neun bis 15 ABCC-Gene zu finden. Innerhalb der Coleoptera ist diese Unterfamilie bei Schwarzkäfern (*Tenebrionidea*) und im Kartoffelkäfer erweitert mit einem Mittelwert von 27 Genen (Denecke et al. 2021; Xiao et al. 2022). Aufgrund der hohen Anzahl der ABCC-Transporter können sie verschiedene Funktionen übernehmen, wie beispielsweise den Ionentransport, so bildet der humane ABCC7 Chlorid-Kanäle (Dean et al. 2022), und die humanen ABCC8 und ABCC9 regulieren Kalium-Kanäle (Dean et al. 2022; Schinkel and Jonker 2003). Die ABCC-Transporterproteine besitzen, ähnlich wie die ABCB Transporter, ein breites Substratspektrum und werden auch als *multidrug resistance associated proteins* (MRPs) bezeichnet. In einer jüngsten Studie wurde beobachtet, dass die Mitglieder der ABCC-Unterfamilie im *T. castaneum* mit Pestizidresistenz assoziiert sind, was die Anpassungsfähigkeit durch Genduplikationen in dieser Genfamilie verdeutlicht (Rösner and Merzendorfer 2020). Ähnliches kann beim Kartoffelkäfer vermuten werden, der ein weitverbreiteter Schädling ist und gegenüber 55 verschiedenen Chemikalien bereits Resistenzen entwickelt hat<sup>9</sup>. Einige ABCC-Proteine stehen auch im Zusammenhang mit BT Resistenz (Barve et al. 2022; Heckel 2021; Wu et al. 2019). Auch im *C. asclepiadeus* könnten homologe Gene ähnliche Funktionen übernehmen.

Die Unterfamilien D, E und F besitzen eine geringere Anzahl an Genkopien, die von einer (Unterfamilie E) bis zu vier Genkopien bei den Unterfamilien D und F im *C. asclepiadeus*

---

<sup>9</sup> <https://www.pesticideresistance.org/> 03.04.2023 15:45

reichen. Die Unterfamilie D besteht aus stark konservierten Halbtransportern, die an den Peroxisomen-Membranen lokalisiert sind und Heterodimere bilden, um Coenzym A-Ester zu transportieren (Wanders et al. 2007). Üblicherweise besitzen Insekten zwei ABCD-Kopien (Merzendorfer 2014). Es konnte bisher eine ABCD-Kopie im *C. asclepiadeus* identifiziert werden. In anderen Käferarten kommen bis zu vier ABCD-Gene vor (Xiao et al. 2022). Die meisten Insekten sowie der Mensch besitzen nur eine ABCE-Kopie (Dean et al., 2001; G. Liu et al., 2021; S. Liu et al., 2011; W. Liu et al., 2021; X. Q. Liu et al., 2019), auch im *C. asclepiadeus* konnte nur eine ABCE-Kopie lokalisiert werden. Die Unterfamilie F mit drei Transkripten deckt sich mit anderen Publikationen (Broehan et al., 2013; Evans et al., 2018; Wu et al., 2019; Xiao et al., 2022). Bei den Unterfamilien E und F handelt es sich nicht um Transporterproteine, da sie keine TMD besitzen. Diese Proteine sind an der Koordination der Proteintranslation und der mRNA-Bildung beteiligt (Wu et al. 2019). RNAi-Experimente mit ABCE und ABCF Genen im *T. castaneum* hatten einen letalen Ausgang für die Käfer (Broehan et al. 2013). Die Unterfamilien D, E und F sind stark konserviert, was auf wichtige und ursprüngliche Funktionen hindeutet (Annilo et al. 2006; Moitra and Dean 2011).

Die Unterfamilie G besteht aus Halbtransportern, die Hetero- oder Homodimere bilden, um funktionsfähig zu werden, dadurch erhöht sich das Substratspektrum (Wu et al. 2019). Neben der Unterfamilie C bilden sie die nächstgrößte Unterfamilie, was auch in *C. asclepiadeus* zu beobachten ist. Neben dem Transport von Xenobiotika spielen sie eine wichtige Rolle beim Transport von Augenpigmenten in der Fruchtfliege (Ewart et al. 1994). Der humane ABCG2-Transporter ist auch als BCRP (*b*rest *c*ancer *r*esistance *p*rotein) bekannt, dieser besitzt ein breites Wirkungsspektrum und gilt wie ABCB- und ABCC-Proteine als *multi drug* Efflux-Transporter (Tarr et al. 2009; Wong et al. 2014). In der Gelbfiebermücke (*Aedes aegypti*) konnten homologe ABCG2-Gene identifiziert werden und eine Verbindung zur Pyrethroid-Resistenz besteht (Bariami et al. 2012). Die Hessenfliege (*Mayetiola destructor*) zählt zu den Hauptschädlingen von Weizen oder anderen Getreidearten. Der stärkste Schaden an dem Getreide, ist auf den Larvenfraß zurückzuführen. Der bisher effektivste Schutz besteht aus genetisch veränderten Weizensorten, die eine Larvenantibiose auslösen, die auf einzelne Gene zurückzuführen ist. Shukle et al. führten Experimente durch, bei denen Hessenfliegenlarven auf einer resistenten Weizensorte „Iris“ und einer nicht-resistenten Weizensorte „Newton“ gehalten wurden. Dabei zeigten die Larven, die auf der Iris-Linie gehalten wurden, eine verstärkte Expression von ABCG-Genen in den Malpighischen Gefäßen

im Vergleich zu den Larven auf der Newton-Linie (Shukle et al. 2008). Ähnliche Funktionen könnten ABCG-Proteine auch im *C. asclepiadeus* übernehmen.

Die Unterfamilie H wurde ursprünglich in der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) entdeckt und fehlt in Pflanzen, Pilzen und Säugetieren (Dermauw and Van Leeuwen 2014; Merzendorfer 2014). In verschiedenen Käferarten konnten drei ABCH-Gene identifizieren, was sich auch mit hier erzielten Ergebnissen deckt. Obwohl die Proteine der Unterfamilie H denen der Unterfamilie G ähneln, gelten sie als separate Unterfamilien. Die möglichen Funktionen von ABCH Proteinen sind noch relativ unbekannt (Wu et al. 2019).

Umfangreiche phylogenetische Untersuchungen von den C- und N- terminalen NBDs der ABC-Transporter haben gezeigt, dass die Unterfamilien A und H, B und D sowie E und F Schwestergruppen bilden (Liu et al. 2019; Liu et al. 2021; Wu et al. 2019; Xiao et al. 2022). Die C-terminalen NBDs der ABCC- gruppieren sich mit den NBDs der ABCB Transporter (Dermauw and Van Leeuwen 2014; Liu et al. 2011), auch hier gruppieren sich die NBDs der ABCB-Unterfamilie mit den der ABCC-Unterfamilie. Der ABC-Scan hat die erhaltenen Sequenzen des *C. asclepiadeus* den einzelnen Unterfamilien über das Hidden-Markov-Modell zugeordnet. Als weitere Kontrolle der verschiedenen Unterfamilien wurden bekannte Sequenzen von *C. populi* (ABCA,B,C,D,F,G,H) und ABCE des Menschen verwendet (Dean et al., 2001; Strauss et al., 2014). Es konnte ähnliche Verwandtschaften der verschiedenen Unterfamilien beobachtet werden. Allerdings ist die Unterfamilie E näher mit A und H verwandt als mit den Unterfamilien F und D. Dies könnte sich durch eine Erweiterung des Datensatzes um verschiedene Käferarten oder Insektenarten verändern.

Laut dem FAQ-Bereich<sup>10</sup> des Trinity-Anbieters sollte ein herkömmliches Assembly eine Alignmentrate von 70-80% aufweisen. Das bedeutet, dass 70-80% der eingegebenen Reads im assemblierten Transkriptom abgedeckt sein sollten. Das Trinity-Assembly von *C. asclepiadeus*, das für die bioinformatische Analyse zur Verfügung stand, zeigte eine Alignmentrate von 50,1%. Obwohl diese Zahl von den empfohlenen 70-80% abweicht, wurde der MultiQC-Report dennoch grün markiert und somit als ausreichend bewertet. Die verbleibenden nicht assemblierten Reads könnten Transkripte mit geringer Expression und unzureichender Abdeckung sein, die nicht erfolgreich assembliert werden konnten. Es ist auch möglich, dass

---

<sup>10</sup> <https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki/Transcriptome-Assembly-Quality-Assessment>  
03.04.2023 16:04

diese Reads eine geringe Qualität aufweisen oder fehlerhaft sind, oder Adapter-Sequenzen nicht vorab entfernt wurden sind. Die aus dem ABC-Scan erhaltenen Sequenzen konnten eindeutig den acht Unterfamilien zugeordnet werden, und die Verteilungstendenzen stimmen überwiegend mit bekannten Publikationen überein. Dennoch scheinen einige Unterfamilien unterrepräsentiert zu sein. Durch das Erstellen eines neuen Trinity-Assemblys mit weniger strengen Kriterien könnten eventuell noch weitere Transkripte von ABC-Sequenzen in dem Transkriptom gefunden werden. Dennoch bietet das ABC-Scan Ergebnis eine gute Grundlage für weitere Expressions- und Funktionalitätsanalysen, um genauere Aussagen über mögliche Funktionen der verschiedenen ABC-Proteine treffen zu können.

#### 4.2 Expressionspektrum der ABCB-Transporter in *C. asclepiadeus*

Die Gewebe-spezifische Expression der beiden *CascABCB*-Volltransporter lässt auf verschiedene Funktionen der Proteine schließen. Die beiden Gene zeigten deutliche Unterschiede in den untersuchten Geweben. *CascABCB1* wird am stärksten im Nervengewebe exprimiert und ist überall außer in den Malpighischen Gefäßen stärker als *CascABCB2* exprimiert. Es wurde gezeigt, dass ABC-Proteine der Unterfamilie B in der Detoxifikation von Giftstoffen oder der Sequestration von sekundären Pflanzenmetaboliten involviert sind (Denecke et al. 2017; Kowalski et al. 2020; Rösner and Merzendorfer 2020; Schmidt et al. 2019). Untersuchungen von Geweben, die für die Sequestration von Stoffen sensibel sind, wie dem Darm (selektive Aufnahme), Malpighische Gefäße (selektive Ausscheidung), Elytren (Wehrdrüsen) und das Nervengewebe (Schutz vor toxischen Substanzen), können Hinweise auf die mögliche Funktion der ABCB-Transporter geben (Beran and Petschenka 2022). Die Gewebe-spezifische Expression der ABCB-Transporter wurde in verschiedenen Insektenarten beobachtet. Einer der Volltransporter kommt hauptsächlich im Nervengewebe vor, ein weiterer überwiegend im Verdauungstrakt und ein dritter in Elytren und Nervengewebe oder Exkretionsgewebe und Verdauungstrakt (Denecke et al. 2017; Favell et al. 2020; Kowalski et al. 2020). Die unterschiedliche Expression der Transporter lässt Genduplikationen mit verschiedenen Funktionen vermuten. Auch die hier untersuchten ABCB-Volltransporter zeigten eine Gewebe-spezifische Expression. Veränderungen der Transporterexpression kann außerdem bestimmen wie weit Giftstoffe in das Gewebe eindringen und wie schnell sie aus dem Körper geschleust werden können (Denecke et al. 2017).

Der Hauptexpressionsort von *CascAbcb1* liegt im Nervengewebe, was auch mit der *C. auratus* übereinstimmt. Im *C. auratus* wurde nachgewiesen, dass ABCB1 Digoxin transportiert, was auf eine Schutzfunktion des Nervengewebes hindeutet, da es dieses aktiv aus dem Nervengewebe transportieren könnte (Kowalski et al. 2020). In anderen Studien konnte ebenfalls eine schützende Wirkung von ABCB-Transportern im Nervengewebe nachgewiesen werden (Borst & Schinkel, 2013; Mayer et al., 2009; Murray et al., 1994). Es wurde festgestellt, dass *DmeMdr65* und *49* wahrscheinlich eine Rolle beim Transport von Colchicin spielen, einem Giftstoff, der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*) (Tapadia and Lakhota 2005; Wu et al. 1991). Weitere Studien haben gezeigt, dass *DmeMdr65 Knock outs* außerdem anfälliger für neuroaktive Insektizide waren, während *DmeMdr49* und *DmeMdr50* je nach verwendetem Insektizid unterschiedlich reagierten (Denecke et al. 2017). Neben der Expression von ABCB-Transportern im Nervengewebe kann das Nervengewebe auch durch eine physiologische Barriere, dem Perineurium, geschützt werden (Petschenka, Pick, et al. 2013).

Die nächstfolgenden Gewebe, in denen *CascAbcb1* exprimiert wird, sind die Elytren und der Abschnitt Kropf-Mitteldarm. In beiden Geweben ist die Expression ungefähr gleich stark. In *C. auratus* wird der ABCB2-Transporter am stärksten in den Elytren exprimiert und zeigt ein substratspezifisches Transportverhalten gegenüber dem in der Wirtspflanze vorkommenden Cardenolid Cymaridin. Im Wehrsekret des *C. asclepiadeus* sind überwiegend die Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Leucin sowie Diacetylputrescin zu finden (Dobler et al., 1998). Aminosäuren und andere Stoffe gehören auch zum Substratspektrum von ABCB-Transportern (Dermauw and Van Leeuwen 2014; Holtorf et al. 2019). Da *C. asclepiadeus* keinen Cardenoliden in seiner Ernährung ausgesetzt ist, wäre es möglich, dass *CascAbcb1* den Transport ebenfalls Molekülen des Wehrsekrets und den essentiellen Aminosäuren koordiniert. Näheres zum möglichen Transportmechanismus wird im nächsten Absatz diskutiert. Der *TcAbcb-3B* von *T. castaneum* zeigt eine hohe Expressionsrate im Mitteldarm (Rösner and Merzendorfer 2020). In einer anderen Expressionsstudie mit dem Mehlkäfer (*Tenebrio molitor*) zeigte sich eine erhöhte Expression von *TmAbcb2* und *TmAbcb3* in den Tracheen und eine mögliche Funktion im respiratorischen System (Xiao et al. 2022). In dieser Arbeit zeigten die beiden ABCB-Gene vernachlässigbare Expressionsraten in den Tracheen. *Cpabc12* (entspricht in dieser Arbeit *CpopABCB2*) besitzt die höchste Expressionsrate auch im Verdauungstrakt und als zweitstärkste ist *Cpabc7* (homolog zu ABCB6) (Strauss et al. 2014). Beide Proteine stehen

im Zusammenhang mit dem Transport von Pflanzenstoffen und die möglichen Funktionen von ABCB6 wurden in dem vorherigen Kapitel bereits besprochen.

Das *CascAbcb2*-Gen wird in den getesteten Geweben deutlich schwächer exprimiert als *CascAbcb1* und hat seinen Hauptexpressionsort in den Malpighischen Gefäßen. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Osmoseregulation, Ionenregulation und Ausscheidung von Giftstoffen, wobei die Entgiftung von sekundären Pflanzenmetaboliten durch die Aktivierung von Entgiftungsenzymen wie P450-Monooxygenasen (P450s) und Glutathion-S-Transferasen (GSTs) unterstützt wird (Buss and Callaghan 2008). ABC-Transporterproteine sind ebenfalls wichtig für die Entgiftung und werden in insektizidresistenten Kohlschaben (*Plutella xylostella*) häufiger hochreguliert als GSTs und P450s, was ihre Relevanz für die Detoxifikation über die Malpighischen Gefäße verdeutlicht (You et al. 2013). In *C. auratus* werden vorwiegend die Transporter ABCB2 und ABCB3 in den Malpighischen Gefäßen exprimiert, aber in geringeren Mengen als an ihren jeweiligen Hauptexpressionsorten (*Cau*ABCB2: Elytren, *Cau*ABCB3: Verdauungstrakt) (Kowalski et al. 2020). In der Fruchtfliege wird MDR49 nach der oralen Zugabe des Chemomedikaments Methotrxate (MTX) in den Malpighischen Gefäßen hochreguliert, was ebenfalls auf eine Schutzfunktion hindeutet (Chahine and O'Donnell 2009). In *C. populi* konnten vier verschiedene ABCB-Transporter in den Malpighischen Gefäßen nachgewiesen werden, darunter der Volltransporter *Cpabc12* sowie drei Halbtransporter *Cpabc7* (homolog ABCB6), *Cpabc8* (homolog ABCB10) und *Cpabc9* (homolog ABCB7) (Strauss et al. 2014). Obwohl in dieser Arbeit keine Expressionsuntersuchungen zu den ABCB-Halbtransportern durchgeführt wurden, könnten sie ähnliche Funktionen übernehmen und in diesen Geweben vorkommen. Die Funktionen der Halbtransporter wurden im vorherigen Abschnitt diskutiert. ABC-Transporter des Tabakswärmers (*Manduca sexta*) transportieren Nikotin und Vinblastin (ein Chemotherapeutikum) und in der Fruchtfliege Cardenolide über die Malpighischen Gefäße hinaus (Gaertner et al., 1998; Gaertner & Morris, 1999; Groen et al., 2017). Daher könnte *Casc*ABCB2 eine ähnliche Funktion beim Käfer haben. Da die Konzentration von *CascAbcb2* in den getesteten Geweben gering war, wurde die Expression von *CascAbcb2* im gesamten Käfer geprüft. Die Expressionsrate des gesamten Käfers, deckt sich mit den getesteten Geweben. Dadurch das mRNA Konzentrationen und die Proteinexpressionen nicht miteinander korreliert (Sarkadi et al. 2006), hat die geringe Expression keinen weiteren Einfluss auf die ATPase Aktivitäts-Assays bei *Casc*ABCB2.

Beide ABCB-Volltransporter zeigen unterschiedliche Expressionsmuster und könnten wichtige Schutzmechanismen in ihren jeweiligen Hauptexpressionsorten übernehmen. Dadurch, dass *C. asclepiadeus* keinen Cardenoliden in seiner Nahrung ausgesetzt ist, könnte der *CascAbcb1*, der die zweitstärkste Expression in den Elytren und im Mitteldarm aufweist, anstatt an der Entgiftung von Toxinen beteiligt zu sein, an dem Transport von nicht toxischen, aber dennoch wichtigen Substanzen wie dem Wehrsekret beteiligt sein. Die Expressiondaten treffen keine Aussage über die Orientierung der Transporter in den untersuchten Geweben. Alle eukaryontischen ABC-Transporter sind Efflux-Transporter, die Substrate aus dem Zytoplasma in die extrazelluläre Matrix transportieren. Die Richtung des Efflux (rein oder raus), wird darüber bestimmt ob die Transporter apical oder basolateral auf der Zelloberfläche lokalisiert sind (Schinkel and Jonker 2003). Über spezifische Antikörper könnte die subzelluläre Lokalisation der ABC-Transporter aufgeklärt werden. Da oft mehrere ABC-Transporter innerhalb eines Gewebes exprimiert werden, könnten auf Basis der Daten aus dem ABC-Scan das Expressionsmuster weiterer Unterfamilien oder der ABCB-Halbtransporter bestimmt werden. Als weiteres Gewebe sollte noch der Fettkörper des *C. asclepiadeus* untersucht werden, da dort ebenfalls verschiedene ABC-Proteine exprimiert werden und dieses Gewebe ein wichtiger Speicherort von Nährstoffen ist und bei der Detoxifikation ebenfalls beteiligt ist (Anon n.d.; Bretschneider, Heckel, and Vogel 2016; Strauss et al. 2014)

#### 4.3 Überprüfung des Substratspektrums der ABCB-Transporter mittels ATPase-Assay

Die Charakterisierung der verschiedenen in Zellkultur exprimierten ABCB-Transporter (*C. asclepiadeus* und *C. populi*) wurde unter Verwendung von verschiedenen Substraten durchgeführt. Verapamil diente dabei zur Funktionskontrolle der verwendeten Transporter und gilt als Standardsubstrat für ABCB-Transporter (Buss and Callaghan 2008; Hawthorne and Dively 2011). Digoxin gilt ebenfalls als Standardsubstrat für ABCB1-Transporter und interagiert mit diesem Transporter sowohl bei Vertebraten und Invertebraten (Piet Borst and Schinkel 2013; Fromm et al. 1999; Hughes and Crowe 2010; de Lannoy and Silverman 1992; Petschenka, Pick, et al. 2013). Cymarine kommt in der Wirtspflanze des *C. auratus* vor (Golab et al. 1959). Ouabain wurde verwendet, da sich bei Tracerversuchen gezeigt hatte, dass es in der Cardenolid-angepassten Art überwiegend im Wehrsekret und bei der nicht angepassten Art im Kot nachgewiesen werden konnte (Dobler 2004). Calotropin ist ein Cardenolid, welches aus den Wirtspflanzen der nächsten Verwandten der beiden *Chrysochus*-Arten, *C. cobaltinius*

und der Gattung *Platycorynus*, stammt (Dobler and Farrell 1999; Jolivet and Verma 2008). Alle getesteten Cardenolide unterscheiden sich in ihren physiochemischen Eigenschaften: Digoxin ist unpolar und kann Membranen passiv durchqueren, weshalb es aus sensiblen Geweben wie Nervengewebe aktiv gepumpt werden muss (Petschenka, Pick, et al. 2013). Ouabain hingegen ist ein stark polares Cardenolid und muss aktiv über die Membran transportiert werden oder diffundiert nur langsam über diese (Petschenka, Pick, et al. 2013). Cymarine hat einen Permeationskoeffizienten von Xlog P3 von 0,8 und Calotropin von 0,9, wobei beide zwischen dem stark polaren Ouabain (Xlog P3 -1,7) und dem lipophilen Digoxin (Xlog P3 1,3) liegen (Herbertz et al. 2021).

Die Funktionalitätsversuche mit verschiedenen Konzentrationen von Verapamil für die *C. asclepiadeus* ABCB-Transporter zeigte den erwarteten glockenförmigen Verlauf (Glavinas et al., 2008; Kowalski et al., 2020; Litman et al., 1997). Dieser Verlauf taucht bei Substraten auf, die mit verschiedenen Konzentrationen getestet werden, dabei steigt die ATPase Aktivität bei geringen Substratkonzentration und fällt bei steigender Substratkonzentration, dies könnte auf verschiedene Bindestellen der ABCB-Transporter zurückzuführen sein (Glavinas et al., 2008; Loo & Clarke, 2008). Bei den *C. populi* ABCB-Transportern ist nur die abfallende Seite des Glockenverlaufs zu erkennen, da keine geringen Verpamilkonzentrationen getestet wurden. Es wurden keine geringen Verpamilkonzentrationen für *C. populi* getestet, da ich mich zu der Zeit stärker an die Publikation von Kowalski et al. 2020 gehalten habe, in der die Konzentrationen von 30,60 und 90  $\mu\text{M}$  getestet wurden. Anders als bei *C. auratus* reichte diese Konzentrationspanne für *C. asclepiadeus* und *C. populi* nicht aus, um den beschriebenen Glockenverlauf zu erhalten. Aus zeitgründen konnte ich die Versuche für *C. populi* nicht mehr nachziehen.

Die Substitutionen bei den ABCB-Volltransporter von *C. asclepiadeus* und *C. populi* an den Positionen 65,306,942,945,978, 982 (basierend auf Proteinalignment mit den ABCB1 Transporter der Maus und des Menschen) haben keinen Einfluss auf den Verapamil-Transport (Aller et al. 2009; Loo and Clarke 2008; Zeino et al. 2014).

*Casc*ABCB1 zeigt keine klare Stimulation der ATPase Aktivität durch eines der getesteten Cardenolide. Überraschenderweise konnte keine direkte Stimulation von *Casc*ABCB1 durch Digoxin festgestellt werden auch wenn es als bekanntes Substrat für ABCB1 Transporter gilt und auch bei nicht Cardenolid-adaptierten Insekten als Substrat nachgewiesen werden konnte

(Gozalpour et al. 2013; Petschenka, Pick, et al. 2013). Eine geringe ATPase-Aktivität für den humanen ABCB1 mit Digoxin konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Adachi, Suzuki, and Sugiyama 2001). Die unklare Stimulation von *CascABCB1* könnte zu einem durch die hohe Variabilität des ATPase-Assay verursacht sein, Stärken und Schwächen der Assay-Methode werden im nächsten Kapitel diskutiert.

Es wäre auch möglich, dass Digoxin aufgrund von Aminosäuresubstitutionen in der Proteinbindetasche des Transporterproteins tatsächlich kein Substrat für *CascABCB1* ist. Drei Bindungsstellen des humanen ABCB-Transporter wurden durch photoaffine Markierung, zielgerichtete Antikörperfärbung und zielgerichtete Mutagenese definiert: Hoechst 33342 (H-Stelle), Rhodamin 123 (R-Stelle) und Modulierung (M-Stelle modulatory) (Zeino et al. 2014). Liganden können jedoch auch als Substrate, Inhibitoren oder Modulatoren von ABCB-Transportern wirken (Zeino et al. 2014). Da die ABCB1-Transporter der beiden *Chrysochus*-Arten identisch sind in Bezug auf die neun Aminosäuren, die Gozalpour et al. als entscheidend im Zusammenhang *Digitalis*-ähnlichen Substraten charakterisiert haben (Gozalpour et al. 2013), könnten auch andere Aminosäuren im *C. asclepiadeus* für den Transport von Digoxin verantwortlich sein. Der Transport von Digoxin kann auch durch eine einzelne Aminosäuresubstitution, Gly185Val gehemmt werden (Safa 1998). Alle hier untersuchten Transporter besitzen jedoch keine Substitution an dieser Position. Die *CascABCB2*, *CauABCB2*; *CauABCB3* Transporter unterscheiden sich an Position 753 in der TM8 in einer Aminosäure (Lys753Ile). Liu et al. 2018 haben gezeigt, dass eine einzelne Aminosäuresubstitution in der ersten Schleife von ABCC2 für die unterschiedliche Toxizität von *S. frugiperda* und *S. litura* gegenüber Cry1Ac verantwortlich ist (Liu et al. 2018). Substitutionen, die in Aminosäuren mit anderen biochemischen Eigenschaften resultieren, können das Bindungsverhalten der Proteintasche und somit die Substratbindung beeinflussen. Die TMDs der beiden *Chrysochus*-Arten (ABCB1) unterscheiden sich in fünf Aminosäuren: Thr768Ile (TM8), Ser775Phe (TM8), Ser837Cys (TM9), Ala841Ser (TM9) und Lys979Gln (TM11). Die letzten drei TMs der TMDs (TM4-6 und TM10-12) bilden die Proteinbindetasche, während TMs 5 und 8 sowie 2 und 11 den Eingang für den Substrateintritt bilden (Loo, Bartlett, and Clarke 2004; Tip W. Loo, Bartlett, and Clarke 2006; Loo and Clarke 2005). Soweit bekannt, können Mutationen, die sich auf die Substratspezifität auswirken, hauptsächlich in TMs 5 und 6 sowie 11 und 12 gefunden werden (Ambudkar et al. 1999). Die Aminosäuresubstitution Lys979Gln im *CascABCB1* befindet sich in TM11 und könnte einen

Einfluss auf die Substratbindung daher nehmen. Um herauszufinden, welche Aminosäuren die Bindung von Digoxin koordiniert, könnten diese durch zielgerichtete Mutagenese verändert werden. Dabei würde ich die *Casc*ABCB1-Sequenz hin zur *Cau*ABCB1-Sequenz hinmutieren, visa versa wäre natürlich auch möglich. Über den verwendeten ATPase-Assay könnte die Aktivität bestimmt werden, um die Aminosäuresubstitution ausfindig zu machen, die für den Digoxin-Transport verantwortlich sein können. Es könnten auch computerbasierte Bindsimulationen erstellt werden, wie sie in den Publikationen von Zhen et al. (2012) und Mohammadi et al. (2022) beschrieben sind, um das mögliche Bindungsverhalten zu bestimmen (Mohammadi et al. 2022; Zhen et al. 2012), wobei die experimentelle Versuchreihe aussagekräftiger wäre als die Simulation. Der *C. asclepiadeus* ist in seiner natürlichen Nahrung normalerweise nicht mit Cardenoliden konfrontiert (Dobler 2004), genauso wie *C. populi*. Trotzdem ist es überraschend, dass die ABCB1-Transporter der beiden Arten nicht auf Digoxin reagiert haben. Es ist auch möglich, dass Digoxin im *C. asclepiadeus* und *C. populi* kein Substrat für ABCB1 ist. Versuche mit dem Insektizid Diflubenzuran (DFB) im Mehlkäfer (*T. castaneum*) und mit Ivermectin im Kartoffelkäfer haben gezeigt, dass die getesteten ABCB-Volltransporter nicht mit diesen Substanzen interagieren und daher nicht am Transport dieser Giftstoffe beteiligt sind (Favell et al. 2020; Rösner and Merzendorfer 2020). Es könnten weitere typische ABCB-Substrate wie Vinblastin oder Colchicin im ATPase-Assay getestet werden, um die Spezifität zu überprüfen. Eine Liste potenzieller Substrate für ABCB-Transporter findet sich in den Publikationen von Zeino et al. 2014 und Porretta et al. 2016 (Porretta et al. 2016; Zeino et al. 2014). Da *Casc*ABCB1 am stärksten in den Elytren und dem Vorderdarm exprimiert wird, vermute ich, dass dieser Transporter Moleküle des Wehrsekrets transportiert. Neben Aminosäuren enthält das Wehrsekret auch Diacetylputrescin, das mit einem XPlogP3-Wert von -0,7 ebenfalls polar ist und daher aktiv von *Casc*ABCB1 transportiert werden müsste. Um dies zu überprüfen, sollte ein ATPase-Assay mit Diacetylputrescin durchgeführt werden.

*Casc*ABCB2 zeigte leichte Aktivität durch Digoxin und wurde durch Ouabain stimuliert. Aufgrund des Hauptexpressionsorts in den Malpighischen Gefäßen könnte *Casc*ABCB2 bei der Entgiftung in diesem Gewebe eine wichtige Rolle spielen. Ouabain ist ein stark polares Cardenolid und kann nur aktiv über Membranen transportiert werden oder diffundiert sehr langsam. Die Tatsache, dass radioaktiv markiertes Ouabain im adaptierten *C. cobaltinus* überwiegend im Wehrsekret gefunden wurde und im *C. asclepiadeus* überwiegend über den

Kot ausgeschieden wurde, lässt auf eine Veränderung der Darmpermeabilität schließen, was im Abschnitt Sequestration in der Gattung *Chrysochus* näher erläutert wird. Auch in der Wüstenheuschrecke (*Schistocerca gregaria*) konnten ABCB-Transporter in den Malpighischen Gefäßen identifiziert werden, die das Ausscheiden von Xenobiotika ermöglichen (Rossi, De Battisti, and Niven 2019; Rossi, Ott, and Niven 2020). In der Fluchtliege konnte gezeigt werden, dass der Transport von MTX durch Verapamil an den Malpighischen Gefäßen inhibiert wurde (Chahine and O'Donnell 2009). Die Larven von *Manduca sexta* und *Rhodnius prolixus* sind ebenfalls in der Lage Nikotin und andere Alkaloide wie Morphin und Atropin über die Malpighischen Gefäße aus der Hämolymphe zu eliminieren (Maddrell and Gardiner 1976). *CascABCB2* zeigte keine Stimulation durch Cymarin oder Calotropin. Beide Cardenolide stimulieren ABCB-Transporter in *C. auratus*. *CauABCB2* zeigte ein substratspezifisches Verhalten und transportiert das in der Wirtspflanze vorkommende Cardenolid. Calotropin kommt in der Wirtspflanze von *C. cobaltinus* und artverwandten *Platycornius* vor (Habitatfoto 1.3). *CauABCB3* wird am stärksten im Darm exprimiert und interagiert mit Calotropin, was darauf hindeutet, dass es an der Verhinderung des Eindringens von Xenobiotika über das Darmepithel beteiligt ist (Kowalski et al. 2020).

Der *CpopABCB1* Transporter zeigte wie der *CascABCB1* auch bei den anderen Cardenoliden keine erhöhte Aktivität. Hingegen zeigte der *CpopABCB2* Transporter eine erhöhte Aktivität durch Digoxin und Cymarin zeigte. Der *CauABCB2* konnte ebenfalls durch diese beiden Cardenolide stimuliert werden (Kowalski et al. 2020). *CpopABCB2* und *CauABCB2* unterscheiden sich in drei Aminosäuren (Asn360Ile, Thr340Asn, Ala343Met), die im Zusammenhang mit dem Cardenolidtransport stehen sollen (Gozalpour et al. 2013). Diese Substitutionen scheinen jedoch keine hemmende Wirkung auf den Transport von Digoxin und Cymarin in diesen beiden Käfern zu haben. Sie könnten aber entscheidend sein für den Transport von Calotropin im *C. populi* sein, da beide ABCB-Transporter nicht durch Calotropin stimuliert werden konnten. Zusammen mit der hohen Expression im Darm und den Malpighischen Gefäßen scheint *CpopABCB2* den Käfer vor der Aufnahme über den Darm zu schützen und die Exkretion über die Malpighischen Gefäße zu koordinieren (Strauss et al. 2014). In *C. populi* konnte nachgewiesen werden, dass der CpMRP (ABCC-Transporterprotein) bei der Salicin-Sequestration beteiligt ist. Außerdem konnten Homologe-Gene des CpMRP auch in *C. lapponica* und *P. cochleariae* nachgewiesen werden (Strauss, Peters, Boland, Burse,

et al. 2013). Dies ist ein weiteres Indiz für die mögliche Beteiligung von ABC-Proteinen bei der Interaktion mit Phytochemikalien.

#### 4.4 Der ATPase-Assay zur Bestimmung des Substratspektrums

Um das Wirkungsspektrum von ABC-Transportern bestimmen zu können, gibt es drei verschiedene weit verbreitete Assay-Typen: den Vesikel-Transport-Assay (Translokation des Substrats in Inside-Out-Vesikeln) (Davis et al. 1970), den Nukleotid-Trapping-Assay (Okklusion des Nukleotids während des Transportzyklus) (Urbatsch et al. 1995) und den ATPase-Assay (Messung der Hydrolysegeschwindigkeit von ATP in An- und Abwesenheit des Testsubstrats) (Sarkadi et al. 1992). Alle diese In-vitro-Assays benötigen das Protein als Ausgangsmaterial, entweder als ganze Zelle, die den Transporter exprimiert (Vesikel-Assay) oder als Membranpräparat, das den Transporter enthält (Nukleotid-Trapping- und ATPase-Assay) (Glavinas et al. 2008).

In dieser Arbeit wurde der ATPase-Assay verwendet, der auf der Arbeit von Sarkadi et al. 1992 basiert und von Kowalski et al. 2020 für *C. auratus* modifiziert wurde. Der ATPase-Assay misst photometrisch das von dem Enzym freigesetzte anorganische Phosphat, welches bei der Hydrolyse von ATP entsteht (Rule, Patrick, and Sandkvist 2016). Alle ABCB Transporter binden ATP an ihren NBDs. Mutationen in den konservierten Bereichen der NBD (A-,D-,Q-, H-Loop, sowie dem Walker A und B Motiv) zeigen, dass kein ATP mehr gebunden werden kann und somit kein Transport mehr stattfindet (Zolnerciks et al. 2011). Der ATPase-Assay ist ein weit verbreiteter Assay, um das Wirkungsspektrum von ABCB-Transportern zu bestimmen (Glavinas et al. 2008; Litman et al. 1997; Sarkadi et al. 2006). Für den Assay wird das Protein als Membranpräparat, das den Transporter enthält, benötigt. Weitere benötigte Komponenten sind ATP, ein Analysegerät zur Bestimmung des anorganischen Phosphats, Testsubstrate und ein Mechanismus, um zwischen der generellen ATPase-Aktivität und der induzierten ATPase-Aktivität unterscheiden zu können (Sarkadi et al. 1992). In dem Assay befinden sich verschiedene Inhibitoren wie EGTA (Calcium-ATPasen), Azid (mitochondriale ATPase) und optional Ouabain (Na,K-ATPasen). Um die ABCB-spezifische ATPase-Aktivität zu messen, wird zu einem der Protein-Substrat-Mixe der ABCB-spezifische Inhibitor Vanadat gegeben (Glavinas et al. 2008; Sarkadi et al. 1992; Urbatsch et al. 1995; Zhang, Bachmeier, and Miller 2003). Alle genannten Substanzen können kommerziell erworben werden, und ein Photometer gehört zur Grundausstattung eines jeden molekularbiologischen Labors. Das

gewünschte Protein kann über die heterologe Expression mittels Baculoviren in hohen Mengen in Insektenzellen oder anderen Zelllinien hergestellt werden (Kowalski et al. 2020; Polli et al. 2001; Sarkadi et al. 1992). Die Vorteile des Assays sind, dass er nicht die gesamte Zelle mit exprimiertem Protein benötigt, dass kommerzielle Membranpräparate als positive Kontrolle zur Verfügung stehen und dass die Messung einfach über das Photometer erfolgen kann. Schwachstellen des Assays liegen in der hohen Streuung innerhalb und zwischen den Assay Ergebnissen/Messpunkten, dass Substrate, die sehr langsam transportiert werden, schwierig zu detektieren sind, sowie dass die Lokalisierung des Transporters nicht möglich ist (Glavinas et al. 2008; Zhang et al. 2003). Mögliche Gründe für die hohe Variabilität können unspezifische Bindungen bei der verwendeten Substratkonzentration sein (Litman et al. 1997), die Proteinkonzentration in der Zellmembran (Scarborough 1995) und die Lipidmembran, in der das Protein lokalisiert ist (Urbatsch and Senior 1995). Außerdem hat der Assay eine geringe Sensitivität und erfordert daher hohe Proteinkonzentrationen als Ausgangsmaterial. Wenn diese Schwachstellen berücksichtigt werden, bietet der Assay durch die einfachen Zell- und Membranassays, sowie die einfache Auswertung eine Grundstruktur, um das Wirkungsspektrum der Transporter zu definieren.

In meinen Versuchsreihen konnte ebenfalls eine hohe Variabilität des Assays beobachtet werden. Kowalski et al. hat möglicherweise die Schwankungen durch Erhöhung der biologischen Replikate auf 12-32 minimiert, wogegen hier jeweils nur drei biologische Replikate verwendet wurden. Um die geringe Proteinkonzentration zu erhöhen, habe ich das Volumen des Proteinexpressionsansatzes verdoppelt, dadurch konnte bereits eine höhere Proteinkonzentration erreicht werden. Dabei ist zu erwähnen, dass die Proteinkonzentrationen mittels Bradford-Methode bestimmt wurden und somit eine Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung erfolgte. Nach der Expression fand die Membranisolation über verschiedene Zentrifugationsschritte statt, wobei auch andere Membranproteine enthalten sein können, die das Assayergebnis beeinflussen können. Eine weitere Möglichkeit, die Proteinkonzentration zu erhöhen, wäre der Wechsel der Insektenzelllinie. Obwohl überwiegend *Sf9*-Zellen für die Expression von ABC-Transportern verwendet werden (Cserepes et al. 2004; Kowalski et al. 2020; Özvegy, Varadi, and Sarkadi 2002; Polli et al. 2001; Rautio et al. 2006), wurde die Expression auch in Hi5-Zellen getestet. Vergleiche der Proteinexpression und Konzentration von drei verschiedenen Zelllinien (*Tnao38*, Hi5 und *Sf9*) zeigten, dass die beiden von *Trichoplusia ni* abgeleiteten Zelllinien

*Tnao38* als auch die Hi5-Zellen eine höhere Proteinkonzentration im Vergleich zu den *Sf9*-Zellen generieren können, um dies zu testen habe ich die Hi5- Zelllinie verwendet. Die Hi5-Zellen können ebenfalls mit in *Sf9*-Zellen hergestellten Baculovirus infiziert werden (Wilde et al. 2014). Bei ABCB-Transporterproteinen handelt es sich um membranassoziierte Proteine (Dassa & Bouige, 2001). Daher sollte das Fluoreszenzsignal des Zweiantikörpers (Cy3), der an den Erstantikörper (C219) bindet, vor allem in den Zellmembranen detektierbar sein. In beiden Zelllinien konnte die Lokalisation in den Zellmembranen nachgewiesen werden, wobei die Hi5 Zellen für ABCB1 ein intensiveres Signal zeigten. Nach der Membranisolation konnten die beiden Proteine ebenfalls mit dem spezifischen Antikörper C219 mittels Western Blot auch in beiden Zelllinien nachgewiesen werden (Bande bei ~130 kDa). Beide ABCB-Transporter haben potentielle Bindestellen für den C219-Antikörper, wobei beide einen Aminosäureaustausch im C-Terminalen Epitop des Antikörpers aufweisen. Trotz mehrfacher Versuche und Rücksprachen mit anderen Laboren war es mir nicht möglich, für die Hi5-Zellen eine stabile Zellkultur aufzubauen. Meistens sind die Zellen zwischen der 10. und 15. Passage "gestorben". Da das Hi5-Zellmedium dreimal so teuer ist wie das InsectExpress Medium für die *Sf9*-Zellen, wurden die Expressionsversuche in Hi5-Zellen eingestellt. Bei vorläufigen ATPase-Assays mit den Transportern, die in Hi5-Zellen exprimiert wurden, zeigte sich auch keine veränderte Aktivität im Vergleich zu den in *Sf9*-Zellen exprimierten Transportern. Dies war ein weiterer Grund, bei dieser Zelllinie zu bleiben und ein Indiz für die geringe ATPase-Aktivität der getesteten *C. asclepiadeus* ABCB-Transporter.

Proteine können in verschiedenen Expressionssystemen exprimiert werden, und es gibt kein universelles Expressionssystem (Verma, Boleti, and George 1998). Expressionssysteme mit *Escherichia coli* (*E. coli*) oder Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) eignen sich durch ihre einfache Kultivierung, schnelle Wachstumsraten und die geringe Konzentration an Fremd-DNA, die bei der Transfektion für die Expression verschiedener Proteine ausreicht (Verma et al. 1998). Durch das Fehlen von posttranslationalen Modifikationen und Disulfidbrücken sowie der Bildung von Einschlusskörpern (*Inclusion bodies*) bei stark exprimierten Proteinen bot sich die Expression in *E. coli* nicht an (Verma et al. 1998). Zudem zeigten Aktivitäts Assays, dass ABCB-Transporter in einer *E. coli* Lipidmembran keine Aktivität aufweisen (Urbatsch and Senior 1995). Die Zusammensetzung der Lipidmembran beeinflusst die Aktivität, die im ATPase-Assay gemessen wird (Glavinas et al. 2008). Weniger Cholesterol in den Zellmembranen führt zu einer geringeren Aktivität im ATPase Assay (Pál et al. 2007). Hefen

besitzen im Vergleich zu *E. coli* fortgeschrittene Proteinfaltungsmaschinerien und Eukaryonten-typische Proteinmodifikationen, aber mit PMA1 häufig vorkommende ATPasen in den Zellwänden (Jacobs 2010), die die spätere Analyse im ATPase Assay stören würden. Die ABCB-Transporter könnten auch in herkömmlichen Säugetierzelllinien wie HeLa und HEK293 exprimiert werden, aber auch hier befinden sich endogene ABCB-Proteine (Shukla et al. 2012) und Na,K-ATPasen (Dobler et al. 2012), die bei Nachweismethoden und im ATPase-Assay stören würden. Insektenzellen sind ebenfalls leicht zu kultivieren, und das etablierte Baculovirus-Expressionssystem verspricht hohe Proteinausbeuten (Glavinis et al. 2008; Sarkadi et al. 1992, 2006; Verma et al. 1998). Insektenzellen verfügen über eukaryotische posttranslationale Modifikationen (Glykosylierung, Phosphorylierung), besitzen keine oder nur geringe Mengen an endogenen ABCB-Proteinen und Na,K-ATPasen und mit dem Polyhedrin-Promotor einen stärkeren Expressionspromotor als üblich in eukaryotischen Zellen, außerdem wurden Insektengene in Insektenzellen exprimiert (Rao et al. 1994). Die Infektionsstärke (Virustiter) des Baculovirus für die beiden *C. asclepiadeus* ABCB-Transporter wurde visuell überprüft und empirisch durch Erhöhung des Volumens oder durch wiederholte Herstellung von Viruspassagen angeglichen. In dieser Arbeit wurde das Bac-to-Bac Expressionssystem von Invitrogen verwendet, das bis zu 16 Tage für die Proteinexpression benötigt. Es wurde jedoch auch eine verkürzte Baculovirus-Amplifikationsmethode von Scholz und Suppmann entwickelt, die die Proteinexpression auf 12 Tage verkürzt und eine höhere Ausbeute erzielen soll (Scholz and Suppmann 2017). Diese Methode wurde einmal getestet, aber es wurde keine erhöhte Konzentration im Bradford-Assay festgestellt, weshalb sie nicht im ATPase-Assay getestet wurde. Außerdem bestand die Möglichkeit, dass diese Ergebnisse nicht mit der Publikation von Kowalski et al 2020 vergleichbar wären, daher wurden diese Versuche eingestellt. Für den ATPase Assay sollten 5 µg/µL Protein eingesetzt werden (Kowalski et al., 2020). Nach der Membranisolation wurden Aliquots mit einer Arbeitskonzentration von 5 µg/µL Protein für jedes biologische Replikat angesetzt. Die Konzentration der Aliquots wurde jedoch nicht nochmals mittels Bradford definiert. Dadurch konnten mögliche Abweichungen der Membranextrakte der verschiedenen biologischen Replikate nicht in der Berechnung der ATPase Aktivität (nmol Pi/mg Protein/min) berücksichtigt werden, was die Streuung innerhalb des ATPase Assays erhöhen kann.

Beide *Casc*ABCB-Transporter wurden in den pIB-V5 His-Tag Expressionsvektor kloniert und könnten über die transiente Expression in *Sf9*-Zellen exprimiert werden. Die korrekte

Expression könnte hier über den C219-Antikörper, der spezifisch für den humanen ABCB-Transporter ist, und/oder über den V5-Antikörper überprüft werden. Die Aufreinigung könnte dann über eine Nickel-Chelatharz erfolgen, um nur das spezifische Protein zu isolieren beziehungsweise aufzureinigen. Die nachfolgende Proteinanalyse könnte mit dem Western-Blot und den spezifischen Antikörpern durchgeführt werden. Mit diesem aufgereinigten Protein könnte dann der ATPase-Assay zur Substratspezifitätsbestimmung erneut durchgeführt werden. Durch die Aufreinigung mittels der Nickel-Säule könnte eine genauere ABCB-Proteinkonzentration erzielt werden. Zunächst würde ich den ATPase-Assay wie beschrieben wiederholen. Als weitere Verifizierung der Transportleistung würde in den ATPase-Assay um einen Inhibitions-Assay erweitern. Dabei würde ich eine konstante Verapamil-Konzentration zur Proteinlösung geben und die Testsubstrate in verschiedenen Konzentrationen hinzufügen. Wenn sich dadurch die Menge des freigesetzten Phosphats ändert, kann ich Rückschlüsse auf den Transport ziehen. Dieser Versuchsablauf wurde bereits in der Publikation von Gozalpour et al. (2013) mit dem Vesikel-Transport-Assay beschrieben. Alternativ zum ATPase-Assay könnte auch der Vesikel-Transport-Assay aus dieser Publikation durchgeführt werden. Der Vesikel-Transport-Assay beruht darauf, dass die Membranpräparate eine *inside-out* Vesikel Fraktion besitzen. Somit transportieren die ABCB-Transporter die Substrate nicht aus der Zelle, sondern in die Vesikel. Daher ist es möglich die Transportaktivität durch die in die Vesikel eingearbeitete Menge quantitativ zu bestimmen. In dieser Arbeit wurde der der ATPase-Assay mit dem ABCB1-Transporter von *O. fasciatus* mit Digoxin als Positivkontrolle validiert. Die *C. asclepideus* ABCB-Transporter zeigten auch den erwarteten glockenförmigen Verlauf durch Verapamil. Außerdem konnte ich deutliche Veränderungen der Aktivität bei dem ABCB2 von *C. populi* für Digoxin und Cymarin nachweisen. Dennoch könnte der ATPase-Assay durch eine weitere Positivkontrolle (humaner ABCB1) mit Digoxin getestet werden. Wenn die Konzentration der ABCB-Proteine durch eine transiente Expression erhöht werden kann, sollten die ATPase-Assays erneut durchgeführt werden. Zusätzlich sollten die verwendeten Aliquots bevor sie in dem ATPase-Assay verwendet werden mittels Bradford-Assay bestimmt werden, um die „tatsächliche“ Konzentration des Proteins in die Berechnung mit einzubeziehen. So könnten die hier erzielten Ergebnisse nochmal über ein anderes Expressionssystem validiert werden.

#### 4.5 Mögliche Evolution der Sequestration in der Gattung *Chrysochus*

Pflanzenabwehrstoffe spielen eine wichtige Rolle bei der (Ko-)Evolution zwischen Pflanzen und Insekten, indem sie selektiven Einfluss auf die morphologischen und physiologischen Merkmale von Insekten und ihr Verhalten nehmen (Beran and Petschenka 2022). Eine Anpassung an toxische Pflanzenmetabolite ist die Sequestration, die als selektive Aufnahme, Transport, Modifikation, (Ein-)Lagerung und der Einsatz der sekundären Pflanzenmetabolite zur eigenen Verteidigung beschrieben wird (Duffey 1980; Opitz and Müller 2009). Überwiegend ist diese Fähigkeit in Coleoptera (Blattkäfern) und Lepidoptera (Schmetterlingen) bekannt, hat sich aber auch in anderen Insektenordnungen unabhängig entwickelt (Beran and Petschenka 2022; Opitz and Müller 2009). Um die Sequestration ganzheitlich beleuchten zu können, muss diese von verschiedenen Punkten betrachtet werden: (i) der Zusammenhang zwischen der Nahrungsspezialisierung und der Sequestration der Pflanzenabwehrstoffe, (ii) der physiologische Mechanismus der Sequestration und (iii) die mögliche Entwicklung der Sequestration durch die Interaktion verschiedener trophischer Ebenen (Petschenka and Agrawal 2016).

##### 4.5.1 Sequestration und die Wahl der Futterpflanze und andere trophische Ebenen

Sequestration resultiert nicht ausschließlich aus der Spezialisierung auf toxische Pflanzenmetabolite, aber sie stellt eine Verbindung zwischen der ersten trophischen Ebene (Pflanzen) über die zweite trophische Ebene (herbivore Insekten) zur dritten trophischen Ebene (Fressfeinde) her (Petschenka and Agrawal 2016). Die Gattung *Chrysochus* ist im Allgemeinen konservativ in seiner Ernährung, ebenso wie andere wolfsmilch-assoziierte Insekten (Dobler and Brian D Farrell 1999). *C. asclepiadeus* ernährt sich von der Schwalbenwurz (*Vincetoxicum spp.*), die keine Cardenolide enthält (Dobler and Brian D Farrell 1999; Jolivet and Verma 2008). Die beiden nordamerikanischen *Chrysochus*-Arten ernähren sich von *Apocynaceae*, die Cardenolide enthalten. Dabei ist *C. auratus* monophag auf *Apocynium cannabinum*, während *C. cobaltinus* oligophag auf zum Beispiel *A. cannabinum*, *Asclepias speciosa* und *Asclepias eriocarpa* fressen kann (Dobler and Brian D Farrell 1999). Solche Verschiebungen in der Vorliebe für das Wirtspektrum einer oligophagen Art könnte ein wichtiger Schritt bei der Etablierung neuer Futterpflanzen sein (Dobler and Brian D Farrell 1999). Innerhalb der *C. cobaltinus*-Populationen gibt es aufgrund von geringem Genfluss und

oligophager Ernährung die Möglichkeit, dass neue Arten auf Wirte entstehen können, die außerhalb des ursprünglichen Wirtspektrums liegen (Dobler and Brian D Farrell 1999). In Washington, einem US-Bundesstaat, bilden die beiden nordamerikanischen Arten eine Hybridzone, in der sie auf *A. cannabinum* fressen (Peterson et al. 2001). Die nächsten Verwandten von *Chrysochus* sind *Chrysochaes* und *Platycorynus*, die in der paläarktischen und orientalischen Region beheimatet sind. Die in Asien beheimateten *Chrysochaes*-Arten fressen auf *Apocynaceae*, die zum Teil Cardenolide enthalten können (Jolivet and Verma 2008). Es wurden auch *Chrysochaes*-Arten in Vietnam entdeckt, die auf *Calystegia* (*Convolvulaceae*) fressen (Jolivet and Verma 2008). Die Pflanzenfamilie *Convolvulaceae* gilt als ein Brückenglied für den Futterpflanzenwechsel hin oder weg von *Asclepias*-Pflanzen (Farrell und Mitter, 1993). *Platycorynus* frisst ebenfalls auf *Apocynaceae*, die Cardenolide enthalten können oder nicht (Jolivet and Verma 2008), so liegen der Arbeitsgruppe Habitatfotos von *P. peregrinus* auf einer Cardenolid-haltigen *Calotropis*-Art vor (Abbildung 1.3). Bisher kann angenommen werden, dass der letzte gemeinsame Vorfahre der nordamerikanischen Arten sowohl *Apocynum* als auch *Asclepias* in der Ernährung hatte und somit eine Toleranz gegenüber Cardenoliden hatte (Dobler 2004). Welche Anpassungen *Chrysochaes*-Arten gegenüber Cardenoliden haben, ist noch unbekannt. Um genauere Aussagen über die Futterpflanzenwahl und den Zusammenhang mit der Sequestration treffen zu können, sollten umfangreichere phylogenetische Untersuchungen verschiedener *Chrysochaes*-Arten (insbesondere *Chrysochaes asiaticus*, da dieser auf *Convolvulaceae* fressen soll), *Platycorynus* und weiterer eurasischer *Chrysochus*-Arten durchgeführt werden. Diese Untersuchungen sollten mit Futterwahl-Experimenten kombiniert werden, um die Anpassungen an verschiedene Futterpflanzen und deren möglichen Einfluss auf die Evolution der Sequestration besser verstehen zu können. Dennoch ist es nicht eindeutig, ob das spezialisierte Fressverhalten die Grundlage für die Evolution der Sequestration bildet oder ob die Sequestration den Wirtswechsel verhindert (Petschenka and Agrawal 2016).

Der entscheidende Vorteil, den die Sequestration bietet, ist der Schutz vor Fressfeinden (dritte trophische Ebene). Dabei sind Spezialisten besser vor Fressfeinden geschützt als Generalisten (Bernays and Graham 1988; Dyer 1995). Innerhalb der Milchkrautwanzen (*Heteroptera: Lygaeinae*), die Cardenolide von verschiedenen Pflanzenarten sequestrieren, wird die Spezialisierung an die Futterpflanze durch den höheren Schutz vor Fressfeinden und Parasiten vorangetrieben (Petschenka et al., 2020). *Chrysochus*-Käfer geben nach einer äußeren Störung

ihr Wehrsekret direkt über ihre Wehrdrüsen ab (Dobler, Dalozé, and Jacques M. Pasteels 1998). Es konnte ein Sequestrationsgradient im Zusammenhang mit der Futterpflanzenspezialisierung bei Blattläusen beobachtet werden, die auf *Asclepias* fressen (Agrawal 2016). Dabei fraßen vier verschiedene Blattlausarten an *Asclepias syrica*, wobei die Sequestrationsfähigkeit vom Generalisten *Myzus persicae* über die spezialisierteren Arten *Aphis asclepiadis* und *A. nerii* bis zum monophagen ernährenden *Myzocallis asclepiadis* anstieg (Agrawal 2016). Bei den *Danaus*-Schmetterlingen kann die Cardenolidkonzentration stark variieren und ist ebenfalls von der Futterpflanze abhängig (Brower et al. 1984). Ob *C. auratus* durch die monophage Ernährung auf *A. cannabinum* einen stärkeren Schutz verglichen mit der oligophagen Art *C. cobaltinus* besitzt, ist nicht bekannt. Obwohl das Wehrsekret von *C. asclepiadeus* keine Cardenolide enthält, hat es trotzdem eine abwehrende Wirkung auf die sehr aggressive Ameisenart *Myrmicaria opaciventris* (Dobler, Dalozé, and Jacques M. Pasteels 1998). *Vincetoxicum spp.* enthält keine Cardenolide, aber andere toxische Inhaltsstoffe (Dobler, Dalozé, and Jacques M. Pasteels 1998; Jolivet and Verma 2008; Wiegrebe et al. 1969). Es gilt als giftig für Säugetiere und einige Insekten, bei Weidetieren führt der Verzehr zum Erbrechen (Laukkanen et al. 2012; Muola et al. 2010; Solbreck and Sillen-tbllberg 1990). Bei der Milchkrautwanze *Lygaeus equestris*, die ebenfalls von *Vincetoxicum* frisst, ist sie eher vor einem Angriff durch Hühner geschützt, als die Haltung mit Sonnenblumkerne (Tullberg, Gamberale-Stille, and Solbreck 2000). Auch bei *Chrysochus* könnte eine erhöhte Schutzwirkung gegen Fressfeinde durch die Anpassung an Cardenolide in der Nahrung gewährleistet sein. Darüber hinaus haben sie eine auffällige Färbung, die ebenfalls abwehrend wirken könnte (Isman, Duffey, and Scudder 1977; Peterson et al. 2001).

Als Verteidigungsstrategie könnten sekundäre Pflanzenmetaboliten aufbereitet werden, was gegenüber der *de-novo* Herstellung von Abwehrstoffen kostengünstiger und evolutionsbiologisch vorteilhafter sein könnte. Bei der Blattkäfergattung *Oreina* wurde gezeigt, dass die Sequestration aus einer *de-novo* Produktion entstanden ist und ebenfalls mit der Wirtspflanze assoziiert ist (Dobler et al. 1996). Bei tropischen Blattkäfern der Gattung *Platyphora* (*Chrysoelinae*, *Chrysomelina*), die auf sechs verschiedenen Pflanzenarten fressen, wird vermutet, dass der Wechsel zwischen verschiedenen Wirtspflanzen durch ein "duales Verteidigungssystem" erleichtert wird (Termonia et al. 2002). Die Blattkäfer verteidigen sich mit Saponinen, die sie aus den sequestrierten pflanzlichen Vorstufen des Amyrins herstellen. Eine Gruppe innerhalb von *Platyphora* sequestriert sowohl Saponine als auch

Pyrrrolizidinalkaloide, während die anderen Arten die Sequestration von Saponinen beibehalten (Termonia et al. 2002). Dabei kann sich die chemische Verteidigung entweder aus einem autogenen Metabolismus oder der Sequestration von Pflanzenstoffen oder einer Kombination beider Mechanismen entwickelt haben (Termonia et al. 2001, 2002). In der Blattkäfer-Unterfamilie *Chrysomelina* hat sich die Sequestration von Salicin auf der Grundlage eines autogenen Metabolismus zweimal unabhängig entwickelt (Termonia et al. 2001). Um festzustellen, wie sich die Verteidigungsstrategie innerhalb von *Chrysochus* entwickelt hat, müssen weitere Untersuchungen der Futterpflanze (*Vincetoxicum*) durchgeführt werden und die Analyse muss auf die asiatischen *Chrysochus*-Arten (Beispiel *Chrysochus chinensis*) und *Platycorynus* ausgeweitet werden. Die beiden nordamerikanischen Arten sequestrieren die Cardenolide aus den Wirtspflanzen (Dobler, Dalozé, and Jacques M. Pasteels 1998). Bisher ist nur bekannt, dass *C. aclepiadeus* Phenylalanin, Tryptophan, Leucin und Diacetylputrescin im Wehrsekret besitzt (Dobler, Dalozé, and Jacques M. Pasteels 1998). Phenylalanin, Tryptophan und Leucin zählen zu den essentiellen Aminosäuren und müssen über die Nahrung aufgenommen werden (Boudko et al. 2005; Holtorf et al. 2019). Auch müssen weitere vergleichende phylogenetische und molekularbiologische Daten aus dem Genus *Chrysochus* erhoben werden, um sagen zu können, wie sich die chemische Abwehr entwickelt hat. Generell sind die Futterpflanzenassoziationen nicht immer vollständig belegt (Dobler 2004; Termonia et al. 2002).

#### 4.5.2 Das Darmgewebe als evolutionäre entscheidende Station der Sequestration und der mögliche Transportmechanismus mittels ABCB-Transporter

Die erste wichtige Station für die Sequestration ist der Darm, dabei werden die sekundären Pflanzenmetabolite über das Darmlumen, die peritrophische Membran und das Darmepithel aufgenommen und gelangen über passive Diffusion oder aktiven Transport in die Hämolymphe, Wehrdrüsen oder Speicherkompartimente (Beran and Petschenka 2022). Versuche mit radioaktiv markierten Ouabain zeigten, dass sich Ouabain im *C. cobaltinus* sowohl in der Hämolymphe als auch im Wehrsekret befand, wobei nur Spuren davon in der Hämolymphe des *C. asclepiadeus* zu finden waren und der Großteil des Ouabains über den Kot ausgeschieden wurde (Dobler 2004). Dies deutet auf eine veränderte Darmpermeabilität hin. Ähnliches kann auch bei den *Danaini*-Schmetterlingen beobachtet werden. Der Monarchfalter (*D. plexippus*) sequestriert Cardenolide aus seiner Futterpflanze *Asclepia*

*curassavica*, während die nahverwandte *Euploea core* ebenfalls auf Cardenolid-haltigen Pflanzen frisst, diese jedoch nicht sequestriert (Petschenka and Agrawal 2015). Die Cardenolide werden im Darm der *E. core* Raupen abgebaut und im Darmlumen der Monarchfalter Raupen angereichert. Die Anreicherung der Cardenolide im Darmlumen der Monarchfalterraupe ist ein neuer Mechanismus innerhalb der herbivoren Insekten (Dreisbach et al. 2022). Bei *E. core* ist die Cardenolidkonzentration im Darminhalt geringer als die in der Pflanze, was ebenfalls auf einen Abbau hinweist (Petschenka and Agrawal 2015). Durch den Abbau der Cardenolide im Darmlumen der *E. core* gelangen diese nicht in die Hämolymphe, somit wird die sensible Na,K-ATPase geschützt (Dreisbach et al. 2022). Der Mitteldarm der amerikanischen Großschabe (*Periplaneta americana*) und der Wüstenheuschrecke (*Schistocerca gregaria*) ist undurchlässig für polare und unpolare Cardenolide (Ouabain und Digitoxin) (Scudder and Meredith 1982). Auch der Mitteldarm des Oleanderschwärmers (*D. nerii*) ist undurchlässig gegenüber der in der Nahrung vorkommenden Cardenolide (Petschenka, Pick, et al. 2013). Ob der Mitteldarm von *C. asclepiadeus* auch undurchlässig für unpolare Cardenolide wie Digoxin oder Digitoxin ist, ist bisher nicht bekannt, aber es ist möglich. Es könnten erneut Versuche mit radioaktiv markierten Digoxin wie in der Publikation von Dobler (2004) durchgeführt werden oder eine *in-vitro*-Aufnahmeassay mit dem Mitteldarm von *C. asclepiadeus* mittels HPLC durchgeführt werden (Discher et al., 2009). Es konnte auch gezeigt werden, dass apolare Cardenolide während der Sequestration in polare Cardenolide konvertiert werden können (Brower et al. 1984). Dies mindert die Toxizität der unpolaren Cardenolide, da sie weniger membrangängig werden und polare Cardenolide sind kostengünstiger einzulagern (Frick and Wink 1995). Die Einlagerung von polaren Cardenoliden gilt für *C. cobaltinus* und *C. auratus* (Dobler, Daloze, and Jacques M. Pasteels 1998). Des Weiteren könnten apolare Cardenolide (Digitoxin) durch Micellen, die von der peritrophische Membran des Insektendarm gebildet werden, umschlossen werden (Barbehenn 2001).

Die genauen Mechanismen, die die Verarbeitung, Aufbereitung und Verteilung der Cardenolide koordinieren, sind noch immer nicht gänzlich entschlüsselt (Beran and Petschenka 2022; Petschenka and Agrawal 2016). Kowalski et al. (2020) haben drei ABCB-Volltransporter im *C. auratus* identifiziert und das mögliche Cardenolid- Substratspektrum beschrieben. Im *C. asclepiadeus* konnten über verschiedene bioinformatische Methoden (tblastx-Suche, ABC-Scan) zwei ABCB-Volltransporter identifiziert werden. Bei der phylogenetischen Untersuchung wurde die gesamte Proteinsequenz (TMD-NBD-TMD-NBD)

der verschiedenen ABCB-Transporter (Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Vertebraten, Crustacea) verwendet. Als Außengruppe wurden verschiedene ABCC-Volltransporter verwendet. Wie in vorherigen Studien trennen sich die ABCB-Volltransporter in den taxonomischen Gruppen auf, was auf eine stammbaumspezifische Duplikation zurückzuführen ist (Dermauw and Van Leeuwen 2014; Sturm, Cunningham, and Dean 2009; Xiao et al. 2022). In den Blattkäfern spalten sich die ABCB-Transporter nochmals in zwei Klassen auf: ABCB1 und ABCB2/ABCB3, dies konnte auch bei *C. auratus* gezeigt werden (Kowalski et al. 2020). Die beiden ABCB1-Transporter weisen einen Bootstrapwert von 100 auf und sind damit homolog zueinander. Der zweite ABCB-Volltransporter des *C. asclepiadeus* ist den *Cau*ABCB2 und ABCB3 ähnlich und hat zu beiden *C. auratus* Transportern den gleichen Abstand mit dem Bootstrap-Wert von 100. Die ausschließliche Interaktion des *Cau*ABCB2 mit Cymarin (einem Cardenolid der Wirtspflanze) unter den getesteten Cardenoliden und die Lokalisation in den Elytren (Wehrdrüsen) unterstützt die Annahme, dass die Genduplikation durch eine Anpassung an Cardenolide entstanden sein könnte (Kowalski et al. 2020). Weitere Genduplikationen sind in *C. populi* (ABCB1 und 3) und im Bergkieferkäfer (*Dendroctonus ponderosae*) (ABCB2 und 3) entstanden. Genduplikationen, die zu einer Diversifizierung führen, sind vor allem in den ABC-Unterfamilien A, B, C und G zu beobachten, durch diese Genduplikationen kann das Spektrum der Transportsubstrate erweitert werden (Merzendorfer 2014).

Beide ABCB1-Transporter zeigen ihren Hauptexpressionsort im Nervengewebe der Käfer, was auf eine schützende Funktion der Na,K-ATPase hindeuten könnte (Denecke et al. 2017; Fahima Mayer et al. 2009; Petschenka, Pick, et al. 2013). Im ATPase-Assay zeigte das *Casc*ABCB1 keine gesteigerte Aktivität durch die getesteten Cardenolide, insbesondere keine durch Digoxin. Der *Cau*ABCB1-Transporter interagiert mit Digoxin und Calotropin (Kowalski et al. 2020). ABC-Transporter stehen ebenfalls im Zusammenhang mit dem Transport verschiedener Nährstoffe und Aminosäuren, was für *Casc*ABCB1 näherliegend wäre, da es ebenfalls in dem Darm und den Elytren stark exprimiert wird (Dermauw and Van Leeuwen 2014; Holtof et al. 2019). Der *Casc*ABCB2-Transporter wird am stärksten in den Malpighischen Gefäßen exprimiert und zeigte eine leichte Steigerung der Aktivität durch Digoxin und eine gesteigerte Aktivität durch Ouabain. Dies deutet auf mögliche exkretorische Funktionen hin. Die Resorption von sekundären Metaboliten über die Malpighischen Gefäße ist ein weiterer wichtiger Faktor der Sequestration (Beran and Petschenka 2022), da dadurch die

(Ein)-Lagerung in der Hämolymphe oder Wehrdrüsen ermöglicht wird (Meredith et al. 1984). Welchen Zusammenhang ABC-Transporter in den Malpighischen Gefäßen übernehmen können und welchen Zusammenhang sie mit der Sequestration haben können, wurde im vorherigen Kapitel diskutiert. Die geringe Expression der *C. asclepiadeus* ABCB-Gene in den getesteten Geweben sowie die geringe oder nicht vorhandene ATPase-Aktivität deuten darauf hin, dass die ABCB-Transporter von *C. asclepiadeus* keine Cardenolide transportieren. Dies könnte daran liegen, dass *C. asclepiadeus* Pflanzen frisst, die keine Cardenolide enthalten. Um dies zu überprüfen, sollten ABCB-Transporter weiterer *Chrysochus*-Arten untersucht werden, die nicht auf Cardenolid-haltigen Pflanzen fressen, oder von Artverwandten von *Platycorynus*- sowie *Chrysochaes*-Arten. Neben ABC-Transporterproteinen können noch andere Transporterproteine wie Organo-Anion-Transporterproteine (OATP), oder auch Cytochrome P450 und  $\beta$ -Glucosidasen, die Käfer vor sekundären Pflanzenmetaboliten schützen, von Bedeutung sein (Heckel 2018; Heidel-Fischer and Vogel 2015; Torrie et al. 2004).

Die Besonderheit bei der Sequestration besteht darin, dass Cardenolide selektiv aufgenommen, verteilt und gespeichert werden, wobei sich Insekten vor Selbstvergiftung schützen müssen. Da Cardenolide die essentielle Na,K-ATPase in den Zellen blockieren und damit fatale Schäden anrichten können, haben einige Insekten einen besonderen Schutzmechanismus entwickelt. Durch die Modifizierung der Bindetasche des Enzyms können Cardenolide schlechter andocken, was die Hemmung reduziert oder verhindert (Dobler et al. 2012, 2015; Petschenka et al. 2017; Petschenka and Dobler 2009).

#### 4.5.3 Was war zuerst da? Sequestration und die Na,K-ATPase

Die untersuchten *Chrysochus*-Arten besitzen zwei Isoformen der Na,K-ATPase, eine native und eine weniger sensitive Variante (Aardema et al., 2012, persönliche Mitteilung Susanne Dobler), was eine wichtige Anpassung an die Cardenolide in der Nahrung darstellt. Ähnliche Genduplikationen der  $\alpha$ -Untereinheit der Na,K-ATPase konnten auch beim Wolfmilch-Stammrüssler *Rhyssomatus lineaticollis* (Coleoptera), bei der großen und kleinen Milchkrautwanze (*O. fasciatus* und *Lygaeus kalmii*), bei der Minierfliege (*Phytomyza hellebori*) und bei den Grashüpfern *P. bufonius* und *P. aegrotus* nachgewiesen werden (M L Aardema, Zhen, and Andolfatto 2012; Dobler et al. 2019; Lohr et al. 2017; Petschenka et al. 2017). *O. fasciatus* besitzt drei verschiedenen Isoformen der  $\alpha$ -Untereinheit der Na,K-ATPase, die ebenfalls eine Gewebe-spezifische Expression aufweisen (Lohr et al. 2017), darüber hinaus

zeigten diese Isoformen auch verschiedene Cardenolid-Resistenzen auf (Dalla and Dobler 2016). Die beiden Isoformen bei *C. auratus* wie auch bei den Grashüpfern zeigen ebenfalls eine Gewebe-spezifische Expression auf. Die nicht-resistente Form wurde überwiegend im Kopf (Aardema et al., 2012) oder spezifischer im Nervengewebe (Dobler et al. 2019) wie auch bei den Grashüpfern exprimiert, während die resistente Form im Körper (Aardema et al., 2012) oder spezifischer im Vorder- und Hinterdarm sowie in den Malpighischen Gefäßen (Dobler et al. 2019), bei den Grashüpfern exprimiert wurde. Die Gewebe-spezifische Expression der beiden Isoformen im *C. asclepiadeus* ist bisher unbekannt, könnten aber ähnlich wie *C. auratus* sein und wird derzeit von einer Masterstudentin in der Arbeitsgruppe untersucht. Bisher wurden resistenzvermittelnde Aminosäuresubstitution in der  $\alpha$ -Untereinheit in sieben verschiedenen Insektenordnungen (Heteroptera, Sternorrhyncha, Caelifera, Hymenoptera, Coleoptera, Diptera, Lepidoptera) nachgewiesen und hat sich unabhängig voneinander entwickelt. Sie gilt als erstaunliches Beispiel für konvergente Evolution (Dobler et al. 2012, 2015). Insbesondere die Substitution von Asparagin durch Histidin an Position 122 hat sich unabhängig in den sieben Ordnungen entwickelt (Dobler et al. 2019; Karageorgi et al. 2020). Sechs dieser Insektenordnungen haben die Sequestration von Cardenoliden unabhängig voneinander entwickelt (Bramer et al. 2015; Dobler, Daloz, and Jacques M. Pasteels 1998; Petschenka, Fandrich, et al. 2013) und zeigen alle die entscheidenden Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 111 und 122 (Karageorgi et al., 2020).

Die Anpassung der Na,K-ATPase bei den Danaini-Schmetterlingen ist eng an die Sequestration von Cardenoliden gekoppelt und erfolgte stufenweise. Ein Vergleich von drei verschiedenen Schmetterlingsarten – *E. core*; mit sensitiver Na,K-ATPase, *Danaus gilippus*; mit intermediär sensitiver Na,K-ATPase und *D. plexippus*; mit starker Resistenz der Na,K-ATPase - ergab, dass die Sequestration und Resistenz gegenüber Cardenoliden von der Konzentration der Cardenolide in den Futterpflanzen abhängig sein können (Petschenka and Agrawal 2015). Wie vorher diskutiert, frisst *E. core* auf Cardenolid-haltigen Pflanzen, sequestriert allerdings nicht und schützt die sensitive Na,K-ATPase durch einen undurchlässigen Darm (Dreisbach et al. 2022). Ein weiteres Beispiel für den Zusammenhang zwischen der Na,K-ATPase Anpassung und Sequestration findet sich bei den Bodenwanzen (*Lygaeinae*), bei denen die Anpassung der Na,K-ATPase und der Cardenolidsequestration ursprünglich zu sein scheint (Bramer et al. 2015). Es wurden 20 verschiedene *Lygaeinae*- Arten von fünf verschiedenen Kontinenten

miteinander verglichen. Dabei siedelten sich einige Arten auf Cardenolid-produzierenden Pflanzen an, die nicht mit *Apocynaceae* verwandt sind, während andere *Lygaeinae*-Arten auf nicht Cardenolid-haltige Futterpflanzen wechselten. Dabei ist die Fähigkeit zur Sequestration in den Arten sekundär verloren gegangen, die auf nicht Cardenolid-haltige Futterpflanzen gewechselt hatten, jedoch blieb die resistente Na,K-ATPase erhalten (Bramer et al. 2015). Ähnliches könnte auch in der Gattung *Chrysochus* aufgetreten sein. Aufgrund des Fehlens von Cardenoliden in der Nahrung haben sie ihre Fähigkeit zur Sequestration sekundär verloren. Um dies zu überprüfen, sollten alle zehn *Chrysochus*-Arten sowie artverwandte Arten aus *Platycorynus* und *Chrysarches* auf ihre Sequestrationsfähigkeit und mögliche Na,K-ATPase Substitutionen hin untersucht werden. Obwohl oft eine Verbindung zwischen Resistenz der Na,K-ATPase und Sequestration besteht, gibt es auch Insektenarten, die auf *Asclepias* fressen, ohne Cardenolide zu sequestrieren, aber dennoch eine resistente Na,K-ATPase besitzen (Dobler et al. 2012). Andere Arten wie einige Bärenspinner-Arten sequestrieren die Cardenolide, aber ihre Na,K-ATPase ist sensitiv (Karageorgi et al. 2020), während wiederum andere Arten auf *Asclepias* fressen, aber weder Cardenolide sequestrieren noch eine resistente Na,K-ATPase besitzen (Dreisbach et al. 2022). Dabei scheint, dass eine resistente Na,K-ATPase nicht nötig ist, um Cardenolide in der Nahrung zu tolerieren, sondern eine Anpassung darstellt, die mit der Fähigkeit der Sequestration zusammenhängt (Petschenka and Agrawal 2015). Denn die Fähigkeit der Sequestration kann sekundär reduziert werden, durch einen Wirtwechsel zu nicht Cardenolid-haltigen Pflanzen und die resistente Na,K-ATPase bleibt erhalten (Bramer et al. 2015). Dennoch scheint die insensitive Na,K-ATPase ein evolutionärer Antrieb der Sequestration zu sein (oder umgekehrt), da sie gleichzeitig die Toleranz gegenüber Cardenolide und deren Sequestration bewahrt (Beran and Petschenka 2022).

## 5. Literaturverzeichnis

- Aardema, M L, Y. Zhen, and P. Andolfatto. 2012. "The Evolution of Cardenolide-Resistant Forms of Na(+),K(+) -ATPase in Danainae Butterflies." *Mol Ecol* 21(2):340–49. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05379.x.
- Aardema, Matthew L., Ying Zhen, and Peter Andolfatto. 2012. "The Evolution of Cardenolide-Resistant Forms of Na +,K +-ATPase in Danainae Butterflies." *Molecular Ecology* 21(2):340–49. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05379.x.
- Adachi, Yasuhisa, Hiroshi Suzuki, and Yuichi Sugiyama. 2001. "Comparative Studies on in Vitro Methods for Evaluating in Vivo Function of MDR1 P-Glycoprotein." *Pharmaceutical Research* 18(12):1660–68. doi: 10.1023/A:1013358126640.
- Agrawal, A A, G. Petschenka, R. A. Bingham, M. G. Weber, and S. Rasmann. 2012. "Toxic Cardenolides: Chemical Ecology and Coevolution of Specialized Plant-Herbivore Interactions." *New Phytol* 194(1):28–45. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.04049.x.
- Agrawal, Anurag A. 2016. "Population Growth and Sequestration of Plant Toxins along a Gradient of Specialization in Four Aphid Species on the Common Milkweed *Asclepias Syriaca*." 547–56. doi: 10.1111/1365-2435.12523.
- Agrawal, Anurag A., Georg Petschenka, Robin A. Bingham, Marjorie G. Weber, and Sergio Rasmann. 2012. "Toxic Cardenolides: Chemical Ecology and Coevolution of Specialized Plant-Herbivore Interactions." *New Phytologist* 194(1):28–45. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.04049.x.
- Akhtar, Y., and M. B. Isman. 2004. "Comparative Growth Inhibitory and Antifeedant Effects of Plant Extracts and Pure Allelochemicals on Four Phytophagous Insect Species." *Journal of Applied Entomology* 128(1):32–38. doi: 10.1046/j.1439-0418.2003.00806.x.
- al-Robai, A. A. 1993. "Different Ouabain Sensitivities of Na+/K(+)-ATPase from *Poekilocerus Bufonius* Tissues and a Possible Physiological Cost." *Comp Biochem Physiol B* 106(4):805–12.
- Aller, Stephen G., Jodie Yu, Andrew Ward, Yue Weng, Srinivas Chittaboina, Rupeng Zhuo, Patina M. Harrell, Yenphuong T. Trinh, Qinghai Zhang, Ina L. Urbatsch, and Geoffrey Chang. 2009. "Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding." *Science* 323(5922):1718–22. doi: 10.1126/science.1168750.
- Ambudkar, Suresh V., Saibal Dey, Christine A. Hrycyna, Muralidhara Ramachandra, Ira Pastan, and Michael M. Gottesman. 1999. "Biochemical, Cellular, and Pharmacological Aspects of the Multidrug Transporter." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39:361–98. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.39.1.361.
- Annilo, Tarmo, Zhang Qun Chen, Sergey Shulenin, Julie Costantino, Lauren Thomas, Hong Lou, Stefan Stefanov, and Michael Dean. 2006. "Evolution of the Vertebrate ABC Gene Family: Analysis of Gene Birth and Death." *Genomics* 88(1):1–11. doi: 10.1016/j.ygeno.2006.03.001.
- Anon. n.d. "Arch Insect Biochem Physiol - 2005 - Cheng - EST-based Profiling and Comparison of Gene Expression in the Silkworm Fat Body.Pdf."
- Bangert, Irina, Franz Tumulka, and Rupert Abele. 2011. "The Lysosomal Polypeptide

- Transporter TAPL: More than a Housekeeping Factor?" *Biological Chemistry* 392(1–2):61–66. doi: 10.1515/BC.2011.007.
- Barbehenn, Raymond V. 2001. "Roles of Peritrophic Membranes in Protecting Herbivorous Insects from Ingested Plant Allelochemicals." *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47(2):86–99. doi: 10.1002/arch.1039.
- Bariami, Vassiliki, Christopher M. Jones, Rodolphe Poupardin, John Vontas, and Hilary Ranson. 2012. "Gene Amplification, Abc Transporters and Cytochrome P450s: Unraveling the Molecular Basis of Pyrethroid Resistance in the Dengue Vector, *Aedes Aegypti*." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6(6). doi: 10.1371/journal.pntd.0001692.
- Barve, Pranoti R., Meenakshi B. Tellis, Vitthal T. Barvkar, Rakesh S. Joshi, and Ashok P. Giri. 2022. "Functional Diversity of the Lepidopteran ATP - Binding Cassette Transporters." *Journal of Molecular Evolution*. doi: 10.1007/s00239-022-10056-2.
- Baum, Michael. 2016. "Transmembrane Carriers of Cardenolide-Adapted Leaf Beetles (Coleoptera, Chrysomelidae)."
- Ter Beek, Josy, Albert Guskov, and Dirk Jan Slotboom. 2014. "Structural Diversity of ABC Transporters." *Journal of General Physiology* 143(4):419–35. doi: 10.1085/jgp.201411164.
- Beran, Franziska, and Georg Petschenka. 2022. "Sequestration of Plant Defense Compounds by Insects: From Mechanisms to Insect-Plant Coevolution." *Annual Review of Entomology* 67:163–80. doi: 10.1146/annurev-ento-062821-062319.
- Bernays, Elizabeth, and Michelle Graham. 1988. "On the Evolution of Host Specificity in Phytophagous Arthropods." *Ecology* 69(4):886–92.
- Blount, Jonathan D., Hannah M. Rowland, Christopher Mitchell, Michael P. Speed, Graeme D. Ruxton, John A. Endler, and Lincoln P. Brower. 2021. "The Price of Defence: Toxins, Visual Signals and Oxidative State in an Aposematic Butterfly." *BioRxiv* 1–31.
- Borst, P, and A. H. Schinkel. 2013. "P-Glycoprotein ABCB1: A Major Player in Drug Handling by Mammals." *J Clin Invest* 123(10):4131–33. doi: 10.1172/jci70430.
- Borst, Piet, and Alfred H. Schinkel. 2013. "P-Glycoprotein ABCB1: A Major Player in Drug Handling by Mammals." *J Clin Invest* 123(10):4131–33. doi: 10.1172/jci70430.
- Boudko, Dmitri Y., Andrea B. Kohn, Ella A. Meleshkevitch, Michelle K. Dasher, Theresa J. Seron, Bruce R. Stevens, and William R. Harvey. 2005. "Ancestry and Progeny of Nutrient Amino Acid Transporters." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(5):1360–65. doi: 10.1073/pnas.0405183101.
- Bramer, Christiane, Susanne Dobler, Jürgen Deckert, Michael Stemmer, and Georg Petschenka. 2015. "Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Resistance and Cardenolide Sequestration: Basal Adaptations to Host Plant Toxins in the Milkweed Bugs (Hemiptera: Lygaeidae: Lygaeinae)." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282(1805). doi: 10.1098/rspb.2014.2346.
- Bretschneider, Anne, David G. Heckel, and Heiko Vogel. 2016. "Know Your ABCs: Characterization and Gene Expression Dynamics of ABC Transporters in the Polyphagous Herbivore *Helicoverpa Armigera*." *Insect Biochemistry and Molecular*

- Biology* 72:1–9. doi: 10.1016/j.ibmb.2016.03.001.
- Broehan, Gunnar, Tobias Kroeger, Marcé Lorenzen, and Hans Merzendorfer. 2013. “Functional Analysis of the ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Gene Family of *Tribolium Castaneum*.” *BMC Genomics* 14(1):1–19. doi: 10.1186/1471-2164-14-6.
- Brower, L. P., and S. C. Glazier. 1975. “Localization of Heart Poisons in the Monarch Butterfly.” *Science* 188(4183):19–25. doi: 10.1126/science.188.4183.19.
- Brower, L. P., J. N. Seiber, C. J. Nelson, S. P. Lynch, M. P. Hoggard, and J. A. Cohen. 1984. “Plant-Determined Variation in Cardenolide Content and Thin-Layer Chromatography Profiles of Monarch Butterflies, *Danaus Plexippus* Reared on Milkweed Plants in California - 3. *Asclepias Californica*.” *Journal of Chemical Ecology* 10(12):1823–57. doi: 10.1007/BF00987364.
- Bowers MD (1993) Aposematic caterpillars: life-styles of the warningly colored and unpalatable. In: Stamp NE, Casey TM (eds) *Caterpillars ecological and evolutionary constraints on foraging*. Chapman & Hall, New York, pp 331–371
- Buss, D. S., and A. Callaghan. 2008. “Interaction of Pesticides with P-Glycoprotein and Other ABC Proteins: A Survey of the Possible Importance to Insecticide, Herbicide and Fungicide Resistance.” *Pesticide Biochemistry and Physiology* 90(3):141–53. doi: 10.1016/j.pestbp.2007.12.001.
- Carton, Yves, Marylène Poirié, and Anthony J. Nappi. 2008. “Insect Immune Resistance to Parasitoids.” *Insect Science* 15(1):67–87. doi: 10.1111/j.1744-7917.2008.00188.x.
- Cavadini, Patrizia, Giorgio Biasiotto, Maura Poli, Sonia Levi, Rosanna Verardi, Isabella Zanella, Manuela Derosas, Rosaria Ingrassia, Marcella Corrado, and Paolo Arosio. 2007. “RNA Silencing of the Mitochondrial ABCB7 Transporter in HeLa Cells Causes an Iron-Deficient Phenotype with Mitochondrial Iron Overload.” *Blood* 109(8):3552–59. doi: 10.1182/blood-2006-08-041632.
- Chahine, Sarah, and Michael J. O’Donnell. 2009. “Physiological and Molecular Characterization of Methotrexate Transport by Malpighian Tubules of Adult *Drosophila Melanogaster*.” *Journal of Insect Physiology* 55(10):927–35. doi: 10.1016/j.jinsphys.2009.06.005.
- Cohen, James A., and Lincoln P. Brower. 1983. “Cardenolide Sequestration by the Dogbane Tiger Moth (*Cycnia Tenara*; Arctiidae).” *Journal of Chemical Ecology* 9(4):521–32. doi: 10.1007/bf00990224.
- Cserepes, Judit, Zsófia Szentpétery, László Seres, Csilla Özvegy-Laczka, Thomas Langmann, Gerd Schmitz, Hristos Glavinas, Izabella Klein, László Homolya, András Váradi, Balázs Sarkadi, and N. Barry Elkind. 2004. “Functional Expression and Characterization of the Human ABCG1 and ABCG4 Proteins: Indications for Heterodimerization.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320(3):860–67. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.037>.
- Dalla, Safaa, and Susanne Dobler. 2016. “Gene Duplications Circumvent Trade-Offs in Enzyme Function: Insect Adaptation to Toxic Host Plants.” *Evolution* 70(12):2767–77. doi: 10.1111/evo.13077.

- Dalla, Safaa, Herman G. P. Swarts, Jan B. Koenderink, and Susanne Dobler. 2013. "Amino Acid Substitutions of Na,K-ATPase Conferring Decreased Sensitivity to Cardenolides in Insects Compared to Mammals." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43(12):1109–15. doi: 10.1016/j.ibmb.2013.09.006.
- Dassa, Elie, and Philippe Bouige. 2001. "The ABC of ABCs: A Phylogenetic and Functional Classification of ABC Systems in Living Organisms." *Research in Microbiology* 152(3–4):211–29. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01194-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01194-9).
- Davis, J. S., W. D. Noteboom, J. A. Willett, S. Liao, L. Jurkowitz, D. A. Silverman, B. W. O. Malley, W. L. Mcguire, B. W. O. Malley, P. O. Kohler, W. L. Mcguire, G. D. Aurbach, B. Weiss, B. B. Brodie, B. A. Houston, N. J. Rosenbrough, R. J. Randall, M. G. Rosenfeld, L. R. Chase, B. W. O. Malley, B. W. O. Malley, K. R. Leininger, D. Sagher, E. Braunwald, R. H. Shanks, J. W. Miller, R. J. Ho, H. C. Meng, M. A. Kirchberger, M. L. Heidrick, K. Yosinager, K. Birchall, L. R. Chase, G. D. Aurbach, and M. Tomkins. n.d. "Inside-Out Red Cell Membrane Vesicles: Preparation and Purification." (14):14–17.
- Dean, Michael, Karobi Moitra, and Rando Allikmets. 2022. "The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily." *Human Mutation* 43(9):1162–82. doi: 10.1002/humu.24418.
- Denecke, Shane, Roberto Fusetto, and Philip Batterham. 2017. "Describing the Role of *Drosophila Melanogaster* ABC Transporters in Insecticide Biology Using CRISPR-Cas9 Knockouts." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 91:1–9. doi: 10.1016/j.ibmb.2017.09.017.
- Denecke, Shane, Ivan Rankić, Olympia Driva, Megha Kalsi, Ngoc Bao Hang Luong, Benjamin Buer, Ralf Nauen, Sven Geibel, and John Vontas. 2021. "Comparative and Functional Genomics of the ABC Transporter Superfamily across Arthropods." *BMC Genomics* 22(1):1–13. doi: 10.1186/s12864-021-07861-2.
- Dermauw, Wannes, and Thomas Van Leeuwen. 2014. "The ABC Gene Family in Arthropods: Comparative Genomics and Role in Insecticide Transport and Resistance." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 45(0):89–110. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.11.001>.
- Dermauw, Wannes, Edward John Osborne, Richard M. Clark, Miodrag Grbić, Luc Tirry, and Thomas Van Leeuwen. 2013. "A Burst of ABC Genes in the Genome of the Polyphagous Spider Mite *Tetranychus Urticae*." *BMC Genomics* 14(1). doi: 10.1186/1471-2164-14-317.
- Dobler, S. 2004. "The Evolution of Adaptations to Plant Secondary Compounds in Chrysochus Leaf Beetles (Chrysomelidae, Eumolpinae)." edited by P. ;Santiag.-B. Jolivet J. A.;Schmitt, M. *New Developments in the Biology of Chrysomelidae* 117–23.
- Dobler, Susanne, Safaa Dalla, Vera Wagschal, and Anurag A. Agrawal. 2012. "Community-Wide Convergent Evolution in Insect Adaptation to Toxic Cardenolides by Substitutions in the Na,K-ATPase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(32):13040–45. doi: 10.1073/pnas.1202111109.
- Dobler, Susanne, Désiré Daloze, and Jacques M Pasteels. 1998. "Sequestration of Plant Compounds in a Leaf Beetle's Defensive Secretion: Cardenolides in

- &lt;SMALL&gt;Chrysochus&lt;/SMALL&gt;.” *Chemoecology* 8(3):111–18. doi: 10.1007/s000490050015.
- Dobler, Susanne, Désiré Dalozé, and Jacques M. Pasteels. 1998. “Sequestration of Plant Compounds in a Leaf Beetle’s Defensive Secretion: Cardenolides in Chrysochus.” *Chemoecology* 8(3):111–18. doi: 10.1007/s000490050015.
- Dobler, Susanne, and Brian D Farrell. 1999. “Host Use Evolution in Chrysochus Milkweed Beetles: Evidence from Behaviour, Population Genetics and Phylogeny.” *Mol Ecol* 8(8):1297–1307. doi: 10.1046/j.1365-294X.1999.00693.x.
- Dobler, Susanne, and Brian D. Farrell. 1999. “Host Use Evolution in Chrysochus Milkweed Beetles: Evidence from Behaviour, Population Genetics and Phylogeny.” *Molecular Ecology* 8(8):1297–1307. doi: 10.1046/j.1365-294X.1999.00693.x.
- Dobler, Susanne, Patrick Mardulyn, Jacques M. Pasteels, and Martine Rowell-Rahier. 1996. “Host-Plant Switches and the Evolution of Chemical Defense and Life History in the Leaf Beetle Genus Oreina.” *Evolution* 50(6):2373–86. doi: 10.1111/j.1558-5646.1996.tb03625.x.
- Dobler, Susanne, Georg Petschenka, and Helga Pankoke. 2011. “Coping with Toxic Plant Compounds – The Insect’s Perspective on Iridoid Glycosides and Cardenolides.” *Phytochemistry* 72(13):1593–1604. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.04.015.
- Dobler, Susanne, Georg Petschenka, Vera Wagschal, and Lara Flacht. 2015. “Convergent Adaptive Evolution - How Insects Master the Challenge of Cardiac Glycoside-Containing Host Plants.” *Entomologia Experimentalis et Applicata* 157(1):30–39. doi: 10.1111/eea.12340.
- Dobler, Susanne, Vera Wagschal, Niels Pietsch, Nadja Dahdouli, Fee Meinzer, Renja Romey-Glüsing, and Kai Schütte. 2019. “New Ways to Acquire Resistance: Imperfect Convergence in Insect Adaptations to a Potent Plant Toxin.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 286(1908). doi: 10.1098/rspb.2019.0883.
- Dreisbach, Domenic, Dhaka R. Bhandari, Anja Betz, Linda Tenbusch, Andreas Vilcinskis, Bernhard Spengler, and Georg Petschenka. 2022. “Spatial Metabolomics Reveal Divergent Cardenolide Processing in the Monarch Butterfly (&lt;Em&gt;Danaus Plexippus&lt;/Em&gt;) and the Common Crow (&lt;Em&gt;Euploea Core&lt;/Em&gt;).” *BioRxiv* (July 2022):2022.06.02.494161. doi: 10.1111/1755-0998.13786.
- Duffey, S. S. 1980. “Sequestration of Plant Natural Products by Insects.” *Annual Review of Entomology* 25(1):447–77. doi: 10.1146/annurev.en.25.010180.002311.
- Dyer, Lee A. 1995. “Tasty Generalists and Nasty Specialists? Antipredator Mechanisms in Tropical Lepidopteran Larvae.” *Ecology* 76(5):1483–96. doi: 10.2307/1938150.
- Editor, Anthony M. George. n.d. *Transporters — 40 Years On*.
- van Den Elsen, J. M., D. A. Kuntz, F. J. Hoedemaeker, and D. R. Rose. 1999. “Antibody C219 Recognizes an Alpha-Helical Epitope on P-Glycoprotein.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(24):13679–84.
- Ewart, G. D., D. Cannell, G. B. Cox, and A. J. Howells. 1994. “Mutational Analysis of the Traffic ATPase (ABC) Transporters Involved in Uptake of Eye Pigment Precursors in Drosophila

- Melanogaster. Implications for Structure-Function Relationships." *Journal of Biological Chemistry* 269(14):10370–77. doi: 10.1016/s0021-9258(17)34070-x.
- Favell, Grant, Jeremy N. McNeil, and Cam Donly. 2020. "The ABCB Multidrug Resistance Proteins Do Not Contribute to Ivermectin Detoxification in the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa Decemlineata* (Say)." *Insects* 11(2). doi: 10.3390/insects11020135.
- Farrell BD, Mitter C (1993) Phylogenetic determinants of insect/ plant community diversity. In: *Species Diversity: Historical and Geographical Perspectives* (eds Ricklefs RE, Schluter D), pp. 253– 266. University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Figueira-Mansur, Janaina, Carlos G. Schrago, Tiago S. Salles, Evelyn S. L. Alvarenga, Brenda M. Vasconcellos, Ana Claudia A. Melo, and Monica F. Moreira. 2020. "Phylogenetic Analysis of the ATP-Binding Cassette Proteins Suggests a New ABC Protein Subfamily J in *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae)." *BMC Genomics* 21(1):1–10. doi: 10.1186/s12864-020-06873-8.
- Frick, C., and M. Wink. 1995. "Uptake and Sequestration of Ouabain and Other Cardiac Glycosides in *Danaus Plexippus* (Lepidoptera: Danaidae): Evidence for a Carrier-Mediated Process." *Journal of Chemical Ecology* 21(5):557–75. doi: 10.1007/BF02033701.
- Fromm, Martin F., Richard B. Kim, C. Michael Stein, Grant R. Wilkinson, and Dan M. Roden. 1999. "Inhibition of P-Glycoprotein-Mediated Drug Transport: A Unifying Mechanism to Explain the Interaction between Digoxin and Quinidine." *Circulation* 99(4):552–57. doi: 10.1161/01.CIR.99.4.552.
- Gaertner, L. S., and C. E. Morris. 1999. "Accumulation of Daunomycin and Fluorescent Dyes by Drug-Transporting Malpighian Tubule Cells of the Tobacco Hornworm, *Manduca Sexta*." *Tissue Cell* 31(2):185–94. doi: 10.1054/tice.1999.0025.
- Gaertner, Lorin S., Christine L. Murray, and Catherine E. Morris. 1998. "Transepithelial Transport of Nicotine and Vinblastine in Isolated Malpighian Tubules of the Tobacco Hornworm (*Manduca Sexta*) Suggests a P-Glycoprotein-like Mechanism." *Journal of Experimental Biology* 201(18):2637–45. doi: 10.1242/jeb.201.18.2637.
- Gatehouse, John A. 2002. "Plant Resistance towards Insect Herbivores: A Dynamic Interaction." *New Phytologist* 156(2):145–69. doi: 10.1046/j.1469-8137.2002.00519.x.
- Gerrard, Bernard, Claudia Stewart, and Michael Dean. 1993. "Analysis of Mdr50: A *Drosophila* P-Glycoprotein/Multidrug Resistance Gene Homolog." *Genomics* 17(1):83–88. doi: 10.1006/geno.1993.1286.
- Glavinas, Hristos, Dóra Méhn, Márton Jani, Berend Oosterhuis, Krisztina Herédi-Szabó, and Péter Krajcsi. 2008. "Utilization of Membrane Vesicle Preparations to Study Drug-ABC Transporter Interactions." *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 4(6):721–32. doi: 10.1517/17425255.4.6.721.
- Golab, T., C. H. Trabert, Herb. Jäger, and T. Reichstein. 1959. "Die Glykoside Der Rhizome von *Apocynum Cannabinum* L. 3. Mitteilung. Glykoside Und Aglykone, 208. Mitteilung." *Helvetica Chimica Acta* 42(7):2418–30. doi: 10.1002/hlca.19590420713.
- Gozalpour, Elnaz, Hanneke G. M. Wittgen, Jeroen J. M. W. van den Heuvel, Rick Greupink,

- Frans G. M. Russel, and Jan B. Koenderink. 2013. "Interaction of Digitalis-like Compounds with P-Glycoprotein." *Toxicological Sciences* 131(2):502–11. doi: 10.1093/toxsci/kfs307.
- Groen, Simon C., Erika R. LaPlante, Nicolas M. Alexandre, Anurag A. Agrawal, Susanne Dobler, and Noah K. Whiteman. 2017. "Multidrug Transporters and Organic Anion Transporting Polypeptides Protect Insects against the Toxic Effects of Cardenolides." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 81:51–61. doi: 10.1016/j.ibmb.2016.12.008.
- Hawthorne, David J., and Galen P. Dively. 2011. "Killing Them with Kindness? In-Hive Medications May Inhibit Xenobiotic Efflux Transporters and Endanger Honey Bees." *PLoS ONE* 6(11). doi: 10.1371/journal.pone.0026796.
- Heckel, David G. 2018. *Insect Detoxification and Sequestration Strategies*. Vol. 47.
- Heckel, David G. 2021. "The Essential and Enigmatic Role of Abc Transporters in Bt Resistance of Noctuids and Other Insect Pests of Agriculture." *Insects* 12(5). doi: 10.3390/insects12050389.
- Heidel-Fischer, Hanna M., and Heiko Vogel. 2015. "Molecular Mechanisms of Insect Adaptation to Plant Secondary Compounds." *Current Opinion in Insect Science* 8:8–14. doi: 10.1016/j.cois.2015.02.004.
- Herbertz, Marlena, Susanne [Akademischer BetreuerIn] Dobler, and Christian-1967-[Akademischer BetreuerIn] Lohr. 2021. "Analyses of Function and Tissue-Specific Expression of the Na,K-ATPase  $\beta$ -Subunits and Associated A1-Subunits in *Oncopeltus Fasciatus*."
- Higgins, C. F. 1992. "ABC Transporters: From Microorganisms to Man." *Annual Review of Cell Biology* 8: 67–113. Doi:10.1146/Annurev.Cb.08.110192.000435.An." *Annual Review of Cell Biology* 8:67–113.
- Higgins, Christopher F. 2001. "ABC Transporters: Physiology, Structure and Mechanism - An Overview." *Research in Microbiology* 152(3–4):205–10. doi: 10.1016/S0923-2508(01)01193-7.
- Holtof, Michiel, Cynthia Lenaerts, Darron Cullen, and Jozef Vanden Broeck. 2019. "Extracellular Nutrient Digestion and Absorption in the Insect Gut." *Cell and Tissue Research* 377(3):397–414. doi: 10.1007/s00441-019-03031-9.
- Holzinger, Ferdinand, Christoph Frick, and Michael Wink. 1992. "Molecular Basis for the Insensitivity of the Monarch (*Danaus Plexippus*) to Cardiac Glycosides." *FEBS Letters* 314(3):477–80. doi: 10.1016/0014-5793(92)81530-y.
- Horisberger, J. D. 2004. "Recent Insights into the Structure and The Sodium Pump in the P-ATPase." *Physiology* 19:377–87.
- Hughes, Jeff, and Andrew Crowe. 2010. "Inhibition of P-Glycoprotein-Mediated Efflux of Digoxin and Its Metabolites by Macrolide Antibiotics." *Journal of Pharmacological Sciences* 113(4):315–24. doi: 10.1254/jphs.10109FP.
- Isman, M. B., S. S. Duffey, and G. G. E. Scudder. 1977. "Cardenolide Content of Some Leaf- and Stem-Feeding Insects on Temperate North American Milkweeds (*Asclepias* Spp.) ."

- Canadian Journal of Zoology* 55(6):1024–28. doi: 10.1139/z77-130.
- Jacobs, Anna. 2010. "Expression , Aufreinigung Und Funktionelle Untersuchungen Der ABC-Transporter."
- Jin, Minghui, Ying Cheng, Xueqin Guo, Meizhi Li, Swapan Chakrabarty, Kaiyu Liu, Kongming Wu, and Yutao Xiao. 2020. "Elicit Expression of HaABCB6 Gossypol Detoxification." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 103387. doi: 10.1016/j.ibmb.2020.103387.
- Jolivet, Pierre, and Krishna Verma. 2008. "Eumolpinae – a Widely Distributed and Much Diversified Subfamily of Leaf Beetles (Coleoptera, Chrysomelidae)." *Terrestrial Arthropod Reviews* 1(1):3–37. doi: 10.1163/187498308x345424.
- Jorgensen, Peter L., Kjell O. Håkansson, and Steven J. D. Karlish. 2003. "Structure and Mechanism of Na,K-ATPase: Functional Sites and Their Interactions." *Annual Review of Physiology* 65:817–49. doi: 10.1146/annurev.physiol.65.092101.142558.
- Karageorgi, Marianthi, Simon C. Groen, Fidan Sumbul, Julianne N. Pelaez, I. Kirsten, Jessica M. Aguilar, Amy P. Hastings, Susan L. Bernstein, Michael Astourian, Geno Guerra, Felix Rico, Susanne Dobler, A. Anurag, and Noah K. Whiteman. 2020. *Monarch Butterfly*. Vol. 574.
- Karowe, David N., and Victoria Golston. 2006. "Effect of the Cardenolide Digitoxin on Performance of Gypsy Moth (*Lymantria Dispar*) (Lepidoptera: Lymantriidae) Caterpillars." *Great Lakes Entomologist* 39(1–2):34–39.
- Kim, In Wha, Xiang Hong Peng, Zuben E. Sauna, Peter C. FitzGerald, Di Xia, Marianna Müller, Krishnamachary Nandigama, and Suresh V. Ambudkar. 2006. "The Conserved Tyrosine Residues 401 and 1044 in ATP Sites of Human P-Glycoprotein Are Critical for ATP Binding and Hydrolysis: Evidence for a Conserved Subdomain, the A-Loop in the ATP-Binding Cassette." *Biochemistry* 45(24):7605–16. doi: 10.1021/bi060308o.
- Koch, Vanessa, Martin Nieger, and Stefan Bräse. 2020. "Towards the Synthesis of Calotropin and Related Cardenolides from 3-Epiandrosterone: A-Ring Related Modifications." *Organic Chemistry Frontiers* 7(18):2670–81. doi: 10.1039/d0qo00269k.
- Kowalski, Paulina, Michael Baum, Marcel Körten, Alexander Donath, and Susanne Dobler. 2020. "ABCB Transporters in a Leaf Beetle Respond to Sequestered Plant Toxins." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 287(1934):1–9. doi: 10.1098/rspb.2020.1311.
- Labeyrie, E, and S. Dobler. 2004. "Molecular Adaptation of Chrysochus Leaf Beetles to Toxic Compounds in Their Food Plants." *Mol Biol Evol* 21(2):218–21. doi: 10.1093/molbev/msg240.
- Labeyrie, Estelle, and Susanne Dobler. 2004. "Molecular Adaptation of Chrysochus Leaf Beetles to Toxic Compounds in Their Food Plants." *Molecular Biology and Evolution* 21(2):218–21. doi: 10.1093/molbev/msg240.
- de Lannoy, Inés A. M., and Melvin Silverman. 1992. "The MDR1 Gene Product, P-Glycoprotein, Mediates the Transport of the Cardiac Glycoside, Digoxin." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 189(1):551–57. doi: 10.1016/0006-291X(92)91593-F.

- Laukkanen, Liisa, Roosa Leimu, Anne Muola, Marianna Lilley, Juha Pekka Salminen, and Pia Mutikainen. 2012. "Plant Chemistry and Local Adaptation of a Specialized Folivore." *PLoS ONE* 7(5). doi: 10.1371/journal.pone.0038225.
- Limmer, Stefanie, Astrid Weiler, Anne Volkenhoff, Felix Babatz, and Christian Klämbt. 2014. "The Drosophila Blood-Brain Barrier: Development and Function of a Glial Endothelium." *Frontiers in Neuroscience* 8(OCT):1–19. doi: 10.3389/fnins.2014.00365.
- Linton, Kenneth J. 2007. "Structure and Function of ABC Transporters." *Physiology* 22(2):122–30. doi: 10.1152/physiol.00046.2006.
- Litman, Thomas, Thomas Zeuthen, Torben Skovsgaard, and Wilfred D. Stein. 1997. "Structure-Activity Relationships of P-Glycoprotein Interacting Drugs: Kinetic Characterization of Their Effects on ATPase Activity." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1361(2):159–68. doi: 10.1016/S0925-4439(97)00026-4.
- Liu, Guichun, Wei Liu, Ruoping Zhao, Jinwu He, Zhiwei Dong, Lei Chen, Wenting Wan, Zhou Chang, Wen Wang, and Xueyan Li. 2021. "Genome-Wide Identification and Gene-Editing of Pigment Transporter Genes in the Swallowtail Butterfly *Papilio Xuthus*." *BMC Genomics* 22(1):1–18. doi: 10.1186/s12864-021-07400-z.
- Liu, Leilei, Zuwen Chen, Yanchao Yang, Yutao Xiao, Chenxi Liu, Yuemin Ma, Mario Soberón, Alejandra Bravo, Yongbo Yang, and Kaiyu Liu. 2018. "AC SC." *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. doi: 10.1016/j.ibmb.2018.06.004.
- Liu, Shumin, Shun Zhou, Ling Tian, Enen Guo, Yunxia Luan, Jianzhen Zhang, and Sheng Li. 2011. "Genome-Wide Identification and Characterization of ATP-Binding Cassette Transporters in the Silkworm, *Bombyx Mori*." *BMC Genomics* 12(October):0–14. doi: 10.1186/1471-2164-12-491.
- Liu, Wenbin, Xiaoya Sun, Wenwen Sun, Anmo Zhou, Ruoqun Li, Bin Wang, Xun Li, and Chuncai Yan. 2021. "Genome-Wide Analyses of ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Gene Family and Its Expression Profile Related to Deltamethrin Tolerance in Non-Biting Midge *Propisilocerus Akamusi*." *Aquatic Toxicology* 239(August):105940. doi: 10.1016/j.aquatox.2021.105940.
- Liu, Xiao Qiang, Hong Bo Jiang, Ying Xiong, Peng Peng, Hong Fei Li, Guo Rui Yuan, Wei Dou, and Jin Jun Wang. 2019. "Genome-Wide Identification of ATP-Binding Cassette Transporters and Expression Profiles in the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina Citri*, Exposed to Imidacloprid." *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics* 30:305–11. doi: 10.1016/j.cbd.2019.04.003.
- Lohr, Jennifer N., Fee Meinzer, Safaa Dalla, Renja Romey-Glusing, and Susanne Dobler. 2017. "The Function and Evolutionary Significance of a Triplicated Na,K-ATPase Gene in a Toxin-Specialized Insect." *BMC Evolutionary Biology* 17(1):1–10. doi: 10.1186/s12862-017-1097-6.
- Loo, Tip W., M. Claire Bartlett, and David M. Clarke. 2004. "Disulfide Cross-Linking Analysis Shows That Transmembrane Segments 5 and 8 of Human P-Glycoprotein Are Close Together on the Cytoplasmic Side of the Membrane." *Journal of Biological Chemistry* 279(9):7692–97. doi: 10.1074/jbc.M311825200.
- Loo, Tip W., M. Claire Bartlett, and David M. Clarke. 2006. "Transmembrane Segment 1 of

- Human P-Glycoprotein Contributes to the Drug-Binding Pocket." 545:537–45. doi: 10.1042/BJ20060012.
- Loo, Tip W., M. Claire Bartlett, and David M. Clarke. 2006. "Transmembrane Segment 7 of Human P-Glycoprotein Forms Part of the Drug-Binding Pocket." *Biochemical Journal* 399(2):351–59. doi: 10.1042/BJ20060715.
- Loo, Tip W., and David M. Clarke. 2005. "Do Drug Substrates Enter the Common Drug-Binding Pocket of P-Glycoprotein through 'Gates'?" *Biochemical and Biophysical Research Communications* 329(2):419–22. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.01.134.
- Loo, Tip W., and David M. Clarke. 2008. "Mutational Analysis of ABC Proteins." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 476(1):51–64. doi: 10.1016/j.abb.2008.02.025.
- Loo, Tip W., and David M. Clarke. 2015. "Mapping the Binding Site of the Inhibitor Tariquidar That Stabilizes the First Transmembrane Domain Of." 290(49):29389–401. doi: 10.1074/jbc.M115.695171.
- Maddrell, S. H., and B. O. Gardiner. 1976. "Excretion of Alkaloids by Malpighian Tubules of Insects." *Journal of Experimental Biology* 64(2):267–81. doi: 10.1242/jeb.64.2.267.
- Malcolm, S. B., and L. P. Brower. 1989. "Evolutionary and Ecological Implications of Cardenolide Sequestration in the Monarch Butterfly." *Experientia* 45(3):284–95. doi: 10.1007/bf01951814.
- MALCOLM, STEPHEN B. 1991. *Cardenolide-Mediated Interactions between Plants and Herbivores*.
- Mayer, F, N. Mayer, L. Chinn, R. L. Pinsonneault, D. Kroetz, and R. J. Bainton. 2009. "Evolutionary Conservation of Vertebrate Blood-Brain Barrier Chemoprotective Mechanisms in Drosophila." *J Neurosci* 29(11):3538–50. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5564-08.2009.
- Mayer, Fahima, Nasima Mayer, Leslie Chinn, Robert L. Pinsonneault, Deanna Kroetz, and Roland J. Bainton. 2009. "Evolutionary Conservation of Vertebrate Blood-Brain Barrier Chemoprotective Mechanisms in Drosophila." *J Neurosci* 29(11):3538–50. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5564-08.2009.
- Meredith, J., L. Moore, and G. G. E. Scudder. 1984. "Excretion of Ouabain by Malpighian Tubules of *Oncopeltus Fasciatus*." *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 15(5). doi: 10.1152/ajpregu.1984.246.5.r705.
- Merzendorfer, Hans. 2014. *ABC Transporters and Their Role in Protecting Insects from Pesticides and Their Metabolites*. Vol. 46. 1st ed. Elsevier Inc.
- Mithöfer, Axel, and Wilhelm Boland. 2012. "Plant Defense against Herbivores: Chemical Aspects." *Annual Review of Plant Biology* 63:431–50. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103854.
- Mohammadi, Shabnam, Halil İbrahim Özdemir, Pemra Ozbek, Fidan Sumbul, Josefin Stiller, Yuan Deng, Andrew J. Crawford, Hannah M. Rowland, Jay F. Storz, Peter Andolfatto, and Susanne Dobler. 2022. "Epistatic Effects Between Amino Acid Insertions and Substitutions Mediate Toxin Resistance of Vertebrate Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPases." *Molecular Biology and Evolution* 39(12):1–13. doi: 10.1093/molbev/msac258.

- Moitra, Karobi, and Michael Dean. 2011. "Evolution of ABC Transporters by Gene Duplication and Their Role in Human Disease." *Biological Chemistry* 392(1–2):29–37. doi: 10.1515/BC.2011.006.
- Moore, Lynn V., and G. G. E. Scudder. 1986. "Ouabain-Resistant Na,K-ATPases and Cardenolide Tolerance in the Large Milkweed Bug, *Oncopeltus Fasciatus*." *Journal of Insect Physiology* 32(1):27–33. doi: 10.1016/0022-1910(86)90154-X.
- Morita, Masashi, and Tsuneo Imanaka. 2012. "Peroxisomal ABC Transporters: Structure, Function and Role in Disease." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1822(9):1387–96. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.02.009.
- Muola, Anne, Pia Mutikainen, Marianna Lilley, Liisa Laukkanen, Juha Pekka Salminen, and Roosa Leimu. 2010. "Associations of Plant Fitness, Leaf Chemistry, and Damage Suggest Selection Mosaic in Plant-Herbivore Interactions." *Ecology* 91(9):2650–59. doi: 10.1890/09-0589.1.
- Murray, Christine L., Michele Quaglia, Jon T. Arnason, and Catherine E. Morris. 1994. "A Putative Nicotine Pump at the Metabolic Blood–Brain Barrier of the Tobacco Hornworm." *Journal of Neurobiology* 25(1):23–34. doi: 10.1002/neu.480250103.
- Opitz, Sebastian E. W., and Caroline Müller. 2009. "Plant Chemistry and Insect Sequestration." *Chemoecology* 19(3):117–54. doi: 10.1007/s00049-009-0018-6.
- Özvegy, Csilla, András Varadi, and Balázs Sarkadi. 2002. "Characterization of Drug Transport, ATP Hydrolysis, and Nucleotide Trapping by the Human ABCG2 Multidrug Transporter. Modulation of Substrate Specificity by a Point Mutation." *Journal of Biological Chemistry* 277(50):47980–90. doi: 10.1074/jbc.M207857200.
- Pál, Á., D. Méhn, É. Molnár, S. Gedey, P. Mészáros, T. Nagy, H. Glavinas, T. Janáky, O. von Richter, G. Báthori, L. Szente, and Peter Krajcsi. 2007. "Cholesterol Potentiates ABCG2 Activity in a Heterologous Expression System: Improved in Vitro Model to Study Function of Human ABCG2." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 321(3):1085–94. doi: 10.1124/jpet.106.119289.
- Peelman, Frank, Christine Labeur, Berlinda Vanloo, Stein Roosbeek, Catherine Devaud, Nicolas Duverger, Patrice Denèfle, Marie Rosier, Joël Vandekerckhove, and Maryvonne Rosseneu. 2003. "Characterization of the ABCA Transporter Subfamily: Identification of Prokaryotic and Eukaryotic Members, Phylogeny and Topology." *Journal of Molecular Biology* 325(2):259–74. doi: 10.1016/S0022-2836(02)01105-1.
- Peterson, Merrill A., Susanne Dobler, Jeff Holland, Lauren Tantalo, and Stefanie Locke. 2001. "Behavioral, Molecular, and Morphological Evidence for a Hybrid Zone between *Chrysochus Auratus* and *C. Cobaltinus* (Coleoptera: Chrysomelidae)." *Annals of the Entomological Society of America* 94(1):1–9. doi: 10.1603/0013-8746(2001)094[0001:BMAMEF]2.0.CO;2.
- Petschenka, Georg, and Anurag A. Agrawal. 2015. "Milkweed Butterfly Resistance to Plant Toxins Is Linked to Sequestration, Not Coping with a Toxic Diet." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282(1818). doi: 10.1098/rspb.2015.1865.
- Petschenka, Georg, and Anurag A. Agrawal. 2016. "How Herbivores Coopt Plant Defenses: Natural Selection, Specialization, and Sequestration." *Current Opinion in Insect Science*

14(January):17–24. doi: 10.1016/j.cois.2015.12.004.

- Petschenka, Georg, and Susanne Dobler. 2009. "Target-Site Sensitivity in a Specialized Herbivore towards Major Toxic Compounds of Its Host Plant: The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase of the Oleander Hawk Moth (*Daphnis nerii*) Is Highly Susceptible to Carden." *Chemoecology* 19(4):235–39. doi: 10.1007/s00049-009-0025-7.
- Petschenka, Georg, Steffi Fandrich, Nils Sander, Vera Wagschal, Michael Boppré, and Susanne Dobler. 2013. "Stepwise Evolution of Resistance to Toxic Cardenolides via Genetic Substitutions in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase of Milkweed Butterflies (Lepidoptera: Danaini)." *Evolution* 67(9):2753–61. doi: 10.1111/evo.12152.
- Petschenka, Georg, Christian Pick, Vera Wagschal, and Susanne Dobler. 2013. "Functional Evidence for Physiological Mechanisms to Circumvent Neurotoxicity of Cardenolides in an Adapted and a Non-Adapted Hawk-Moth Species." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280(1759). doi: 10.1098/rspb.2012.3089.
- Petschenka, Georg, Vera Wagscha, Michael Von Tschirnhaus, Alexander Donath, and Susanne Dobler. 2017. "Convergently Evolved Toxic Secondary Metabolites in Plants Drive the Parallel Molecular Evolution of Insect Resistance." *American Naturalist* 190(august):S29–43. doi: 10.1086/691711.
- Pinsonneault, R. L., N. Mayer, F. Mayer, N. Tegegn, and R. J. Bainton. 2011. "Novel Models for Studying the Blood-Brain and Blood-Eye Barriers in *Drosophila*." *Methods Mol Biol* 686:357–69. doi: 10.1007/978-1-60761-938-3\_17.
- Polli, Joseph W., Stephen A. Wring, Joan E. Humphreys, Liyue Huang, Jonathon B. Morgan, Lindsey O. Webster, and Cosette S. Serabjit-Singh. 2001. "Rational Use of in Vitro P-Glycoprotein Assays in Drug Discovery." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299(2):620–28.
- Popovic, Marta, Roko Zaja, Karl Fent, and Tvrtko Smital. 2013. "Molecular Characterization of Zebrafish Oatp1d1 (Slco1d1), a Novel Organic Anion-Transporting Polypeptide." *Journal of Biological Chemistry* 288(47):33894–911. doi: 10.1074/jbc.M113.518506.
- Porretta, Daniele, Sara Epis, Valentina Mastrantonio, Marco Ferrari, Romeo Bellini, Guido Favia, and Sandra Urbanelli. 2016. "How Heterogeneous Is the Involvement of ABC Transporters against Insecticides?" *Acta Tropica* 157:131–35. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.02.002.
- Rao, V. V., M. L. Chiu, J. F. Kronauge, and D. Piwnica-Worms. 1994. "Expression of Recombinant Human Multidrug Resistance P-Glycoprotein in Insect Cells Confers Decreased Accumulation of Technetium-99m-Sestamibi." *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 35(3):510–15.
- Rautio, Jarkko, Joan E. Humphreys, Lindsey O. Webster, Anand Balakrishnan, John P. Keogh, Jeevan R. Kunta, Cosette J. Serabjit-singh, and Joseph W. Polli. 2006. "In Vitro P-Glycoprotein Inhibition Assays for Assessment of Clinical Drug Interaction Potential of New Drug Candidates: A Recommendation for Probe Substrates." *Drug Metabolism and Disposition* 34(5):786–92. doi: 10.1124/dmd.105.008615.
- Rees, Douglas C., Eric Johnson, and Oded Lewinson. 2009. "ABC Transporters: The Power to

- Change." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(3):218–27. doi: 10.1038/nrm2646.
- Reichstein, T. 1888. "21. Die Cardenolide Von." 202–19.
- Repke, K. R. H. 1985. "New Developments in Cardiac Glycoside Structure-Activity Relationships." (July):275–78.
- Rösner, Janin, and Hans Merzendorfer. 2020. "Transcriptional Plasticity of Different ABC Transporter Genes from *Tribolium Castaneum* Contributes to Diflubenzuron Resistance." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 116:103282. doi: 10.1016/j.ibmb.2019.103282.
- Rossi, Marta, Davide De Battisti, and Jeremy Edward Niven. 2019. "Transepithelial Transport of P-Glycoprotein Substrate by the Malpighian Tubules of the Desert Locust." *PLoS ONE* 14(10):1–23. doi: 10.1371/journal.pone.0223569.
- Rossi, Marta, Swidbert R. Ott, and Jeremy E. Niven. 2020. "Malpighamoeba Infection Compromises Fluid Secretion and P-Glycoprotein Detoxification in Malpighian Tubules." *Scientific Reports* 10(1):1–12. doi: 10.1038/s41598-020-72598-z.
- Rule, Chelsea S., Marcella Patrick, and Maria Sandkvist. 2016. "Measuring in Vitro ATPase Activity for Enzymatic Characterization." *Journal of Visualized Experiments* 2016(114):3–7. doi: 10.3791/54305.
- Safa, Ahmad R. 1998. "[21] Photoaffinity Labels for Characterizing Drug Interaction Sites of P-Glycoprotein." Pp. 289–307 in.
- Saier, Milton H., Vamsee S. Reddy, Gabriel Moreno-Hagelsieb, Kevin J. Hendargo, Yichi Zhang, Vasu Iddamsetty, Katie Jing Kay Lam, Nuo Tian, Steven Russum, Jianing Wang, and Arturo Medrano-Soto. 2021. "The Transporter Classification Database (TCDB): 2021 Update." *Nucleic Acids Research* 49(D1):D461–67. doi: 10.1093/nar/gkaa1004.
- Sarkadi, B., E. M. Price, R. C. Boucher, U. A. Germann, and G. A. Scarborough. 1992. "Expression of the Human Multidrug Resistance cDNA in Insect Cells Generates a High Activity Drug-Stimulated Membrane ATPase." *Journal of Biological Chemistry* 267(7):4854–58.
- Sarkadi, Balázs, László Homolya, Gergely Szakács, and András Váradi. 2006. "Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System." *Physiological Reviews* 86(4):1179–1236. doi: 10.1152/physrev.00037.2005.
- Scarborough, Gene A. 1995. "Drug-Stimulated ATPase Activity of the Human P-Glycoprotein." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 27(1):37–41. doi: 10.1007/BF02110329.
- Schinkel, Alfred H., and Johan W. Jonker. 2003. "Mammalian Drug Efflux Transporters of the ATP Binding Cassette (ABC) Family: An Overview." *Advanced Drug Delivery Reviews* 55(1):3–29. doi: 10.1016/S0169-409X(02)00169-2.
- Schmidt, Lydia, Natalie Wielsch, Ding Wang, Wilhelm Boland, and Antje Burse. 2019. "Tissue-Specific Profiling of Membrane Proteins in the Salicin Sequestering Juveniles of the Herbivorous Leaf Beetle, *Chrysomela Populi*." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 109(December 2018):81–91. doi: 10.1016/j.ibmb.2019.03.009.

- Scholz, Judith, and Sabine Suppmann. 2017. "A New Single-Step Protocol for Rapid Baculovirus-Driven Protein Production in Insect Cells." *BMC Biotechnology* 17(1):1–9. doi: 10.1186/s12896-017-0400-3.
- Schönfeld, Werner, Jürgen Weiland, Claus Lindig, Marek Masnyk, Marek M. Kabat, Alicja Kurek, Jerzy Wicha, and Kurt R. H. Repke. 1985. "The Lead Structure in Cardiac Glycosides Is 5  $\beta$ ,14  $\beta$ -Androstane-3  $\beta$ ,14-Diol." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 329(4):414–26. doi: 10.1007/BF00496377.
- Scudder, G. G. E., and J. Meredith. 1982. "The Permeability of the Midgut of Three Insects to Cardiac Glycosides." *Journal of Insect Physiology* 28(8):689–94. doi: 10.1016/0022-1910(82)90147-0.
- Shukla, Suneet, Candice Schwartz, Khyati Kapoor, Abdul Kouanda, and Suresh V. Ambudkar. 2012. "Use of Baculovirus BacMam Vectors for Expression of ABC Drug Transporters in Mammalian Cells." *Drug Metabolism and Disposition* 40(2):304–12. doi: 10.1124/dmd.111.042721.
- Shukle, Richard H., Mikio Yoshiyama, Philip K. Morton, Alisha J. Johnson, and Brandon J. Schemerhorn. 2008. "Tissue and Developmental Expression of a Gene from Hessian Fly Encoding an ABC-Active-Transporter Protein: Implications for Malpighian Tubule Function during Interactions with Wheat." *Journal of Insect Physiology* 54(1):146–54. doi: 10.1016/j.jinsphys.2007.08.012.
- Smilanich, Angela M., Lee A. Dyer, Jeffrey Q. Chambers, and M. Deane Bowers. 2009. "Immunological Cost of Chemical Defence and the Evolution of Herbivore Diet Breadth." *Ecology Letters* 12(7):612–21. doi: 10.1111/j.1461-0248.2009.01309.x.
- Solbreck, Christer, and Birgitta Sillén-Tullberg. 1990. "Population Dynamics of a Seed Feeding Bug, *Lygaeus Equestris*. 1. Habitat Patch Structure and Spatial Dynamics." Author (s): Christer Solbreck and Birgitta Sillén-Tullberg. Published by: Wiley on Behalf of Nordic Society Oikos. Stable URL: <https://www.jstor.org/stable/3588221>. 58(2):199–209.
- Strauss, Anja S., Sven Peters, Wilhelm Boland, and Antje Burse. 2013. "ABC Transporter Functions as a Pacemaker for Sequestration of Plant Glucosides in Leaf Beetles." *eLife* 2(2):1–16. doi: 10.7554/eLife.01096.
- Strauss, Anja S., Sven Peters, Wilhelm Boland, Antje Burse, and Marcel Dicke. 2013. "ABC Transporter Functions as a Pacemaker for Sequestration of Plant Glucosides in Leaf Beetles." *eLife* 2(2):1–16. doi: 10.7554/eLife.01096.
- Strauss, Anja S., Ding Wang, Magdalena Stock, René R. Gretscher, Marco Groth, Wilhelm Boland, and Antje Burse. 2014. "Tissue-Specific Transcript Profiling for ABC Transporters in the Sequestering Larvae of the Phytophagous Leaf Beetle *Chrysomela Populi*." *PLoS ONE* 9(6). doi: 10.1371/journal.pone.0098637.
- Sturm, Armin, Phil Cunningham, and Michael Dean. 2009. "The ABC Transporter Gene Family of *Daphnia Pulex*." *BMC Genomics* 10:1–18. doi: 10.1186/1471-2164-10-170.
- Tanigawara, Y., N. Okamura, M. Hirai, M. Yasuhara, K. Ueda, N. Kioka, T. Komano, and R. Hori. 1992. "Transport of Digoxin by Human P-Glycoprotein Expressed in a Porcine Kidney Epithelial Cell Line (LLC-PK1)." *J Pharmacol Exp Ther* 263(2):840–45.

- Tapadia, Madhu G., and S. C. Lakhota. 2005. "Expression of Mdr49 and Mdr65 Multidrug Resistance Genes in Larval Tissues of *Drosophila Melanogaster* under Normal and Stress Conditions." *Cell Stress and Chaperones* 10(1):7–11. doi: 10.1379/CSC-67R.1.
- Tarr, Paul T., Elizabeth J. Tarling, Dragana D. Bojanic, Peter A. Edwards, and Ángel Baldán. 2009. "Emerging New Paradigms for ABCG Transporters." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791(7):584–93. doi: 10.1016/j.bbalip.2009.01.007.
- Tay, Wee Tek, Rod J. Mahon, David G. Heckel, Thomas K. Walsh, Sharon Downes, William J. James, Sui Fai Lee, Annette Reineke, Adam K. Williams, and Karl H. J. Gordon. 2015. "Insect Resistance to *Bacillus Thuringiensis* Toxin Cry2Ab Is Conferred by Mutations in an ABC Transporter Subfamily A Protein." *PLoS Genetics* 11(11):1–23. doi: 10.1371/journal.pgen.1005534.
- Termonia, Arnaud, Ting H. Hsiao, Jacques M. Pasteels, and Michel C. Milinkovitch. 2001. "Feeding Specialization and Host-Derived Chemical Defense in Chrysomeline Leaf Beetles Did Not Lead to an Evolutionary Dead End." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(7):3909–14. doi: 10.1073/pnas.061034598.
- Termonia, Arnaud, Jacques M. Pasteels, Donald M. Windsor, and Michel C. Milinkovitch. 2002. "Dual Chemical Sequestration: A Key Mechanism in Transitions among Ecological Specialization." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 269(1486):1–6. doi: 10.1098/rspb.2001.1859.
- Theodoulou, Frederica L., and Ian D. Kerr. 2015. "ABC Transporter Research: Going Strong 40 Years On." *Biochemical Society Transactions* 43:1033–40. doi: 10.1042/BST20150139.
- Torrie, Leah S., Jonathan C. Radford, Tony D. Southall, Laura Kean, Andrew J. Dinsmore, Shireen A. Davies, and Julian A. T. Dow. 2004. *Resolution of the Insect Ouabain Paradox*. Vol. 101. 2004/09/07. doi: 10.1073/pnas.0403087101.
- Tullberg, Birgitta S., Gabriella Gamberale-Stille, and Christer Solbreck. 2000. "Effects of Food Plant and Group Size on Predator Defence: Differences between Two Co-Occurring Aposematic Lygaeinae Bugs." *Ecological Entomology* 25(2):220–25. doi: 10.1046/j.1365-2311.2000.00238.x.
- Urbatsch, I. L., B. Sankaran, J. Weber, and A. E. Senior. 1995. "P-Glycoprotein Is Stably Inhibited by Vanadate-Induced Trapping of Nucleotide at a Single Catalytic Site." *Journal of Biological Chemistry* 270(33):19383–90.
- Urbatsch, Ina L., and Alan E. Senior. 1995. "Effects of Lipids on ATPase Activity of Purified Chinese Hamster P-Glycoprotein." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 316(1):135–40.
- Vaughan, Gerald L., and Arthur M. Jungreis. 1977. "Insensitivity of Lepidopteran Tissues to Ouabain: Physiological Mechanisms for Protection from Cardiac Glycosides." *J Insect Physiol* 23(5):585–89. doi: 10.1016/0022-1910(77)90052-X.
- Verma, R., E. Boleti, and A. J. T. George. 1998. "Antibody Engineering: Comparison of Bacterial, Yeast, Insect and Mammalian Expression Systems." *Journal of Immunological Methods* 216(1–2):165–81. doi: 10.1016/S0022-1759(98)00077-5.

- Wanders, Ronald J. A., Wouter F. Visser, Carlo W. T. Van Roermund, Stephan Kemp, and Hans R. Waterham. 2007. "The Peroxisomal ABC Transporter Family." *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* 453(5):719–34. doi: 10.1007/s00424-006-0142-x.
- Wiegrebe, Von Wolfgang, Ludwig Faber, Hans Brockmann, and Herbert Budzikiewicz. 1969. "Alkaloide Aus." 162:154–62.
- Wilde, Monika, Miriam Klausberger, Dieter Palmberger, Wolfgang Ernst, and Reingard Grabherr. 2014. "Tnao38, High Five and Sf9-Evaluation of Host-Virus Interactions in Three Different Insect Cell Lines: Baculovirus Production and Recombinant Protein Expression." *Biotechnology Letters* 36(4):743–49. doi: 10.1007/s10529-013-1429-6.
- Wong, Kelvin, Jerome Ma, Alice Rothnie, Philip C. Biggin, and Ian D. Kerr. 2014. "Towards Understanding Promiscuity in Multidrug Efflux Pumps." *Trends in Biochemical Sciences* 39(1):8–16. doi: 10.1016/j.tibs.2013.11.002.
- Wu, C. T., M. Budding, M. S. Griffin, and J. M. Croop. 1991. "Isolation and Characterization of Drosophila Multidrug Resistance Gene Homologs." *Molecular and Cellular Biology* 11(8):3940–48. doi: 10.1128/mcb.11.8.3940-3948.1991.
- Wu, Chao, Swapan Chakrabarty, Minghui Jin, Kaiyu Liu, and Yutao Xiao. 2019. "Insect ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters: Roles in Xenobiotic Detoxification and Bt Insecticidal Activity." *International Journal of Molecular Sciences* 20(11):12–14. doi: 10.3390/ijms20112829.
- Xiao, Kai Ran, Chao Yan Wu, Lin Yang, Jun Wang, Qi Sheng Song, David Stanley, Shu Jun Wei, and Jia Ying Zhu. 2022. "Comparative Genomic Analysis of ABC Transporter Genes in Tenebrio Molitor and Four Other Tenebrionid Beetles (Coleoptera: Tenebrionidea)." *Archives of Insect Biochemistry and Physiology (May)*:1–14. doi: 10.1002/arch.21916.
- Xiong, Jie, Jinmei Feng, Dongxia Yuan, Jun Zhou, and Wei Miao. 2015. "Tracing the Structural Evolution of Eukaryotic ATP Binding Cassette Transporter Superfamily." *Scientific Reports* 5:1–15. doi: 10.1038/srep16724.
- You, Minsheng, Zhen Yue, Weiyi He, Xinhua Yang, Guang Yang, Miao Xie, Dongliang Zhan, Simon W. Baxter, Liette Vasseur, Geoff M. Gurr, Carl J. Douglas, Jianlin Bai, Ping Wang, Kai Cui, Shiguo Huang, Xianchun Li, Qing Zhou, Zhangyan Wu, Qilin Chen, Chunhui Liu, Bo Wang, Xiaojing Li, Xiufeng Xu, Changxin Lu, Min Hu, John W. Davey, Sandy M. Smith, Mingshun Chen, Xiaofeng Xia, Weiqi Tang, Fushi Ke, Dandan Zheng, Yulan Hu, Fengqin Song, Yanchun You, Xiaoli Ma, Lu Peng, Yunkai Zheng, Yong Liang, Yaqiong Chen, Liying Yu, Younan Zhang, Yuanyuan Liu, Guoqing Li, Lin Fang, Jingxiang Li, Xin Zhou, Yadan Luo, Caiyun Gou, Junyi Wang, Jian Wang, Huanming Yang, and Jan Wang. 2013. "A Heterozygous Moth Genome Provides Insights into Herbivory and Detoxification." *Nature Genetics* 45(2):220–25. doi: 10.1038/ng.2524.
- Zeino, Maen, Mohamed E. M. Saeed, Onat Kadioglu, and Thomas Efferth. 2014. "The Ability of Molecular Docking to Unravel the Controversy and Challenges Related to P-Glycoprotein - A Well-Known, yet Poorly Understood Drug Transporter." *Investigational New Drugs* 32(4):618–25. doi: 10.1007/s10637-014-0098-1.
- Zhang, Yan, Corbin Bachmeier, and Donald W. Miller. 2003. "In Vitro and in Vivo Models for Assessing Drug Efflux Transporter Activity." *Advanced Drug Delivery Reviews* 55(1):31–

51. doi: 10.1016/S0169-409X(02)00170-9.

Zhen, Ying, Matthew L. Aardema, Edgar M. Medina, Molly Schumer, and Peter Andolfatto. 2012. "Parallel Molecular Evolution in an Herbivore Community." *Science* 337(6102):1634–37. doi: 10.1126/science.1226630.

Zolnerciks, Joseph K., Edward J. Andress, Michael Nicolaou, and Kenneth J. Linton. 2011. "Structure of ABC Transporters." *Essays in Biochemistry* 50(1):43–61. doi: 10.1042/BSE0500043.

Züst, Tobias, Georg Petschenka, Amy P. Hastings, and Anurag A. Agrawal. 2019. "Toxicity of Milkweed Leaves and Latex: Chromatographic Quantification Versus Biological Activity of Cardenolides in 16 *Asclepias* Species." *Journal of Chemical Ecology* 45(1):50–60. doi: 10.1007/s10886-018-1040-3.

Zutz, Ariane, Simone Gompf, Hermann Schägger, and Robert Tampé. 2009. "Mitochondrial ABC Proteins in Health and Disease." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1787(6):681–90. doi: 10.1016/j.bbabi.2009.02.009.

## 6. Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

A/a	Adenosin
Abb.	Abbildung
AcMNPV	<i>Autografica californica</i> Multiple Polyhedrose Virus
ABC-Transporter	ATP-Binding Cassette Transporter
ad.	Adde (aufgefüllt)
ADP	Adenosindiphosphat
Ala	Alanin
Arg	Arginin
AS	Aminosäure/n
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosidtriphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar/e
BSA	bovine serum albumin (Bovines Serumalbumin/ Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C/c	Cytosin
ca.	circa
<i>Casc.</i>	<i>Chrysochus asclepiadeus</i>
<i>Cau</i>	<i>Chrysochus auratus</i>
<i>Cpop</i>	<i>Chrysomela populi</i>
cDNA	complementary Desoxyribinucleic acid
CoCl <sub>2</sub>	Cobaltchlorid
Cy3	Indocarbocyanin 3
Cys	Cystein
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4,6_Diamindin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleotid
DTT	Dithothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycolbistetraessigsäure
<i>Et al.</i>	<i>Et alii/ et aliae</i>
G/g	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GC-Gehalt	Anteil der Basen Guanin und Cytosin
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
H	Histidin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid

HCL	Salzsäure
His	Histidin
Hi5	aus High 5 Zellen (BTi-Tn-5B1-4) immortalisierte Insektenzellen
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IgG	Immunglobulin der Klasse G
Ile	Isoleucin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K	Kalium
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth-Medium</i>
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Max.	Maximum
MDR	multidrug-resistance
Met	Methionin
MRP	multidrug-resistance protein
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Min	Minute/n
MPH <sub>2</sub> O	Millipore-Wasser
Ms	Millisekunden
N	Asparagin
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBD	Nukleotidbindedomäne
Na,K-ATPase	Natrium-Kalium-Pumpe
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase-chain-reaction</i> (Polymerasen- Kettenreaktion)
PGP	P-Glycoproteine
Phe	Phenylalanin
PMSF	Phenylmethylsufonylflurid
Pro	Prolin
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
Rpm	rounds per minute (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumlaurylsulfat)
Ser	Serin
<i>Sf9</i>	aus <i>Spodoptera frugiperda</i> immortalisierte Zelllinie
SOC- Medium	Super optimal broth with Catabolite repression
T/t	Thymin
Tab	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-buffered-saline
TBST	Tris-buffered-saline + Tween20

TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
TMD	Transmembrandomäne
Thr	Threonin
Tris	Tris-aminomethan
Trp	Tryptophan
Tween 20	Polyoxyethylen-20-sorbitan-monolaurat
Tyr	Tyrosin
U	Units (Einheiten)
μ	Mikro
UTR	<i>untranslated region</i> (untranslatierter Bereich)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Val	Valin
VPI/II/III	Viruspassage eins/zwei/drei
x g	X-faches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5 Brom 4 chlor 3 indoxyl-β-D-galactopyranosid

## 6.2 *C. asclepiadeus* ABCB-Sequenzen

### >*Chrysochus asclepiadeus abcb1*

GGTACATATTTTTAGAAAATAATTGAAGTAACTGTTTTCAAT**ATG**AAAAATTCTATAATGACAGATGA  
AAAAGATGAAGCTGTTGAAACAAATACAAGGGCTAAGAAATCTTCAGCTAATGACTCTGTTCCATATT  
ACCGTTTGTTTCATCTACTCAACTGTTGTGGATCAAATCTGTATTGCAGTTGCTTCAATTTGTGCTTGTAT  
ATGTGGCGGAAGCCAGCCTTATATGATGATCATTTTTGGAGAAATAACTGGCAACATTGTTGACTACG  
CTACATTAGTGTCCAATGCAACAAATGAACTTATATAACAAGACCGAAATTACATACTTATAGATCAA  
GCCACAGACTTTGCAATCAAAGTTATAATTATTGGGATTATAACTATAACGACTTCTTATATATCAAGT  
TTGTTATTTAATTTCTCTGCTATAAGACAGATTTTTAAAATGAGGAAGAAATTTTTGGAGAAGACCTTA  
AACCAAGATGTGGAATGGTATGACTTAAATCCAGTTGGAGATTTTGCCACAACATTTACTCAAAAATAT  
TTCGAAAATTGAAGAAGGAATTGGTGAAGATTGGATTGTTTCTATTTTTGAGTCTACTTTTGTAGT  
TGGGGTAATATTGGCTCTAATAACAAGGATGGAAGTAGCATTAGTCTGTCTTGTCTCCTTACCCCTTTC  
TTCTATAATAATGGGTTTCATTACTTGGTTATCTACCAAATTTCTGAAAAAGAGTTAGAATCATATGC  
TGCCGCTGGCGCAATAGCTGAAGAAGTGCTTAGTTCTGTTAGAACAGTAGTGGCTTTTGTATGGGCAA  
GACAAAGAGATGGCAAGATATAACAAACATTTGATTCATGCCAAGAATAATAATATTTAAAGAACTTT  
GTTAATGCTTTGAGTAACGGATGCCTTTGGTTTTTTGTATATGCATGTTACGCTCTTTCTTTTTGGTAT  
GGGATTAATTAATTATTGATGAAAAGGAGCTAGCATCAGATGAAAGAGTTTATACTCCTGGAACAA  
TGGTTGGTGTATTTTTCTCAACCTTGATGGCATCTTGAATTTTGAATGGGAGCTCCTTTCTTAGAAA  
CTTTGGAGCAGCAAAAGGAGCAGCCAAAAGATTTTTAATATTCTTGAGAGTGAACCGAAAATTCA  
CAAACATAAAGACGTTGGCAAAAAAATCAATAAATTTAGAGTAGTATTGTATTTGAAAAGATCTCTT  
TCAGTTATCCATCTAGGCCAGATGTTGAGGTCCTTAAGGGATTTAATCTGAAAATTGAATGCGGAAAA  
ATTGTTGCACTGGTTGGAATTCTGGATGTGGTAAATCAACCTGTATTCAATTACTTCAGCGGTTTTAT  
GATCCATTACTAGGAAACATATTTGTTGATGGGATAAATATTAACAATTGAATATTTCTCAATGGAG  
AGAAAAATTAGGCGTGGTAAGTCAAGAACCTACATTATTTGCTACAACCATATCAGAGAATATCAGG  
TATGGCAAACCTGGCAGTAAGTCAACGGGAAATAGAAGAAGCAGCTAAGAAAGCCAATGCCACAAA  
TTTATAATGTGCTTACCACACGGATATCAAACCTGTAATTGGTGAAGAGGGCGCTCAGCTTTCTGGTGG  
CCAAAAACAAAGAATTGCTATAGCAAGAGCTTTGGTGAGAAAGCCAGAAATATTATTGTTAGATGAA  
GCTACTTCTGCACTAGATACAACCTAGTGAAGCAGAAGTTCAAACAGCCCTAGATTCGGTAAGTCATGA

GTGCACAACAATTATCGTAGCTCATCGGTTATCAACAATTAGAAAGGCTAATGTAATAGCATTGTTT  
CCGACGGTACAGTCATAGAGTATGGAACCTCATGCAGAACTAATGGCTGCACAAGGTGCATATTACAG  
GCTTGTTAGTTCACAAGGAATTACAGATATGTCTAATATTGCAGCAAATACTAAATTAGAAAGAACTC  
GGAGTTTATCAAATACATCGGAAGTTGACGAAGCAGATGAAGAAATTCCAGAAGAATTGGCAGTAG  
AAGAAATTATACATAAACCTAAAGGGACATTACTAAAAGTAATGAAAATAAACAGGAAGGAGTGGTT  
CCCCATTTGGTTGGGTGTATATCATCAATTCTTACTGGAGCTTCCTTGCCAGTATACGGATTAGTTTTT  
GGAGAAATAGTTGGAAAACCTGGACATAAAGGATAACGTAAAGCTACGATCAGAAAGTAACGTATCA  
TGTTTAACTTCCTCATTTTAGGAATTGTTACAGGTATAGCGATGTTTCTTCAGATGTTCTCTTTGGAT  
ATGCTGGTGA AAAACTCACTTTAAGGATTAGAAAAAACTTTTGAAGCAATGTTACACCAAGAAAT  
GGGTTGGTACGATAAAAAGAAAACGGTATTGGGTCATTATGTGCCCGATTGGCTGGAGATTACAGCT  
AGCGTTCAAGGAGCAGCTGGCGTTCAAATTGGTGCTTGTAAATTTTATATCAACATTTCTTATTGCA  
TCTATTTTTCTTTGTATTACGAATGGAAATTGACCCTGGTCTTACTTTCATTTTACCACTTATATTGAT  
CTCTATTTATTTAGAACAAAAGATGGTAAAAAATGACGCTAAACAAAATAGAAMAGTTTTAGAAAA  
TCTGCAAAGGTAGCTGTAGAAGCATTGGCCAACATTAGAACCCTAATCTCTTTGGGTTGTAAAATGT  
ATTTTTGGACTTATATGTTAAAGATTTAGTGCCTTATCAAAAATTGGCAAAGAAAAAAGCGCATTTTA  
GAGGTATGGTTTTGGGAATGGCCAGAAGTCTACTTTTGTGTTGCTTACGCTGCTGGTATAGCTTACGGC  
GTTCAATTGGTTATAAACCAAGTCATTGATTACGGAACAATGTTTAAAGGTCAATGAATGTATAATCGT  
AGGATCATGGTCAATAGGAACCGCTTTATCCGTTTCTCCTAATTTGCAGAAAGGCTTAGTTGCAGCAG  
AAAAAATATTTGCCCTTTGGAAAAGTTCGCTCATAAAAATACTCTCAATCCCATAAGGTCTTTTT  
GGACAAAAGAAGATGTTGAATATTCTCAAGTCTACTTTTCTTACCCTACCGTCCTTCAATTCCTGTTTT  
GAATTGCCTGAATCTTCTAATTCAAAGGGGAAAAACTGTTGCGTTAGTGGGATCTAGTGGTTGTGGA  
AAATCTACAATAATTCAGTTATTAGAAAAGATTCTACGATGCATCTTATGGAGAAATATCTATAGATGG  
GATTGAAACTAAAATGATGGATCTAAAACTCTCAGGATGCAGTTGGGTATAGTGTCTCAGGAACCA  
AATTTATTTGAAAAACTATTGCTGAAAATATAGCTTATGGAGCCAATCATCGCGATGTCAGCCTTGA  
TGAAATTGTTGAGGCAGCCAAAGCTGCTAATATCCATAATTTTATCGTCTCTTTGCCGACTGGTTATGA  
AACCAAAATAGGAAGTAAGGGTACTCAGTTATCGGGAGGCCAGAGACAGAGAATTGCTATTGCTAG  
AGCATTGGTGAGAAATCCAAAATTTTACTTCTCGATGAAGCTACCTCTGCATTGGACAACGAAAGTG  
AAAAGATCGTCCAAGAAGCTCTAGACAACGCACAAAAGGTAGAACTTGCATACCATAGCGCATAG  
ACTGACAACCATACAAAACGCTGATATCATATGTGTTCTAAAGGACGGATTTGTAGCTGAAATGGGC  
ACACATATACAACCTGCTAGAGAAAAGGGGTCAATATTATGAATTTTATAGATTACAACTGGCCACAA  
TTAAACCATTTTAAAAATTGAAGAAATGTAGTATAGGTACACATAAAAGCATGTTTGACCTATAAAAA  
TATGTAGTATTACTTTATGCCGG

> *Chrysochus asclepiadeus* ABCB1

MKNSIMTDEKDEAVETNTRAKKSSANDSVPPYRLFYISTVVDQICIAVASICACICGGSQPYYMMIIFGEITG  
NIVDYATLVSNAETNETYIQDRNYILIDQATDFAIKVIIIGIITITTSYISSLLFNFSAIRQIFKMRKKFLEKTLNQD  
VEWYDLNPVGDFAATFTQNISKIEGIGEKIGLFFESTFVVGVLALIQGWKLALVCLVSLPSSIIIMGFIT  
WLSTKFSEKELESYAAAGAAIEEVLSSVRTVVAFDGQDKEMARYNKHLIHAKNNNIKRTLFNALSNGCLW  
FFVYACYALSFWYGIKLIIDEKELASDERVYTPGTMVGVFFSTLMASWNFGMGAPFLETFGAAKGAQKIF  
NILESEPKIHKHKDVGKKINKFQSSIVFEKISFSYSPRPDVEVLKGFNLKIECGKIVALVGNISGCGKSTCIQLLQ  
RFYDPLLGNIFVDGINIKQLNISQWREKLGTVSVEPTLFATTISENIRYGLAVSQREIEEAANKANAHKFIM  
CLPHGYQTVIGERGAQLSGGQKQRIAIARALVRKPEILLDEATSALDITSEAEVQTALDSVSHECTTIIVAH  
RLSTIRKANVIAFVSDGTVIEYGTHAELMAAQGAYRLVSSQGITDMSNIAANTKLERTRLSNTSEVDEAD  
EIEPEELAVEEIIHKPKGTLLKVMKINRKEWFPILVGCISSILTASLPVYGLVFGIEVGLDKLDKDNVKLRS  
VSNLNFILGIVTGIAMFLQMFSGYAGEKLTLRIRKKTFEAMLHQEMGWYDKKENGIGSLCARLAGDSAS  
VQGAAGVQIGACLNFISTFLIASIFSLYEWKLTLLVLSFSPILISYILEQKVMKNDKQNRXVLEKSAKVAVE  
ALANIRTVISLGCENVFLDLYVKDLVPYQKLAKKKAHFRGMVLGMARSLLLFAYAAGIAYGVQLVINQVIDY  
GTMFKVNECIIVGSWSIGTALSVPNLQKGLVAAEKIFALLERIPLIKNTLNPISFWTKEDVEYSQVYFSYPT

RPSIPVLNCLNLLIQRGKTVALVGSSGCGKSTIIQLLERFYDASYGEISIDGIETKMMDLKLRLMQLGIVSQEP  
NLFKEDIAENIAYGANHRDVSLEIVEAAKAANIHFIVSLPTGYETKIGSKGTQLSGGQRQRIAIARALVRN  
PKILLDEATSALDNESEKIVQEALDNAQKGRTCITIAHRLTTIQNADIICVLKDGFAEMGTHIQLLEKRGQ  
YYEFYRLQGTGHN\*

> *Chrysochus asclepiadeus abcb2*

CCGACCGATTTATGTAAGTTTCAGTATGTTTTTGCAGCAAAATATTGATGTGTGTAACGGGCGTTTTAT  
TGAACATAGATTTTAGGCACTAATGGACAACAAGGAAATTATAAATAAAGACAAAGATAAAAGCCCT  
TTGGACATAGAATTTGTTAAACCAGAAGAAGAAAAACAAAATGTGGACGATAAAACATATTCATTTAT  
ACAACGTTCAGGTATAACACAGGACTCGACAGGTGTCTTATGTTTCATTGGCACTGCAGCAGCTCTTG  
CAACAGGGAGTATTCAACCTCTAAATTCATTCTTTACGGTGATTTGACAGGAAACATTATCGATTATT  
CAATAAAAGTACGCTACTCGAATGGATCTGAAGATATGTTAGATGAAGCCGGAGATGAACTTATTGG  
TCACGTCAAACACTTCGCCCTTATGAACAGCTTGATCGGTGTTTTCATACTAATTTGCAGTTACATTT  
AACGGCAACATTCAATTATACTGCGATGAGACAAGCGTTGAAGTTAAGGTCTATTTATTAGAAAAAA  
TTTTAAATCAAGATATACCTTGGTATGATACGAGGCAGATTGGAGATTTGCTAGTAGGATGGCTGAT  
GACATGTACAAATATGAAGACGGTATAGGAGAGAAAATCCCATGTTCTCACTTCCAAGCGATATT  
TGTAGCTGCAATGATAATTGCCTTAATTAAGGTTGGGAATTAGCCCTTGATGTCTGTCTTCTTACC  
AGCATCTTAATTGCATTGGGAATAGTGAGTTTTATTCTACAAAATTGGCAAAAAAGAATTAGAAG  
CTTATGGCGAAGCAGGAACAATTGCCGAAGAAGTACTTTCAGCCATCAGAACAGTGGTAGCATTGG  
TGGTCAAGAAAAAGAAGTGAAGATATGACGAGAAATTAATTTTTGCTAGACAAAACAACATCAAG  
AGATCCTTATTCAATGGTCTAAACATGGGAGTTCTCTGGCTCATAATTTACACAAGTTACGGTTGGCT  
TTTTGGTACGGAGTTGGTCTAATTCTGAAAGACAGAGACAAAATACTACTTATACCGTCTCTACT  
ATGATCACAGTTTTCTTAGCGTCATGAGCGGTTCCATGAACTTTGGAATATCGTCCCCATACATAGAA  
GCGTTTAGTATATCCAAAGCTGCAGGGTCTAACTATTTCAATTATCGACAACAAACCTGTTATTAAT  
TTGTCTAAAGGAAGAGGTCAAAAATACTGAATGATATCAAAGGAAACATTAGTTTTAAAAACGTCCATTT  
TCATTATCCCTCTCGAAAAGATGTTCCAATTCTTAAGGACTAGACTTAGAAATCCATCTGGAGAAAC  
AGTCGCTTTAGTTGGAGGTTCCGTTGTGGTAAATCCACAGTTGTTCAACTCATTCAAAGATTTTATG  
ATCCAATTTAGGAGAGGTACAATACTAGATGGCAAAGACATAAAAGAATTAGATTTAACCTGGTTAAG  
ACACAATATAGGTTTGTGGCCAAGAACCGGTGCTCTTTGGCACCACCATACGCGAAAACATCAAT  
ATGGTTTTTCCAGTGCACAGACGAAGATATTATTAAGCAGCAAAAAGTGCAAATGCTCATAGTTTC  
ATAAAGAAGCTACCAATGGTTATGATACTTTGGTGGGGGAACGTGGTACACAATTGTCGGGAGGA  
CAAAAACAAGAATTGCTATTGCGAGAGCTTTAGTGAGGAATCCATCAATTTATTATTAGATGAAGC  
TACATCAGCTTTGGACAATGCTAGCGAAAGGAAAGTTCAAGATGCTTTAGATTAGCAAGCAAAAAC  
TGCACAATACTATCATAGTTGCCATCGTTTATCCACAATAAGAGGCGCAAAACAAAATTGTCGTCCTTTCA  
GAAGGTAAAGTTGTCGAACAAGGAACTCATGATGAATTGATGGCCCTCAAAGCGAATATTATCAAC  
TGTTTATGGCTCAAGTACAAAGCAAAGAAGATGTAGAAGCTTCCGGAAAAAAGATGTAATTGAAG  
AAATTGATGAGGATGATTTTATGATGATGAAAAAGAAAATCAGAACTAAAGTTATACGAGGAAGAAG  
AAGAAGACGAAAACGAAACAGACGTAGAGACTTCTTTCTCGAAATTGTGAAGTTTAAATACACCAGA  
ATGGAAAATTATCACTTTGGGATGTATTGCTTCAATAATCGTTGGTTGTTGATGCCAGTTTTCGCAGT  
TCTTTTTGGAAGTATTATGAGCACATTAATAATCTTGACGAAGATTACGTAAGGAGAGAATCCAAAA  
AATATGCGATGTATTTGTTATTGCTGGAAGTGTATTGTTATTTGCGGGGACTCTTCAAATTTACCTAT  
TCGGAATTGCGGGAGAAAAATGACCAAAAGAATCCGAAGTCAATTGTTTAAAGGAATGTTAAAGCA  
GGAAATGGGCTTTTTGATAGAAAAGAAAACGGCGTTGGGGCGCTGTGTTCCAAATTATCAGGAGAC  
GCCTCAAGCGTACAAGGTGCAACTGGGCAACGAGTAGGTGCTGTCATTCAAATATGGCTACCTTAT  
GCCTAGCTTTAGGTTTGGCGATGTATTATGAATGGAATTTGGGATTAGTAACGGCTTCTTTTACCCCA  
TTCATAGTTATTACGGTTTTCATAGAACGAAAAAATACGAAAGGATTGAATGATAAAAGAGATAAAA  
CCCTACAAAAGCTACTAAGCTTGCTGTAGAAGCCGTTGGAAACGTGCGCACTGTGCGCATCTTAAAGT  
CTGGAACCTACCATCCATAATTTATATATGCAAGAATTGATTCCAATTCATAAGAGCTCAATTAAGCT

GTGCATTGGCGGGCAGCAGTTTTTGGTTTATCCAGAAGTTTGATGTTCTTTCCTATTCAACATGTATG  
TTCTACGGTGGATATCTAATCATAGATGGTATGCCTTTCGAGATTATTTTCAAAATATCACAAAGCATT  
ATTCTTGGAACACTACGTCAATAGCAAATTCCTTAGCTTTTACTCCCACTTTACCAGAGGACTTAGAGCT  
GCTAGAAACATCAAACAATTTCTAAATAGGACACCTCGCATTCAAGACCAAACAAATGCAACATCTAA  
GCACGATGTAATTGGCAATGTGGAGTACTCAAATATTAATTTCTCCTATCCTACAAGAAAAGCAATAC  
CAGTCCTTAAAGGCCTCGACCTTCAGGTTTTACAAGACAAAACCGTAGCTTTGGTAGGAGCGAGTGG  
TTGTGGAAAATCAACGATCATTCAACTTATAGAACGTTTTTATGATCCTGACAGAGGTGATGTTACAC  
TGGACGACGAAAACATTAATAATATCACTCTAAGATCACTGAGATCTCACATGGGAATTGTGTCTCAA  
GAACCAATCTTTTTAGTAAACCATTGCAGAAAATATCGCATATGGGGACAATTCTAGAATAGTGG  
TAAAAATGAAATAATAAATGCTGCAAAAATGCCAATATACACAACCTTTATTTTCAGGTCTTCCATTGG  
GATATGAAACAAAACCTGGGGAAAAAGGTACCCAGCTGTGAGGAGGACAAAAGCAAAGAATAGCTA  
TAGCTAGAGCTTTACTTAGAAAATCCTAAAATATTACTTCTTGATGAAGCAACGTCTGCATTAGATACAG  
AAAGTGAAAAAATTGTTCAAGAAGCGTTAGATACAGCTAAAGTAGGAAGAACTTGTATTACAATTGC  
TCATCGACTTACTACCATTGAGAATGCTGACTTAATATGTGTAATTGATCGAGGAGTAGTTGCAGAAT  
CAGGAACACACAAAGAAGTCTAGAAAAAATGGACTCTATTATAGATTGCAATCCAGAAAAAATA  
GACATTTATTATGTATTTTCTTAATAATTTTATTTATTTATGTGTATCCATAAAAATAGTTT

>*Chrysochus asclepiadeus* ABCB2

MDNKEIINKDKDKSPLDIEFVKPEEEKQNVDDKYTFIQLFRYTTGLDRCLMFIGTAAALATGSIQPLNSILY  
GDLTGNIIDYSIKVRYNSGEDMLDEAGDELIGHVKHFALMNSLIGVFILICSYISTATFNYTAMRQALKLRSI  
YLEKILNQDIPWYDTRQIGDFASRMADDMYKYEDGIGEKIPMFLNFQAIFFVAAMIILIKGWELALVCLSSL  
PASLIALGIVSFISTKLAKKELEAYGEAGTIAEEVLSAIRTVVAFGGQEKVRYDEKLIFARQNNIKRSLFNGL  
NMGVLWLIYTSYGLAFWYGVGLILKDRDKNPTTYTVSTMITVFFSVMSGSMNFGISSPYIEAFSISKAAGS  
KLFSIIDNKPVINLSKGRGQKLNDIKGNISFKNVHFHYPSRKDVPILKGLDLEIPSGETVALVGGSGCGKSTVV  
QLIQRFYDPISGEVQLDGDKIDELDLTWRHNIIGLVGQEPVLFGTIRENIKYGFSSATDEDIKAASANAH  
SFIKKLPNGYDTLVGERGTQLSGGQKQRIAIARALVRNPSILLLDEATSALDNASERKVQDALDSASKNCTTI  
IVAHRLSTIRGANKIVVLSEGVVEQGTDELMLKSEYYQLVMAQVQSKEDVEASGKKDVIEEIDEDDFD  
DEKRKSELKLYEEEEEDENETDVETSFFEIVKFNTPEWKIITLGCIASIIVGCSMPVFAVLFGSIMSTLNNLDE  
DYVRRESKKYAMYFVIAGSVMLFAGTLQIYLFGIAGEKMTKRIRSQLFKGMLKQEMGFFDRKENGVGALC  
SKLSGDASSVQGATGQRVGAVIQNMATLCLALGLAMYEWKLGVTASFTPFIVITVFIERKNTKGLNDR  
DKTLQKATKLAVEAVGNVRTVASLSLEPTIHNLQMELIPLHKSSIKAVHWRAAVFGLSRSLMFFAYSTCM  
FYGGYLIIDGMPFEIIFKISQALILGTTSIANSLAFTPNFTRGLRAARNIKQFLNRTPRIQDQTNATSKHDVIG  
NVEYSNINFSYPTRKAIPVLKGLDLQVLQDKTVALVGASGCGKSTIIQLIERFYDPRGDVTLDDENIKNITLR  
SLRSHMGIVSQEPNLFKTIENIAYGDNSRIVDKNEIINAANKNANIHNFIISGLPLGYETKLGEKGTQLSGGQ  
KQRIAIARALLRNPKILLLDEATSALDTESEKIVQEALDTAKVGRTCITIAHRLTTIQNADLICVIDRGVVAESG  
THKELLEKNGLYYRLQSQKK\*



Mmus_ABCB1_3g5u	REIIGVVSQEPVL FATTIAENIRYGRDVTMDEI EKAVKEAMAYDFIMKLPHQFDL VGE	522
Hsap_ABCB1_6c0v	REIIGVVSQEPVL FATTIAENIRYGRDVTMDEI EKAVKEAMAYDFIMKLPHQFDL VGE	520
Cpop_ABCB1	RQKIAVVSQEPAL FATTIAENIRLGLDQAQAEIEAAAKKANVHKFL LPLPHGYDTLVIGE	526
Cau_ABCB1	REKLGVSQEPFL FATTISENIRYGLTVSQRIEEAAKKAHMHKIMCLPMGYDTLVIGE	524
Cascs_ABCB1	REKLGVSQEPFL FATTISENIRYGLTVSQRIEEAAKKAHMHKIMCLPMGYDTLVIGE	524
Cpop_ABCB2	RTHIGVVSQEPVL FGTTIMENIKYGAIEANEDDVAIAAKKANAHFTFKSLPMGYNTLVGE	529
Cau_ABCB2	RHNIIGVVSQEPVL FGTITIRENIKYGCPAATDEDEI IKAASKANMHHSFKKLP5GYDLVGE	529
Cau_ABCB3	RHNIIGVVSQEPVL FGTITIRENIKYGCPAATDEDEI IKAASKANMHHSFKKLP5GYDLVGE	532
CasC_ABCB2	RHNIIGVVSQEPVL FGTITIRENIKYGFSATDEDEI IKAASKANMHHSFKKLP5GYDTLVGE	529

ABC-Signatur Walker B \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \* : \* \* \* \* \*

Mmus_ABCB1_3g5u	RGALSGGQQRITAIARALVRNPK ILL LDE IT SALTDESEAVVQALDKAREGRITIVIA	582
Hsap_ABCB1_6c0v	RGALSGGQQRITAIARALVRNPK ILL LDE IT SALTDESEAVVQALDKARKGRITIVIA	586
Cpop_ABCB1	RGALSGGQQRITAIARALVRNPK ILL LDE IT SALTDTTSEAEVQALDSVSGECTIIVA	586
Cau_ABCB1	RGALSGGQQRITAIARALVRNPK ILL LDE IT SALTDTTSEAEVQALDSVSHECTIIVA	584
Cascs_ABCB1	RGALSGGQQRITAIARALVRNPK ILL LDE IT SALTDTTSEAEVQALDSVSHECTIIVA	584
Cpop_ABCB2	RGALSGGQQRITAIARALVRNPK ILL LDE IT SALTDTTSEAEVQALDSVSDCTTIVA	589
Cau_ABCB2	RGALSGGQQRITAIARALVRNPK ILL LDE IT SALTDTTSEAEVQALDSVSKNFTTIVA	582
Cau_ABCB3	RGALSGGQQRITAIARALVRNPK ILL LDE IT SALTDTTSEAEVQALDSVSKNFTTIVA	590
CasC_ABCB2	RGALSGGQQRITAIARALVRNPK ILL LDE IT SALTDTTSEAEVQALDSVSKNFTTIVA	589

Mmus_ABCB1_3g5u	HRLSTVIRNADVIAGFDGGVIVEQGNHDELMPREKGIYFKLVMTQTAGNEIELGMEACKSKD	642
Hsap_ABCB1_6c0v	HRLSTVIRNADVIAGFDGGVIVEQGNHDELMPREKGIYFKLVMTQTAGNEIENAADESCKD	646
Cpop_ABCB1	HRLSTIRKANVIAFVSDGRVTEHGHAEI MAEQSSVYKLVVSQGTDTSNIA-DT--KLE	644
Cau_ABCB1	HRLSTIRKANVIAFVSDGRVTEHGHAEI MAEQSSVYKLVVSQGTDTSNIA-DT--KLE	641
Cascs_ABCB1	HRLSTIRKANVIAFVSDGRVTEHGHAEI MAEQSSVYKLVVSQGTDTSNIAAMT--KLE	642
Cpop_ABCB2	HRLSTIQGANKIIVLSEKGVVEQGHDELMLKKEEYKLVVTTQNKSKETVQY-T--KSD	646
Cau_ABCB2	HRLSTIRGANIKIVLSEKGVVEQGHDELMLKKEEYKLVVTTQNKSKETVQY-T--KNE	646
Cau_ABCB3	HRLSTIRGANIKIVLSEKGVVEQGHDELMLKKEEYKLVVTTQNKSKETVQY-T--KNE	649
CasC_ABCB2	HRLSTIRGANIKIVLSEKGVVEQGHDELMLKKEEYKLVVTTQNKSKETVQY-T--KSD	646

Mmus_ABCB1_3g5u	EIDNLDMSKDSGSSLIARRSTRKSCGPHDQDKLSTKEA--LDEDVPPASFMRLKLN	780
Hsap_ABCB1_6c0v	EIDALENSNDRSRLIRKRSTRSRVSGSQDQDKLSTKEA--LDESIPVPSFMRLKLN	784
Cpop_ABCB1	RSFSLMSKCIVED---EEE-----KIDEETAE--EYVSKGVVVKVIMN	885
Cau_ABCB1	RTKSFMTKSKVDDA----NEE-----IPEELAVEEIIHKSMGTLLKVMKMI	683
Cascs_ABCB1	RTRLSMNTSEVDEA---DEE-----IPEELAVEEIIHKSMGTLLKVMKMI	684
Cpop_ABCB2	KTQEH-----DVI-----DEVVIV-----EAAFAAEDDEDDVSDRNKLLDVIKMI	680
Cau_ABCB2	VIEEID---QDIFD---EEMNT-----VLKPSFEG--DKEDVTQTETSFFEVKLN	690
Cau_ABCB3	VIEEVD---EDDFD---DEQRKS-----ILKSEEE---EETQVETSFFEIVKLN	691
CasC_ABCB2	VIEEID---EDDFD---DEKRKS-----ELKVEEEDENEDTQVETSFFEIVKFN	691

TM7

TM8

Mmus_ABCB1_3g5u	STEPYFYVGIICATIMGGLPAPFVITFSKIVGVFTNKGPPETQRQ	760
Hsap_ABCB1_6c0v	LTEPYFVGVFCATIMGGLPAPFAIIFSKIGVFTRIDDPETKRO	764
Cpop_ABCB1	KPEYFYVFIIGLCSGLTGASLPVYGLVFGG	744
Cau_ABCB1	MKEVFPILVGCISSVLTGASLPVYGLVFGG	742
Cascs_ABCB1	RKEVFPILVGCISSVLTGASLPVYGLVFGG	743
Cpop_ABCB2	APVYVQIVVASIGSTVIGCAMPVIFSVLFGS	748
Cau_ABCB2	ALEKSIITLGSIASAIVGCSMPVFAVLFAD	749
Cau_ABCB3	APVYVQIVVASIGSTVIGCAMPVIFSVLFGS	750
CasC_ABCB2	TPVYVQIVVASIGSTVIGCAMPVIFSVLFGS	750

Mmus_ABCB1_3g5u	ISFITFFLQGFTEGAGEILTKRLRYMVFMSLRQDVSWFDDPKNTTGALTTRLANDAAQ	820
Hsap_ABCB1_6c0v	ISFITFFLQGFTEGAGEILTKRLRYMVFMSLRQDVSWFDDPKNTTGALTTRLANDAAQ	824
Cpop_ABCB1	VTGIANFLQVFSFGAGEKLTLRIRKKTPEANLHQEMGWDRKENGVSGLCARLAGDSAA	884
Cau_ABCB1	VTGIANFLQVFSFGAGEKLTLRIRKKTPEANLHQEMGWDRKENGVSGLCARLAGDSAS	882
Cascs_ABCB1	VTGIANFLQVFSFGAGEKLTLRIRKKTPEANLHQEMGWDRKENGVSGLCARLAGDSAS	885
Cpop_ABCB2	VAVMVSFLQVYMFAGEKMTIRIRKQVFAHLNQEIGFFDRKSNVGVGALCAKLSGDAAS	888
Cau_ABCB2	VILFAAFLOVYLFAGEKMTARIRSQLFKANLQDQMGFFDRKENGVSGLCAKLSGDAAS	889
Cau_ABCB3	VMLVAVFLQVYLFAGEKMTARIRSQLFKANLQDQMGFFDRKENGVSGLCAKLSGDAAS	810
CasC_ABCB2	VMLFAGTLQVYLFAGEKMTKRIRSQLFKANLQDQMGFFDRKENGVSGLCAKLSGDAAS	810

TM9

TM10

Mmus_ABCB1_3g5u	VKGATGRLAVIFQNIANLGTGIIISLIYVQLTLLLLIAVPIIAIAGVVENKPLSGQAL	880
Hsap_ABCB1_6c0v	VKGATGRLAVITQNIANLGTGIIISLIYVQLTLLLLIAVPIIAIAGVVENKPLSGQAL	884
Cpop_ABCB1	IQQVAGVIGITVLNFCITFLTCAFSFYVWKLTLVLLSFCPLIFFSVVFQKSMQNDAI	864
Cau_ABCB1	VQGAAGVIGASLNF IATFLIASIFSLYYVWKLTLVLLSFSPLIISIYLEQVWKNDAK	862
Cascs_ABCB1	VQGAAGVIGACLNF ISTFLIASIFSLYYVWKLTLVLLSFSPLIISIYLEQVWKNDAK	863
Cpop_ABCB2	VQGTATGRIGVVLQSMATFLAVGLAHYYVRLGLVTVAFNPFLLIAFFERRNSGQHD	868
Cau_ABCB2	IQQATGVRVGVVQNIATFLIAGLGLSYYVWKLGLLTAAPLMLVYVMEIRNTEGLID	869
Cau_ABCB3	IQQATGVRVGVVQNIATFLIAGLGLSYYVWKLGLLTAAPLMLVYVMEIRNTEGLID	870
CasC_ABCB2	VQGTATGRVGAVINMATLCLALGLAHYYVWKLGLVTAASFPIFVITVFIERKNTKGLID	870

Mmus_ABCB1_3g5u	KDKKLEGGSGKIATEAENFRTVVSLTRQKFEHYAQSILQIPYRNAM-KKAHVFG	939
Hsap_ABCB1_6c0v	KDKKLEGGSGKIATEAENFRTVVSLTRQKFEHYAQSILQIPYRNAM-KKAHVFG	943
Cpop_ABCB1	KNQKMYNRSKLAIVEATGIRTRVVSIGCERNVFDHYKELSPYQALAK-RKSHFRG	923
Cau_ABCB1	HIREVLEKSAKVAVEALANIRTVISLGCENIFLDLVKDLVYQKLA-KKAHFRG	921
Cascs_ABCB1	QNRTVLEKSAKVAVEALANIRTVISLGCENIFLDLVKDLVYQKLA-KKAHFRG	922
Cpop_ABCB2	TRDKALQKSTKIAIVEGWGRITVVSIGLCEKFMHLYISELMPHYKSNRASLMMRG	928
Cau_ABCB2	ERDKTLQATKLAIVEAWGNVRTVVSIGLEPIFHMVYQELNPLKSSS-KALHMRG	928
Cau_ABCB3	KRDKTLQATKLAIVEAWGNVRTVVSIGLEPIFHMVYQELNPLKSSS-KVHMRG	929
CasC_ABCB2	KRDKTLQATKLAIVEAWGNVRTVVSIGLEPIFHMVYQELNPLKSSS-KVHMRG	929





## 6.5 ABC-Scan Sequenzen

>c19546\_g2\_i1\_ABCA

MSFLEKSYNQELERNISISIQEFPYPHTQDSGIGTIFRDYLPSTLFSFIFICPAILQRVVEEKYSGIKELMKMVMGMKS  
WMLWLGFINGMIPMIFISICFIVILMKFPLFGTEYPPIEYTDGSILFCFLLYCMAANVFCFALSTCFNKPAIAVVCGL  
LWILSYFVPKFSFGLDESMNGLTFSENMLLNLLPNMALHYGYAAISSYEERELGVQWNNFAKPSSGGTDEVTMLNV  
FLMLILDIFLYLVLTIFYVDGINPGKYGVREPWLFPLKAFRKLKSNNSNIVENDSESVHLEYIEEGKGLSKGIEIQHLCKRY  
GSKVAVDNLNIDIYKHQITVLLGHNGAGKSTTMSMVTGMLNVTSGSIKINGLNKDNMDEIRKSLGLCPQHLLFT  
DLTVKEHLIFFAKLKGNSNEAEKEVNDLLNKLHLTEKKNAMAHTLSGGMKRKLCLGMALVGGSKVLILDEPSSGM  
DPESRRELWDLNWRGEKILITTHFMEEADTLGDWIAIMDHGSLQCYGTPMYLKKLYHTGYHLSLILKDDTDDEE  
KIDIQKFIKAIYIPKSQLNSQNAKQLTFVLPFESNKNMNSLFSHLEQKKDDLKIENISVTITLEDVFLKVRSDSNEVLEAR  
SQDYTEGVGLKKKELRMKTLFKKRFNFRFRFVAYLVPALIALAFFILTIILSWNASDYKNGPELKSLESYKKS SVYY  
NGTNDASSLLRKYRELVEEQGSMCFEVDITQAI VAKGIENILYKEHLVAAAQFSRTPSGIEAYALYNAKALHSPPI  
VNLIINAITKDLLGNEYSISTSNWPLESVNSHSSRAEYSEAKIVVLWIIMPLGCLFVVGSIIFPHTEISSRFAQLQYMC  
GVKWPWCYWLVTFAADMIIYFITILIASIVCIASEPFRGTNEFGALLLVFTMYGLSGIPFAYIFSRKRSASGAFASFIILGLF  
LGIILCLVIGVLIESGDPYKYIGESLKICAILFIPQVGLTYSGAEFSRKVVDNFNMAAAPQKMQSLCYNPNPCCNGN  
GTTACSQYKGYMPVLEINFLIMFGSCFLFLINILLDSYFWKRIFSQMVFKLYKIKRDGYQKLPRQKTDKNHEEKEIQ  
KCNTLRANKLQKTYSGKRVDDINITLNVGECLGILGVNGAGKTTFRMLTREEIVDEGKVGITLKIIDEKIDINNDEYL  
EKLGYCPQVDALNYVLSGREILT VIAQLRGVENPVQVVNQFLELSEYADIPCGHYSGGNKRKLSLAVSLIGFRKFI  
LDEPTNGVDPASRRKCWNLIKYMQUEEKLSFILTSHSMMECEALCNLIMKDKGKFQKEGTINSLKSGIGGFSIKLKL  
RNKNSNSEDMMKQLSYSNEKLG SCHLVDAVEPEECYNVTNLANSDDHEEGYDAVDATCNM KFDNIESLKKYFFKQYE  
SNCELKDEHLGLLHFYISDRNKTWSSIFQVVEDIKHANPDLIEDYAVSEASLEDVFLSVAKSDDEKQESKKKRTKI

>c16646\_g1\_i1\_ABCA

MQYGKQAVVKDLTMDIYQNDITVLLGHNGAGKTTTLLSILLGLFPPTGGTAIIDDYDIRRDIQSIRKSLGYCPQKNILYK  
NLTVRDHFIILGMLKGLSSSEANEEADGYIEILNFTDKEDVQASKLGGMKRKLKIGIALCGPSKIFILLDEPTAGIDPLS  
KRIIWDTLRSLKQNRITLLTTHSMEEADWFGDRIAIVNGELRCYGTSSFLKKEYGAGYRLIINKDSNCQVEKITKLLR  
QYSPSMKVYSDIGSELTYILEDSSLTSLGPVLDNLESKSKSLGILNFGISLTSLEEVFMKVGQTENKSDGNKDENKNE  
DTTVERLDLSSNYPSGCVLLCLQFYAMMMKRRIFTVKWSFITLSHIFILINILFLAVSSDISRWSFFELPALHLNLNHFS  
NRDVVTLVENNSTSDYFMHYKSFLENGIVKTVDNITKEMMLLTQQNLEMVHFIYIMGATFADVDSNSQVPLVNIT  
AWFNNDPYHTVGITMSYVLNTIYRKLKSNCEAIDFINYPLPKPESRLKIETGLTSGSNLVFCLFFAFLAVSAFFTIFVI  
KERVSKYKHQQFVSGVNLVFWIATFLWDAMLYLMAVTVTLVSLAFYKEDGFSSVKDLGHLIIIFLYGYAAIPLAYC  
VSYFFHYPPSSGYSFMLSFLALVFFVIEKVVLNKYAAGFMHWFILLPQYNFLLGLCDYHQLYAIYNRVCYHPACKT  
LNLKYKECFEIPDDNARKYCQGTGKGFVMEEPGIGGNLMVALIEGTVFFAILFFIDSSWINTLRNIIVTPKKPIPLP  
DEDHDVIAEKFYIKLSEELTEKYTVATNLLTKCYGKKRVVNGIYLGIKKSECFGLVGLNGAGKTTTFRMISGDTSITY  
GDAWVNKFNKVNKLGARKSVGYCAQSNAILEEMTPREAITFCFMRGILLRRARRIVEFLASEFNFLQYLDKPIKNLS  
GGNQRKLGAAATCLIGDPLVIYLDPESSGLDPASKHYLWKSLSALRKQGKICILLTTHDMEECEALCTRLAIMVNGNFR  
CLGSKQELKSKFSQGYILVIKMMRVPVMESEDTEEVDFVYMNFPAAKLEKIQLLVFYIKDASLSWAKAFNIMESGI  
DTVYDIVDFTLSQGTLEQVF

>c15349\_g1\_i1\_ABCA

MVNNWDFKLLLMWKNWILQIRSKKQTIMEILTIPIFFSVLLVIRHVSDPEFNDEKVPYKPCILWNTSSLCDPTAEG  
DDFAKPTNFQNLTLIYAPNTSIAIDRVMMVYFRPFKDVVGFNLNSDEIDSYYAIQSSNVTAAGIVFNNQYADTVDPKEL  
SNLKIQRFPSELRTSESSII SWFTNLIFPAFQLPGPRNPYENTGASPSYGGFSLIQHYLTALSLAQNNVSLDDVST  
WIESHQYPYISMRRFAYAAWYDDTLTILSTMLPLIFVLSFAYTCLNIIRSITVEKEKQLKESMKIMGLPNWLHWTAW  
FTKCFIILAISDVLIVLLKVKWSNKYGVLTADPTVLYVLLIYSCSVITLGFVSTLFSKANNVAASGFIWFMCIYIPY  
NFLVQNYDTLSLAAKLSVLLQNSAMSFGRVILMYEGTADGISWSTLFTPNTVDDDLSLGLILIMLILDFTLYLGIALY

IEAVFPGEYGVAQPWYFLFTKSYWTGIPPIDTDDKKYGNENKEFFESEPTNLHAGVKINNLCESFDNKVAVDNLTNLN  
MYQDQITVLLGHNGAGKTTTMSMLTGMITPSRGTANINGNDIVKNISGVRQSLGLCPQHNVIFDNLTVAEHLRFFS  
KLKGLKDEGLQAEISKYVKLLDFEDKKNAMSSTLSGGMKRKLKSVGIALCGNSQVVMLDEPTSGMDPSARRILWDLIE  
KEKTGRTILLTTHFMDEADILGDRIAIMADGELQCCGSSFFLKKKYGTGYQLIMEKTKSCDVIEWTKLLKRYIPDLEVDR  
NVGSELSYLLSEMYSSVFEPMLRHLSESERLGRSISLTTMEEVFMKVGADHQREQEEDSEYNHGYTNVNLNITA  
SPSYTTGADLIWNQFYAMFLKRLVSKRSWFLLLVQVFLPSFLIISILIESPNSQTTLPAVQLSLSTFEDPVTLLQNTSG  
NTLDAYVEAYQQLVKFKKTDNMTELLRLTTMPTTVRRRYIVGADFEIFSNIPAITAYFNNEPYHSPGITLSLVLNLSVL  
KAFSNCCKDGYNTPGDIGRMILIFLYFACSVLPVIYLLAYLFKIPSEGYGKIMLFSIFTGTIPFIVILKQIGNLKDVGNLSL  
HWVFLSPWYSMMMSGISESYNTHVYKLCSPYFAICPSNMSIEQCLDISGPLIKSICIDADGDYFKWKSPGIGRNLAYS  
FVEAACFLTLLIIIEYKYLSKIIYSIIQKLPKYPIEFDESDVAEERNRIRNSTISELQSENLVVTKDLTKYYGKFLAVNGICL  
SIKHYEFCGLLGENG

>c15226\_g1\_i1\_ABCA

MDKSTSCDSSQVTHLLRKYIPNAEYGNVGSSELYLLTENQSYVFEPMKLDLEDNSQRLGVRYSIGISLTTLEEVFMKV  
GADHGQEDKDEKEFMNGDIHDTNDSLSNTRMNLDSLSPNEANGFALLFNQFLAMLMMKFLSVTRSWILLVVQV  
AMPTVFLIIAIVTRGRNRTGNLPMPLDLDFKSESVTLIEDNSTFSYDQMYQKSMKESHYTTKSENMISEMISLTK  
ITPITVRRKYIVGASFNDIQVPLIGAVPNITAWFNNDPYHSPGISLGLVLNAVYRKLGNCIDYDCSIKFINYPMPYSATT  
QVKQLLNGQNMGFQLAFNIGFSMAFVSSFYVLFVIRENVCNSKHLQFVSGVKVYIFWIASILADMLTYLITAVVLLIT  
LIIFQEDGFKTSADIERMFLIFFYFGWAFMPMLYISGYFFDVPSTGFTRMTLFSIFTGTA AFLVVQVLSTESLNLEHVG  
RALHWVFLVIPHYSLASGISESFKVYGYNYICNNLLEVCMQSPLSKEDCWEMISNQKIKEICEEADTNYFKWKAPGIG  
RNLAYSFTEGLILFTGLLFIIEYEVFSKIIYFVSQKCPKPKDNPDESDVMEELKLRDFSESEIKTNYILAVKDLTKYYG  
KFLAVNGLCLGVKKYECFLLGVNGAGKTTTFKMLTGDVKISFGDGWVNSFSLRSQLKEVQRFIGYCPQFD

>c3189\_g1\_i1\_ABCA

MGANLDFILLMWNWILQYRKPLQTHIIVPVVFTLLLVLRDLIDPKFNDPIVYTDYCPNPMNVSPSLCDPKA  
NNIDPDLVLPDFSLFNLMYTPNNSITIKRVMIDIIRPYFADTVGFNNVADMNNYIEYSSNATAGGIVFESKSGSIEDL  
ENLKVQIRFPELSDVNSMTENWFTKLIFPLFQLPGPRSPTMNTGSAPSYYAEGFLNLQYITTIALSLVKTNKNFSEF  
NYPYVNMRRFAYNSWYDDPLLVLVTQMLPLIIMISFVYTSLNTVKAITAEKEKQLKESMKIMGLPNWLHWTAWFT  
KCFIFLAISCAFVILLKAKWFGDYAVLTYADGTIIYVFLMCYVCSITFCFALSTFFSKANNASTVAGLAWFISYAPYTF  
VQQKYDTMSLAAKLLISLLHNSGMSFGCQVILMYEGTANGIQWSTLFTPNNTADDNLSLGHMTLILLFDLFLYFIAIY  
VEAVFPGEYGVPKSWYFLFTKSYWCGEEESDEYNKTNLDNYYHNRDLFEADPSNFHAGVRIDKLRKQFGDKVAV  
EALTLNMYQGQITVLLGHNGAGKTTTMSMLTGMITPTEGTAINGYDIRENIAGVRQSLGLCPQHNVIFDELVAE  
HLYFFSKLGLRNGELKAEIDKYVKLLDFEDKRNKSVTSLSGMKRKLKSVGVALCGHSHKVVMLDEPTSGMDPSARRT  
LWNLIESEKEGRTILLTTHFMDEADLLGDRIAIMSGGQLQCCGSSFFLKKKYGTGYQLIMEKTNNDVLDVGVKALLKKY  
IPDIEINSNIGSELSFLLERYSSVFEPMLRQLEAESDRLGVRYSIGISLTTLEEVFMKVGAAHSPEEVSKEPINGNSGNG  
SNVKIDMAVSPTYTDSFGLIYNQFYAMFLKRFVSKRSWFLLLLQIFIPCIFLVI AVLSEPSGLEAVLPPLDLTSLKFTNP  
VTLMENNTNSNYADTYSNLVKVQVPVNITETMLEMTKS RPTKARLQYIVGVDIKTPNKDKSSLTAYFNHDAYHSPGI  
SLSLVNLTFLKVQTNCSSECSIDFENYPLDYTPDSKITKSSSYQPVAFNAGFSMAFVS AFFVLFVIREIISKSHLQFVSGL  
KVSIFWISHFICDLFVYILVITVYICITLICFQKGDYDTAPAIGRIILYFYFVCAVLPVYIFGYLFEIPSSGFTKMTLIGVFTG  
CVPFIVVMIFQQIDNLKDAGNMMHWFLLSPWYSMITGISESYNTYTYTNLCDGLYDNCEKANKTKEECFANLAA  
NVYEICRDTDGRYYKWKSPGIARNLLFSFTEAVVFFMLLLAIEHQVFSKITYFINQKLFQKYPIANLDESDVAEERDRI  
RNGTQTETQSENIVIQDLTKYYKNFLAVNGLSLGIKHYECFLLGENGAGKTTTFKMITGDESISYGDGWVNGMSI  
KSHQKEVQKVIGYCPQFDALLDDMTGRETIIMFSLIRGIVYSDSVAISEYLANEFDTAHLHKKIKEMSGGNKRKLSTA  
LSLVGDPVLYLDEPTTGM DPATKRYLWAALCRLRDSGKSIVLTS HSMEECEALCTRLAIMVHGNFKCLGSTQHLKS  
KFAQGYSLSIKIKRPNSSGLQHAETANVERFMNEKFPDAKLTEKHEELLSYQITDSNVPWSRMFGILEEGKKIYSEIE  
DYNLQCTLEQVLSFTQKRN

>c14789\_g2\_i1\_ABCBF

MVKNDAKQNRVTLEKSAKVAVEALANIRTVISLGCENVFLDLYVKDLVPYQKLAKKKAHFRGMVLGMARSLLLFAY  
AAGIAYGVQLVINQVIDYGTMFKVNCCIIVGSWSIGTALSVPNLQKGLVAAEKIFALLERIPLIKNTLNPIRSFWTKED  
VEYSQVYFSYPTRPSIPVLNCLNLLIQRGKTVALVGSSGCGKSTIIQLLERFYDASYGEISIDGIETKMMDLKTLMQLG  
IVSQEPNLFEKTI AENIAYGANHRDVSLEIVEAAKAANIHNFI VSLPTGYETKIGSKGTQLSGGQRQRIAIARALVRNP  
KILLLDEATSALDNESEKIVQEALDNAQKGRTCITIAHRLTTIQNA

>c19676\_g1\_i1\_ABCBF

MDNKEIINKDKDKSPLDIEFVKPEEEKQNVDDKTYSFIIQLFRYTTGLDRCLMFIGTAAALATGSIQPLNSILYGDLTGNI  
IDYSIKVRYNSGSEDMLDEAGDELIGHVKHFALMNSLIGVFILICSYISTATFNVTAMRQALKRSIYLEKILNQDIPWY  
DTRQIGDFASRMADDMYKYEDGIGEKIPMFLNFQAI FVAAMI ALIKGWELALVCLSSLPASLIALGIVSFISTKLAKKE  
LEAYGEAGTIAEEVLSAIRTVVAFFGGQEKEVKRYDEKLIFARQNNIKRSLFNGLNMGVWLIIYTSYGLAFWYGVGLIL  
KDRDKTNPTYTVSTMITVFFSVMSGSMNFGISSPYIEAFSISKAAGSKLFSIIDNKPVINLSKGRGQKLN DIKGNISFKN  
VHFHYP SRKDVPI LKGLDLEIPSGETVALVGGSGCGKSTVVQLIQRFYDPISGEVQLDGDKIKELDTWLRHNIGLVG  
QEPVLF GTTIRENIKYGFSSATDEDI IKAASANAHSFIKKLPNGYDTLVGERGTQLSGGQKQRIAIARALVRNPSILL  
DEATSALDNASERKVDALDSASKNCTTIIVAHRLSTIRGANKIVVLESEGKVVQGTHDELMALKSEYYQLVMAQV  
QSKEDVEASGKKDVIEEIDEDDFDDEKRKSELKLYEEEEEDENETDVETSFFEIFKFNTP EWKIITLGCIASIIVGCSMPV  
FAVLFGSIMSTLNNLDEDYVRRESKKYAMYFVIAGSVMLFAGTLQIYLFGIAGEKMTKRIRSQ LFKGMLKQEMGFFD  
RKENGVGALCSKLSGDASSVQGATGQRVGA VIQNMATLCLALGLAMYYEWKLG LVTASFTPFIVITVFIERKNTKGL  
NDRDKTLQKATKLAVEAVGNVRTVASLSLEPTIHNL YMQELIPLHKSSIKAVHWRAAVFGLSRSLMFFAYSTCMFY  
GGYLII DGMPEFIIFKISQALILGTTSIANS LAFTPNFTRGLRAARNIKQFLNRTPRIQDQTNATSKHDVIGNVEYSNINF  
SYPTRKAIPVLKGLDLQVLQDKTVALVGASGCGKSTIIQLIERFYDPDRGDVTLDDENIKNITLRLSRSHMGIVSQEPN  
LFSKTIAENIAYGDNSRIVDKNEIINA AKNANIHNFI SGLPLGYETKLGEKGTQLSGGQKQRIAIARALLRNP KILLLDEA  
TSALDTESEKIVQEALDTAKVGRTCITIAHRLTTIQDADLICVIDKGVVAESGTHKELLEKHGLYYKLQTQKK

>c3518\_g1\_i1\_ABCBH

MRGEKIAVVGSNGTGKSTFIKSLLGFTHYTG DILIDGINARNLPKGSVFSLSIYIPQDDYTSDDTVLNNLRLGNRNATR  
ELIETKARLFDSHETFLNLENGYDTKAGIRGNRLSGGQKQKISLVRAAVKDAPIFVLDEATAAIDKGYEAKVLEIILRRM  
PGKTVVMIIHEKNRLQEFDKVFFLNNGRLESTGRYEEL

>c6071\_g1\_i1\_ABCBH

MLNISYCPPNVTVWEVWVNNGTSQCFM DTVTSSVIAGFILVAGTIQLCMYRKYGTEVSPNHLSKSKLYYFQIFLTLF  
LPVLEIVRFSLQGTILNDKTIYGYMIVSLV FICFAFPFSIWIISVERHYLLPSVPTRGHGITLLLLFWTLTFISENLAFNL TQ  
KNWWFKLTDLTDQVEMSLFVLR YITCLLIFL MGLKAPGIMQNI DYFSLNDPQRNFSGAEGAESQSTWKNFWKVK  
ILSPFLWPKKSCSLQFRVLF CFVLLAAGRAVNLYVPIYQKLI VDSMDGDVNLVFRWDWVVVVYGLKFLQGGGTGS  
MGLLNNLRSFLWIRIQYTTREVEVELFRHLHSLSLRWHLGRKTGEVLRVMDRGTDSINNLLNYMIFSIAPTIIDIII AV  
TYFIAAFNIWFLIVFTMVLYIILTIVITEWRTKFQRRMN LADNETRARSVDSLLNFETVKYGAEKYEVEAFRENVL  
NFQNEEFKSIITANILNTIQNIICGGLLAGSLLCVHLV VNEHTLKAGDYVLFATYIVQLYVPLNWFVGTYYRQIQRFVD  
MENMFDLLREEQEIIDAPGAGPISVKKGAIEFN NVTFGYLPERLV LKNVTFVPPGKTVALVGPSPSGKSTIIRLLFRFY  
DVETGSIIDNQNIKIVTQESLRAIGVVPQD TVLFNNTIKYNIQYGR L TADADIIEASRGADIHEKILQFPDGYETKVG  
ERGLRLSGGEKQRVAIARTLLKAPSIILLDEATSALDTQTERNIQESLEKMCANRTTIIVAHRLSTIIHADEILVLQDGEIV  
ER GKHEHLIGQEGIYANMWKQQLSKENSSVETSLEKSTT

>c14528\_g1\_i1\_AbcBH

MAAIVNLSVISINSKLFYVHLRKS LCYRHFTHINAKRKTLECSPLIYETQRTTSSSKDKLERFVPSGGILALALKKISLTK  
PKSQPSRGC FHPGASALSRETIPLKGASPV TGTQMIQAMLYIWPKN DKATRDRVKLALSLLIAAKVVNVTVPFIFKY  
SVDYLNAGSALNMDTAPDVTLVATSL LIGYGIARASAAGFNELRNAVFAKVAQQSIRKISKNVFLHLHNLDLNFHL  
QRQTGALSKTIDRGRGINFVLSAMVFNIVPTIFELALVSSILGIKCGAAF GGISMGCVGVYALYTLTVTQWR TKFRIY

MNQAENEAGNKAIDSLINYETVKYFNNEKFEADRYDESLKKYEAAASLKTNSLAMLNFGQNVIFSASLSAIMILAAQ  
HIVTGLTLVGDLMVNGLLFQLSIPLGFLGSVYREVRQALIDMQTMFTLMTMDSSIKSKTDAPYLHVNSKTSDIVFE  
NVSFYGPKNKEIFDNLNFKISP GK KIALVGGSGSGKSTLIRLLFRFYEPHGRILIGNQDIREVHIESLRRRAISIVPQDSVL  
FHDTIKYNIHYGNLAASEKEVIEAAKMAEIHDSIITWPHGYNTQVGERGLKLSGGKEQRVAIARAILKNAPIFVFDEAT  
SSLD SITEHNILKALRNATQGRTSICIAHRLSTIMDADEIYVLENGRVDQGTHQSLLQNRGSLYWRLWDTQNHKIS  
EKPVNL

>c17206\_g1\_i1\_ABCBH

MWKLIQNSCNVHNTLRNLYLKDCFTLRSCNLLHTKQKLKHSIKNVRSKLSKQQHSNTFVFPKISSFGVSLTSGTIAYIV  
LTNKKVFCQQKKSRSIDYRDDSNKDAKFDWKLFWSYLRPHILYFFAAIVGALAVAILNIEIPQIMGGVINVIARFNESK  
DSNLFKEMKVPVAVKLVAMYVAQSICTFFIYMLSIMGEKIAYKMKTELFSSILHQDIAFFDQRTGEIINRLTSDVQD  
FKSSFQKQSVSGLRAATQVIGSTISLVMISPQMTFITLLCVPSIIVAGTIIGSLLRVTSRKAQAQGEKTTAVADEAVAN  
MRTVRAFAMEDQEQLFTSEAEYAMVLNEKLGFGIGLFAQGNTMFLNSMVLMTLYMGGYLLSTNQLTAGEVMA  
YLMASQTIQRSLAQMSLLFGSTIRGLAAGARIFEYINLKPSMSLVEGKTISDDHLKGNIEFKNVTFAYPTRKQQNVLQ  
NFNLSVPSGKTIAIVGASGNGKSTIVALIERFYDVKDGSVELDGCDIRKLDPSWLRRLVGLISQEPVLFGTSIMENIRY  
GKHEATDEEVRQAAILAHADDEFISNPKGYNTLVGERGATLSGGQKQRIAIARALLKNPKVLLLDEATSALDAESEKIV  
QSALETAGKGRVIVIAHRLSTIQNADLIVVLHKGKIVEMGTHESLKKLRGYYWSLTYQQLNSPAG

>c37312\_g1\_i1\_ABCBH

MVLLVSALNSLVAKGFELESKRIEVESMSREEFVVCGTEDSVLGTGRSVIGPGAIESLDLSGVSVFLHGTPILQNVNLKI  
ARNDRIALVGCNGAGKSTFFRLLGFHRYSGCVRANHEAADLSSGMLRDHISYLSQNRFAEGSVLDVLEVIPDDEIT  
DVCKRFGAHGFISRLPQGYQTPVDGLSQAQRQMVS VIRAYFKKACILLADEPADCLDPTDRDVTMDILLGSDRHQI  
KIVILHSREYIHKFDRVLVASDHTIKSYTLNAYVECVSG

>c2271\_g1\_i1\_ABCC

MDITKEIINPNRDDANPVSVLFFGFTYDLFRKGYKKTLEVEDLYNPLNKDRSKLLGNKIQRNWETELAKAKISNKKPS  
LMKAIKTFWVEYALLGIFTGFMDLGVKLIQPSILGGMLDYFKPNTTTTKEEALWYAGIIVMLNLLNAITANHYILGVF  
HEGM RIRAACCALVYRKALNLSKTALGDTASGKIVNLLSNDVSRFDIVSMFIHQMWVGPISALIVMALLYKDAGWP  
GILGVVVVFIIVPLQSYTGKLSAKYRKQTALRTDERVRLMDEIISGIQVIKMYAWEKPFKEIISLARRAEIKIITKSSYVRS  
FMTFNLFTRRLALFCTLLTMALVNEEITASRVFVFMAYFNILSMSMGAMFVRGISEIAEVIVGVNRLQDFLMNEEFQ  
TNESQSDLNDKEIMVNYDDIITLKNLTAKWNLKNSENALGNMDIHIRDGQLLGIIGPVGSGKSSLLSTLLGELEVTSG  
KMRINGTISYASQEPWVFAATIRQNILFGAKYDKQRYQDVVKVCALEKDFEQFANGDLSIVGDRGASLSGGQKARI  
NLARAVYRDTDIYLLDDPLSAVDIHVSKHLYEQCICGYLKNKTRILVTHQVHYLKNADSIILKNGRIEEEGTFKLTNSD  
NLYAKLLTAETEDPESTRKHTESENKLSRSRKSLSGRKLSLALSEISLVDTLTLEDNEDEEEEEKEIQKDLQEESKGGKIK  
GSILVKYFQAGGSCFIILIMLILYIATQLAASGTDYVWSYWVNIIELGKNTDIPTSFIVPLSTETCLTVYGIGIISLFI  
SRSVLFYKIAMWSSKNLHKVIFNSVVGATVRFDDTNPGRILNRFKSDIGTIDELLPKVILDSAQILLMFGNLILVVIIN  
PYFLILVFLSIIIFGMLRHVFLKSSKNIKRLEGIMRSPVFTHLNATLQGLTTIRAFGAQDILSDEFDKHQDYHSSAWYM  
FISASSAFGFWLDMFCAGFVAITFSFFTFGENFGISGGNVGLAISQATALTGMLQWGMRQSAEVS NQLMSVERVL  
EYNLLPKEVQPAKPFPPKSWPESGQITFDNMGLRYPPEGPLVKDLTLTIKPEKVGIVGRTGAGKSSTILALFRLAP  
VEGSIKVDNIDTKNLSLETLRNISIIPQDPVLFSGTLRYNLDPFEEYPDEALYKAIEDVELKDPANVINRLENRVM DRG  
ANYSVGRQLICLARAIIRNNKILMLDEATANVDPQTDALIQKTIRKKFADCTVITVAHRLNTIMSDKVLVMDAGR  
VIEFNHPHILLQNKNGAFNKMVAETGKAVSDQLRKIASESHQRYLAVPE

>c9928\_g1\_i1\_ABCC

MYAWEKSFEKVVALARKFEIDKITHASYIRGLYLGLTVFTERLCLYLTLITFVFLGNRLTGDIVFSMAQLFNTVQLYMAI  
YYPGSLSSYAEAKVSIKREEFLLEENEPKITNKVNGSLHVEKPGKIKLSKVNASWIPNSIIDTLIDVNLEIKPGILCCVV  
GNVSGSKSSLLQVLLKELPLTKGVMNITGKVAYASQEPWLVFVSSVRNNILFGKSYTKQRYTEVVVKVCALEKDFKQFP  
YGDKTLVGERGVSLSGGQRARINLARAVYSEADIYLFDDPLSAVDTHVGKHLFEECIIRYLRNKTRILVTHQIQFLRKA

DLIVVMNNGKIESMGTFNDLGENELRHYSHEQHEHQKEMIKKPETLFVKKERMHSHSVASFASISSVLTEFEEPQET  
QELIEKGVIPASTYTEYRNGAGVPLLIIFAGFLIIAQMASNAADFVWVYWTNKEDLRFESLNGHSSVFRGNDSLSE  
SLVLDNFTNQSFNWTDTKEESVIPPKEWYIIISAFIGASIILTPLSRNICYIIFMKASKTLHNKMFNNVLQAPMRFFDT  
NPSGRILNRFKDMGTIDEVLPKATTEALQVFLVMAGILLLVFIVSPWMIVPALFLGFIFYICEAIYLGSAQDIKRELV  
TRAPVFSHISASLYGLSTIRASHAEQMIREFDNLQDQHTSTWYMLLACSEAFGFYLDIISTIFLSCVTFQFLIFKENTL  
SANVGLVISQAMVLTGMLQLGPRATAEVASNMTSVERVLQYSKLDKEGPFETLPAKKPPRDWPSKGITFKNTYLR  
YVPDEAPVLRNLSIEIQAGEKVGIVGRTGAGKSTLIASLRLAPIEGLIAIDDIDTADIGLYDLRSNISIIIPQEPVFFATIRY  
NLDPFDKASDEVLWEALEKVELKSAIDSLDMKVSEGGSNFSAGQRQLMCLARAIVRNNKVLVMDEATANVDHVT  
DSLIQKTIRENFKDCTVLTIAHRLNTIMSDKVLVLDGGVAVEFAHPHELLNIPDGYFTKMVKETGVSMESSLRKIAK  
EAYEKHETNH

>c16520\_g1\_i1\_ABCC

MRSHYLLFKSSFSNYSIYLSYVFSICYLVAQLIYGLTLIPSEGSTTYLNFSTRYTELGENQPLLHNAYGGFLEEGDPAYL  
GVAMENTHLLSKLFFSWVNPLMEKGYVGKVNVEDLYDLPFYLTGCHISAKLSTTFLEKQDNETGRRRSSTNPEVS  
FIDRSNRKVSLLRALHRCFWVQFYSVGLLRLIADITAFAGPMLLNKLGIFIEDKSEDIKWGYIFAVGLVLTITISALCDS  
HFNYWMAIIGLHMRGALVTTVYRKTLSVSSTMLSSHFSIGEIVNFMSTDTDRIVNSCPSFHSFWSIPFQLGVCLYLLY  
QQVGLAFLAGLIFSIVLIPINKLIANKIGQLSTKLMEQKDARVKIITEVLRGIKAIKLYVWEQHFIRLITKLRDKELKYLKG  
RKYLDALCVYFWATTPVVISILTFSTYVLMGNKLTAAIVFTSIALLNMLISPLNAFPWVLNGLTEAWVSIRIQKLLDLP  
DLELDSYYDKSVMENQDNVEILITDGGFDWRKEMSAADKMRLHAPEEKVKDKGKGGKRSSALMTADKSNAD  
SRIREVDDDSVFRLLHVNFKIKKGEFIGIIGPVGSGKSSFLSAVLGELSMNSGSIASVQIESGFGFVTQPWLQRGTVR  
DNILFGKPYEDTRYKAVLACGLNDDILTLPAGDMTGVGEGGTTLSGGQKARIALARAVYQDKVVYLLDDILSAVDV  
KVAKHIFQHCIMGLLLGKTRILCTHHVKYMVYADKIGLMENGTFKIIGKPAQVLSDIDDNLPIDLELEESIQSSSTLSS  
LLDSSKFDIKGGDGEDKDSILLEEFSEAGSLEFSVYASYWKALGHLLSLLILLSVTLMQFSRNMTDWWLAHWVTD  
ENNSTNSTNLTTINHDLMSYDVYEDESSTSSYLKVVYEFACVNTIFTLVRAFVFAYGGIMAAAKFHKLLKSVMKAK  
CTFFDVPTGRILNRFSSDITYVDDSLPFIMNILLAQFFGLCGALTITIYGLPWICLILVPLIPVYHWLQNHRYLTSRELK  
RISSVTLSPVYSHFNESLQGLTTIRGMRAIQRFRDNELNVDNLKAQFASQAAARWLGLRLQFIGVAVVTGVSFI  
IQHQYDVADPGMIGLAISYALSITGTLGVINAFETETEREMIAVERVNQYITELTPETGYFIIDPPFAWPSQGVIMFKD  
VELRYREHLVPSLKGISFETRPCEKIGVVGRTGAGKSSIITLFRLEVELSSGTITIDTVDITRISLALRSRMFCIPQDPFLF  
SGSIRENLDPGEFRENEIWNALTKVSLAEVIKIRIGGLDHKVDGGGVNFGGQKQLICLARAVLHNAKILCVDEATA  
NVDEETDRLIQNTLRTAFRSTVITIAHRIQTIFDSRVLVMDQGEIVEFDTDPDSSLAHQDSRFYKLVNNE

>c17487\_g1\_i1\_ABCC

MYRSVGIAGLAGMLAMGIEALPLQGWMSKIQKLRFKIAEKTDYRVKLMNEIVSGIRVIKMYAWEKSFVAVVELAR  
KEEIDVITKTSYVRGFSLSLMVFTERLSLYLTICFVLIGNKLSDDVVSMAQLINSIQLYMCIIYPNALASYAEAKVSIKRL  
EQVLTLEENGEKAVLNNNGSGCVGKPGTIRTEKATASWNLYPVLDTLNDINLKINPGTLCCIVGNVAGKSSLLQMLL  
RELPLNCGRVDIVGEISYASQQPWLVS SVRENILFGKPYIKSRYDQVVKVCALETFDQFPYGDKTIVEERGVSLSG  
GQRARINLARAVYAQADIYLFDDPLSAVDAHVGKHLFEECIREYLKNKTRVLVTHQLQLKHADVIVILREGKIHKIGT  
YDELSESELQSLYPESTLEDKSNENDHGKALENFAENYVENEDEPEEKTEAMGSGAIPTSTYAEYRHHGAGLFLVLLFL  
VFLIIAQMASNAADLWVYWTNMEETKHNYSNILLEDDFTTIYPDNQSLIDDTMLYSVISNATSGYLQPESHTSFV  
NDTSIGNFEFVGSEEFYIYITIFIIAAMILTPARSHLFYKIFMNASKGLHKKMFANVLAAPMRFFDTNPSGRILNRFN  
DMGVIDELLPRATLEAIQVFLVMSGILMIVFIVTPWMIAPTLALGLLFYFRVVYLKTAQNVRKLEGISRAPVFSHISAS  
LYGMPTIRASKAEKMVTKEFDNLQDIHTSTWFMYIASSEIFGFYLDICISTIFLGVVTFQFLILSNESVLSGNVGLVISQS  
MVLGTMLQIGVRQTAEVASNMTSIEVRLQYTKLEKENNYDDQPSKNLEKDWSYFAKLTYPINERNWPQMGITFR  
SVYLKYAPEAQVPLKNLNEIHAGEKIGIVGRTGAGKSTLMSALFRLAPVEGAIVDDVDTAKIRLNLRSSISIIIPQEPV  
LFSSTVRYNLDPFKISDDILWRALENVELKGAENLDQLVSEGGSNFSAGQRQLMCLARAIVRNNKILVMDEATAN  
VDPHTDSLIQKTIRENFKNCTVLTIAHRLNTVMDSKILVMKAGEAVEFGHPYELLQNPEGHLSKMLKQTGCFMEN  
NLRNVAETHYDRCLSETNKIKHL

>c17487\_g1\_i2\_ABCC

MYRSVGIAGLAGMLAMGIEALPLQGWMSKIQGLRFKIAEKTDYRVKLMNEIVSGIRVIKMYAWEKSAKVVVELAR  
KEEIDVITKTSYVRGFSLSLMVFTERLSLYLTIICFVLIGNKLSDDVVFMAQLINSIQLYMCIIYYPNALASYAEAKVSIKRL  
EQVLTLEENGEKAVLNNGSGCVGKPGTIRTEKATASWNLVPLDNLNDINLKINPGTLCCIVGNVAGKSSLLQMLL  
RELPLNCGRVDIVGEISYASQQPWLFFVSSVRENILFGKPYIKSRYDQVVKVCALETDFFQFPYGDKTIVEERGVSLSG  
GQRARINLARAVYAQADIYLFDDPLSAVDAHVKGKHLFEECIREYLNKTRVLVTHQLQFLKHADVIVILREGKIHKIGT  
YDELSESELQSLYPESTLEDKSNENDHGKALENFAENYVENEDEPEEKTEAMGSGAIPTSTYAEYRHHGAGLFLVLLFL  
VFLIIAQMASNAADLVWVYWTNMEETKHNYSNILLEDDFTTIYDPDNQSLIDDTMLYSVISNATSGYLQPESTSFV  
NDTSIGNFEFVGSSEFYIYITIFIIAAMILTPARSHLFYKIFMNASKGLHKKMFANVLAAPMRFFDTNPSGRILNRFNSN  
DMGVIDELLPRATLEAIQVFLVMSGILMIVFIVTPWMIAPTLALGLLFYFRVVYLKTAQNVKRLEGISRAPVFSHISAS  
LYGMPTIRASKAEKMMVTKFDNLQDIHTSTWFMYIASSEIFGFYLDICISTIFLGVVTFQFLILSNESVLSGNVGLVISQS  
MVLGTMLQIGVRQTAEVASNMSTIERVLQYTKLEKENNYDDQPSKNLEKDWSYFAKLYINPERNWPQMGIKIFR  
SVYLKYAPEAQPVLNKLNLEIHAGEKIGIVGRTGAGKSTLMSALFRLAPVEGAIVDDVDATAKIRLNELRSSISIIPEPV  
LFSSTVRYNLDPFKISDDILWRALENVELKGAIENLDQLVSEGGSNFSAGQRQLMCLARAIVRNNKILVMDEATAN  
VDPHTDSLQIKTIRENFKNCTVLTIAHRLNTVMDSDKILVMKAGEAVEFGHPYELLQNPEGHLSKMLKQTGCFMEN  
NLRNVAETHYDRCLSETNKIKHL

>c17866\_g1\_i1\_ABCC

MAALFGVAFLVSFVPLQMWLAKRVSVLRLRTALRTDERVRLMNEISGIVIKMYCWEKPFALIALARKKEMKAIR  
LHSYLIGLIYSFEIFVARTSIFISILGYILLGNYVTAEKIFAITAIYNCMRPVITILFSLASIAEVNVSILKRLQNILAFDEKTL  
EDPLILINGNLLKSKQKESVKNGISNGVVKDEICDKKEIKGSNLPRIMLKDVCMWSQDTSDDTLHNINLDIHSNQLL  
AIIIGPVGSGKSSILNLLKELPVKSGEIEIDGEMSYASQEPWLFAGNIRQNIIVFGEAYNEERYQRVVEACALKSDFELFA  
HGDKTLVGEKGSLSGGQKARINLARCXYKTAADIYLLDDPLSAVDANVKGKHYEKCVKEFLTNKICILVTHQLQYLKN  
ADKIIIMNDGEIQSEGKYSELQSSGLHFAKMLKAFHTEDIEEEKRIKSRQNSEMEVEVEVEEENQVAEKENQASGTI  
KKEIYWKYLRAGGGPLAIGFLIFLIINQLVANGAEYFVYVWVLETDLASRIKNNQTTKNETIPRDTIICLYSAMTLGTI  
VVAVCKSIYYMLFFAIASRNLDHYIFSRIRATMRFYNNNPSGRILNRFKDLGIIDEYLPVSLIDVLEIGLLLTGAILTSSIV  
EPWLLLP

>c18304\_g2\_i1\_ABCC

MLQPILAEYISYFDAVNKDKGPTGEGWLLGSGVVLIAFLNVLIMHYCSLGCQREGMRVRVACCSLMYRKLKLSQTSL  
GQTAAGQLVNLMNSNDVQRFDLAANFLHYTWIMPIQAVLAFYVVMYRSVGLAALAGMLALSIAIPLQGYLSKLQG  
QLRYKIAIRTDHRVKLMSEITSGIVIKMYAWEKPFKVVVELARKLEINVITKTSYIRGVSVLALCVFTERTVLYLTLITFVL  
SGESLTGNVVFMAQLFNTVQLYMCIFFPLSISTYAEARVSIKRLNFLTMEENPKNKRDPNQKIATSSAGEIRITKA  
NATWLPNPIVYTLMNINLDIKPGTLCCVVGSGVAGKSSLLQMLLDELPLTTGKMEITGSIYASQEPWLFVSSIRNNIL  
FGKPYLKNRYKDIVRVCALQRDFEQFPQRDQTPVGERGVSLSGGQRARINLARAVYNEADIYLLDDPLSAVDTHVG  
KHLFEQCIKQYLNKKTRILVTHQLQFMRQADLIILLNNGRIEKICKFSELTESELKNLNQESHHEENEREKSPTEVRDR  
LNSHDQRDRQLQSIASFSSLLNEEPQDTEEQMETGSIIPASTYSEYWRSGGNYFILAFLAFLFIIAQMAVNASDLWLTH  
WTNMEENTRLSLNRTLAQSTDAPLKITIPGIINNALNNSHLNTITTSNLSDPHYIIIIYSIFILLSMILTTFRSLLYYKM  
CMTASKVLHNKMFANVLQAPIRFFDTNPSGRILNRFKDMGSLDELLPRALLDAIQIFLVMGILVMNFIVTPWMI  
PAALLGGLFYFRVVYLSTAQDVKRLEGVTRAPVFSHVSASLYGMPTIRASNAEEMVIKEFDTLQDQHTSTWFSFLA  
SSEAFGFYLDIISTTFLALVTYQFLIFKTENTLSGNVGLVISQSLITGMLQFGVRQTAEVASNMISVERILQYTKLDKEG  
PFESIKKPPKWPSAGDVKFKNTYLYKYPGEY

>c18304\_g2\_i2\_ABCC

MDSSKFKVSPEDKANICNKIFYCWVLPFIKFGYKNDLRIKDVYNTTKADFSGLGDELEKYWNEEVAKCTKGTNK  
KPSLQRAILKTFKYSYGIWFLQCVILRMLQPIIAEYISYFDAVNKDKGPTGEGWLLGSGVVLIAFLNVLIMHYCSLG  
CQREGMRVRVACCSLMYRKLKLSQTSLQTAAGQLVNLMNSNDVQRFDLAANFLHYTWIMPIQAVLAFYVVMYRS  
VGLAALAGMLALSIAIPLQGYLSKLQGLRYKIAIRTDHRVKLMSEITSGIVIKMYAWEKPFKVVVELARKLEINVI



PLGLYSEDIWKTLLHKIHLDATVPSLDTNIEDINFSTGQRQLICVARAIKKNKIVVLDEATANMDPETEDMIQKIISN  
NFSDCTVFIIAHLRQSILDCNKVMVLDRGQIVFDDPKVLIDNPNSRFSQMLKNAGIDESTQTESNK

>c19309\_g1\_i2\_ABCC

MDHFETGKRKRSIYHCEKEKEKNPIEKANIFSKLTFGYTLGLLRKGKLTEIEEGDLYEVLKSCRSKCKGDKTEQQWKK  
STSTVQLFWKCFGIKIVLLCALDISWTVITSVLQPYGLSRLIAYFQENQTTISRNEAYMCAAIVVVLNMLHCIFWQNL  
QVYQTIFGVEIRTSKLSLLYRKTLLAPSSYSETSIGNLVTVTRDINEIQYNLWMFKDFLVFTVQTIILVYLFYAKMGYC  
AFIGIGIMFLVIPVQAYLSSRLTKLRLEVGNKSDNRLKCTQEALTAIKIIMYTWENFFIKRIAIEYRKTIELTLAKVLFNLL  
LLIIGINTSKVSLILLISYTWLGFTSNTEMVFYIMSLSLQLMSALSYPQSMAKAATFHAAFIRLNRLVQGDDELKIDC  
ELTEKPSIDIKEAVVKIGNEEVKGVSLRITKPSLVAVTGPLGSGKSSLLKLVSQDYAICEGOAKIRGSISFASQEPWLPF  
ATIKQNIIFGETFDKKRYKEVIKVCALYDLLLLENGDETLVVNGGQNLKGGQSRINLARAIYRDSDIYLLDDPLTALD  
NRVQNHIFSECIQSFLNGKICILVSNLHIAAANHVVFRDGNVESNDQTKDVDGNKFENLIAIKNTENEGRKTILID  
EGEKQPPAIKAKQQSKLNIYHEVKKAGKVDLSVYVKHIKFGGGFLVFLVLLYILSQVSDSSLDKMLTKWTDIQQ  
RVLDMQDNSTINNTTYFEEVSSQKDHTFNMTVVLMLGLRTVFNLLAYFSFIWFQCASINLHQTMSAVLKAVMSF  
FDTHYIGNILNRFSCDINNIDERLNYMYTHIIVFRVTGCLLIATVNWFFLIPSSIIILMLRICYIQTGRCLKRLETATT  
SPMLGHINASLEGLTTRAFKAENALIDEFDRHQDFYSSAYFTLQLCTISFAFFLDVFSTIFSFIIARLFFEHDSAGDV  
GLALTQVFLTSNVQGISQWANLESCMTSVERSVEYTEIDKEPSKGLAKHWPSEGALTVEKVTLYNSSKVPILNN  
LNFSVKPREKIGIVGRTGAG

>c19520\_g2\_i1\_ABCC

MLPNLISNIQTVVSVKRLNKFMNSEDLPNNAVFHEPNKEYPLTIENGTFSWGENTTLQDINIKLKANTLTAVVGGV  
GSGKSSLVSAFLGEMEKISGRVNTFGSIAVVSQQAYIQNATLKENILFGRPYDKELFDKVIHACALKPDLDMPLGADL  
TEIGEKGINLSGGQQRVSLARAVYANADIYFMDDPLSAVDSHVKGHIFEQVMGPKGLLNKTRLLVTHGITYLPQT  
DHIIVIKNGGISESGTYSKLLSQKGAFAEFLQLHNLNEDSADDNELDELQDQLADTSISEEVTRRLDRQRSRTSDELNRN  
GSIKRASVDSIRDQKIEKNLNLKTKAKRGQKLTEKEKAETGNVRLSVYKYFKSIGYTFMLITVGFSLIYQGFQVSSNV  
WLGMWADDDKIVVNDTVDSGRRDMYLGVYVGLGIGQVTLIVANIVFTKATLDAAVRIHQFLLNNILRLPMAFFD  
TTPMGRILARFSDINGVDQRLPNNLQMIIMRLIQVIGSLAVICFNVPWFVAVLLIPISIVYVFMQRLVYVATSRQLKRLE  
SVRSPIYSHFGETISGLQVIRAFSQQQRFILETDKKVDLNQVCHYPSIVANRWISIRLEMMGNFIILFASMFCVLGRN  
MAPGIVGLTISYALQITQLLNFIVRQTSDIETNIVAVERIKEYGETAQEAPWEIPSRNPPKSWPEIGTVEFQDYAVRYR  
PGLDLVLTGINFRINGGEKVGIVGRTGAGKSSMTLSLFRIEAAQGGILIDGINVANIGLHLSRSLTIIPQDAVLFSGSL  
RMNLDPFHEHSDQEIWATLEHAHLKPFVKGLPAGLQHEIAEGGENLSVGQRQLVCLARALLRKTILILDEATAAVD  
LETDDLQKTIPTAFKECTVITIAHRLNTIMSDRIMVLDKGRIVEFDSPENLLANPGSIFSGMHK DAGLS

>c22228\_g1\_i1\_ABCC

MECKALDDFCGSKFWDTDLTWNTYHPELTPCFEKTVLIWVPCIFLWLFSGIEVGYILQSKRRNVPNWNRNISKLTLI  
GVLFLALIDIFVTMSDASVIYNVDIYSPLIKALTFALSAILLHYNRKYGLHTSGLQFQFWLILVICGIPQFHTEIRMGQA  
NLVPEEKYTNHAIYLIHYPLSILVFLNLCIADLPPKETLYPQTEKPCPEEKAGFLSRITYLWFDPLIYKGFKPLVAEDLW  
DMNPEDCSRELVPKFDKHWKSLAKAQSANARSSSSQASYKSGSTQVDISHTTKKIASVVPALIKIFGPSYLFNSML  
LFIQIIMTFANPQLLGLLISYVSNREETWKGYTYASLFLVSGIFQTFLQNYHTKIFTMGMRIRSVLISALYKKSLSISNA  
ARRERTVGEIVNLMAVDAQKFMELANSINMLWSAPVQIVLCVYFLWQELGVSVLAVGLVMICLIPINGIVASKLKKL  
HMKQMKTKDARVKMMSEILNGIKVLKLYAWEPSFENNVLKTREREIKVLKQTNYLQASTSFIWQCAPFMVSLMSF  
ATFVLSDDKNILDANKAFVSLFNIIRMPMTMLPNLITSLIQTMSVNRINTFMNADDLNPHSVYHEVNKEYPLTIE  
NGTFSWGTDAPVLRDINLQKAHTLAVVGSVSGKSSLSAFLGELEKLSGRVNTFGSLAYVSQQAWIQNATLRD  
NILFGKPYDAKFYETVIEACALKPDEMLPGGDQTEIGEKGINLSGGQKQRVSLARAVYANVEVYLFDDPLSAVDSH  
VGKHIFEQVIGSKGLLRSTKLLVTHGVTYLPKTDKIIVIKEGEISESGTYQELLNSKGAFAEVFLQHISEDNVDEELSE  
LQDQLIDTPLSEEVTRQLSRRTSRASESSVVDLIRSGLSRQTSRDSTHDRKLPFKGSKQQFGGKAGGDNKRGLPKR  
RGPQGAKLIELEKSETGNVSWEVYKYVLAIGFLWILVTLINGISQGLAVGSNVWLGIVWADDTEIYVNGTVNKGKR  
DMYLAGYGILGIGQVAIVASNLLFTKATLDAAVRIHAFLLKTMMLPLAFFDVTMGRILARFSDINGVDQRLP

MTFQMILSQIFRIIGTIAVVSYSQPIFIVIMLILGVIYVVFVQRLYVASSRQLRRLESVSRSPIYSHFGETVSGVTVIRAFGA  
QERFTLESERKVDLNQVCNYPGIISNRWLSIRLESIGNLIFFAALFAVIGRDTAPALVGLTVSYALNITQTLNWLVRMT  
SDVETNIVAVERIKEYGTIAQEAAWDIPQKNPPKTWPDHGAVEFKNYAVRYRQGLDLVLSGMNFSIQGGGEGKIGIVG  
RTGAGKSSMTLCLFRIIEAAEGKIIDGVNIGEIGLHALRSKLTIIPOQDAVLFSGSLRMNLDPFDEHSDEELWTSLEHAH  
LKPFVKGLSAGLQHEIAEGGENLSVGQKQLLCLSRALLRKTILILDEATAAVDLETDDLIQNTIRTEFKECTVITIAHRL  
NTIMDSDRIIVLDKKGKIVEFDTPASLLANSDSVFSGMHKDAGLS

>c6230\_g1\_i2\_ABCD

MPTVISKFLEKSERTVNAHRNVISGAIIASALCVYAYKVGYPFVASLIHKSNEALNINNNLVTSNILQQNGEVKKKKV  
RNRFKNGIPNFNLQFILQVIKLVKIMIPSLFCTEIALGGHTTFLFRFLFSIYVANLEGAIVKYIVRKEPKNFMKQLGKW  
FAVAIPATYINSMIRYLESRIALSFRSRLVEHSYKLYFNNSYRVRTVLDGRLDNCAQRLTDDIETVAGTVSHLYGQITK  
PCFDILLMAIALANLVKSRNSNLIIGPIIISGVVVISALILRLVSPKFGQLVAEEAEKKGYL RHVHSRIVSNSEEIAFYGGH  
KVEKSHLRQAYRILVEHLEHMFVGLWVFMLEQFLMKYVWSGTGMVVVSLPILLAATNKRRTKNILSLPSSGAPA  
ANTEEFTDDNVSERTHYFTTAKNLLITGSNAVERLMSSYKDIVELAGHTARVANMFTVLEEASQGIYHKTIVAKKEKS  
NGFEIEFKGDQPLAKGKIFYSSNYEILHNVPVTPNCDIVCPSLSLHIKPGQHLLITGPNCGKSSLFRILNGLWPIYGG  
ELYTPKNSLFYIPQKPYMVIGNLRDQVIYPTDYADMINKQVTEEDLRKIMRMVYLDHIVERDTFHEVKDWDILSGG  
EKQRMAVARLFYHKPKYALLDECTSAVSIDVESNIYQSAIDMGITLLTITHRPTLWKFHHTILQFDGAGSWEFSELNH  
NNRLDWKKEKEVLLKNSSSSNEQTNRLYQLNKLLGEDE

>c32148\_g1\_i1\_ABCE

MSKRKDL EESDKLTRIAIVNSDKCKPKRCRQECKKSCPVVRMGKLCIEVTPNSKIAAISEELCIGCGICVKKCPFEAITII  
NLPSNLQKETHRYGKNSFKLHRLPIPRPGEVLGLVGTNGIGKSTALKILAGKQKPNLGRYMDPPDWTEILNHFRGN  
ELQNYFTKILEDDLKALIKPQYVDQIPKAIRGTVGQLLDRKNECNMNDIGRMLDLNHIKEREIGALS GGELQRFACA  
MVCIQNGDIFMFDEPSSYLVDVKQRLNAARTIRSLLOPKFIIVVEHDLVLDYLSDFICCLYGVPGAYGVVTPMFSVR  
EGINIFLDGFPVTENLFRDES L VFKAESATEEEIKRMNHYEYPAMRKTMGSEFELNVVKGQFSDSEILVLLGENTG  
KTTFIRMLAGNLEPDSGAGDLPQLHISYKPKISPKSQGLVRQLLHEKIRDAYIHPQFIADVMKPLKIEDIIDQEVQNL  
SGGELQRVAMTLCLGKPADVYLIDEPSAYLDSEQRVAAKVIKRFIIHAKKTGFVVEHDFIMATYLADRIVVFEGSPSV  
KTTAHTPQTLLAGMNRFLLELLGITFRDPNNFRPRINKLESVKDVEQKRAGQYFFLED

>c5717\_g1\_i1\_ABCF

MSKKRGNKKGKNAEDDFDISSNANENDTLTSKPAKGKTAKKGGKGRDDDGSDEEVNNDIVEQSSKTENIPPQP  
VKKKATKKGKGNKKDDWSDKDDVDVLPFEADSELVHMAQKKSNAKAKKADSDDEEFKEGIPKLAKNVEKK  
KMILDSDDEDILSKNQENDYDFESTPTPKPVKGGKKNKRKEIEFEEVTSSEKKNDEEESDEETKAQYDSGDEFEE  
GIVKLVKKGKGNKQEEETEEISQPIKKNRKNKEETHSELDEESSTMLELNKDTDHHEVDEEDVPQPVKKMG  
KNKNSIEKVQNEVVTEKSDSIEQNGNEDTMEEDHSSSEDKSDKLDVVAEITDELATLISEDKTKKELTHKEKKKM  
KKDEEYKMMMEAMLKKGQGHSELDSNFTVSQVQKTAGQMAALENAVDIKIENFSISAKGNDL FVNANLLIAQG  
RHYGLVGPNGHGKTTLLRHIAQRAFAIPPNDILYCEQEVVADDNSAVDTVLAADV KRTTELLKECQQLEEQTNKGNL  
EVQDRLTEVYSELKAIGADSAEPRARRILAGLGFDKEMQDRATKNFSGGWRMRVSLARALYIEPTLLLLDEPTNHLD  
LNAVIWLDNYLQAWKKTLLIVSHDQSFLDNVCNEIHLDTKKLYYYKGNYSMFKKMHVQKRKEMIKEYEKQEKRLKE  
LKSSGSSKKQAEKKQKEALTRKQEKNRKMQKQEDDVQTMELLQRPKEYLVKFRFPEPPPLQPPVLGLHNVTFGYP  
GQKPLFVDTFDGMNSRVAIVGPNVGKSTFLKLLTKDLTPLKGEARMNHLRIGRFDQHSGEHLTAQETPSEYLI  
RLFDLQYEKARKQLGTGFLASHAHTIKMKDLSGGQKARVALAELCLNAPDVLILDEPTNNDIESIDALAEAINETG  
GVIIVSHDERLIRETNCALYIIEDQTINELDGDFFDYRKELLES LGEVINSPSIAANAALA

>c16817\_g1\_i1\_ABCF

MQQRQHVQEFIDRFYRNANRAALVQSKIKMLEKLPKPVIKETEVLKLPDTEPLSPPIQLNEVMFRYTQDRIIFS  
DVNLGATMDSRVCIVGDNGAGKTTLLKIIMGILSPTSGMRHVHRNLKFGYFSQHVDQLDMNVSSVELLQQTYPG

KPMEEYRRQLGSFGVSGDLALQIVSSLSGGQKSRVAFARMCMGRPNFLVLEPTNHLDIETIEALGKAIQKYTGCVI  
LVSHDERLIRMVCNELWVCGGGSVRSIEGGFDEYRKIVEQELEASQAK

>c36074\_g1\_i1\_ABCF

MPSDAKKREQQRKKEAAKARQAGKKNEKPKNEEQNGISKTNGLENGEENGSTDLSTEEALCAKLEADAKLNAEAR  
SCTGSLAVHPKSRDVKIANFSITFHGSEMLQDTMLELNCGRRYGLIGLNGSGKSTLLAVLGNREVPPIPEHIDIFHLTRE  
MPASDKTALQCVMEVDEQRIRLEKLAEEVSCEDDESQEQLMDIYERLDEISADTAEARAAEILHGLGFTKDMQNK  
KTKDFSGGWRMRLARALYVPHLLLLDEPTNHLDLDACVWLEELRNYKRILVLISHSQDFLNGVCTNIIHINKKRL  
KYTGNFYDAFVKTRMELLENQMKQYNWEQDQINHMKNYIARFGHGSAKLARQAQSKETLAKMVAQGLTEKVT  
SDKIVTFYFPCSGSIPPPVIMVQNVSFYNDKSPWIYKNLEFGIDLTRLALVGPNGAGKSTLLKLYGELTPTEGMIR  
KNSHLRIARYHQHLHELLNLDLSPLEYMMKEFPDVKEKEEMRKIIIGRYGLTGRQQVCPIRQLSDGQRCRVVFAWLA  
WQTPHLLLLDEPTNHLDMETIDALADAVSEFEGGMVLVSHDFRLISQVAEEIWWCENATVTKWQGDILSYKDHLKS  
RILKDAKRK

>c2747\_g2\_i1\_ABCG

MGPSGAGKTSLLNLTGFQTHNVSGSIKCSGNIGKKNPSEYKDKSCYILQDDILPDLFTVEECMMMAVNLKIANLS  
EKSKDYLVNDVLEILGLKNCKKTRCESLSGGQRKRLSIALELVNPPIMFLDEPTTGLDSAASAQCVRMLKYLASQGRT  
IICTIHQPSAIIYEMFDLIYMMSHGKCVYQGASHNTVPFLSSAGFCQYHNPADYFLEVNGDYGNFTDYLVKAAT  
RNNWRNTVPTIQTITDHIQDVQKDSIYDSKSCSFEVPTSEWVKLCVLLKRTGTQIYRDWTSQKLLLVHFTGIIIVGLTF  
QNAGTDASKITKNLGLFVGMIIYIYACMPGVLFKPELRLKRFNNWYKLTYYIAFMLFDIPLQLTFSTAYSLLA  
FSISSQPFEEFRISRALAIQGLVGLSSSSLGHIMGSLWSNPVNGLFWGSIIAIMILFAGFLIIFSHMNILMYFMTYFCFT  
SFAIEGLMQSVYGYNRPNLVCPEEVEYCPYTSPASLLKDIGMDKQNFWLDMGYLVATFLVVRTIAFCTLKRKISTA

>c12203\_g1\_i1\_ABCG

MEPSAAHQNFQKFLAAKRPDSMKLELLTIPENNYVNSFGTSNSVNVVNSFKNITYAVKEGIIKRKRILLDKINGAFES  
GELTAIMGPSGCGKTTLMNILAGYTTAGVTGSKLINDELREENIFRRKSCYIMQDDNLQPLLTVQEAMSIADLKMT  
STYSEKDKKTRIKEILDSMNLWQHRKTRTCTLSGGQKRLSIALELLKNPEIMFFDEPTSGLDLASKQCILLKQLAM  
SGRSIICTIHQPSATIFEMFDHLYVLAEGKCVYQGSVKLLPYLEEVGLRCPEYHNPADYILEVASGEHGNFTEALYKK  
SENGVNVQEWRRKQRDSIDVQSIQHIGRMMESGKITPVHAPPVIFSKVRSCDNDQSNQCCHKSYPYSYCNQICVLLK  
RTFLILTRDRTLTYSRFLTHLGIASFLGILYIGMDASNMLNMFNFVFFSVMFLMLTAFNCVTTTTFPELPIITREHFN  
KWYSLKSYIIAISLADIPVQVFATVLYALITYFMTKQPVELYRVLLFICMCILISLVAQSFGLFIGACMDVKNVGIIGPFC  
MLPFTIFSGFFVQLNSSHPYLRWIFHISFLKYGFEGLLSVFGYGRGKLPDADYCHFVYPEKFLKEMDMQYAKYSTA  
VIFLVGLFLAIRIAAYFALSIHIRYNRQRR

>c13670\_g1\_i1\_ABCG

MIPGEYVLELCNVFYSGQIEPGSCVQRMFGTIKTGVILKDVSMVHSGEVLAILGSKGSGKKALLDVISRRAQGPPIRG  
QILLNGQPMSLCLFQQRCAVYVTHKCDLIPGLTVEQTLTYTATRLSTYLKSSKVKQVMADLALSQVANKTIEDLTPSEY  
RRLMIGVQIIKDPVVLLEPTWELDPLNTYLVVSILSNAAKKYGTAVLTMEKPRSDVFPFLERVLYLCLGDVVTGG  
TRQMLEYFNAIGFPCQLENPLMYLCLSTVDRRSRERFVESNHQIAALVDKFKHEGGPYRKGSSISGANHLLQHSI  
HGNKITLLLGRPSSISTGWLIYRRLSATLNFKKEGVRQTFRLFLPLFFLLWIFYRDIKDYQHTYISRSGLVNCLAGV  
YFLGIINAVLLYPSYRTRYFQESQEGLYGGTMFLVTYHLVSIPFSFLSTAGASAILRSEEHT

>c15301\_g2\_i1\_ABCG

MKAGSLVALMGASGAGKSTLMSALGYRQGGGSEVEGDILVNGRIIGPYMKFLSGFMYQEDLFPYLTVMHEMNI  
MANLKLDRRLTKEDKRKLLDILRQMGLLKCLHSGKGGDQNKALSGGEKKRALAFATELLDPPVLCDEPTTGLDYY  
SAQKIVKMMNKMAFEGKTLCTIHQPSSDIFAMFNQVLLAEGRIAYMGSIHNALEFFERLGYVCPHNYSPADFFIK  
TLASAPGYEDNSRLAVKRFCDQFAVSDYAKEVEILVQYEFHMGRAVLSRHFELRKDFKEAFWFSQLYWLIYRWFLD

NVRNRSIETLKIVQRIIVAVVVGSCYAGINPYTQTGIQSVQGLVFLVFTENTFSPMYSVLAQFPENTPLFLREYSSGLYH  
PLTYYSKIIALVPGFFIQPITFVLIAYGIAGLRWEVYPPFFMTTAVTILTMNVASSCGIFFSNAFESVPIAMAYLVPF

>c16658\_g1\_i1\_ABCG

MEVVLHESTNAVNDATDKSERPYDNTFVRINSDDKVNDYQNGYATFAKFQPKQNIDIQFENVFTTATEGGVFTKR  
KQKEILHKINGRFPTGQLIAIMGPSGAGKSTLLDVLSGYRIHGIGGNVYVNGVERDLKEFRRVSCYITQDDRLQPLLV  
EESMHVAADLKLSSSTIPQSEKKLIIDQILDTRLLESKATRVAGLSGGQKKRMSIALELISNPFVMFLDEPTTGLDSSSC  
MTCIRLLKNLAKQGRTHICTIHQPSASLFLQFDQVYVVLASGNCLYQGSTNKLVPFLETVGSPPCKYHNPADYVIELACG  
EFGEEIINSMTATNNGRSLTYFENAELPDMRLLREDTRAEKNTSLLATSQYNQLKVLRRGFVKSKRDMALTYLR  
IGANVLVGLMLGTVYVWQAGTDGSKVLDNYNLLFSLMHMMSTMMMLTILTFPSEMSILIKEHFNRWYSLKMYLLA  
VTIVDIPLSVFCSFIFSVILYLMTAQPMANRFSMFCAISTLIVFIAQGFGLMIGAYFNVVNGTFLGPTLSLPMMMFA  
GFGVRLCDLPTYLWGSYISYLRYLEGLVGAIVGLNRGIIIECPEDKYCHYKPKLLSEIGVPADQFDNDVVFLILFLV  
LRVAAFVMLKCKLMAVR

>c18098\_g1\_i1\_ABCG

MEARNKAGTSSLGCCNFNDLSLTSVSTDDNVTYETKNNFVKVPHENNNNRFLHNMDESKAIFPKLAVNLKFENV  
TFDATSWCLSKMRKETKRILHGVSGEFKAGELSVIMGPSGAGKSTLLNVLAGFITKGGGIVKLNNTVRDPSRFRKL  
SAYIPQEDEIRMSLTVKEAMTFAVHLKLGYNVSNQYKMQKIADVLELLGLEKTHNTLSRSLGGQRKRLGVALELLN  
NPPILFLDEPTTGLDSSSCTHCVSFLKRLAQEGRTVVATMHQPSALMFEMFDKLYTVSEKCIYDGRTSNLVYPYLAN  
MNLQCPPYHNPADYLMEVSMGEHGADISTMAEKAKINQNLKSISYENNEKEILAEYNFNNTKIHVNPDDASGPA  
AIIMQFYLLYKRNLTTTRRAW

>c18760\_g1\_i1\_ABCG

MDRSSSSDNNTLCYFRKRPPINIEFQDLTYTVPQGRKGSKLILRSISGEFKSGQLTAILGPSGAGKSTLLNILAGYKCRG  
ATGSVLINGESRNLKQFQKMSRYIMQEDLIQPMPLTVEETMLMAANLKLGRRLSLNDKVRAIDEILDLLRSLGTTKKTQ  
TNMLSGGERKRLSIALELLNPPVFLDEPTTGLDDLSCAQCSILLKKAIEGGRTVICSIHTPSAKLFSMFDQVYIISAG  
QCVYQGYGPEVVPFLCSAGLDCPRHYNPADFIIEVCSGEYGFQDRLVCAIDNGRVVYNRKNKEVQMEEVILDSNIS  
LIKENKPEIDIIDFRHESGWL

>c16457\_g1\_i1\_ABCH

MYENFAVHVKDVVKNYGSKEILKKLCMAVERGQIYGLLGASGCGKTTLLSCIVGRKKINSGEIWMGGKPGEPGSG  
VPGPRVGYMPQDIALVGEFTVQDAIFYFGRILGMKESKITERFHLYKQLELPPDNRYLKNCSGGEQRRVSFAAALV  
HKPELLILDEPTVGVDPDLLRDIWNHLVEITTKDNISVVITTHYIEEARQANKIGLMREGRLAEESPSRLLTIFNTGTLE  
EVFLILSRRQEEGRLDNINSHPVTDQNNSDIGTDRACAGSTVSVISDVNNEIQSSKDALAKKEYKRRGNLDRRLNA  
LLDKNWKQFYRNITGIIFLLAFPIQTMVFMSAVGGDIKDIPLGIVNDESMTTSCYNFDINSTTESYDFGSCHFYNMS  
CRFLTHLDHPMIKKELYSNLSDAFDAIRHGDIIGVLYIHANYSSLAEEIEKGDIEDDVLKSEIKVWMDMSNRQTG  
GTIKYKLLDLYNDFQQSIFDACNFTPGLGKYPLDINTIHGEKDEAYTIYMIPGAIITIVFFMGAIMTSQIIITDRHDGVW  
DRSIVAGVTSIEITLTHFALQACIAVIQSLEALLVYVYIYKQDYVGNMFLIYFILYLEGICGMAYGFVVSISINHSMAN  
TVLTGIFLPMMLSLGLMWPTGMPYGLRIFARCLPFTMAIESLRNVTKKGWSLDDWEVFNMGVGVCLLWITFFGTL  
SVYLIKTKR

>c18021\_g1\_i1\_ABCH

MTEGPSDELRRRQFKGQMSTVHTRRQAVCVRRAYKKGYSKSNPFVILDGLNMTVPKGCYGLLGASGCGKTTLL  
NCIVGRKRLNSGEIWLGGTPGSRGSGVPGPRVGYMPQEIALYGEFSIRETLKYFGWISNMSTTSQVEAKVDFFINFL  
MLPDADRLIKNSGGQQRVSLAATLLHEPELLILDEPTVGVDPDLLRTNIWNHLVELTKHGRTTVITTHYIDETRQAH  
LIGLMRGGYFLAEESPERLISQFSADSLEDVFLKLSVIQNMGRRRSSILQTVTESIHVPDFPGGAVNEAAVLDELQ  
GEISGEFGENVSITSRVSIAPEPSIEAQPEMPDEEPEVSLKDYLKILNLNHRALIWKNFLWMWRNIPMMA  
FTVGLPLAQMCLFCWAIGHEPVGKLSVNVREIDFPKEHCAPMLGCNSTRLSCNYLEFISQNYNSINLDYQETEEQAR

NMVKSGKAWAVLVVQHNFSDAMKERMELGRDVSDEDELLASTITVFQDKSNQNIQAQYITRDLIFGFFDFIASYLSSC  
 DLDPVAGKLPQWNRPIYGDGEPDFTNFASPGVILTIFFMAVALTSGAMLMERNAGILERSLVNGITGTELLFSLVIT  
 QFVVM LGQTVLVMVSVFVFKLRLEGSVLLLFAITLLSGICGMCYGFVVSACDNERTATYMAMGSFLPIVMLCGII  
 WPIEAMNNYLKIISTVLPLTQATESLRCVLARGWPISDPVVYSGFISLTIWIAVFLTISILVLKFKKG

>c27214\_g1\_i1\_ABCH

MLTLRILLDVVCRLLGFYTRHISIDGNIMGERIEPSVPGPDLVGVNVERPPLIHQQSTVWVSKRQHAVCVRHAFKHYG  
 TKKKPNHVLSNLNMTVAKGTIYGLLGASGCGKTTLLSCIVGRRRLNTGEIWWLGGKPGTKGSGVPGKRVGYMPQEI  
 ALYGEFTIKETMMYFGWIFGMESKEINERLQFLNFDLPSQNRMVKNLSGGQRRVSAVALMHDPPELLILDEPT  
 VGVDP LLRQSIWNHLVQITKDGNKTVIITTHYIEEARQAHAIGLMRSGKLLAEESPHVLLSMYGCSSLEDVFLKLSRK  
 QVQGGFAGNDQNISNNISLASLNWNKKDAISVTEESGVVGLNFHQSKVLEVTDSNGHLDIGKSSSSSNALQDADC  
 DCSNCSEWTTVGKMRALLQKNFLRMWRNVGVMFIFALPVMQVILFCLAIGGDPKDLKLAIVNHEKNYSNLTYQE  
 CFYEHGCKFGNLSCRYDLTNTSTIVKQYYPTPEAAKAAVRRGEAWGALYFTENFTDALVARMALGKDADAETLDQ  
 SEIRVWLDMSNQQIGIILQRDLQLAYQNFTKDVLRDCEHNEELAEIPVAFKKPIYGSNQPSFTDFVAPGVILTIVFFLA  
 VALTSSALITERIDGLDRSWVAGVTPGEILSSHVITQFFVMCGQTALVLIFMILVFEVECRGDIFLVIVITILQGLCGM  
 CFGFVISAICELERNAIQLALGSFYPTLLSGVIWPIEGMPTVLRVISTFLPLTLATTSLRSIMTRGWNMAEPDVYFGFIS  
 TVVWIALFLTISLLVLKLRG

## 6.6 OD-Werte der ATPase-Assays

OfaABC B1 Digoxin											
10min											
0.026	0.026	0.144	0.141	0.146	0.149	0.136	0.163	0.157	0.166	0.159	0.094
0.061	0.061	0.145	0.146	0.153	0.149	0.134	0.165	0.162	0.177	0.174	0.106
0.087	0.086	0.133	0.128	0.132	0.13	0.11	0.13	0.124	0.13	0.133	0.109
0.108	0.12	0.134	0.134	0.129	0.13	0.11	0.132	0.128	0.134	0.142	0.104
0.148	0.138										0.105
0.166	0.156										0.099
0.198	0.173										0.037
0.251	0.251										0.039

Leerbacmid Br1 Digoxin Cymarin											
15min											
0.029	0.031	0.12	0.119	0.123	0.118	0.111	0.117	0.115	0.119	0.12	0.119
0.067	0.067	0.122	0.121	0.124	0.116	0.115	0.12	0.117	0.127	0.135	0.12
0.094	0.096	0.123	0.116	0.126	0.115	0.111	0.115	0.119	0.122	0.123	0.12
0.126	0.127	0.123	0.11	0.124	0.116	0.111	0.117	0.117	0.122	0.133	0.12
0.159	0.16	0.113	0.107	0.123	0.115	0.111	0.116	0.116	0.113	0.115	0.113
0.183	0.182	0.116	0.107	0.12	0.113	0.108	0.111	0.112	0.111	0.108	0.107
0.218	0.228	0.106	0.107	0.118	0.111	0.107	0.109	0.11	0.11	0.11	0.035
0.275	0.279	0.114	0.113	0.121	0.113	0.111	0.111	0.109	0.099	0.105	0.034

Leerbacmid Br2 Digoxin Cymarin											
15min											
0.03	0.03	0.126	0.126	0.134	0.123	0.124	0.124	0.124	0.122	0.126	0.092
0.068	0.069	0.13	0.138	0.132	0.126	0.126	0.126	0.126	0.124	0.134	0.097
0.095	0.095	0.1	0.098	0.103	0.098	0.098	0.098	0.1	0.098	0.107	0.11
0.131	0.127	0.094	0.102	0.101	0.097	0.101	0.1	0.102	0.1	0.109	0.107
0.161	0.16	0.112	0.115	0.123	0.108	0.12	0.12	0.113	0.113	0.114	0.09
0.186	0.187	0.115	0.115	0.114	0.117	0.125	0.116	0.112	0.112	0.118	0.105
0.225	0.224	0.092	0.093	0.095	0.088	0.095	0.098	0.098	0.1	0.099	0.034
0.286	0.287	0.102	0.098	0.095	0.094	0.094	0.092	0.091	0.097	0.092	0.034

Leerbacmid Br3 Digoxin Cymarin											
15min											
0.031	0.03	0.12	0.119	0.119	0.12	0.12	0.12	0.113	0.118	0.123	0.099
0.069	0.069	0.122	0.121	0.121	0.122	0.12	0.12	0.122	0.122	0.125	0.105
0.096	0.097	0.103	0.104	0.104	0.104	0.105	0.101	0.101	0.103	0.103	0.099
0.128	0.13	0.108	0.106	0.106	0.106	0.107	0.103	0.104	0.106	0.122	0.112
0.159	0.161	0.121	0.119	0.119	0.119	0.12	0.116	0.117	0.119	0.135	0.093
0.189	0.187	0.123	0.113	0.119	0.119	0.113	0.118	0.111	0.117	0.117	0.108
0.222	0.225	0.105	0.107	0.104	0.103	0.103	0.098	0.093	0.096	0.102	0.035
0.283	0.301	0.11	0.105	0.104	0.107	0.104	0.105	0.099	0.102	0.102	0.035

Leerbacmid Br1 Ouabain											
15min											
0.03	0.031	0.124	0.123	0.123	0.122	0.12	0.122	0.123	0.121	0.122	0.101
0.069	0.07	0.119	0.119	0.12	0.119	0.118	0.12	0.121	0.122	0.122	0.106
0.096	0.096	0.107	0.107	0.107	0.107	0.11	0.106	0.109	0.108	0.105	0.098
0.129	0.13	0.109	0.113	0.111	0.113	0.114	0.111	0.111	0.108	0.101	0.11
0.159	0.16										0.1
0.186	0.186										0.109
0.226	0.225										0.034
0.04	0.038										0.034

Leerbacmid Br2 Ouabain											
15min											
0.03	0.03	0.116	0.116	0.115	0.106	0.112	0.105	0.112	0.114	0.114	0.103
0.069	0.069	0.116	0.117	0.112	0.118	0.12	0.105	0.11	0.117	0.116	0.105
0.096	0.096	0.109	0.11	0.098	0.109	0.108	0.1	0.105	0.111	0.11	0.102
0.129	0.129	0.113	0.104	0.1	0.104	0.104	0.102	0.107	0.112	0.107	0.113
0.158	0.159										0.102
0.184	0.187										0.109
0.221	0.224										0.035
0.038	0.038										0.034

Leerbacmid Br3 Ouabain											
15min											
0.032	0.042	0.117	0.115	0.115	0.115	0.113	0.112	0.104	0.109	0.112	0.103
0.069	0.07	0.115	0.114	0.112	0.114	0.112	0.11	0.111	0.105	0.113	0.107
0.097	0.106	0.111	0.109	0.11	0.111	0.106	0.1	0.098	0.106	0.1	0.107
0.13	0.094	0.114	0.112	0.112	0.113	0.108	0.107	0.105	0.106	0.107	0.113
0.163	0.162										0.11
0.189	0.188										0.109
0.228	0.228										0.033
0.04	0.041										0.034

CascABCB1 Br1 Verapamil Ouabain											
15min											
0.032	0.032	0.159	0.157	0.161	0.157	0.144	0.138	0.136	0.139	0.138	0.088
0.064	0.065	0.163	0.155	0.153	0.146	0.138	0.137	0.133	0.13	0.128	0.09
0.088	0.089	0.132	0.129	0.118	0.132	0.145	0.144	0.135	0.141	0.143	0.134
0.115	0.115	0.13	0.123	0.12	0.121	0.136	0.139	0.135	0.14	0.133	0.133
0.139	0.14	0.151	0.14	0.141	0.149	0.129	0.149	0.13	0.142	0.146	0.123
0.186	0.188	0.146	0.139	0.136	0.143	0.132	0.145	0.138	0.127	0.139	0.125
0.238	0.246	0.131	0.137	0.112	0.134	0.131	0.132	0.128	0.125	0.121	0.046
0.032	0.032	0.129	0.126	0.131	0.129	0.122	0.124	0.128	0.126	0.135	0.035

CascABCB1 Br2 Verapamil Ouabain											
15min											
0.032	0.032	0.135	0.131	0.143	0.104	0.122	0.123	0.123	0.127	0.121	0.109
0.065	0.065	0.128	0.133	0.129	0.126	0.134	0.13	0.121	0.125	0.126	0.108
0.09	0.09	0.114	0.11	0.119	0.123	0.124	0.128	0.124	0.129	0.126	0.117
0.182	0.117	0.119	0.117	0.122	0.122	0.124	0.127	0.125	0.124	0.122	0.116
0.138	0.142	0.147	0.136	0.134	0.13	0.114	0.104	0.103	0.121	0.12	0.117
0.188	0.191	0.136	0.144	0.118	0.128	0.129	0.105	0.128	0.134	0.131	0.118
0.244	0.247	0.112	0.122	0.122	0.118	0.112	0.12	0.12	0.119	0.109	0.039
0.031	0.031	0.12	0.119	0.12	0.118	0.112	0.102	0.119	0.119	0.117	0.039

CascABCB1 Br3 Verapamil Ouabain											
15min											
0.032	0.032	0.136	0.14	0.135	0.136	0.132	0.137	0.135	0.131	0.137	0.09
0.066	0.065	0.132	0.138	0.138	0.135	0.137	0.135	0.134	0.13	0.137	0.109
0.092	0.091	0.121	0.125	0.121	0.129	0.139	0.138	0.139	0.134	0.137	0.116
0.12	0.125	0.126	0.124	0.129	0.134	0.138	0.137	0.138	0.133	0.137	0.121
0.146	0.142	0.118	0.139	0.143	0.142	0.144	0.141	0.127	0.145	0.14	0.114
0.192	0.193	0.128	0.142	0.14	0.128	0.133	0.14	0.135	0.139	0.139	0.126
0.251	0.251	0.118	0.125	0.126	0.129	0.126	0.119	0.122	0.124	0.129	0.039
0.031	0.031	0.126	0.123	0.108	0.124	0.127	0.111	0.127	0.121	0.126	0.041

CascABC1 Br1 Digoxin Cymarin											
15min											
0.029	0.029	0.128	0.128	0.123	0.122	0.127	0.117	0.121	0.22	0.12	0.099
0.065	0.066	0.133	0.131	0.124	0.132	0.129	0.122	0.127	0.129	0.129	0.107
0.09	0.089	0.102	0.105	0.115	0.094	0.106	0.099	0.102	0.102	0.108	0.131
0.12	0.122	0.106	0.109	0.105	0.099	0.109	0.102	0.108	0.102	0.105	0.132
0.146	0.145	0.125	0.136	0.135	0.101	0.137	0.132	0.132	0.128	0.13	0.115
0.198	0.197	0.123	0.129	0.131	0.123	0.127	0.13	0.133	0.128	0.119	0.112
0.259	0.256	0.114	0.12	0.106	0.103	0.115	0.115	0.119	0.112	0.113	0.033
0.04	0.037	0.102	0.12	0.115	0.116	0.113	0.113	0.116	0.115	0.111	0.036

CascABC1 Br2 Digoxin Cymarin											
15min											
0.03	0.03	0.138	0.135	0.13	0.125	0.122	0.11	0.12	0.13	0.132	0.092
0.067	0.067	0.139	0.131	0.133	0.129	0.129	0.127	0.128	0.137	0.134	0.106
0.09	0.089	0.098	0.098	0.096	0.095	0.096	0.094	0.095	0.112	0.104	0.14
0.12	0.121	0.1	0.1	0.101	0.099	0.098	0.103	0.101	0.116	0.102	0.138
0.145	0.145	0.137	0.136	0.131	0.132	0.122	0.136	0.135	0.132	0.135	0.116
0.196	0.199	0.135	0.135	0.136	0.132	0.127	0.132	0.132	0.135	0.134	0.116
0.26	0.255	0.122	0.122	0.121	0.125	0.116	0.124	0.122	0.119	0.118	0.04
0.038	0.037	0.125	0.125	0.126	0.123	0.123	0.128	0.125	0.119	0.118	0.036

CascABC1 Br3 Digoxin Cymarin											
15min											
0.03	0.03	0.126	0.115	0.126	0.113	0.114	0.103	0.122	0.117	0.13	0.105
0.067	0.065	0.131	0.122	0.127	0.12	0.115	0.105	0.129	0.119	0.138	0.108
0.09	0.09	0.121	0.118	0.126	0.109	0.118	0.101	0.12	0.115	0.125	0.114
0.121	0.12	0.124	0.122	0.121	0.115	0.118	0.106	0.122	0.118	0.133	0.115
0.147	0.146	0.12	0.128	0.137	0.135	0.136	0.113	0.139	0.126	0.138	0.116
0.197	0.2	0.14	0.119	0.139	0.134	0.134	0.126	0.137	0.136	0.136	0.116
0.255	0.256	0.123	0.123	0.119	0.115	0.115	0.113	0.123	0.1	0.118	0.034
0.037	0.036	0.163	0.11	0.12	0.116	0.113	0.111	0.12	0.114	0.114	0.034

CascABC1 Br3 Digoxin Cymarin											
15min											
0.03	0.03	0.126	0.115	0.126	0.113	0.114	0.103	0.122	0.117	0.13	0.105
0.067	0.065	0.131	0.122	0.127	0.12	0.115	0.105	0.129	0.119	0.138	0.108
0.09	0.09	0.121	0.118	0.126	0.109	0.118	0.101	0.12	0.115	0.125	0.114
0.121	0.12	0.124	0.122	0.121	0.115	0.118	0.106	0.122	0.118	0.133	0.115
0.147	0.146	0.12	0.128	0.137	0.135	0.136	0.113	0.139	0.126	0.138	0.116
0.197	0.2	0.14	0.119	0.139	0.134	0.134	0.126	0.137	0.136	0.136	0.116
0.255	0.256	0.123	0.123	0.119	0.115	0.115	0.113	0.123	0.1	0.118	0.034
0.037	0.036	0.163	0.11	0.12	0.116	0.113	0.111	0.12	0.114	0.114	0.034

CascABC2 BR1-3 Verapamil											
15min											
0.041	0.042	0.145	0.153	0.154	0.146	0.064	0.164	0.123	0.131	0.137	0.095
0.073	0.074	0.146	0.144	0.151	0.151	0.064	0.135	0.131	0.122	0.139	0.097
0.097	0.099	0.121	0.123	0.121	0.122	0.038	0.112	0.105	0.107	0.112	0.132
0.128	0.126	0.123	0.126	0.119	0.123	0.039	0.109	0.105	0.111	0.113	0.134
0.158	0.163	0.133	0.174	0.174	0.174	0.063	0.177	0.173	0.063	0.06	0.036
0.196	0.196	0.123	0.164	0.167	0.122	0.058	0.171	0.159	0.057	0.057	0.034
0.253	0.249	0.108	0.107	0.134	0.136	0.035	0.15	0.137	0.037	0.035	0.04
0.041	0.042	0.13	0.137	0.136	0.135	0.037	0.148	0.143	0.038	0.032	0.039

CascABC2 BR1 Digoxin Cymarin											
15min											
0.032	0.032	0.159	0.161	0.155	0.163	0.158	0.155	0.16	0.156	0.163	0.098
0.065	0.065	0.162	0.16	0.153	0.163	0.161	0.155	0.157	0.16	0.164	0.1
0.091	0.09	0.116	0.122	0.113	0.115	0.115	0.114	0.119	0.116	0.129	0.125
0.119	0.118	0.121	0.122	0.117	0.123	0.112	0.117	0.118	0.117	0.125	0.128
0.143	0.144	0.121	0.124	0.121	0.129	0.122	0.122	0.122	0.118	0.121	0.101
0.193	0.194	0.125	0.126	0.117	0.12	0.114	0.117	0.12	0.116	0.12	0.102
0.246	0.254	0.124	0.123	0.122	0.117	0.114	0.118	0.117	0.118	0.115	0.042
0.032	0.032	0.12	0.123	0.125	0.117	0.119	0.116	0.117	0.111	0.116	0.04

CascABC2 BR2 Digoxin Cymarin											
15min											
0.032	0.032	0.144	0.145	0.142	0.144	0.142	0.139	0.145	0.141	0.142	0.126
0.065	0.064	0.146	0.144	0.142	0.142	0.143	0.138	0.144	0.14	0.143	0.118
0.091	0.091	0.12	0.125	0.122	0.119	0.122	0.135	0.121	0.117	0.117	0.109
0.118	0.116	0.12	0.128	0.123	0.123	0.139	0.12	0.125	0.116	0.117	0.108
0.143	0.142	0.126	0.129	0.127	0.125	0.106	0.123	0.121	0.122	0.118	0.103
0.192	0.196	0.128	0.122	0.123	0.127	0.125	0.122	0.116	0.124	0.121	0.107
0.251	0.245	0.121	0.125	0.123	0.124	0.161	0.121	0.138	0.12	0.121	0.044
0.032	0.032	0.121	0.126	0.123	0.12	0.124	0.117	0.118	0.118	0.115	0.043

CascABC2 Br3 Digoxin Cymarin											
15min											
0.032	0.032	0.15	0.144	0.144	0.142	0.145	0.145	0.142	0.147	0.148	0.101
0.065	0.065	0.145	0.143	0.146	0.139	0.141	0.141	0.144	0.145	0.147	0.104
0.091	0.091	0.136	0.143	0.125	0.13	0.154	0.155	0.124	0.125	0.121	0.121
0.119	0.12	0.136	0.12	0.129	0.114	0.112	0.126	0.126	0.125	0.127	0.119
0.145	0.145	0.146	0.14	0.134	0.133	0.127	0.137	0.15	0.139	0.138	0.116
0.194	0.197	0.145	0.133	0.135	0.139	0.14	0.146	0.142	0.137	0.136	0.114
0.253	0.255	0.116	0.124	0.124	0.115	0.116	0.116	0.117	0.114	0.114	0.044
0.032	0.032	0.114	0.121	0.119	0.113	0.115	0.122	0.117	0.114	0.113	0.044

CascABC2 BR1&2 Ouabain											
15min											
0.031	0.031	0.142	0.134	0.135	0.121	0.133	0.141	0.14	0.14	0.137	0.095
0.065	0.065	0.136	0.128	0.119	0.125	0.137	0.147	0.133	0.136	0.132	0.095
0.091	0.09	0.114	0.133	0.117	0.107	0.119	0.113	0.116	0.119	0.117	0.118
0.117	0.116	0.124	0.119	0.101	0.106	0.107	0.119	0.116	0.116	0.116	0.117
0.137	0.126	0.128	0.126	0.135	0.134	0.127	0.13	0.126	0.134	0.131	0.119
0.182	0.192	0.13	0.131	0.136	0.131	0.124	0.132	0.125	0.132	0.126	0.121
0.242	0.252	0.138	0.125	0.117	0.115	0.103	0.108	0.108	0.111	0.106	0.042
0.031	0.031	0.121	0.105	0.111	0.114	0.119	0.114	0.11	0.114	0.106	0.04

CascABC2 Br3 Ouabain											
15min											
0.031	0.032	0.119	0.117	0.125	0.122	0.115	0.116	0.116	0.122	0.119	0.083
0.064	0.064	0.12	0.119	0.122	0.117	0.115	0.119	0.116	0.117	0.116	0.082
0.088	0.088	0.119	0.105	0.096	0.096	0.087	0.091	0.09	0.092	0.091	0.105
0.114	0.114	0.106	0.089	0.092	0.094	0.097	0.093	0.089	0.095	0.09	0.101
0.14	0.139										0.103
0.186	0.187										0.1
0.239	0.241										0.039
0.034	0.032										0.04

CascABC1 BR1&2 Calotropin							
15min							
0.029	0.03	0.134	0.135	0.129	0.136	0.132	0.102
0.064	0.064	0.14	0.133	0.136	0.139	0.138	0.107
0.085	0.086	0.118	0.111	0.111	0.112	0.11	0.124
0.116	0.118	0.112	0.11	0.112	0.115	0.114	0.122
0.143	0.144	0.135	0.131	0.133	0.138	0.134	0.11
0.19	0.189	0.137	0.133	0.121	0.138	0.133	0.116
0.244	0.253	0.107	0.11	0.14	0.111	0.109	0.034
0.039	0.038	0.115	0.106	0.102	0.114	0.111	0.04

CascABC1 BR3 und CascABC2 BR1 Calotropin							
15min							
0.029	0.029	0.143	0.151	0.133	0.137	0.137	0.102
0.063	0.065	0.141	0.126	0.123	0.129	0.141	0.107
0.086	0.088	0.113	0.11	0.107	0.11	0.108	0.118
0.12	0.116	0.11	0.112	0.113	0.105	0.113	0.124
0.146	0.145	0.147	0.134	0.129	0.137	0.133	0.112
0.196	0.192	0.137	0.133	0.135	0.132	0.14	0.118
0.25	0.254	0.113	0.111	0.112	0.116	0.112	0.038
0.04	0.039	0.113	0.113	0.119	0.115	0.116	0.035

CascABC2 BR2&3 Calotropin							
15min							
0.031	0.029	0.141	0.133	0.141	0.141	0.144	0.115
0.064	0.064	0.143	0.133	0.14	0.146	0.147	0.122
0.085	0.085	0.122	0.124	0.123	0.124	0.127	0.131
0.118	0.119	0.12	0.127	0.127	0.128	0.128	0.129
0.145	0.143	0.136	0.126	0.143	0.146	0.141	0.116
0.184	0.189	0.135	0.135	0.129	0.139	0.138	0.129
0.245	0.244	0.128	0.127	0.124	0.125	0.121	0.038
0.041	0.042	0.129	0.132	0.127	0.13	0.123	0.036

CpopABC1 BR1 Digoxin Verapamil											
15 min											
0,044	0,048	0,154	0,131	0,139	0,146	0,092	0,119	0,124	0,112	0,125	0,083
0,078	0,078	0,155	0,151	0,138	0,145	0,088	0,089	0,13	0,119	0,129	0,092
0,101	0,101	0,123	0,102	0,098	0,11	0,104	0,102	0,106	0,107	0,107	0,105
0,128	0,129	0,119	0,106	0,114	0,112	0,107	0,093	0,111	0,109	0,115	0,094
0,154	0,151	0,332	0,087	0,09	0,094	0,088	0,09	0,089	0,089	0,09	0,091
0,144	0,144	0,319	0,241	0,225	0,09	0,087	0,089	0,089	0,088	0,088	0,089
0,192	0,191	0,112	0,106	0,094	0,089	0,083	0,091	0,091	0,092	0,089	0,039
0,243	0,242	0,097	0,105	0,092	0,096	0,086	0,09	0,088	0,088	0,089	0,037

CpopABC1 BR2 Digoxin Verapamil											
15 min											
0,04	0,043	0,162	0,155	0,161	0,153	0,102	0,138	0,136	0,13	0,143	0,094
0,075	0,076	0,163	0,172	0,159	0,159	0,102	0,108	0,143	0,136	0,142	0,103
0,102	0,101	0,132	0,123	0,107	0,12	0,115	0,117	0,118	0,122	0,123	0,121
0,128	0,129	0,125	0,123	0,121	0,123	0,116	0,106	0,12	0,123	0,126	0,108
0,154	0,151	0,336	0,104	0,107	0,105	0,1	0,103	0,102	0,102	0,102	0,107
0,147	0,147	0,332	0,273	0,242	0,103	0,1	0,102	0,102	0,102	0,101	0,103
0,2	0,199	0,121	0,123	0,105	0,102	0,094	0,104	0,104	0,106	0,102	0,041
0,256	0,254	0,106	0,122	0,105	0,109	0,098	0,103	0,101	0,101	0,101	0,039

CpopABC1 BR3 Digoxin Verapamil											
15 min											
0,033	0,034	0,194	0,191	0,172	0,177	0,161	0,159	0,152	0,162	0,15	0,1
0,072	0,071	0,191	0,187	0,179	0,171	0,166	0,165	0,166	0,17	0,165	0,103
0,094	0,093	0,117	0,122	0,123	0,126	0,126	0,124	0,12	0,13	0,127	0,152
0,123	0,123	0,129	0,121	0,124	0,123	0,124	0,122	0,123	0,138	0,127	0,111
0,147	0,15	0,382	0,358	0,27	0,107	0,11	0,11	0,105	0,103	0,106	0,097
0,198	0,197	0,369	0,322	0,274	0,11	0,105	0,108	0,105	0,103	0,108	0,107
0,255	0,254	0,131	0,13	0,104	0,104	0,105	0,107	0,107	0,103	0,106	0,039
0,038	0,037	0,129	0,124	0,128	0,106	0,104	0,11	0,105	0,102	0,102	0,04

CpopABCB1 BR1 Cymarin Ouabain											
15 min											
0,027	0,028	0,102	0,103	0,101	0,099	0,112	0,104	0,098	0,098	0,105	0,089
0,065	0,068	0,125	0,105	0,12	0,101	0,105	0,104	0,099	0,111	0,109	0,094
0,092	0,094	0,105	0,107	0,106	0,106	0,104	0,104	0,106	0,102	0,104	0,11
0,119	0,115	0,105	0,1	0,108	0,11	0,099	0,098	0,099	0,104	0,105	0,092
0,148	0,149	0,133	0,1	0,099	0,101	0,104	0,103	0,098	0,1	0,129	0,098
0,198	0,196	0,101	0,104	0,101	0,106	0,105	0,105	0,104	0,116	0,123	0,098
0,257	0,262	0,109	0,11	0,115	0,103	0,099	0,106	0,105	0,107	0,107	0,042
0,034	0,035	0,115	0,114	0,109	0,104	0,109	0,098	0,102	0,111	0,107	0,044

CpopABCB1 BR2 Cymarin Ouabain											
15 min											
0,03	0,03	0,134	0,14	0,104	0,119	0,124	0,119	0,117	0,104	0,101	0,097
0,067	0,068	0,105	0,138	0,125	0,123	0,113	0,108	0,12	0,117	0,11	0,103
0,092	0,092	0,113	0,113	0,111	0,111	0,104	0,101	0,108	0,101	0,109	0,094
0,122	0,122	0,122	0,115	0,113	0,115	0,105	0,112	0,114	0,103	0,114	0,113
0,147	0,146	0,137	0,13	0,136	0,133	0,124	0,104	0,125	0,1	0,121	0,097
0,198	0,198	0,129	0,135	0,105	0,129	0,105	0,107	0,106	0,124	0,106	0,11
0,257	0,256	0,116	0,116	0,119	0,107	0,113	0,118	0,106	0,109	0,107	0,039
0,034	0,035	0,117	0,118	0,116	0,118	0,113	0,117	0,114	0,1	0,111	0,039

CpopABCB1 BR3 Cymarin Ouabain											
15 min											
0,03	0,033	0,147	0,107	0,138	0,13	0,112	0,12	0,119	0,118	0,119	0,097
0,068	0,068	0,146	0,137	0,13	0,12	0,108	0,123	0,109	0,116	0,131	0,117
0,094	0,092	0,118	0,113	0,113	0,107	0,107	0,114	0,103	0,107	0,111	0,096
0,124	0,123	0,117	0,107	0,104	0,104	0,103	0,108	0,109	0,113	0,118	0,111
0,149	0,148	0,132	0,115	0,114	0,105	0,108	0,123	0,109	0,103	0,136	0,096
0,2	0,2	0,137	0,115	0,108	0,108	0,108	0,111	0,105	0,104	0,125	0,104
0,257	0,256	0,114	0,115	0,106	0,112	0,104	0,108	0,102	0,106	0,106	0,051
0,036	0,035	0,111	0,109	0,107	0,105	0,108	0,106	0,103	0,103	0,114	0,033

CpopABCB2 BR1 Digoxin Verapamil											
15 min											
0,03	0,031	0,093	0,091	0,086	0,136	0,184	0,183	0,202	0,214	0,214	0,087
0,064	0,067	0,095	0,09	0,092	0,143	0,2	0,177	0,211	0,217	0,216	0,091
0,087	0,088	0,094	0,104	0,098	0,107	0,09	0,103	0,09	0,101	0,111	0,101
0,115	0,114	0,107	0,091	0,106	0,106	0,092	0,107	0,102	0,11	0,116	0,089
0,139	0,139	0,157	0,089	0,09	0,09	0,094	0,094	0,091	0,091	0,093	0,091
0,185	0,185	0,15	0,091	0,085	0,09	0,093	0,092	0,088	0,091	0,087	0,091
0,24	0,242	0,105	0,093	0,092	0,093	0,088	0,089	0,092	0,092	0,092	0,043
0,037	0,042	0,097	0,105	0,108	0,093	0,092	0,09	0,091	0,089	0,087	0,039

CpopABCB2 BR2 Digoxin Verapamil											
15 min											
0,031	0,033	0,076	0,134	0,086	0,178	0,182	0,194	0,226	0,228	0,215	0,082
0,065	0,065	0,136	0,145	0,162	0,173	0,173	0,194	0,23	0,23	0,219	0,088
0,088	0,084	0,077	0,084	0,091	0,102	0,101	0,094	0,102	0,094	0,106	0,116
0,112	0,112	0,099	0,107	0,099	0,103	0,096	0,09	0,1	0,1	0,116	0,09
0,134	0,134	0,147	0,156	0,165	0,087	0,087	0,082	0,086	0,092	0,087	0,085
0,18	0,18	0,142	0,141	0,155	0,087	0,085	0,08	0,086	0,09	0,087	0,087
0,232	0,233	0,099	0,099	0,1	0,086	0,082	0,079	0,085	0,086	0,086	0,036
0,037	0,04	0,098	0,085	0,102	0,089	0,085	0,083	0,089	0,088	0,086	0,037

CpopABCB2 BR3 Digoxin Verapamil											
15 min											
0,031	0,033	0,094	0,16	0,104	0,218	0,207	0,227	0,245	0,244	0,243	0,098
0,067	0,067	0,166	0,17	0,173	0,195	0,195	0,224	0,245	0,271	0,252	0,099
0,091	0,088	0,094	0,103	0,102	0,115	0,114	0,113	0,117	0,112	0,123	0,13
0,118	0,117	0,121	0,119	0,12	0,121	0,119	0,112	0,118	0,122	0,133	0,105
0,143	0,141	0,176	0,187	0,194	0,102	0,102	0,102	0,102	0,108	0,102	0,103
0,191	0,191	0,178	0,174	0,182	0,102	0,1	0,101	0,101	0,105	0,102	0,102
0,248	0,248	0,118	0,118	0,117	0,1	0,099	0,1	0,1	0,101	0,1	0,038
0,037	0,04	0,123	0,106	0,118	0,105	0,103	0,106	0,104	0,103	0,101	0,039

CpopABCB2 BR1 Cymarin Ouabain											
15 min											
0,034	0,03	0,139	0,154	0,102	0,152	0,109	0,1	0,172	0,189	0,188	0,097
0,068	0,067	0,147	0,105	0,103	0,102	0,103	0,16	0,175	0,108	0,179	0,102
0,093	0,093	0,104	0,103	0,105	0,113	0,105	0,102	0,106	0,099	0,109	0,092
0,122	0,12	0,107	0,109	0,104	0,112	0,106	0,107	0,108	0,109	0,11	0,107
0,144	0,145	0,141	0,104	0,139	0,102	0,107	0,102	0,147	0,137	0,14	0,094
0,197	0,197	0,141	0,148	0,104	0,108	0,103	0,103	0,138	0,145	0,135	0,103
0,26	0,256	0,112	0,113	0,108	0,106	0,11	0,099	0,111	0,11	0,105	0,039
0,036	0,035	0,116	0,114	0,111	0,112	0,115	0,102	0,102	0,109	0,105	0,041

CpopABCB2 BR2 Cymarin Ouabain											
15 min											
0,031	0,032	0,163	0,119	0,146	0,119	0,125	0,132	0,131	0,135	0,127	0,112
0,067	0,071	0,15	0,141	0,14	0,134	0,135	0,13	0,131	0,131	0,128	0,117
0,092	0,093	0,121	0,124	0,123	0,124	0,12	0,12	0,121	0,12	0,12	0,107
0,123	0,122	0,127	0,125	0,124	0,123	0,126	0,123	0,123	0,125	0,127	0,127
0,149	0,153	0,14	0,115	0,118	0,116	0,114	0,116	0,144	0,14	0,13	0,111
0,201	0,201	0,151	0,115	0,117	0,143	0,138	0,116	0,119	0,14	0,144	0,129
0,262	0,265	0,131	0,116	0,114	0,118	0,119	0,118	0,118	0,125	0,128	0,039
0,037	0,036	0,129	0,116	0,118	0,126	0,117	0,13	0,116	0,114	0,124	0,039

CpopABCB2 BR3 Cymarin Ouabain											
15 min											
0,03	0,03	0,16	0,128	0,124	0,118	0,12	0,09	0,118	0,119	0,114	0,089
0,065	0,066	0,177	0,149	0,094	0,126	0,117	0,113	0,121	0,117	0,12	0,095
0,087	0,088	0,14	0,098	0,105	0,099	0,107	0,09	0,11	0,108	0,106	0,084
0,115	0,116	0,112	0,11	0,099	0,104	0,098	0,099	0,111	0,108	0,106	0,097
0,137	0,14	0,104	0,102	0,129	1,652	0,101	0,122	0,108	0,09	0,128	0,089
0,184	0,195	0,097	0,133	0,091	0,09	0,097	0,117	0,094	0,127	0,125	0,093
0,238	0,24	0,1	0,099	0,099	0,095	0,098	0,104	0,098	0,094	0,106	0,04
0,035	0,034	0,1	0,098	0,104	0,098	0,106	0,1	0,109	0,108	0,106	0,039

CpopABCB10 Br1&2 Calotropin							
15min							
0.03	0.031	0.154	0.149	0.142	0.147	0.142	0.118
0.065	0.061	0.153	0.152	0.152	0.153	0.151	0.128
0.089	0.088	0.136	0.143	0.136	0.129	0.134	0.126
0.12	0.116	0.135	0.133	0.134	0.136	0.143	0.133
0.147	0.147	0.147	0.142	0.151	0.15	0.15	0.124
0.195	0.193	0.15	0.144	0.145	0.147	0.144	0.126
0.252	0.259	0.13	0.129	0.134	0.133	0.132	0.041
0.046	0.046	0.139	0.134	0.136	0.133	0.137	0.041

CpopABCB12 Br1&2 Calotropin							
15min							
0.029	0.029	0.153	0.15	0.139	0.144	0.145	0.12
0.065	0.065	0.153	0.144	0.137	0.14	0.153	0.12
0.089	0.09	0.131	0.125	0.128	0.13	0.13	0.124
0.117	0.116	0.133	0.13	0.127	0.131	0.128	0.127
0.146	0.147	0.148	0.139	0.143	0.147	0.14	0.143
0.191	0.196	0.148	0.137	0.135	0.149	0.143	0.131
0.254	0.26	0.131	0.121	0.127	0.124	0.126	0.045
0.043	0.042	0.132	0.128	0.127	0.124	0.129	0.041

CpopABCB10 und ABCB12 Br3 Calotropin							
15min							
0.031	0.029	0.145	0.158	0.157	0.153	0.146	0.117
0.066	0.065	0.152	0.168	0.158	0.156	0.147	0.126
0.09	0.088	0.133	0.136	0.125	0.127	0.124	0.128
0.117	0.118	0.131	0.134	0.128	0.129	0.127	0.132
0.146	0.147	0.15	0.143	0.147	0.145	0.153	0.115
0.195	0.197	0.147	0.15	0.144	0.149	0.158	0.13
0.255	0.257	0.136	0.131	0.129	0.132	0.134	0.039
0.045	0.043	0.132	0.141	0.128	0.129	0.135	0.038

## 7. Danksagung

Puh, das war eine echt wilde Zeit, diese Promotion, und ich möchte mich jetzt zum Schluss bei allen Menschen bedanken, die mich in dieser Zeit begleitet haben. Zunächst gilt besonderer Dank Prof. Dr. Susanne Dobler für die Ausschreibung und Bereitstellung dieser Arbeit! Darüber hinaus hat sie mich stets in meiner Arbeit motiviert und mir geholfen, meine Kompetenzen weiterzuentwickeln. Sie hat mir zugetraut, zu verschiedenen Konferenzen alleine zu fahren und meine Ergebnisse nationalem sowie internationalem Publikum zu präsentieren. Bemerkenswert finde ich außerdem, dass sie neben der ganzen Verwaltungsarbeit, die sie zu leisten hat, sich auch individuell um die Bedürfnisse ihrer Promovierenden und Mitarbeitenden gekümmert hat. Nicht zu vergessen ist auch die COVID-Pandemie, in der wir alle gelebt haben und in der wir uns alle auf besondere Umstände einstellen mussten. Ich bin dankbar, dass wir als Arbeitsgruppe relativ souverän damit umgegangen sind und die Wünsche und Bedürfnisse jeder Person geachtet und beachtet haben und dass es die meisten "mild" getroffen hat. Umso mehr habe ich mich gefreut, dass zum Ende meiner Promotion auch die meisten (alle) COVID-Regularien aufgelöst wurden und wir so einige Arbeitsgruppenfeiern etc. nachholen konnten. Außerdem möchte ich mich bei allen bedanken, die regelmäßig Kuchen und Kekse in den Sozialraum mitgebracht oder wieder aufgefüllt haben. Nochmal Danke, Susanne, für die Betreuung und Begleitung meiner Promotion. Ich hätte wirklich nie gedacht, dass ich so weit komme!

Ich möchte mich auch bei Dr. Andrej Fabrizius bedanken, der bisher ALLE meine Abschlussarbeiten begutachtet und bewertet hat. Ich hoffe, es sind Entwicklungen zu sehen. Bewundernswert finde ich ebenfalls die Leistung, die er momentan für die Arbeitsgruppe Burmester/Fabrizius leistet, und trotzdem Zeit für mich hatte und immer witzig und freundlich ist.

Jedes Labor ist nichts ohne die technischen Assistentinnen, und mit Vera Wagschal haben wir ein sehr kompetentes wandelndes Methodenlexikon in der Arbeitsgruppe und eine Person, die uns auch passiv noch zu erziehen versucht. Ich möchte mich für die Herstellung meiner Pappelblattkäfer-Kontrollen bedanken sowie für das häufige Nachrechnen meiner Verdünnungsreihen oder Ansätze usw. Auch für die Dinge, die du im Hintergrund für mich oder die Arbeitsgruppe tust, die wir wahrscheinlich gar nicht mitbekommen. Gleiches gilt natürlich für Jennifer Drechsler, die unsere Bestellungen organisiert hat und fleißig Pakete geschleppt hat und sich momentan als Partybeauftragte unseres Instituts entwickelt. Ich hatte mit euch super witzige Gespräche und Mittagspausen. Danke!

Ganz besonderen Dank geht auch an meine Lieblings Bürokollegin Dr. Marlena HerbertZzzzz, die auch stets souverän auf meine: „Ich hab da mal ne dumme Frage“ reagiert hat und ebenfalls viel mit mir Dreisatz- Rechnungen nochmal durchgegangen ist. Ich habe von dir und Piet, richtig witzige Geburtstagsgeschenke oder Wichtelgeschenke bekommen. Danke. Ich liebe deine/ eure Wortwitze, die ihres gleichen sucht. Ich bewundere deinen Ehrgeiz alles Wissen zu wollen und sich um Ideen, die ich längst vergessen habe, weiter zu entwickeln und

mich darin zu bestärken, diese nicht loszulassen. Ich wünsche dir und deiner Familie alles erdenklich Gute und weiterhin viel Spaß und Erfolg und ich freu mich wirklich sehr, dass wir uns hier kennen gelernt haben. Meine liebsten Bürosprüche: „Frau Doktor!! Waschen, Schneiden, Legen“, „Team-Clean“, und die diversen Knöpfe der Soundmaschine.

Dr. Shabman Mohammadi, eine absolute Proteinexpression- und Aktivitäts-Assay pipettier Maschine! Wow ehrlich, ich bin tief beeindruckt wie viel du wissenschaftlich hier in dieser AG und woanders gerissen hast und stets uns andere motiviert hast und dabei immer nen mega Look anhast. Du bist ein richtiges Vorbild für Frauen in der Wissenschaft. Ich bewundere wie engagiert du auch mit diesem neumodischen Internet wie Instagram, Twitter etc. deine wissenschaftliche Arbeit promotest. Danke für die vielen witzigen Gespräche, die Einladung zu deiner Hochzeit und die coolen Restaurants und Bars, die du uns gezeigt hast! Danke.

Ich möchte mich auch bei Paulina Kowalski bedanken, die den ATP Aktivitäts-Assay für ABCB Transporter in unserer Arbeitsgruppe etabliert hat. Danke, dass du an den Wochenenden hergekommen bist, neben deinem Vollzeitjob um mir und Sha diesen Assay zu zeigen. Auch dir wünsche ich alles Gute.

Außerdem bedanke ich mich auch bei Alina Sanken für die Gespräche, wenn wir uns gesehen haben und Hut ab für diesen nahtlosen Übergang der Promotion in einen „richtigen“ Job. Ich wünsche dir viel Erfolg. Außerdem möchte ich mich bei Mario Röpke bedanken, der auch ein enormes fachliches Wissen hat und mir geholfen hat bei der bioinformatisch und der Auswertung der Enzym Assay. Du bist eine top Bereicherung für die AG. Außerdem möchte ich mich auch bei Dr. Kim Rohlfink bedanken, die eine gute Vertreter bei Susannes Abwesenheit war und mich ebenfalls fleißig motiviert hat und mich auch in der Betreuung anderer Studierender unterstützt hat mir somit den Rücken für das Schreiben freigehalten hat.

Natürlich möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Freundinnen bedanken, die mich bisher hier begleitet haben. Meine fürsorglichen und liebenden Eltern, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben. Sie haben ebenfalls maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen, indem sie mit mir bei über 30°C die Käfer in Cevio gesucht haben. Vor allem freut es mich, dass mein Vater den ersten Käfer gefunden hat. Obwohl ihr vielleicht nicht alles von meiner Arbeit verstanden habt, habt ihr mir aufmerksam zugehört und Fragen entwickelt, Danke dafür. Ich möchte mich auch bei meinen Brüdern bedanken, die mir zwei zauberhafte Nichten beschert haben. Mit ihnen habe ich einen tollen, liebevollen und witzigen Ausgleich zur Dissertation erlebt. Obwohl wir drei so verschieden sind, lassen wir uns so, wie wir sind. Ein Dank geht auch an meine Oma, die leider die Fertigstellung dieser Arbeit nur knapp verpasst hat.

Liebe Jasna, wir kennen uns nun schon die Hälfte unseres Lebens, und diese Entwicklung von der Schulzeit bis zur Promotion begleitest. Danke für die vielen Pyjama-Partys und Urlaube, die wir zusammen erlebt haben. Danke, dass du immer für mich da bist und meine Launen erträgst.

Auch dir, Franzi, möchte ich danken, für den Pöbel-Podcast, den wir über WhatsApp ins Leben gerufen haben, seitdem wir ins Berufsleben eingestiegen sind. Natürlich auch für den Support und Rückhalt in allen anderen Lebenslagen. Bald brechen die Zeiten des herzhaften Lachens an!

Maren, jetzt sind wir beide mit der Promotion fertig! Herzlichen Glückwunsch! Danke, dass du öfter nach Hamburg gefahren bist als ich nach Freiburg.

Jani, danke, dass du immer meine Übersetzungen korrekturliest, auch wenn du weder mein Deutsch noch mein Englisch verstehst!

Ronja, wir sims 2 Doktoren!

Grüße gehen auch an meine Garten-Crew raus! Die beste Zeit im Sommer!

Liebe Riri, während der Promotion eine Fernbeziehung zu führen, hat uns vor einige besondere Herausforderungen gestellt. Es ist kein Geschenk, so abhängig von der Deutschen Bahn zu sein. Ich schätze das Verständnis, das wir füreinander in Bezug auf unsere jeweiligen Lebensentwürfe aufgebracht haben. Danke fürs Motivieren und an mich glauben! Ich freue mich weiterhin auf eine gemeinsame Zukunft mit dir.

Danke auch an alle, die ich möglicherweise vergessen habe!

## 8. Eidstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 25.05.2023

---

Cécilia Plate