

**Molekulare Identifizierung und Charakterisierung  
der Flavin-abhängigen Monooxygenasen in  
verschiedenen Pyrrolizidin-Alkaloid-adaptierten  
Insekten**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**LINZHU WANG**

Kiel, 2012

Gutachter: Professor Dr. Dietrich Ober

Prüfer: Professor Dr. Axel J. Scheidig

Prüfer: Professor Dr. Wolfgang Bilger

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Februar 2013

Zum Druck genehmigt: 05. Februar 2013

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

**Sven Sehlmeier, Linzhu Wang, Dorothee Langel, David G. Heckel, Hoda Mohagheghi, Georg Petschenka, Dietrich Ober** (2010). Flavin-Dependent Monooxygenases as a Detoxification Mechanism in Insects: New Insights from the Arctiids (Lepidoptera). PLoS ONE 5(5): e10435.

**Linzhu Wang, Till Beuerle, James Timbilla, Dietrich Ober** (2012).

Independent recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for safe accumulation of sequestered pyrrolizidine alkaloids in grasshoppers and moths. PLoS ONE 7(2): e31796.

### **Tagungsbeiträge**

Linzhu Wang, Dietrich Ober: Anpassungsstrategie der afrikanischen Harlekin-Heuschrecke (*Zonocerus variegatus*) an toxische Pyrrolizidin-Alkaloide; „Aktuelle Entwicklungen in der Naturstoff-Forschung“ - 20. Irseer Naturstofftage der DECHEMA e.V. - 20-22 Feb. 2008, Irsee.

Linzhu Wang, Dietrich Ober: The complex relationship between specialized insects and plants containing pyrrolizidine alkaloids; BT07-125 years Deutsche Botanische Gesellschaft – Botanical Congress, 03-07 Sep. 2007, Hamburg.

Linzhu Wang, Dietrich Ober: Molecular evolutionary adaptation of insects to pyrrolizidine alkaloid containing plants; SIP13-13<sup>th</sup> Symposium on Insect-Plant Relationships, 29 July-02 August 2007, Uppsala Sweden.

Linzhu Wang, Dietrich Ober: Molecular evolution of Senecionine-*N*-Oxygenase of insects adapted to plants containing pyrrolizidine alkaloids; 23rd ISCE Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology, 22-26 July 2007, Jena.

Linzhu Wang, Dietrich Ober: Klonierung und Expression eines für die Detoxifizierung von Pyrrolizidin-Alkaloiden (PA) verantwortlichen Enzyms aus PA-adaptierten Insekten; Sektion pflanzliche Naturstoffe der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 1-3 Okt. 2006, Kaub.

## **DANKSAGUNG**

Allen voran danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Dietrich Ober ganz herzlich für die Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit, für die Bereitstellung des spannenden Themas, die Diskussionen und die konstruktiven Ideen sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Insbesondere danke ich Claudine Theuring im Institut für Pharmazeutische Biologie an der TU Braunschweig für die Hilfe bei der Herstellung der Pyrrolizidin-Alkaloide und Radio-markierten Substrate aus Pflanzen.

Dr. Till Beuerle im Institut für Pharmazeutische Biologie danke ich herzlich für die freundliche Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft sowie für den erfolgreichen Nachweis von Alkaloiden und oxidierten Produkten aus Insekten.

Meinem Vorgänger Sven Sehlmeier danke ich für die Einarbeitung und die schon fertigen Materialien.

Besonders bedanke ich mich bei Frau Margret Doose für die große Hilfe bei der Fütterung der Heuschrecken.

Mein Dank gilt auch Herrn Klaas Vrieling für seine Gastfreundschaft und Hilfsbereitschaft bei meinem Aufenthalt in Leiden/Niederlande.

Den Kooperationspartnern, insbesondere Herrn George Petschenka in der Abteilung Molekulare Evolutionsbiologie an der Universität Hamburg, möchte ich meinen Dank aussprechen für die Schenkung der Schmettlingsraupe und für die Kultivierungsmethode.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Laborkollegen und Mitarbeitern in der Abteilung für Biochemische Ökologie und Molekulare Evolution für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft. Hierbei danke ich insbesondere Frau Brigitte Schemmerling, Frau Dr. Dorothee Langel, Frau Dr. Dagmar Enß, Frau Dr. Elisabeth Kaltenecker und Frau Dr. Carmen Michalski.

Bei allen Freunden in Braunschweig und in Kiel bedanke ich mich für ihre Begleitung und Freundschaft. Mit euch ist mein Leben schöner geworden.

Ein herzlicher Dank geht an meinen Mann, meine Eltern, meine kleine Schwester und ihren Mann, die in allen Situationen hinter mir stehen sowie ihre liebevolle Unterstützung und Verständnis, die bei der Fertigstellung dieser Arbeit von großem Wert waren.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Typische Sekundärstoffe: Pyrrolizidin-Alkaloide (PAs) .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Biosynthese der Pyrrolizidin-Alkaloide .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Toxizität der Pyrrolizidin-Alkaloide .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4 An Pyrrolizidin-Alkaloide adaptierte Insekten.....</b>	<b>12</b>
1.4.1 Anpassungsstrategien der an PAs adaptierten Insekten .....	12
1.4.2 Adaptionenmechanismen von spezialisierten Lepidoptera und Orthoptera .....	16
<b>1.5 Zielsetzung .....</b>	<b>18</b>
<b>2 PROJEKTTEIL I .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Etablierung eines Expressionssystems für eine Flavin-abhängigen Monooxygenase.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Charakterisierung der Flavin-abhängigen Monooxygenasen in Arctiiden (Lepidoptera) .....</b>	<b>24</b>
<b>3 PROJEKTTEIL II .....</b>	<b>35</b>
<b>Identifizierung und Charakterisierung der Flavin-abhängigen Monooxygenasen in der afrikanischen Heuschrecke <i>Zonocerus variegatus</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>4 PROJEKTTEIL III .....</b>	<b>44</b>
<b>Induktion und Lokalisation der FMOs in Arctiiden und Orthoptera .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Einleitung .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2 Material und Methoden.....</b>	<b>47</b>
4.2.1 Herkunft und Haltung der Insekten.....	47
4.2.2 Reverse-Transkription-(RT)-PCR .....	48
<b>4.3 Ergebnisse .....</b>	<b>52</b>
4.3.1 Induktion der PNO in Insekten .....	52
4.3.1.1 Induktion der PNO in <i>A. caja</i> (Arctiiden).....	52
4.3.1.2 Induktion der PNO in <i>Z. variegatus</i> (Orthoptera) .....	54

4.3.2 Lokalisation der SNO in Insekten.....	56
4.3.2.1 Gewebespezifische Expression der SNO in <i>T. jacobaeae</i> .....	56
4.3.2.2 Gewebespezifische Expression der FMOs in <i>Z. variegatus</i> .....	58
<b>4.4 Diskussion.....</b>	<b>64</b>
<b>5 PROJEKTTEIL IV .....</b>	<b>66</b>
<b>Identifizierung und Klonierung der FMOs aus <i>Danaus plexippus</i> .....</b>	<b>66</b>
<b>5.1 Einleitung .....</b>	<b>66</b>
<b>5.2 Material und Methoden.....</b>	<b>68</b>
5.2.1 Herkunft und Haltung der Insekten.....	68
5.2.2 Gesamt-RNA-Isolierung .....	68
5.2.3 Quantifizierung von RNA und DNA .....	68
5.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	69
5.2.5 Identifikation der FMOs von <i>D. plexippus</i> (DpFMOs) .....	71
5.2.5.1 Sequenzsuche mit degenerierten Primern für DpFMOs .....	71
5.2.5.2 Full-length-cDNA der DpFMO2.....	72
5.2.5.3 Full-length-cDNA der DpFMO1 .....	74
5.2.6 Computergestützte Sequenzanalyse .....	76
<b>5.3 Ergebnisse .....</b>	<b>79</b>
5.3.1 PCR mit degenerierten Primern.....	79
5.3.2 Full-length-cDNA der DpFMO2 .....	79
5.3.3 Full-length-cDNA der DpFMO1 .....	81
5.3.4 Eigenschaften der <i>D. plexippus</i> FMOs .....	83
<b>5.4 Diskussion.....</b>	<b>87</b>
5.4.1 Herzglykoside (CGs) und Pyrrolizidin-Alkaloide (PAs): doppelte Sicherung in <i>Danaus plexippus</i> .....	87
5.4.2 Anpassungsmechanismus der <i>D. plexippus</i> .....	88
5.4.3 Pheromone in Danaiden außer beim <i>Danaus plexippus</i> : .....	89



<b>6 DISKUSSION ZUM GESAMTPROJEKT .....</b>	<b>91</b>
<b>6.1 Funktion der Cytochrom-P450 Monooxygenase (CYP450) und     Flavin-abhängigen Monooxygenase (FMO).....</b>	<b>91</b>
<b>6.2 Phylogenie der FMOs .....</b>	<b>93</b>
<b>6.3 Ausblick.....</b>	<b>95</b>
<b>7 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>97</b>
<b>8 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>101</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>112</b>
<b>ERKLÄRUNG .....</b>	<b>114</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

abs.	absolut
<i>A. caja</i>	<i>Arctia caja</i> , Brauner Bär
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
cDNA	copy-DNA
cpm	Zählimpulse pro Minute (counts per minute)
<i>D. plexippus</i>	<i>Danaus plexippus</i>
DpFMO1	FMO1 von <i>Danaus plexippus</i>
DpFMO2	FMO2 von <i>Danaus plexippus</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DHS	Desoxyhypusin-Synthase
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DOC	Desoxycholat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

FAD	Flavinadenindinukleotid (oxidierte Form)
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid (reduzierte Form)
FCS	Fötales Kälberserum
FMO	Flavin-abhängige Monooxygenase
FPLC	Fast-Protein-Liquid-Chromatography
GC	Gaschromatographie
<i>G. geneura</i>	<i>Grammia geneura</i>
GSP	Genspezifischer Primer
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HSS	Homospermidinsynthase
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LC	Flüssig-Chromatographie
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrum
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)

NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen (OLR)
PA	Pyrrrolizidinalkaloid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
PNO	Pyrrrolizidinalkaloid <i>N</i> -Oxygenase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNO	Senecionin- <i>N</i> -Oxygenase

<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>T. jacobaeae</i>	<i>Tyria jacobaeae</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetra-methyl-ethylendiamin
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -galactopyranosid
<i>Z. variegatus</i>	<i>Zonocerus variegatus</i>

**Der Einbuchstabencode der Aminosäuren:**

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

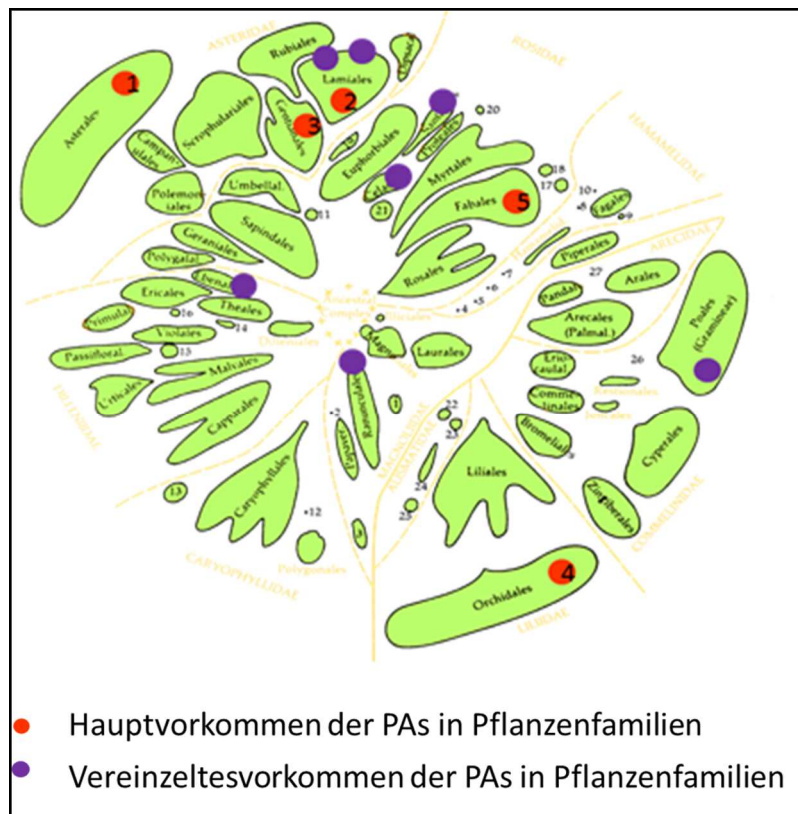
## 1 EINLEITUNG

Pflanzen produzieren eine große Vielfalt chemischer Verbindungen, die biologisch aktiv sind und aus dem Sekundärstoffwechsel stammen. Der pflanzliche Stoffwechsel wird in Primär- und Sekundärstoffwechsel eingeteilt. Den Primärstoffwechsel nennt man auch Grundstoffwechsel, da er unabkömmlich für das Wachstum, die Entwicklung und Reproduktion des Organismus ist. Aufgrund eines hohen Selektionsdrucks im Verlauf der Evolution wurden Primärstoffe kaum verändert. Der Sekundärstoffwechsel hingegen hat zwar keinerlei Bedeutung für das Wachstum oder die Entwicklung, ist aber für den Fortbestand und das Überleben der Art im Ökosystem unverzichtbar (Hartmann, 1996). Sekundärstoffe haben vielfältige Strukturen, weil sie im Verlauf der Evolution individuell verändert und angepasst wurden. Die Funktion von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen für die Pflanze war lange Zeit ungeklärt. Man nahm an, dass sekundäre Stoffwechselwege dazu dienen, unnütze oder toxische Stoffwechselneben- oder Endprodukte des primären Metabolismus unschädlich zu machen (Sachs, 1868; Mothes, 1955; Luckner, 1990). Erst nach und nach wurden pflanzliche Sekundärstoffe als wichtig in ihrer ökologischen Bedeutung erkannt. Die Sekundärinhaltsstoffe wurden unter dem permanenten Selektionsdruck einer feindlichen Umwelt ständig optimiert und weiterentwickelt (Hartmann, 2007). In feindlicher Umwelt können einige Pflanzen mechanische Schutz Waffen, z. B. Dornen, Stacheln, Drüsen- und Brennhaare entwickeln. Die mechanischen Schutz Waffen können die Pflanze allerdings nicht gegen Bakterien, Pilze und Viren verteidigen. Daher wurden umfassendere Abwehrstrategien entwickelt werden, bei denen Sekundärstoffe an vorderster Stelle stehen. Heute kennt man bereits über zwanzigtausend Sekundärstoffe, die nach ihrer chemischen Struktur in drei größere Gruppen unterteilt werden: Stickstoffhaltige und phenolische Substanzen sowie Terpene. Über 14000 N-haltige Strukturen wurden bislang beschrieben; zu ihnen zählen insbesondere Alkaloide, Amine, nicht proteinogene Aminosäuren, Cyanglykoside und Senfölglykoside (Glucosinolate). Davon dienen viele pflanzliche Sekundärstoffe als effektive chemische Abwehrstoffe gegen Herbivoren und Pathogene (Wink, 2004).

Trotz der raffinierten und vielfältigen Verbindungen in Pflanzen haben sich immer wieder bestimmte Herbivoren, insbesondere Insekten, im Laufe der Evolution an sie angepasst und eine Toleranz dagegen entwickelt. Manche Insekten können nicht nur die Pflanzengifte überwinden, sondern Sie können sie im eigenen Körper speichern, um sie als eigene Verteidigung einzusetzen (Hartmann und Ober, 2000). Daher müssen die Pflanzen ihre Abwehr- und Schutzvorrichtungen ständig verbessern, während es den Insekten stets aufs Neue gelingen muss, die verbesserten Schutzbarrieren ihrer Futterpflanzen zu überwinden. Durch den Überlebenskampf wurden Pflanzen und Insekten spezialisierter und dadurch vielfältiger. Ein herausragendes Beispiel für diese komplexe Koevolution ist die Sekundärstoffklasse der Pyrrolizidin-Alkaloide (PAs) und die an PAs adaptierten Insekten, die in unserer Arbeitsgruppe intensiv erforscht werden. PAs sind Abwehrstoffe der Pflanzen, die einen bitteren Geschmack haben und fraßhemmend und toxisch auf unangepasste Herbivoren wirken (Boppre, 1986; Van Dam et al., 1995). In dieser Arbeit soll versucht werden die Anpassungsmechanismen zu charakterisieren und identifizieren, um die verschiedenen biochemischen Anpassungsstrategien besser zu verstehen, die es Insekten aus unterschiedlichen Taxa erlauben mit toxischen PAs sicher umzugehen.

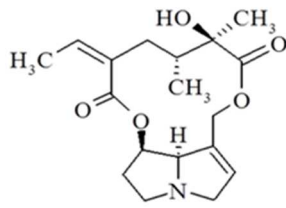
## **1.1 Typische Sekundärstoffe: Pyrrolizidin-Alkaloide (PAs)**

Die PAs repräsentieren eine Klasse typischer sekundärer Pflanzenstoffe (Croteau et al., 2000). Das sporadische Vorkommen ist auf einige nicht nahe miteinander verwandten Pflanzenfamilien der Angiospermen beschränkt. Hauptsächlich (>95%) kommen PA-enthaltende Pflanzenarten in Gattungen innerhalb der Familien der Asteraceae (*Senecio* und *Eupatorium*), der Boraginaceae (z.B. *Heliotropium*), der Orchidaceae (z.B. *Phalaenopsis*) und der Fabaceae (hauptsächlich die Gattung *Crotalaria*) vor. Vereinzelt findet man sie innerhalb der Familien der Apocynaceae, der Convolvulaceae, der Ranunculaceae, der Santalaceae, der Sapotaceae, der Celastraceae und Lamiaceae (Abbildung 1.1) (Hartmann und Witter, 1995; Nawaz et al., 2000).

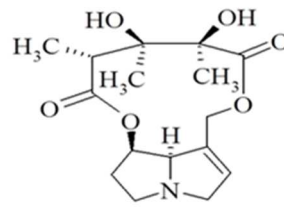


**Abbildung 1.1:** Sporadisches Vorkommen von Pyrrolizidin-Alkaloiden innerhalb der Angiospermen. Aus Ober und Hartmann (1999) und Stebbins (1974), modifiziert. Hauptvorkommen der PAs in Pflanzen Familien: 1) Asteraceae, 2) Boraginaceae, 3) Apocynaceae, 4) Orchidaceae, 5) Fabaceae. Vereinzelt kommen sie zudem innerhalb der Convolvulaceae, der Santalaceae, der Sapotaceae, der Ranunculaceae, der Celastraceae und der Lamiaceae vor.

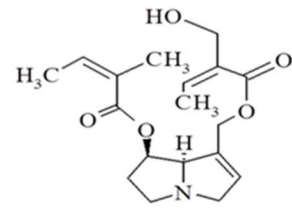


**Gruppe I: Makrozyklische oder offenkettige Diester PAs:**

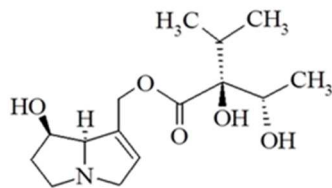
Senecionin



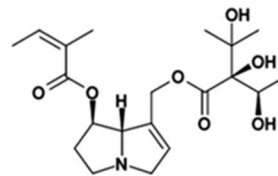
Monocrotalin



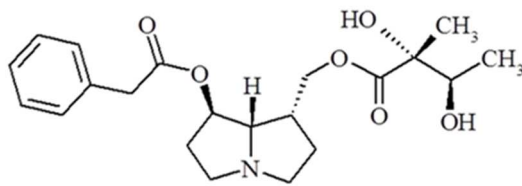
Triangularin

**Gruppe II: Lycopsamin PAs:**

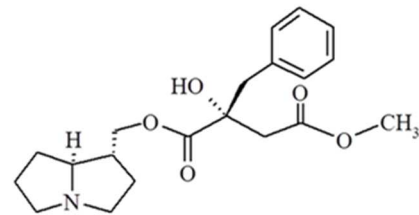
Lycopsamin



Heliosupin

**Gruppe III: Spezifische PAs:**

Ipangulin



Phalaenopsin

**Abbildung 1.2: Klassifikation der PAs mit Beispielen (Hartmann und Witter, 1995; Hartmann und Ober, 2008).** Die drei PA-Gruppen: **Gruppe I:** Makrozyklische oder offenkettige Diester: Senecionin, Triangularin, und Monocrotalin; **Gruppe II:** Lycopsamin Typ: Lycopsamin, Heliosupin; **Gruppe III:** Spezifische Typen: Ipangulin und Phalaenopsin.

Über 660 chemische Strukturen sind von PAs bekannt (Jiang et al., 2006). Grundsätzlich handelt es sich bei PAs um Esteralkaloide mit einer Necinbase als charakteristischen Pyrrolizidin-Grundkörper und einer oder mehreren durch Veresterung verknüpften Necinsäuren. Die Necinsäuren können sowohl offenkettige Monoester und offenkettige Diester sowie makrozyklische Diester und Triester sein. Durch chemische Modifikation wird die PA-Struktur vielfältiger. Aufgrund zahlreicher neu entdeckter PAs wurden sie von Hartmann in drei folgenden Gruppen neu eingestuft. Dadurch soll ein besseres Verständnis der Mechanismen von Biosynthese, biologischer Aktivitäten und Funktion der PAs erreicht werden (Abbildung 1.2) (Hartmann und Ober, 2008).

**Gruppe I.** Makrozyklische oder offenkettige Diester (in Familien Asteraceae, Fabaceae): Senecionin, Triangularin, und Monocrotalin, die mit von Isoleucin abgeleiteten Necinsäuren verestert sind (Abbildung 1.2).

**Gruppe II.** Lycopsamin-Typ (drei Familien: Asteraceae (Tribus Eupatorieae), Boraginaceae und Apocynaceae): Lycopsamin Typ PAs sind Monoester, offenkettige Diester oder makrozyklische Triester vorliegen (Abbildung 1.2).

**Gruppe III.** Spezifische Typen-PAs: Merkmal für die ausgewählten Gattungen umschliessenden Typen Ipangulin (Familie Convolvulaceae) und Phalaenopsin (Familie Orchidaceae), die als Mono-, offenkettige Di- und Triester mit Aryl-, Aralkyl- und selten Alkylnecinsäuren sowie 1,2 gesättigten Necinbase vorliegen (Abbildung 1.2).

## 1.2 Biosynthese der Pyrrolizidin-Alkaloide

PAs werden innerhalb der verschiedenen Pflanzenfamilien in unterschiedlichen Organen synthetisiert. Durch Tracerversuche an Pflanzensorgankulturen können die Biosynthesorte der PAs lokalisiert werden. Während in Asteraceae wie *Senecio* und *Eupatorium* die PA-N-Oxide ausschließlich in der Wurzel lokalisiert sind (Toppel et al., 1987; Sander und Hartmann, 1989; Hartmann und Witter, 1995), sind in Boraginaceae je nach Art das gesamte Sprosssystem, die junge Wurzel oder das junge Blatt zur Biosynthese der PA-N-Oxide fähig (Frölich, 1996; Niemueller et al., 2012). Da hohe Biosyntheseaktivität in der Wurzelspitze und im jungen Blatt nachgewiesen wurde, und scheint die PA-Biosynthese an das Wachstum in Asteraceae (z.B. *Senecio erucifolius* und *Eupatorium cannabinum*) und Boraginaceae (z.B. *Symphytum officinal*) gekoppelt zu sein (Sander und Hartmann, 1989; Frölich, 1996; Anke et al., 2004). In der Gattung *Crotalaria* der Fabaceae wird eine PA-Biosynthese im Spross gefunden. In *Phalaenopsis*-Arten (Orchidaceae) findet die Synthese der PAs in der Luftwurzelspitze statt. Zudem wurde eine Expression der HSS in der Knospe gefunden (Frölich, 1996; Anke et al., 2008).

In *Senecio*-Arten werden PAs in der Form von PA-N-Oxiden ausschließlich in der Wurzel synthetisiert und über das Phloem in die oberirdischen Organe durch einen spezifischen Carrier transportiert (Ehmke et al., 1988; Hartmann und Witter, 1995). Dort werden sie durch weitere chemischen Modifizierungen in das artspezifische PA-Spektrum überführt (Sander und Hartmann, 1989). Im Gewebe werden die PA-N-Oxide in der Vakuole gespeichert, außer *Crotalaria*-Arten. PAs sind metabolisch stabil und zeigen keinen Turnover oder Degradation und werden in Wurzel, Sprosssystem und Blatt stetig verlagert (Hartmann und Dierich, 1998; Frölich et al., 2007). In reproduktiven Organen konnten sogar 10- bis 30-fach höhere Alkaloid-Konzentrationen als in den vegetativen Organen nachgewiesen werden (Hartmann und Zimmer, 1986). Bis zu 90% der Gesamtalkaloide werden in den Blüten akkumuliert, wie beispielsweise, bei *Phalaenopsis* (Orchidaceae) und bei *Heliotropium* (Boraginaceae) (Frölich et al., 2006; Frölich et al., 2007). Bei verschiedenen Boraginaceae (z.B. *Heliotropium indicum* und *Heliotropium spathulatum*)

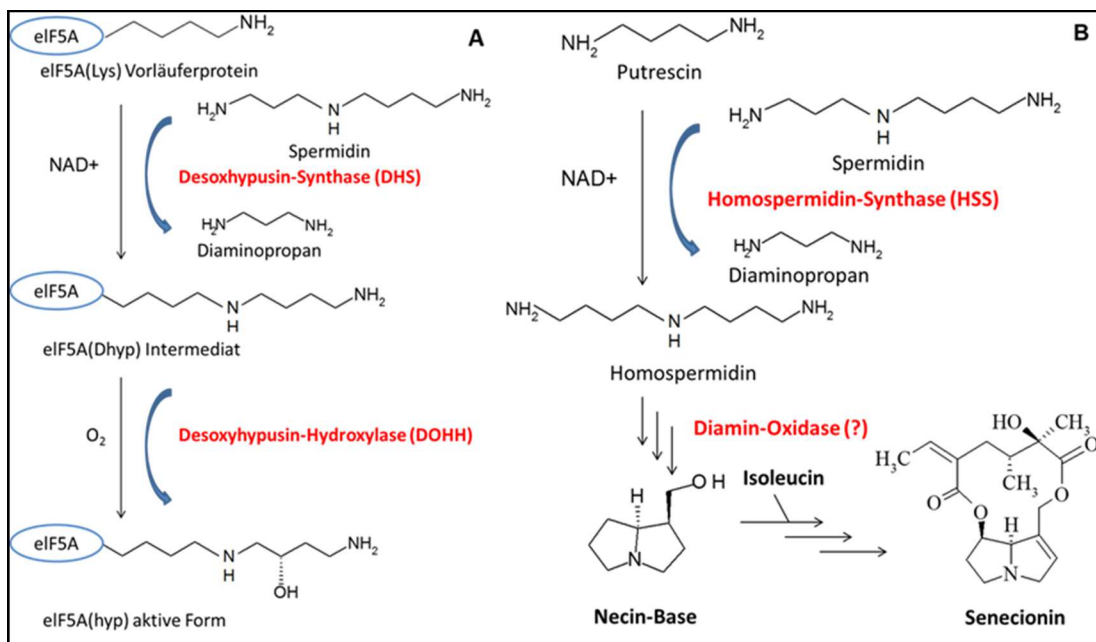
wurden 10-fach höhere PA-Konzentrationen in jungen Blättern als in älteren Blättern gefunden (Frölich, 1996). Ähnliches wurde für *Cynoglossum officinale* beschrieben, für die sogar ein Transport der PA-N-Oxide aus den alten in die jungen Blätter nachgewiesen werden konnte (Van Dam und Vrieling, 1994). Vermutlich dienen PAs als Schutz vor Fraßfeinden für Organe, die für die Fortpflanzung wichtig sind.

Wie bereits erwähnt, bestehen PAs aus einer Necinbase und einer oder mehreren verknüpften Necinsäuren. Die Synthese der Necinbase erfolgt aus Arginin über den Polyaminstoffwechsel von Putrescin und Homospermidin (Hartmann, 1988). Homospermidin ist das erste alkaloidspezifische Zwischenprodukt, das durch das Schlüsselenzym Homospermidinsynthase (HSS; EC 2.5.1.45) in einer NAD<sup>+</sup>-abhängigen Reaktion gebildet wird, indem eine Aminobutylgruppe von Spermidin auf Putrescin übertragen wird, wobei Diaminopropan abgespalten wird (Böttcher et al., 1994; Graser und Hartmann, 2000). Die weiteren Schritte der PA-Biosynthese von Homospermidin bis zur Necinbase sind bislang noch nicht geklärt. Vermutlich wird durch eine Diamin-Oxidase ein intermediäres Dialdehyd gebildet. Das Schlüsselenzym HSS wurde erstmals von Böttcher et al., (1993) aus Wurzelkulturen von *Senecio* und *Eupatorium* nachgewiesen, isoliert und charakterisiert. Durch den Einsatz von  $\beta$ -Hydroxyethylhydrazin (HEH), einem Hemmstoff der Diamino- und Polyaminoxidasen PAO (EC 1.5.3.11), kommt es zu einer Unterbrechung der PA-Biosynthese, die zu einer Anreicherung von Homospermidin führt. Nach Aufheben der Hemmung wird das Homospermidin vollständig in PA-N-Oxide eingebaut (Böttcher et al., 1993).

Die Desoxyhypusin-Synthase (DHS; 2.5.1.46) ist evolutiver Ursprung der Homospermidinsynthase (HSS). Unter dem Selektionsdruck der Herbivorie entstand die HSS durch eine Genduplikation aus der DHS (Ober und Hartmann, 2000; Ober, 2005). Die ubiquitär vorkommende DHS katalysiert den ersten Schritt in der posttranslationalen Aktivierung des eukaryontischen Translationsinitiationsfaktors 5A (eIF5A) (Chen und Liu, 1997). eIF5A ist ein essentieller Faktor in *Saccharomyces cerevisiae* für Zellwachstum und Zellproliferation (Park et al., 1997; Park et al., 1998). Rosorius et al., (1999)

implizieren eine neue Funktion der eIF5A für das Ausschleusen bestimmter mRNAs aus dem Zellkern. Abbildung 1.3: A zeigt, dass die DHS die Übertragung des 4-Aminobutylrestes eines Moleküls Spermidin auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines spezifischen Lysinrests des eIF5A-Vorläuferproteins katalysiert. Als weiterer Aktivierungsschritt wird Desoxyhypusin durch eine Desoxyhypusin-Hydroxylase zum Protein gebundenen Hypusin hydroxyliert (Chen und Liu, 1997). Im Gegensatz zur DHS benutzt die HSS hingegen ein Putrescinmolekül als Akzeptor des Aminobutylrests von Spermidin. Dadurch entsteht Homospermidin, für die PA-Biosynthese (Abbildung 1.3: B). Im Gegensatz zur DHS ist die HSS nicht in der Lage, das eIF5A-Protein zu binden (Ober et al., 2003). Eine Nebenreaktion der DHS wurde in der HSS zur Hauptreaktion entwickelt. Damit wurde HSS als Schlüsselenzym für die PA-Biosynthese etabliert. Durch die phylogenetische Analyse der HSS innerhalb der Angiospermen konnte nachgewiesen werden, dass die sporadisch vorkommenden HSS sich innerhalb der Angiospermen-Taxa mehrmals und unabhängig voneinander aus DHS entwickelt haben (Ober et al., 2003; Reimann et al., 2004).

Die Biosynthese der Necinsäuren kann auf Enzym-Ebene nicht so gut erklärt werden wie die der Necinbase. Als Vorstufen für die Necinsäuren wurden verzweigte Aminosäuren wie Valin, Isoleucin oder Leucin nachgewiesen (Crout et al., 1972). Makrozyklische oder offenkettige Diester-PAs, z.B. Senecionin, Triangularine, und Monocrotalin, sind PAs, die mit von Isoleucin abgeleiteten Necinsäuren verestert werden. Die Biosynthese der Necinsäuren vom Lycopsamin-Typ werden von Valin abgeleitet und vermutlich zusammen eingeführt mit Valin oder durch Transamination von 2-Oxoisovalerat über einen „Aktivierten Acetaldehyde“ (He-ThDP, Hydroxyethylthiamin Diphosphat) durch eine Acetohydroxysäure Synthase AHAS (EC 2.2.1.6) (Weber, 1997; Langel, 2007).



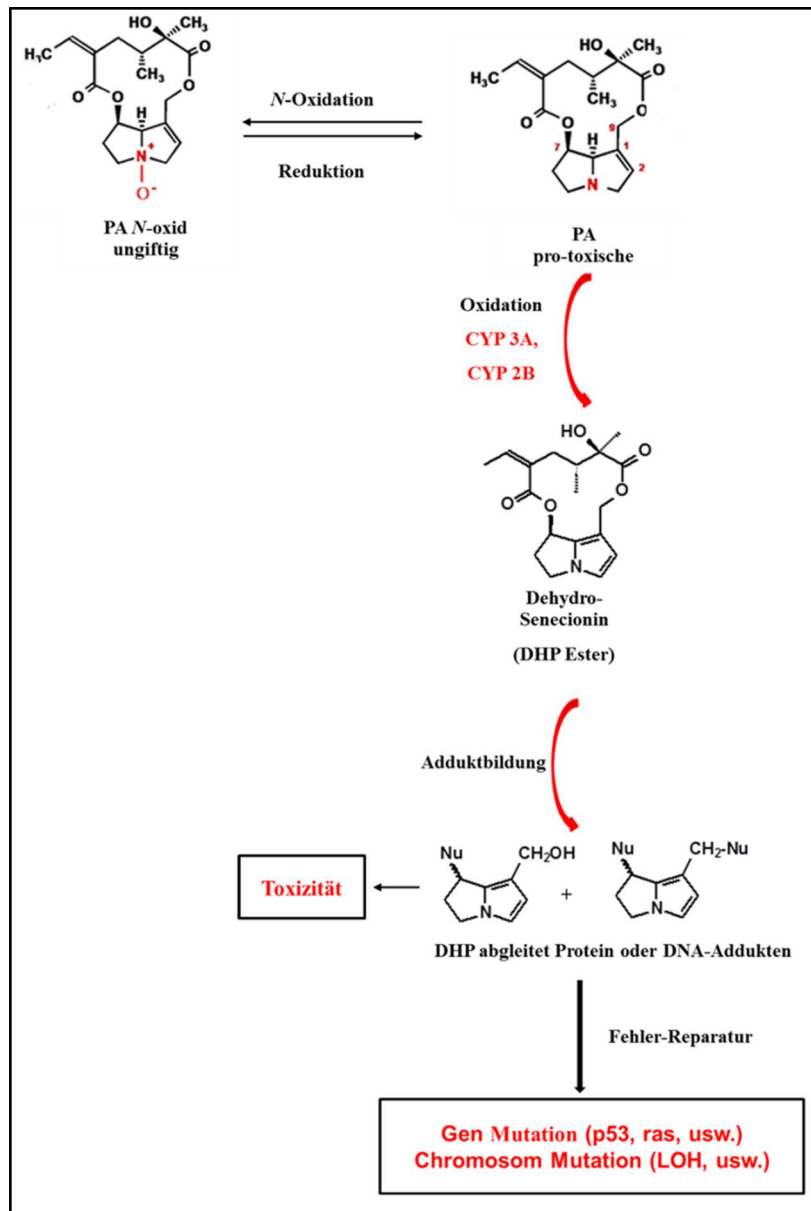
**Abbildung 1.3: Reaktionsmechanismen von Desoxyhypusin-Synthase (DHS, EC 2.5.1.46) und Homospermidin-Synthase (HSS, EC 2.5.1.45).** Die DHS überträgt einen Aminobutylrest von einem Molekül Spermidin auf einen spezifischen Lysinrest des eIF5A-Vorläuferproteins (Abbildung 1.3: A). Das dabei entstandene Desoxyhypusin wird dann in einem weiteren Schritt durch eine Desoxyhypusin-Hydroxylase (DOHH, EC 1.14.99.29) zum proteingebundenen Hypusin hydroxyliert. Die HSS hingegen überträgt den Aminobutylrest auf ein Putrescinmolekül, woraus Homospermidin entsteht (Abbildung 1.3: B). Das Homospermidin ist die Vorstufe zur Synthese der Necinbase, dem gemeinsamen Grundgerüst aller PAs, wie z.B. das Senecionin.

### 1.3 Toxizität der Pyrrolizidin-Alkaloide

PAs können in zwei unterschiedlichen und ineinander umwandelbaren Formen vorliegen. Das lipophile tertiäre Alkaloid, die freie Base, ist für die toxische Wirkung verantwortlich und hat folgende Strukturmerkmale: I. 1,2-Doppelbindung der Necinbase; II. Freie oder veresterte Hydroxylfunktion an Position 7; III. Veresterung der allylischen Hydroxylgruppe an Position 9 (Lindigkeit et al., 1997). Das hydrophile, salzartige *N*-Oxid ist untoxisch. In allen bisher untersuchten Arten der Boraginaceae, Asteraceae und Fabaceae werden die PAs ausschließlich in Form ihrer *N*-Oxide synthetisiert, transportiert

und gespeichert. Diese untoxischen *N*-Oxide werden spontan im Darm zu lipophilen tertiären Alkaloiden reduziert und passiv resorbiert, wenn sie von Tieren mit der Nahrung aufgenommen werden. Danach werden die Alkaloide in der Leber oder in der Lunge durch die Isoform CYP3A und CYP2B der mikrosomalen Cytochrom-P-450-Monooxygenasen (CYP450) in instabile, alkylierende Pyrrolderivate bioaktiviert (Huan et al., 1998). Diese Produkte bilden schnell Addukte mit Proteinen und Nukleinsäuren, was Zyto- und Genotoxizität sowie Mutagenität zur Folge hat (Abbildung 1.4) (Mattocks et al., 1986; Cheeke, 1988; Chen et al., 2010). Durch Experimente in Pflanzen, Leukozyten-Zellkulturen von Beuteltieren (*Potorus tridactylus*) und Hamster-Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass PA-Derivate Chromosomen-Aberrationen verursachen können (Griffin und Segall, 1986). Für eine Reihe von PAs kann nach metabolischer Aktivierung eine mutagene Wirkung in einem *Salmonella typhimurium*-Test nachweisen werden. Die krebserregende Wirkung ist offenbar ein Folge der zellschädigenden Eigenschaften (Inoue, 2004; Ferguson und Philpott, 2008). Bei einigen Säugetieren wie z.B. Pferden kommt es durch PAs zur Schädigung der Leber („Schweinsberger Krankheit“) mit möglicher Todesfolge (Hooper et al., 1978). Die PAs wirken auch auf Insekten toxisch (Frei et al., 1992), da in ihnen eine ähnliche toxische Reaktion der tertiären Alkaloide zu den reaktiven Pyrrolderivaten wie bei den Säugetieren abläuft. Die mutagenen Wirkungen von PAs auf Insekten konnten in einem Flügel der *Drosophila melanogaster* nachgewiesen werden (Frei et al., 1992). Ein solcher Nachweis ist in der Regel schwierig, da PAs eine stark abschreckende Wirkung auf nicht angepasste pflanzenfressende Insekten haben. Die an nicht PA-haltige Pflanzen angepasste Seidenspinnerraupe *Philosamia ricini* eignete sich für ein Toxizitätsexperiment, da sie offenbar mangels sinnlicher und/oder Verhaltensdiskriminierung die PA-behandelte Nahrung wahllos akzeptiert. Narberhaus et al., (2005) demonstrierten eine akut toxische Wirkung auf die Larvenentwicklung der generalistischen Seidenraupe *P. ricini* (Saturniidae). Die weite Verbreitung von PAs bei höheren Pflanzen führte aufgrund ihrer Toxizität schon oftmals zu Vergiftungserscheinungen bei Weidevieh und bei Menschen, die die Alkaloide durch die Nahrung aufgenommen hatten (Culvenor et al., 1981; Roitman, 1983). Schwerwiegend waren Vergiftungen mit PA-haltigen Samen verschiedener *Crotalaria*-Arten in

Indien, die mit essbaren Fabaceen-Samen verwechselt wurden (Tandon et al., 1976). Eine Vergiftung beim Menschen konnte durch die orale Aufnahme möglich sein, z.B. durch Teezubereitungen und von PA-belastetem Honig (Boppre et al., 2005; Kempf et al., 2008).



**Abbildung 1.4: Metabolisierung von PAs in Vertebraten:** PA und PA-N-Oxid sind zwei Formen der PAs. Die hydrophilen, salzartigen und nicht toxischen N-Oxide werden spontan zu lipophilen tertiären Alkaloiden reduziert, die nach der passiven Resorption in der Leber oder in der Lunge durch mikrosomale Cytochrom-P-450-Monooxygenasen (CYP450) in instabile, alkylierende Pyrrolderivate bioaktiviert werden. Diese Produkte bilden schnell Addukte mit Proteinen und Nukleinsäuren, was Zyto- und Genotoxizität sowie Mutagenität zur Folge hat.



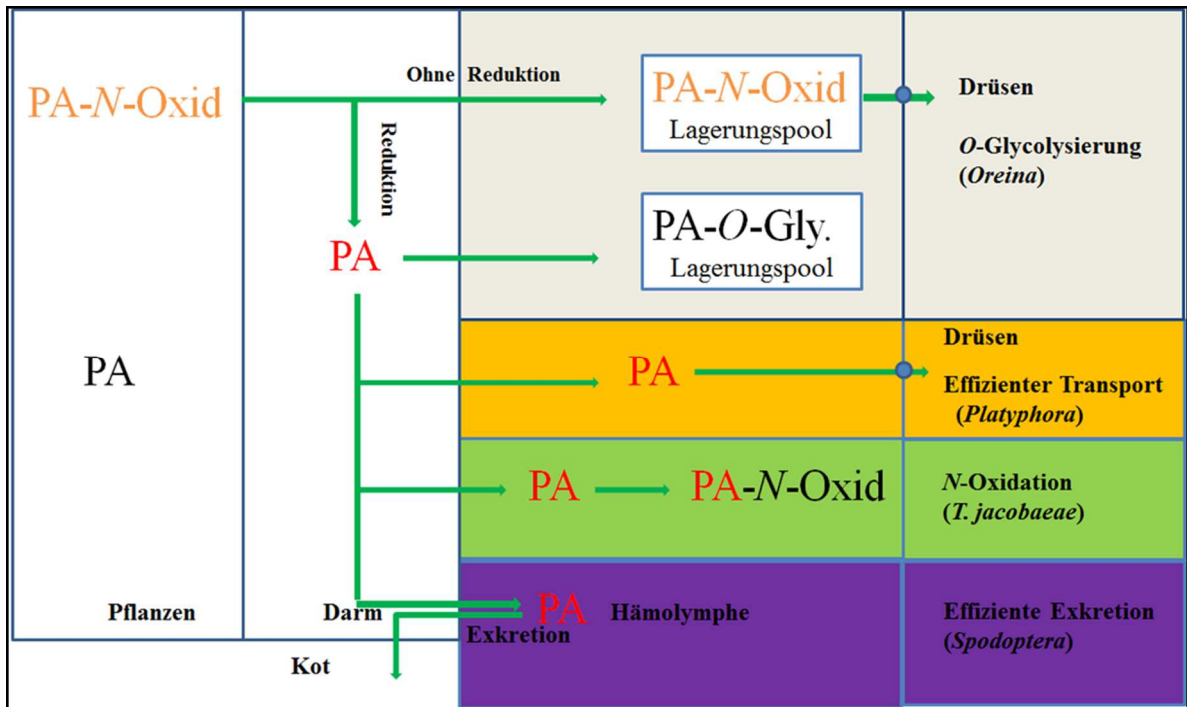
## 1.4 An Pyrrolizidin-Alkaloide adaptierte Insekten

PAs sind chemische Abwehrstoffe der Pflanzen gegen Herbivoren (Hartmann, 1999a; Hartmann und Ober, 2000). Durch die Millionen Jahre lange Koevolution hat eine Reihe von Insekten Mechanismen entwickelt, die sie die toxische PA-Barriere überwinden lassen und die bei einigen sogar als eigene Schutzmethode gegen Feinde oder als Vorstufe von Pheromonen dient.

### 1.4.1 Anpassungsstrategien der an PAs adaptierten Insekten

Verschiedene Anpassungsstrategien mussten entwickelt werden, um die toxischen PAs nach ihrer Aufnahme sicher zu handhaben. Durch die Wechselwirkung mit PA-haltigen Pflanzen haben die adaptierten Insekten folgende Merkmale entwickelt und optimiert: (i) Besondere Sensoren, um die PA-haltigen Pflanzen wahrzunehmen; (ii) Biochemische Mechanismen, um PAs aufzunehmen, beizubehalten, zu metabolisieren, zu akkumulieren und unter kontrollierten Bedingungen zu übertragen; (iii) durch PAs geführte Partnerwahlverhalten (Hartmann, 2004).

Insekten können sowohl PA als auch PA-*N*-Oxid aus Pflanzen aufnehmen. PA-*N*-Oxide werden im Darm spontan zu lipophilen tertiären Alkaloiden reduziert, die nach der passiven Resorption und durch mikrosomale CYP450 zu reaktiven Pyrrolderivaten umgesetzt werden. Als Folge dieser Bioaktivierung werden die genannten toxischen Eigenschaften der PAs induziert. Um diese toxische Barriere zu überwinden, wurden die unterschiedlichen Anpassungsstrategien der PA-adaptierten Insekten entwickelt (Abbildung 1.5).



**Abbildung 1.5: Mechanismen der PA-Adaption bei Insekten.** Strategien der Aufnahme, Stoffwechsel der PAs und PA-N-Oxide in 1) *Oreina cacaliae* 2) *Platyphora boucardi* 3) *Tyria jacobaeae* 4) *Spodoptera littoralis*. Blauer Punkt: postulierte Transporter für freie Base der PAs und PA-N-Oxid; PA aus PA-N-Oxid oxidiert (rot); PA-O-Gly.: PA-O-Glycoside.

Einige Insekten, wie die zu den Eulenfaltern gehörende Art *Spodoptera littoralis* (Noctuidae, Lepidoptera), konnten sich leicht an die PA-haltigen Pflanzen anpassen, diese aber nicht im Körper sequestrieren, sondern es konnte eine effektive Exkretion von PAs nachgewiesen werden (Aplin und Rothschild, 1972). Durch mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Senecionin,  $^{14}\text{C}$ -markiertem Senecionin-N-Oxid und Senecionin-N- $^{18}\text{O}$ -Oxid gefütterte *S. littoralis* wurde herausgefunden, dass PA-N-Oxid zuerst im Darm zu PA reduziert und passiv in der Hämolymphe absorbiert wird. Bevor die toxische Wirkung in der Hämolymphe entsteht, werden PAs effektiv ausgeschieden (Lindigkeit et al., 1997). Diese Strategie wurde in Abbildung 1.5 als „effiziente Exkretion“ (lila) dargestellt.

Andere Insektenarten haben es nicht nur geschafft diese wirkungsvolle chemische Barriere zu überwinden, sondern sie übernehmen und akkumulieren die Wehrchemie der Pflanze, um sie zum eigenen Nutzen einzusetzen

(Hartmann und Witter, 1995; Hartmann und Ober, 2000; Hartmann, 2004). Überraschenderweise finden sich Arten, die PAs pflanzlichen Ursprungs in ihre eigene chemische Abwehr integriert haben, in weit entfernten Verwandtschaftskreisen. So gehören PA-sequestrierende Arten vereinzelt in Taxa wie Coleoptera (einige Blattkäfer: z.B. Chrysomeliden), Lepidoptera (Arctiidae, Nymphalidae, Ithomiidae), Orthoptera (Heuschrecken: z.B. *Zonocerus variegatus*) und Homoptera (Blattläuse: z.B. *Aphis jacobaeae*) (Hartmann und Witter, 1995). Von ihnen wurden ganz unterschiedliche Strategien entwickelt die PAs physiologisch sicher zu behandeln und effektiv als eigene Abwehr einzusetzen.

### **Strategie I: Entgiftung durch effiziente Speicherung in den exokrinen Drüsen:**

Der Blattkäfer *Platyphora boucardi* (Coleoptera, Chrysomelidae) kann PAs entgiften, indem er die PAs effizient in exokrine Drüsen pumpt (Hartmann et al., 2001). Dieser Käfer nutzt PA-Futterpflanzen aus den Familien Boraginaceae, Asteraceae und Apocynaceae. *P. boucardi* nimmt zunächst PA-N-Oxid von den Futterpflanzen auf und reduziert diese im Darm zu PA. Nach ihrer passiven Resorption werden die PAs mit hoher Effizienz in die exokrinen Drüsen gepumpt. Dieser Blättkäfer hat die Strategie entwickelt, PAs nicht in Hämolymphe und anderen Geweben zu entgiften, sondern fast alle PAs als Abwehrstoffe in den Drüsen zu lagern und sie so in die eigene Verteidigung zu integrieren. Wenn der Käfer körperlich angegriffen wird, werden zahlreiche kleine Tröpfchen eines defensiven Sekretes aus diesen Abwehrdrüsen freigegeben. Diese Strategie wurde in der Abbildung 1.5 als „effizienter Transport“ (orange) dargestellt.

**Strategie II: Entgiftung durch die Verhinderung der Reduktion von PA-N-Oxiden und O-Glycosylierung der PAs:**

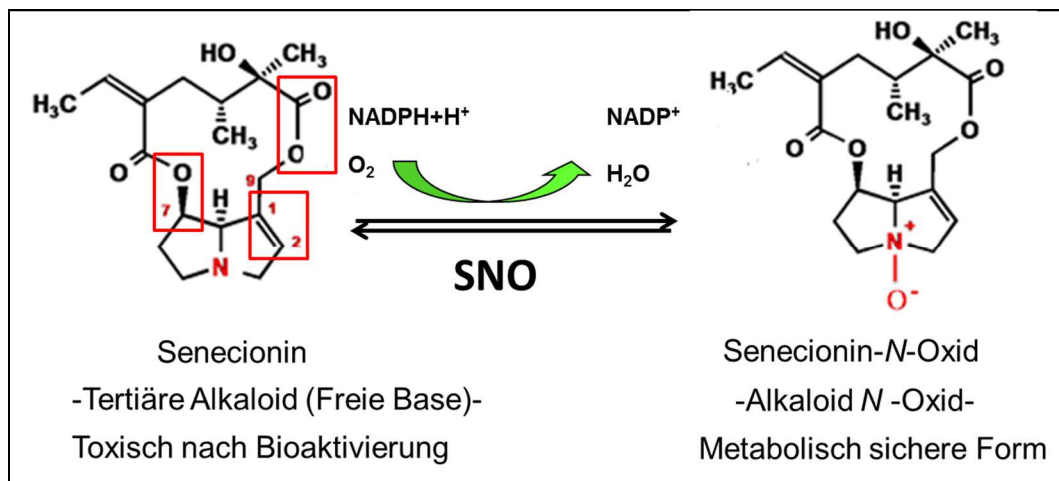
Die Gattung *Oreina* zeigt eine andere Strategie der Speicherung von PAs im Vergleich zu der taxonomisch eng verwandten Blattkäferart *P. boucardi*. *Oreina* können zunächst die Reduktion der PA-N-Oxide im Darm verhindern. Danach werden die PA-N-Oxide in dieser polaren Form durch einen spezifischer Membrancarrier vom Darm in die Hämolymphe transportiert (Ehmke et al., 1991). In der Hämolymphe wird ein Lagerungspool gebildet, den die PA-N-Oxide als ersten Speicherplatz nutzen. Schließlich werden diese vom Blattkäfer in speziellen Wehrdrüsen gespeichert (Rowell-Rahier et al., 1991). Die Alkaloide können in ihren defensiven Drüsen eine ca. 100-fach höhere PA-Konzentration haben als in den Vakuolen der Herkunftspflanzen (Hartmann, 1999a; Hartmann et al., 2001). PA-N-Oxide werden zu einem geringen Anteil in tertiäre PAs reduziert und passiv vom Darm in die Hämolymphe aufgenommen. *Oreina* kann diese geringen Anteile tertiärer PAs nicht in Wehrdrüsen transportieren wie *Platyphora*, sondern entgiftet sie durch O-Glycosylierung in hydrophile Glycoside. (Hartmann et al., 1999b; Hartmann et al., 2001). Diese Strategie wurde in Abbildung 1.5 als „O-Glycosylierung“ (khaki) dargestellt.

**Strategie III: Entgiftung durch N-Oxygenierung der PAs**

Besonders bei den PA-sequestrierenden Lepidopteren wie den Arctiidae, den Unterfamilien Danainae, Ithomiinae der Nymphalidae und den Aphididae der Hemiptera sowie bei der weit entfernten Familie der Pyrgomorphidae innerhalb der Ordnung Orthoptera hat sich die Strategie etabliert tertiäre PAs in die physiologisch sichere Form der PA-N-Oxide umzuwandeln (Hartmann und Witter, 1995). Damit können sie PAs in Form von PA-N-Oxiden im eigenen Körper akkumulieren. Diese besondere Strategie wird in unserer Arbeitsgruppe intensiv erforscht. Diese Strategie wurde in Abbildung 1.5 als „N-Oxidation“ (grün) dargestellt und wird im folgenden Projektteil detailliert beschrieben.

## 1.4.2 Adaptionsmechanismen von spezialisierten Lepidoptera und Orthoptera

Wie schaffen es PA-sequestrierende Arctiiden, die pro-toxischen PAs so sicher zu handhaben, dass fatale Bioaktivierungen ausgeschlossen sind? Mittels Tracerexperimenten konnte gezeigt werden, dass die von *T. jacobaeae* (Lepidoptera) aufgenommenen PAs, unabhängig davon, ob sie als freie Basen oder *N*-Oxide in den Darmtrakt gelangen, ausschließlich als pro-toxische freie Basen resorbiert werden (Lindigkeit et al., 1997). Um die pro-toxischen PAs zu entgiften, spielt eine lösliche Flavin-abhängige Monooxygenase eine wichtige Rolle. Diese Flavin- und NADP-abhängige Monooxygenase (Senecionin-*N*-Oxygenase, SNO) katalysiert die *N*-Oxygenierung, die hochspezifisch nur potentiell toxische PAs in die nicht-toxischen *N*-Oxide umwandelt. Dieser Mechanismus ermöglicht es den Tieren die Alkaloide als physiologisch gut verträgliches Prätoxin zu akkumulieren (Abbildung 1.6).



**Abbildung 1.6: Entgiftung durch *N*-Oxygenierung der PAs (Senecionin als Beispiel).** Das tertiäre Alkaloid Senecionin wird durch die Oxidation von NADPH und die Reduktion von O<sub>2</sub> zu Senecionin-*N*-Oxid als metabolisch sichere Form oxidiert. Die für den Umsatz durch das Enzym Senecionin-*N*-Oxygenase (SNO) von *T. jacobaeae* notwendigen Strukturmerkmale wie Kapitel 1.3 geschrieben sind rot gekennzeichnet.

In Vertebraten, z.B. Meerschweinchen und Schafen, werden die *N*-Oxygenierung nicht durch die SNO katalysiert, sondern die Detoxifizierung geschieht durch eine mikromale Multisubstrat-FMO, die in Insekten nicht vorkommt (Miranda et al., 1991; Huan et al., 1998). Das Enzym SNO wurde als erste Flavin-Monooxygenase von Insekten sowohl biochemisch als auch auf molekularer Ebene gut charakterisiert (Lindigkeit et al., 1997; Naumann et al., 2002). Die *Tyria*-SNO ist ein extrazelluläres Enzym mit einer *N*-terminalen Signalsequenz, welches im Fettkörper synthetisiert und in die Hämolymphe entlassen wird (Naumann, 2003). *T. jacobaeae* ist ein Spezialist, der nur *Senecio jacobaea* als Futterpflanzen verwendet. Die Substratspezifität wurde mit nativer SNO und rekombinanter SNO aus *T. jacobaeae* charakterisiert. Beide akzeptieren PAs mit den strukturellen Eigenschaften, die auch für die Toxizität der PAs verantwortlich sind (Kapitel 1.3). Von den getesteten Substanzen wurde Senecionin am besten umgesetzt (Naumann et al., 2002). Nach diesem ersten Schritt zum Verständnis der evolutiven Anpassung von Insekten an PA-haltige Pflanzen mit der Strategie der *N*-Oxygenierung wäre eine Untersuchung von anderen Insekten der Arctiiden demnach interessant. Wie beispielsweise, *Arctia caja* und *Grammia geneura*, die Generalisten der Unterfamilie Arctiinae und nahe Verwandte von *T. jacobaeae* sind.

## 1.5 Zielsetzung

Um die Koevolution und Anpassungsstrategie zwischen Spezialisten/Generalisten und PAs-Pflanzen besser zu verstehen, wurden die beiden Generalisten *A. caja* und *G. geneura* in dieser Arbeit intensiv untersucht. Sven Sehlmeier (2010) hat die vermutliche PNO aus *A. caja* und *G. geneura* auf der molekularen Ebene aufgeklärt, diese konnte jedoch nicht reproduzierbar heterolog in aktiver Form exprimiert werden. Daher ist es ein Teil der vorliegenden Arbeit, ein Expressionssystem für die PNO aus *G. geneura* zu entwickeln, das die Expression von löslichem und aktivem Protein ermöglicht, um die entsprechende Enzymreaktion biochemisch charakterisieren zu können. Hierfür sollten die Expressionssysteme Hefe (*K. lactis*) und *E. coli* untersucht werden. Durch das photometrische Assay und Radioassay sollte die jeweilige Enzymaktivität analysiert werden. Dadurch soll auch der Unterschied von Substratspezifitäten zwischen Spezialisten (*T. jacobaeae*) und Generalisten (*G. geneura*) besser erklärt werden. Außerhalb der Lepidopteren konnte in der Heuschrecke *Z. variegatus* (Orthoptera, Pyrgomorphidae) eine mit dem Fettkörper assoziierte N-Oxid-Bildung nachgewiesen werden (Biller, 1993; Lindigkeit et al., 1997). Die interessante Frage ist, ob so weit entfernte Insektenlinien wie Orthoptera (Heuschrecken, wie z.B. *Z. variegatus*) die gleiche Strategie verwenden wie die zu den Lepidoptera gehörenden Actiidae? Oder haben sie eine andere neue Strategie für die Entgiftung der PAs entwickelt? Oder, wenn sie die gleiche Entgiftungsstrategie verfolgen, was sind die Unterschiede zwischen der PNO von *Z. variegatus* und der Actiiden-PNO, was ist der Ursprung des Gens und auch, wie ist die phylogenetische Einordnung des Enzyms? Gibt es einen Unterschied in der Substratspezifität zwischen Actiidae und Orthoptera? Diese Fragen sollen in der vorliegenden Arbeit auf molekularbiologischer und biochemischer Ebene geklärt werden. Die Identifizierung und Charakterisierung dieses unbekanntes Enzyms aus der an PAs adaptierten Heuschrecke *Z. variegatus* sind das Hauptziel dieser Arbeit. Eine Klonierung und Expression des rekombinanten Enzyms sollte durchgeführt werden. An Hand des überexprimierten rekombinanten Proteins sollte nach der Reinigung mit Hilfe der Affinitätschromatographie der Km-Wert und die

Substratspezifität analysiert werden. Außerdem sollte eine phylogenetische Einordnung und ein Vergleich der Enzyme innerhalb der Lepidoptera und Orthoptera vorgenommen werden. Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit lag in der Lokalisation der Expressionsgewebe des Enzyms bei Insekten. Dazu wurden RT-PCRs für verschiedene Gewebe durchgeführt und die Gewebe zudem über Immuno-Lokalisation untersucht. Um die Anpassungsmechanismen der PA-adaptierten Insekten besser zu dokumentieren, sollten die für die PA-Detoxifizierung verantwortlichen Enzyme aus weiteren *Danaus plexippus* (Lepidoptera: Nymphalidae) auf molekularer Ebene aufgeklärt und charakterisiert werden. Mit der vorliegenden Arbeit wurden die für die PA-Detoxifizierung zuständigen Enzyme aus verschiedenen Insekten untereinander verglichen, um die Entgiftungsmechanismen, die Zusammenhänge zwischen weit entfernten Insekten und Pflanzen sowie die evolutive Entwicklung der Insekten besser zu verstehen



## 2 PROJEKTTEIL I

### 2.1 Etablierung eines Expressionssystems für eine Flavin-abhängigen Monooxygenase

Zu Beginn der Arbeit waren bereits erste DNA-Sequenzen der FMOs aus einigen Mottenarten bekannt, die möglicherweise für die Anpassung an PA-haltige Pflanzen Bedeutung haben, jedoch konnten diese nur in inaktiver Form heterolog exprimiert werden. Daher war zunächst die Aufgabe, Expressionssysteme zu entwickeln, die die Expression von löslichem und aktivem Protein ermöglichen, um die entsprechenden Enzymsysteme biochemisch charakterisieren zu können.

Das *Escherichia coli*-Expressionssystem wurde für die Überexpression rekombinanter Proteine gewählt. Der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) eignet sich für die Expression rekombinanter Proteine mit pET-Systemen, d.h. Expressionsvektoren mit starkem, induzierbarem T7-RNA-Polymerase/Promotorsystem. Nach Induktion mit IPTG wurde das Fremdprotein produziert. Auf die Bildung des Fremdproteins reagierten die Bakterien meistens mit der Bildung von Einschlusskörpern (engl. Inclusion Bodies). Die Bildung von Inclusion Bodies bei der Expression eukaryontischer Proteine in *E. coli* ist keine Seltenheit (Lilie et al., 1998). Das in den Inclusion Bodies gebildete rekombinante Protein musste zunächst zu löslichem Protein denaturiert und danach wieder renaturiert werden. Dies erschwert die anschließende Gewinnung aktiven Proteins. Deshalb wurden unterschiedliche Versuche durchgeführt, um Aggregation der Proteine zu Inclusion Bodies zu verhindern oder zumindest verringern zu können. Erstens spielt die Wachstumstemperatur eine wichtige Rolle. Bei niedriger Temperatur können die Bakterien nur langsam wachsen. Durch die Verhinderung einer hohen lokalen Proteinkonzentration im Zytoplasma wird sowohl die Bindung der inter- und intramolekularen Disulfidbrücken gesenkt, als auch die Ausbeute an korrekt gefaltetem Protein in der löslichen Form erhöht (Schein und Noteborn, 1988). Deshalb wurde die Kultur bei niedrigen Wachstumstemperaturen von 15 °C und sogar 4 °C inkubiert. Zweitens ist die Expressionsrate auch ein wichtiger Faktor. Eine hohe Expressionsrate führt zu

unkorrektter Faltung, unspezifischer Aggregation und Ausfallen des Enzymes (Mukhopadhyay, 1997). Um die Bildung von Inclusion Bodies zu verhindern bzw. den Anteil an löslichem Protein zu erhöhen, wurde die Expressionsrate durch Reduktion der für die Induktion eingesetzten IPTG-Konzentration von 1 mM auf 0,4 mM vermindert. Drittens kann das gesuchte Enzym mit Chaperonen coexprimiert werden, um die Proteinaggregation gering zu halten sowie das Zielprotein korrekt zu falten (Caspers et al., 1994; Yasukawa et al., 1995). Chaperone können exponierte hydrophobe Seitenketten ungefalteter Proteinketten erkennen und binden, dadurch ermöglichen sie dem entfalteten und/oder unvollständig gefalteten Protein sich korrekt neu zu falten (Cole, 1996). Suh et al., (1996) ist es gelungen, einen gewissen Anteil an FMO aus *S. cerevisiae* durch Coexpression mit den Chaperonen HSP60 (GroEL und GroES) und HSP70 (DnaK, DnaJ und GrpE) in löslichem Zustand zu erhalten. Aufgrund der ähnlichen Eigenschaften des Enzyms in Insekten mit der Hefe-FMO wurde die Insekten-FMO in Zellen von *E. coli* BL21(DE3), die zusätzlich mit dem Plasmid pREP4-groESL (codiert für die Chaperone GroEL und GroES) beziehungsweise mit dem Plasmid pRDKJG (codiert für die Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE) transformiert wurden, coexprimiert. Die Selektion cotransformierter Zellen erfolgte mit Ampicillin (pET22b Ampicillin-Resistenz enthält FMO-cDNA) und Kanamycin (Chaperon codierender Vektor, Kanamycin-Resistenz). Noch einen entscheidenden Einfluss auf die Löslichkeit hat der osmotische Stress. Durch den Zusatz von Sorbitol und Betain zum LB-Kulturmedium wurde der osmotische Stress erhöht. Betain konnte mit Hilfe des Sorbitols in die Zellen aufgenommen werden, um dort die neu synthetisierten löslichen Proteine zu stabilisieren (Blackwell und Horgan, 1991).

Zur Expression von rekombinanten Insekten-FMO in *E. coli* BL21(DE3) wurden zahlreiche Variationen der Expressionsbedingungen durch die Kombination der vorher dargestellten vier wichtigen Einflussfaktoren für die Löslichkeit und Aktivität des Enzyms durchgeführt. Als erfolgreich zum Expressieren von aktiver, löslicher FMO hat sich folgendes Protokoll bewährt: Im LB-Betain-HCl-Sorbit Medium wurde das rekombinante Enzym (z.B. PNO aus *G. geneura*) mit Chaperonen bei 37 °C inkubiert. Vor dem Erreichen der stationären Wachstumsphase, bei einer optischen Dichte (OD) von 0,5 bis 1,0 bei 600 nm,

wurde die Proteinexpression durch 0,4 mM IPTG induziert. Die weitere Inkubation der Kulturen erfolgte bei 4 °C über 72 Stunden. Zur Zellernte wurden die Kulturen 20 min bei 3500 Upm 4 °C zentrifugiert, und der Überstand vollständig abgenommen. Das erhaltene Zellpellet wurde in 5-10 ml Dialysepuffer resuspendiert und die Zellen durch 5 min Ultraschall aufgeschlossen. Die Abtrennung des proteinhaltigen Überstandes von den Zelltrümmern erfolgte durch 10 min zentrifugieren. Das im Überstand vorhandene lösliche Protein wurde mit Ni-NTA durch Metallchelataffinitätschromatographie gereinigt und mit PD-10 Säulen auf 10 mM Kalium-Phosphat Puffer pH 8,0 umgepuffert. Mit dem gereinigten und umgepufferten Enzym wurden Radio- und photometrische Assays durchgeführt, um die Substratspezifität und Aktivität zu charakterisieren.

**Expressionsvektoren:****pET-23a Vektor (Novagen)**

Der pET-23a Vektor ist ein Expressionsvektor für *E. coli*. Durch T7 Promotor mit T7-RNA-Polymerase konnte viel Protein produziert werden. Für die heterologe Expression von eukaryontischen Proteinen ist der Vektor mit einer effizienten bakteriellen Ribosomen-Bindungsstelle ausgestattet. Der pET-23a Vektor wurde mit dem pET-22b MCS (multiple cloning site) modifiziert. Durch die C-terminale His-Tag-Sequenz wurde die Reinigung der rekombinanten Proteine durch Ni-NTA Agarose ermöglicht. Selektion erfolgt durch Ampicillin-Resistenz.

**Chaperone:****pREP4-GroESL (Caspers et al., 1994)**

Die cDNA der HSP60-Chaperone GroEL und GroES wurde im pREP4-Vektor inseriert. Mit Hilfe der Chaperone ist es möglich, heterolog in *E. coli* exprimierte Proteine korrekt zu falten. Als Selektionsmarker besitzt der Vektor Kanamycinresistenz.

**pRDKJG (Caspers et al., 1994)**

Die cDNA der HSP70-Chaperone DanK, DnaJ und GrpE wurde in dem pREP4-Vektor inseriert. Wie das Plasmid pREP4-groESL wurde es mit Insekten-FMO in *E. coli* coexprimiert, um die lösliche und aktive FMO zu gewinnen. Zur Selektion wurde eine Kanamycinresistenz verwendet.

## 2.2 Charakterisierung der Flavin-abhängigen Monooxygenasen in Arctiiden (Lepidoptera)

Eine SNO wurde für Insekten zuerst in dem Arctiiden *T. jacobaeae* (Lepidoptera) gefunden. Dort ist sie für die Detoxifizierung von PAs verantwortlich (Kapitel 1.4.2). Weitere Insekten-FMOs wurden aus verschiedenen Arctiiden (*G. geneura*, *A. caja*, *Arctia villica*) identifiziert. Phylogenetische Analysen zeigen, dass eine Genfamilie mit drei Mitgliedern, FMO1 bis FMO3, in Lepidoptera gebildet wurde. FMO3 ist durch eine Genduplikation von FMO1 und FMO2 in Lepidoptera entstanden. Im Laufe der Evolution wurde eine PA-N-Oxygenase (PNO) innerhalb des FMO1 Gen-Clusters dupliziert, was zur Entwicklung der höchst spezifischen biochemischen und physiologischen Anpassung an PA-haltige Pflanzen führte. Gewebespezifische Expressionsmuster der FMO und SNO von *T. jacobaeae* wurden durch eine Lokalisation spezifischer Transkripte mit RT-PCR untersucht. Die SNO der *T. jacobaeae* wurde im Fettkörper der Larven lokalisiert. Ein N-terminales Signalpeptid vermittelt den Transport der löslichen Proteine in der Hämolymphe, wo SNOs die pro-toxischen PAs in die ungiftige PA-N-Oxid-Form effizient umwandeln können. Um die PNO des Generalisten *G. geneura* und die SNO des Spezialisten *T. jacobaeae* im Detail zu vergleichen, wurden die PNO von *G. geneura* mit einem optimierten Expressionssystem (Kapitel 2.1) in *E. coli* exprimiert. Über Metallaffinitätschromatographie (Ni-NTA Agarose) wurde die PNO aus *G. geneura* gereinigt. Danach konnte die PNO mit verschiedenen PAs als Substrat charakterisiert werden. Schließlich ergab sich eine deutlich erweiterte Substratspezifität in der PNO des Generalisten *G. geneura* im Vergleich zur SNO des Spezialisten *T. jacobaeae*.

Die in der nachfolgenden Publikation veröffentlichte Expression, Reinigung und Charakterisierung der für die Detoxifizierung von PAs verantwortlichen PNOs der *G. geneura* sowie die Vervollständigung der zwei Full-length FMOs (TjFMO1 und TjFMO2) von *T. jacobaeae* wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit angefertigt.

# Flavin-Dependent Monooxygenases as a Detoxification Mechanism in Insects: New Insights from the Arctiids (Lepidoptera)

Sven Sehlmeier<sup>2,3</sup>, Linzhu Wang<sup>1,3</sup>, Dorothee Langel<sup>1</sup>, David G. Heckel<sup>3</sup>, Hoda Mohagheghi<sup>2</sup>, Georg Petschenka<sup>4</sup>, Dietrich Ober<sup>1\*</sup>

**1** Biochemical Ecology and Molecular Evolution, Botanical Institute and Botanical Garden, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Germany, **2** Institute for Pharmaceutical Biology, TU Braunschweig, Braunschweig, Germany, **3** Department of Entomology, Max Planck Institute for Chemical Ecology, Jena, Germany, **4** Molecular Evolution, Institute of Zoology, University of Hamburg, Hamburg, Germany

## Abstract

Insects experience a wide array of chemical pressures from plant allelochemicals and pesticides and have developed several effective counterstrategies to cope with such toxins. Among these, cytochrome P450 monooxygenases are crucial in plant-insect interactions. Flavin-dependent monooxygenases (FMOs) seem not to play a central role in xenobiotic detoxification in insects, in contrast to mammals. However, the previously identified senecionine *N*-oxygenase of the arctiid moth *Tyria jacobaeae* (Lepidoptera) indicates that FMOs have been recruited during the adaptation of this insect to plants that accumulate toxic pyrrolizidine alkaloids. Identification of related FMO-like sequences of various arctiids and other Lepidoptera and their combination with expressed sequence tag (EST) data and sequences emerging from the *Bombyx mori* genome project show that FMOs in Lepidoptera form a gene family with three members (FMO1 to FMO3). Phylogenetic analyses suggest that FMO3 is only distantly related to lepidopteran FMO1 and FMO2 that originated from a more recent gene duplication event. Within the FMO1 gene cluster, an additional gene duplication early in the arctiid lineage provided the basis for the evolution of the highly specific biochemical, physiological, and behavioral adaptations of these butterflies to pyrrolizidine-alkaloid-producing plants. The genes encoding pyrrolizidine-alkaloid-*N*-oxygenizing enzymes (PNOs) are transcribed in the fat body and the head of the larvae. An *N*-terminal signal peptide mediates the transport of the soluble proteins into the hemolymph where PNOs efficiently convert pro-toxic pyrrolizidine alkaloids into their non-toxic *N*-oxide derivatives. Heterologous expression of a PNO of the generalist arctiid *Grammia geneura* produced an *N*-oxygenizing enzyme that shows noticeably expanded substrate specificity compared with the related enzyme of the specialist *Tyria jacobaeae*. The data about the evolution of FMOs within lepidopteran insects and the functional characterization of a further member of this enzyme family shed light on this almost uncharacterized detoxification system in insects.

**Citation:** Sehlmeier S, Wang L, Langel D, Heckel DG, Mohagheghi H, et al. (2010) Flavin-Dependent Monooxygenases as a Detoxification Mechanism in Insects: New Insights from the Arctiids (Lepidoptera). PLoS ONE 5(5): e10435. doi:10.1371/journal.pone.0010435

**Editor:** Juergen Kroymann, CNRS UMR 8079/Université Paris-Sud, France

**Received:** February 18, 2010; **Accepted:** April 7, 2010; **Published:** May 3, 2010

**Copyright:** © 2010 Sehlmeier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants of the Deutsche Forschungsgemeinschaft. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: dober@bot.uni-kiel.de

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Flavin-dependent monooxygenases (FMOs) and cytochrome P450 monooxygenases (CYPs) are two prominent families of monooxygenases in eukaryotes [1,2]. They catalyze the transfer of one atom of molecular oxygen to a substrate and reduce the other to water. FMO genes are found in all phyla [3]. In vertebrates, FMOs form a gene family of five similar genes. They provide an efficient detoxification system for xenobiotics, as they catalyze the conversion of heteroatom-containing chemicals from the animal's food to polar, readily excretable metabolites [4]. Yeast possesses, unlike mammals, only one FMO isoform, which has been shown to be involved in redox regulation and in the correct folding of proteins containing disulfide bonds [5,6]. In plants, FMOs form a large gene family (29 genes in the model plant *Arabidopsis thaliana*), but information about their physiological role is sparse. For *A.*

*thaliana*, individual FMO sequences have been related to auxin biosynthesis and pathogen defense [7]. FMOs oxygenate nucleophilic substrates that usually contain nitrogen or sulfur, such as amines, amides, thiols, and sulfides [8]. A unique feature of FMO is the catalytic cycle that forms a reactive 4 $\alpha$ -hydroperoxyflavin intermediate as a potent monooxygenating agent before the substrate is bound to the enzyme. Like a cocked gun, this activated intermediate will readily react with all substrates that are able to access the active site [9,10].

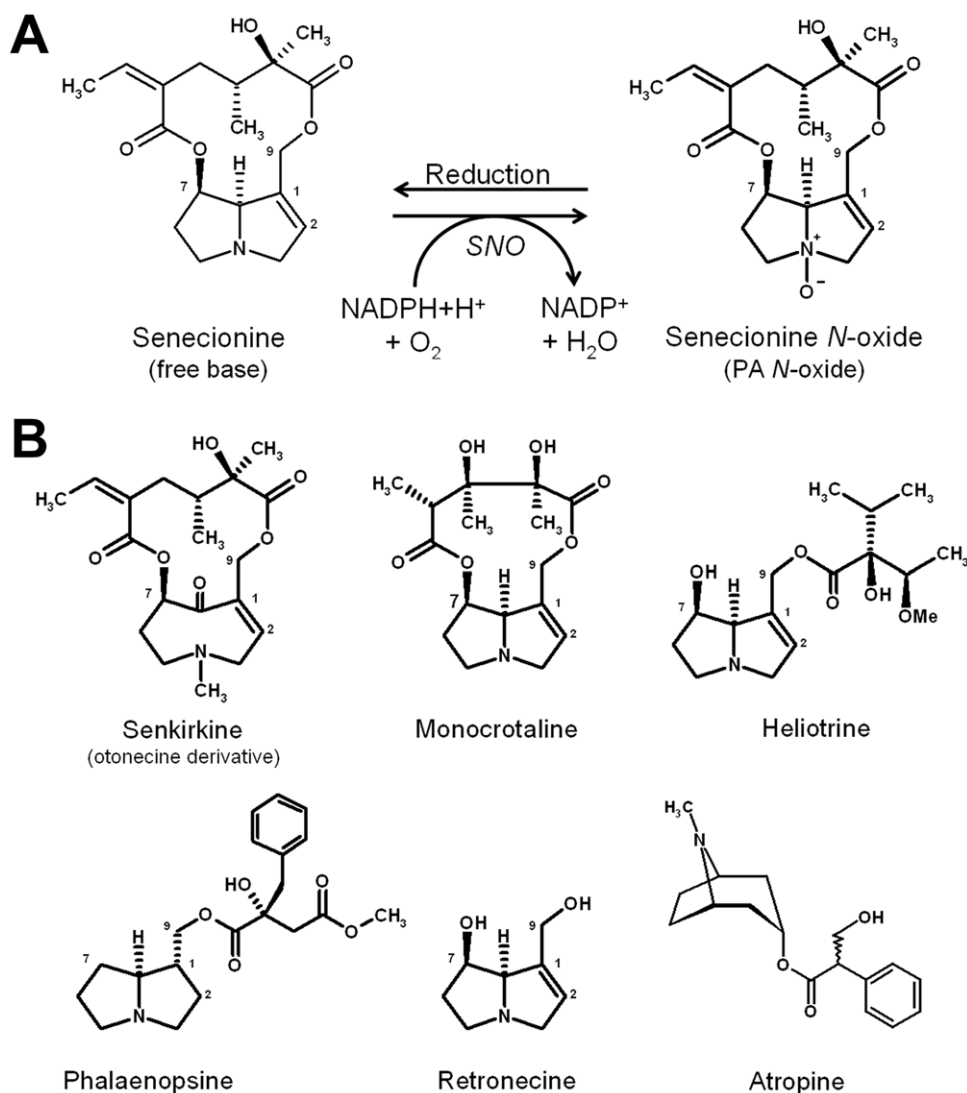
Our extensive knowledge about the structural and catalytic properties of vertebrate FMOs is contrasted by an almost complete lack of knowledge about this enzyme family in insects. CYP enzymes play the dominant role in drug and xenobiotic metabolism in insects [11], possibly compensating the need for FMOs in these processes. Of note, the genome of *Drosophila melanogaster* contains only two genes for FMOs [1,12] but 90 genes

for CYPs, of which 86 seem to be functional [13]. The large number of CYPs in insect genomes has been suggested to be necessary to protect the insect from the diverse array of harmful compounds in its environment [14]. This is also the case for lepidopteran species. One of the best studied examples is the CYP gene superfamily of *Papilio* butterflies (Papilionidae), which have adapted to furanocoumarins, the toxic components of their food plants [15,16]. These toxins are degraded by inducible CYPs that are expressed in the midgut and also in the fat body [17,18].

Adaptation to host plant-derived toxins has also been described for the cinnabar moth, *Tyria jacobaeae* (Arctiidae). Larvae of this species feed exclusively on tansy ragwort (*Jacobaea vulgaris*, syn. *Senecio jacobaea*), which contains toxic pyrrolizidine alkaloids (PAs) and sequester these plant toxins for their own chemical defense. PAs can exist in two transmutable forms: the pro-toxic free base (tertiary amine) and its non-toxic *N*-oxide [19,20]. In the plant, PAs usually occur as *N*-oxides, which are easily converted to their respective free base in the reducing gut milieu of any herbivorous

vertebrate or insect feeding on these plants [21,22]. The toxicity of PAs for non-adapted insects has been shown by feeding experiments [23] and is attributable to cytochrome P450-mediated bioactivation [24]. For *Tyria*, senecionine *N*-oxygenase (SNO), a soluble enzyme located in the hemolymph, has been shown to convert the pro-toxic free base efficiently into its non-toxic *N*-oxide [22] (Figure 1). This enzyme with high substrate specificity for toxic 1,2-unsaturated PAs, is the prerequisite for sequestration of the plant-derived alkaloids by the insect. Recently, SNO has been shown to be a FMO and, until now, the only functionally characterized FMO of insect origin [1].

PA sequestration is known for many species of the tiger moth (Lepidoptera, Arctiidae), some of which use these alkaloids as a precursor for pheromone synthesis [25]. As shown for *Utetheisa ornatrix*, the PAs are acquired during the course of larval feeding and are transferred through metamorphosis to the adult stage [26]. At mating, the male advertises his PA load to the female by the PA-derived pheromone, hydroxydanaidal. Males with the highest



**Figure 1. *N*-oxygenation of PAs by SNO, a flavin-dependent monooxygenase (A) and structures of selected PAs and of atropine (B).** A: PAs are present in the plant mainly as *N*-oxide. After uptake in the diet, they are reduced in the gut of the herbivore to their respective tertiary form, which is lipophilic and easily permeates membranes. In PA-adapted insects, this pro-toxic PA is efficiently converted to the respective PA *N*-oxide in the hemolymph to prevent bioactivation. B: Structures of PAs and atropine tested as substrates with recombinant SNO and PNO. doi:10.1371/journal.pone.0010435.g001

PA load have the highest mating success and transfer a portion of their PAs via the spermatophore to the female [27,28]. Together with the female's own load of PA, these alkaloids are passed to the eggs, protecting them against insect predators, including beetles, ants, and parasitoids [27,29,30].

In contrast to the specialist *T. jacobaeae*, the PA-sequestering arctiid species studied in this project are polyphagous. For *Estigmene acrea*, PAs have been shown to be important for development, as these alkaloids are used as precursors for the biosynthesis of the sex pheromone hydroxydanaidal [31,32]. *Grammia geneura* is not known to synthesize PA-derived pheromones but benefits from sequestered PAs as defense compounds against herbivores and parasitoids [33].

Using an alignment of SNO of *T. jacobaeae* and of FMO-like sequences of the dipteran species *D. melanogaster* and *Anopheles gambiae*, we have been able to identify several new FMO sequences of arctiids and other Lepidoptera. With regard to the polyphagous species *G. geneura*, we have identified and expressed a PA-specific FMO in *E. coli* and compared its substrate specificity with the SNO of monophagous *T. jacobaeae*. Phylogenetic analysis shows that, in Lepidoptera, FMOs form three distinct sequence clusters. In one of these clusters, PA-specific FMO (PA *N*-oxygenases, PNO) originated by gene duplication early in the lineage of arctiids. These results allow a first glimpse into the hitherto untouched area of evolution and functionality of the FMO gene family in insects.

## Materials and Methods

### Insects

Larvae of *Tyria jacobaeae* were collected in The Netherlands and in the vicinity of Kiel, Germany. Larvae of *Arctia caya*, *Arctia villica*, and *Diacrisia sannio* were obtained from private breeders. Larvae of *Estigmene acrea* and *Grammia geneura* came from cultures established by Elisabeth A. Bernays and Michael S. Singer from specimens of field populations collected in southeastern Arizona, USA. All larvae were reared in the lab on a food plant mixture of *Taraxacum officinale*, *Plantago lanceolata*, and *Rubus fruticosus* or on an artificial diet [34], except for those of *T. jacobaeae*, which were exclusively reared on leaves of *Senecio jacobaea*.

### Design of degenerate primers for identification of cDNAs coding for FMO-like sequences

cDNA sequences homologous to FMOs were identified in arctiid insects by a polymerase chain reaction (PCR) approach with degenerate primers. Primers P2, P3, and P8 (Table S1) were designed based on the alignment of amino acid sequences of the SNO of *T. jacobaeae* [1] and of four putative FMOs, two each of the genome of *Drosophila melanogaster* (Acc. No. AAF47118 and AAF57364) and of *Anopheles gambiae* (Acc. No. XP\_311551 and XP\_311550). Later in this project, the primers P12, P17, and P29 (Table S1) were designed according to alignments that resulted from the inclusion of the amino acid sequences of the FMO of *A. caya* and *A. villica* and of the PNO of *Grammia geneura*, as identified in this project.

### Identification of cDNAs encoding FMO-like sequences of *A. caya* (AcFMO), *A. villica* (AvFMO), and *T. jacobaeae* (TjFMO)

The fat bodies of larvae of *A. caya*, *A. villica*, and *T. jacobaeae* were prepared and quickly frozen in liquid nitrogen. Total RNA was extracted by using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) in combination with QIAshredder (Qiagen) mini spin columns. An aliquot containing 1 µg total RNA was reverse-transcribed with oligo-

dT primer P1 (Table S1) by using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). For identification of FMO-encoding cDNAs of *A. caya* and *A. villica*, a semi-nested PCR approach was used to amplify specific DNA fragments of ca. 900 bp in length with a constant annealing temperature of 52°C and *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) in a total volume of 25 µl. For the first PCR, primer pair P2/P1 was used. The resulting reaction mix was diluted 1:100 with 10 mM Tris/HCl buffer, pH 8, and used as a template for a PCR with primer pair P2/P3. The FMO-coding cDNA of *T. jacobaeae* was amplified in a nested PCR approach by using a touch-down temperature program with decreasing annealing temperature from 60°C to 45°C (0.5°C per cycle). After the first PCR with primer pair P2/P3, the reaction mix was diluted 1:100 with 10 mM Tris/HCl buffer, pH 8, and used as template for the second PCR with primer pair P12/P29 resulting in a fragment of ca. 550 bp. For identification of the missing cDNA-ends, 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) and 5'-RACE techniques were applied as described previously [35,36] with primers P4-P7, P8-P11, and P30/P33 (Table S1) for the cDNA sequences of *A. caya*, *A. villica*, and *T. jacobaeae*, respectively. The proteins encoded by the resulting full-length sequences were denominated AcFMO, AvFMO, and TjFMO, respectively. For identification of the cDNA encoding PNO of *A. caya* (AcPNO), the same strategy was used as that described for the AcFMO with the following modifications: the primer pairs P2/P17 and P12/P17 were used with annealing temperatures of 54°C and 58°C for the first and second reaction of the semi-nested PCR approach, respectively. The 3'-RACE and 5'-RACE of the resulting fragment of ca. 600 bp were performed with the primers P18–P21. For identification of a cDNA encoding PNO of *G. geneura*, cDNA was prepared as described for FMO-like sequences of *A. caya* and used as template in a PCR with primer pair P12/P3 and a touch-down program with decreasing annealing temperature from 60°C to 45°C within 30 cycles. The cDNA fragment of ca. 800 bp was completed by 3'-RACE and 5'-RACE with primers P13–P16.

### Partial identification of further FMO-like cDNAs of various Arctiids

For the identification of further FMO-like cDNA sequences of *A. villica*, *Diacrisia sannio*, and *Estigmene acrea*, the same strategies were used as those described above for the identification of the full-length cDNAs of various arctiids. The PCR parameters are given in Table S2.

### Identification of FMO-like sequences of *Helicoverpa armigera* and *Bombyx mori*

FMO sequences of *D. melanogaster* and SNO of *T. jacobaeae* were used in tblastn searches of expressed sequence tag (EST) libraries of *H. armigera* and *B. mori*, and the genome sequence of *B. mori* at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), KaikoBase (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/index.html>), and SilkDB (<http://silkworm.swu.edu.cn/silkdb/>). Sequences identified from *B. mori* included FMO1 (GenBank Accession No. GU564654), FMO2 (GU564656), and FMO3 (GU564657). Genomic locations of *B. mori* FMOs were determined by using the gbrowse genome browser of Kaikobase. Coding sequences of FMO1 from clone HA-GN-M-03-libF\_K16 (GU564659) and FMO3 from clone HA-PAN-384-04-libF-F3\_A05 (GU564662) were obtained from cDNA libraries constructed from *H. armigera* larvae by Heiko Vogel, Max Planck Institute for Chemical Ecology. The sequence of FMO2 from clone 28d18 (GU564660) was obtained from a cDNA library constructed from *H. armigera* larval midgut by Vladimir D. Grubor, University of Melbourne [37].



## Sequence analysis

cDNA sequences were analyzed by using the ProtParam tool [38] for prediction of various protein properties, by using the signalP3.0 server [39] for prediction of signal peptides and their cleavage sites, by using the PSORT II and the TargetP1.1 server [40,41] for the detection of sorting signals and subcellular localizations, and by using the TMHMM2.0 Server [42] for the prediction of transmembrane helices. To generate an alignment of amino acid sequences, ClustalX [43] was used before phylogenies were estimated with the following software of the PHYLIP program package [44]: PROTDIST with the Jones-Taylor-Thornton matrix in combination with NEIGHBOR for neighbor-joining analyses [45] and SEQBOOT and CONSENSE to estimate bootstrap values. Accession numbers of sequences taken from the database are given in Table S3.

## Heterologous expression of cDNA encoding PNO of *Grammia geneura*

The open reading frame (ORF) of the PNO of *Grammia geneura* was analyzed for the presence of an *N*-terminal signal peptide by using the SignalP3.0 server [39]. For amplification of the whole ORF without the signal peptide, a pair of gene-specific primers was constructed that contained restriction sites for subcloning in addition to an artificial initiation codon (P34, *Nde*I) and the stop codon behind an artificial sequence encoding six histidine residues (P35, *Bam*HI). The fragment resulting from amplification with AccuTaq LA DNA Polymerase (Sigma) of the oligo(dT)<sub>17</sub> primed cDNA of *G. geneura* as the template was *Nde*I/*Bam*HI-digested and ligated into a *Nde*I/*Bam*HI-linearized pET3a vector (Novagen) for expression with the T<sub>7</sub> polymerase system [46]. Positive clones were identified as described previously for SNO of *T. jacobaeae* [1]. Expression in *E. coli* BL21(DE3) (Stratagene) harboring the pRDKJG plasmid [47], was achieved in a modified lysogeny broth (LB) medium pH 7.5 containing 2.5 mM betaine hydrochloride and 0.8 M sorbitol at 4°C for 96 h.

## Semiquantitative reverse transcription PCR

Per sample, 1 µg total RNA was used as a template for cDNA synthesis with an oligo-dT primer (P1) by using Superscript III RT (Invitrogen, Carlsbad, CA). PCR was performed with *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) and the following temperature program: 4 min at 95°C initial denaturation, 46 cycles with an annealing temperature of 65°C, and elongation at 72°C for 2 min. The primer pairs specific for *Tj*SNO (P36/P37) and *Tj*FMO (P38/P39) resulted in fragments of ca. 1400 bp. Aliquots were taken at intervals of 3 cycles starting after cycle 28.

## Enzyme assay

Enzyme activity of PNOs was assayed photometrically or by qualitative tracer assays as described previously [1]. Briefly, for the photometric assay, reactions were set up in a total volume of 300 µl 10 mM potassium phosphate pH 8 and 120 µM NADPH. After preincubation for 3 min at 37°C, the reaction was started by addition of 170 µM PA substrate and incubated at 37°C. The reaction was followed by the decrease of NADPH absorption at 340 nm with an Ultrospec 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer (GE Healthcare). For the tracer assays, the volume of the reaction mixture was reduced to 50 µl. The amount of radioactively labeled PA *N*-oxide formed from tertiary PA was analyzed by thin-layer chromatography (TLC). Aliquots of 12.5 µl were therefore taken from the reaction mixture at time intervals between 3 to 30 min to ensure linearity of product formation and applied to silica gel 60 F<sub>254</sub> TLC plates (Merck, Darmstadt).

Enzyme activity was calculated from the substrate (PA)/product (PA *N*-oxide) ratio after separation by using the solvent system dichloromethane:methanol:ammonium hydroxide (25%) at a ratio of 80:20:3. Radioscans were performed by means of a radioactivity thin-layer analyzer (RITA, Raytest, Straubenhardt, Germany). PAs applied as enzyme substrates were obtained as described [22].

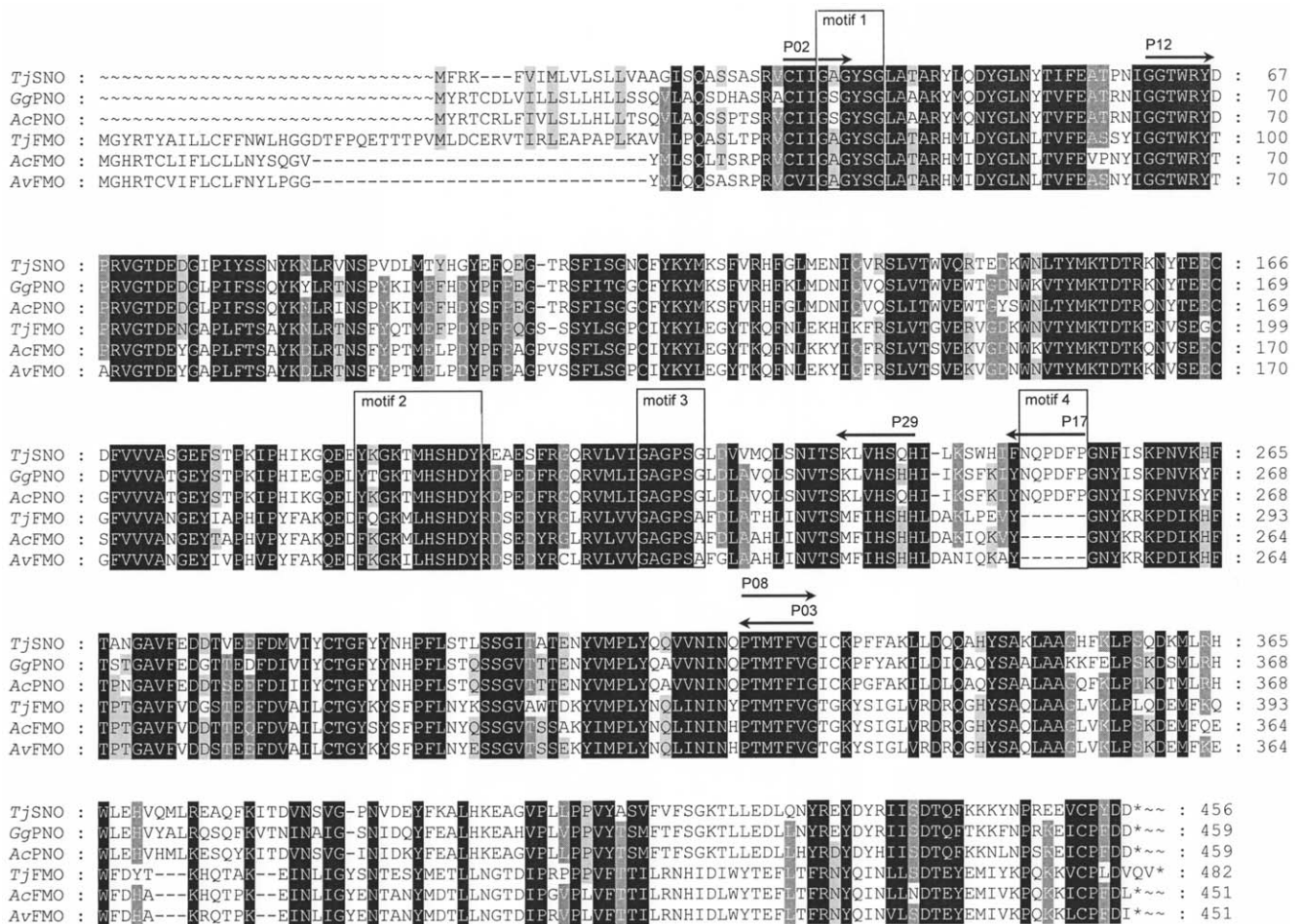
## Results

### Identification of cDNA sequences encoding FMO-like proteins from Arctiids

For identification of cDNA sequences encoding FMOs from Arctiids, species were selected that were closely related to the specialist *T. jacobaeae*. These species included the polyphagous species *Arctia caja*, *Diacrisia sannio*, *Estigmene acrea*, and *Grammia geneura*, for all of which an association with PA-containing plants was previously described [48]. For the species *Arctia villica*, the PA association was confirmed by the ability to *N*-oxygenize tertiary PAs. Senecionine *N*-oxide was detected after incubation of the hemolymph with [<sup>14</sup>C]senecionine as the sole substrate in an assay for PNO activity (data not shown). For cDNA identification by a reverse transcription (RT)-PCR approach, an alignment of FMO-like sequences from insects was used to design degenerate primers. Two sequences identified within each of the genomes of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*, respectively, and the SNO of *T. jacobaeae* (*Tj*SNO) were the only FMO-like sequences of insect origin that were available in this phase of our project. The degree of identity between these sequences at the amino acid level was between 33% and 56%. Conserved sequence motifs that were appropriate for primer design encompassed the FAD- and NADPH-binding sites (motifs 1 and 3 in Figure 2) and an additional conserved sequence stretch in the C-terminal part of the sequence (amino acid 323–329 of *Tj*SNO). Later in this project, after identification of three FMO-like sequences from *A. caja*, *A. villica*, and *G. geneura*, we were able to improve the quality of the alignment and of the degenerate primers. Of all species, except for *G. geneura*, we identified two distinct cDNA sequences of which the derived amino acid sequences showed a high degree of identity to other FMO sequences in the database. The complete ORF was determined for the cDNAs encoding the PNO of *G. geneura* (*Gg*PNO), a putative PNO of *Arctia caja* (*Ac*PNO), and a FMO-like sequence of unknown function of each, *T. jacobaeae* (*Tj*FMO) *A. caja* (*Ac*FMO), and *A. villica* (*Av*FMO) (Table 1). In addition, partial sequences were isolated from *Diacrisia sannio* (*Ds*FMO and *Ds*PNO) and *Estigmene acrea* (*Ea*FMO and *Ea*PNO) and an additional sequence *A. villica* (*Av*PNO). Of those sequences for which we were able to identify the complete coding region, the properties of the cDNA and the encoded proteins are summarized in Table 1. Figure 2 shows that the ORFs of these sequences possess all three characteristic motifs of FMO sequences, i.e., the nucleotide-binding domains that stabilize the binding of FAD (consensus: GxGxxG) and NADPH (consensus: GxGxx(A/G)), respectively, and the FMO-identifying sequence (consensus: FxGxxxHxxx(F/Y)). Computer-based sequence analyses predicted *N*-terminal signal peptides for the vesicular pathway and a lack of a C-terminal membrane anchor, properties previously identified for the senecionine *N*-oxygenase of *T. jacobaeae* [1].

### Heterologous expression of recombinant proteins

The heterologous expression of the SNO of *T. jacobaeae* resulted in the formation of an insoluble and inactive protein [1]. Despite the finding that protein solubilization and subsequent renaturation resulted in an active protein, the specific activity remained low. Therefore, we tried to improve the expression system by using Sf9



**Figure 2. Alignment of the amino acid sequences of FMOs of various arctiid species.** Motif 1, FAD-binding site; motif 2, FMO-identifying sequence; motif 3, NADPH-binding site; motif 4, insertion of six amino acids characteristic for sequences belonging to the putative PNO cluster; TjSNO, *T. jacobaeae* SNO; GgPNO, *G. geneura* PNO; AcPNO, *A. caja* PNO; TjFMO, *T. jacobaeae* FMO; AcFMO, *A. caja* FMO; AvFMO, *A. villica* FMO. doi:10.1371/journal.pone.0010435.g002

insect cells, a system based on pupal ovarian cells of *Spodoptera frugiperda*, a noctuid lepidopteran species related to the Arctiids. Using this system, we were able to detect active SNO in the medium supporting the functionality of the predicted N-terminal signal peptide, but the yield of protein was too low for further biochemical characterization. Insufficient protein yield was also the problem when using a yeast expression system (data not

shown). Finally, by modifying a method described by Blackwell and Horgan [49], we succeeded in expressing PNO of *G. geneura* without the signal peptide in at least a partially soluble and active form. Therefore, we added betaine to the medium and promoted its uptake by osmotic stress by sorbitol. Further improvements were achieved by coexpression with the *E. coli* chaperones DnaK/DnaJ/GrpE by using the plasmid pRDJG [47] and by reducing

**Table 1. Characteristics of FMO-like sequences identified from three Arctiid species.**

		length of cDNA [bp]	length of ORF [bp]	5'-UTR [bp]	3'-UTR [bp]	length of SP [bp]	MW + SP	[kDa] - SP	IEP - SP	membrane anchor	localization
TjSNO <sup>1</sup>	<i>T. jacobaeae</i>	1701	1371	81	249	22	52.2	49.8	6.4	no	extracellular
GgPNO	<i>G. geneura</i>	1775	1380	80	315	23	52.7	50.1	6.4	no	extracellular
AcPNO	<i>A. caja</i>	1938	1380	64	494	23	52.4	49.8	6.5	no	extracellular
TjFMO	<i>T. jacobaeae</i>	1719	1452	84	186	18 (21)	54.9	52.7	6.4	no	extracellular
AcFMO	<i>A. caja</i>	1664	1356	83	225	18	51.4	49.4	7.0	no	extracellular
AvFMO	<i>A. villica</i>	1675	1356	90	229	18	51.4	49.3	6.7	no	extracellular

ORF, open reading frame; UTR, untranslated region, (+/-) SP, (with/without) N-terminal signal peptide; MW, molecular weight; IEP, isoelectric point. <sup>1</sup>data taken from [1]. doi:10.1371/journal.pone.0010435.t001

the expression temperature to 4°C. The purified PNO of *G. geneura* showed a specific activity of 55 nkat/mg with senecionine as substrate.

### Substrate specificity of recombinant PNO of *G. geneura*

The substrate specificity of the PNO of the generalist *G. geneura* was characterized to compare it with the data described previously for SNO of the specialist *T. jacobaeae* [1,22]. Therefore, PAs of the various structural types were tested in addition to some other alkaloids and to substrates of mammalian and yeast FMO (Table 2). The data show that all tested PAs, with exception of the otonecine derivative of senecionine, viz., senkirkine, were substrates for the PNO of *G. geneura*. The most obvious differences from the SNO of *T. jacobaeae* was the ability of the PNO to *N*-oxygenize phalaenopsine, a 1,2-saturated PA, and atropine. Dimethylaniline, as a typical substrate for mammalian FMO, nicotine bases, and nicotine was neither accepted by the specialist's enzyme of *T. jacobaeae*, nor by the generalist's enzyme of *G. geneura*. Of note, the enzyme of *G. geneura* showed a low but unequivocal activity with glutathione as substrate.

### Tissue-specific expression of FMOs in insects

The SNO of *T. jacobaeae* is a soluble protein present in the hemolymph [22]. As a signal peptide was identified at the *N*-

terminus of the respective cDNA [1], a semiquantitative RT-PCR approach was used to identify the tissue expressing the transcript of PA-specific SNO in comparison with the FMO of unknown function. The larvae were dissected, and the various tissues used separately for total RNA extraction. As shown in Figure 3, the *N*-oxygenase transcript was detectable in the fat body, the tissue that synthesizes and secretes proteins of the hemolymph [50]. In addition, a signal was detectable in the integument that might have been attributable to contamination of the sample tissue by adhering fat body tissue, and a signal was detected in the head of the larvae. Cloning and sequencing of the PCR products of the head and the fat body sample revealed that both transcripts were identical at the nucleic acid level.

### PA-specific N-oxygenases form a separate cluster within lepidopteran FMO1

For phylogenetic analysis, we used the arctiid sequences identified in this project in combination with selected FMO-like sequences from Lepidoptera available in the databases. EST sequences of *Bicyclus anynana* (Nymphalidae) and *Plodia interpunctella* (Pyralidae) were assembled to deduce the encoded amino acid sequences. Three FMO-like sequences were taken from the *Bombyx mori* (Bombycidae) genome database (SilkDB, <http://silkworm.genomics.org.cn/>). Additionally, we included three sequences from *Helicoverpa armigera* (Noctuidae) that were identified from a cDNA library of larval midgut [37] and of entire larvae (H. Vogel, unpublished results), respectively. To avoid misleading results attributable to missing N-terminal and C-terminal ends of sequences, only the central part of the alignment was used in which gaps of unidentified sequences had to be filled with replacement characters within the sequences of *P. interpunctella*, *B. anynana*, and the FMO of *E. acraea* (EaFMO). The alignment is available as Figure S1. A neighbor-joining tree with two FMO-like sequences from the genome of *Drosophila melanogaster* as outgroup is shown in Figure 4. The branching pattern shows that lepidopteran FMO-like sequences occur in three well-supported clusters. The presence of one of the three FMO-like sequences of *Bombyx mori* in each of these clusters suggested that FMO in Lepidoptera formed a gene family of three members that we termed FMO1, FMO2, and FMO3 in analogy to the mammalian FMO gene family consisting of five members (FMO1 to FMO5) [51]. FMO3 sequences are only distantly related to lepidopteran FMO1 and FMO2. The closer relationship between FMO1 and FMO2 suggested by the tree is supported by the observation that both genes sit next to each other (tail-to-tail) on chromosome 25 of the *Bombyx* genome, indicating that they originated by a gene duplication event. All arctiid FMOs were identified within this project group with FMO1 and split into two distinct and well-supported clusters of paralogous sequences. In both clusters, the sequences identified from *T. jacobaeae*, i.e., *Tj*SNO and *Tj*FMO, respectively, were each sisters to all other sequences of the respective cluster. This branching pattern is supported by the classification of *T. jacobaeae* into the tribe Callimorphini (subfamily Arctiinae), in contrast to the other arctiid species of this study, which belong to the tribe Arctiini [52]. One of the two arctiid FMO clusters contained the functionally characterized SNO of *T. jacobaeae* [1] and the PNO of *G. geneura*.

### Discussion

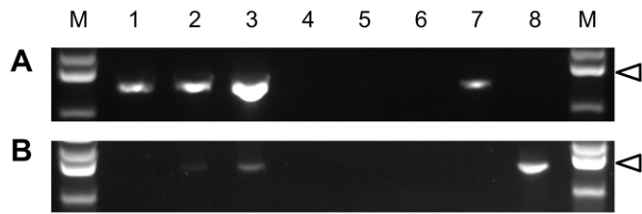
Insects experience a wide array of chemical pressures from plant allelochemicals and pesticides and have developed several effective counterstrategies to cope with these toxins [53]. Among these, CYPs appear to have a key role in plant-insect interactions [11]. In

**Table 2.** Substrate specificity of native *Tj*SNO and recombinant *Gg*PNO.

Substrate	activity [%]	
	SNO of <i>T. jacobaeae</i> <sup>1</sup>	PNO of <i>G. geneura</i>
<b>Pyrrolizidine alkaloids</b>		
Senecionine type		
Senecionine	100	61
Seneciphylline	95	59
Senkirkine	n.d.	n.d.
Monocrotaline type		
Monocrotaline	92	100
Axillarine	74	69
Lycopsamine type		
Heliotrine	25	49
Rinderine	23	43
Phalaenopsine type		
Phalaenopsine	n.d.	19
<b>Other substrates</b>		
Retronecine	n.d.	n.d.
Supinidine	n.d.	n.d.
Atropine	n.d.	21
Nicotine	–	n.d.
Dimethylaniline	n.d.	n.d.
L-Cysteine	n.d.	n.d.
Cysteamine	n.d.	n.d.
Glutathione	n.d.	41

Relative activities refer to 100% values of 77.6 nkat/mg with senecionine for *Tj*SNO and 90.2 nkat/mg with monocrotaline for *Gg*PNO. n.d., not detectable, –, not tested.<sup>1</sup> according to [1,22].

doi:10.1371/journal.pone.0010435.t002



**Figure 3. Tissue-specific expression of SNO (A) and FMO (B) of *T. jacobaeae*.** Semiquantitative reverse transcription PCR was performed with total RNA of various tissues of *T. jacobaeae* larvae. Aliquots were taken after 34 and 43 cycles of amplification with primers specific for *TjSNO* (A) and *TjFMO* (B), respectively. M, 100-bp DNA ladder (Fermentas) with the 1500-bp fragment labeled by an arrowhead; lane 1, head; lane 2, integument; lane 3, fat body; lane 4, hemolymph; lane 5, gut; lane 6, negative control ( $H_2O$ ); lane 7 and lane 8, positive controls (0.5 pg of plasmid carrying the full-length cDNA encoding *TjSNO* and *TjFMO*, respectively).

doi:10.1371/journal.pone.0010435.g003

mammals, the P450 system of xenobiotic detoxification is supplemented by the FMO gene family, which consists of five genes [54,55]. Only recently, we have been able to identify and to characterize functionally the first FMO of insects. The cinnabar moth *Tyria jacobaeae* (Lepidoptera, Arctiidae), an insect specialized for plants containing toxic PAs, has evolved an FMO for the modification and storage of these plant-derived toxins [1]. Here, we describe the identification of several members of the FMO-gene family in lepidopteran species with a focus on sequences of the tiger moth family (Arctiidae), which recruited FMO-encoding genes for adaptation to PA-containing plants by means of a gene duplication early in its lineage. The invention of this new class of FMO was the prerequisite for these insects (i) to feed, unrivaled, on PA-containing plants, (ii) to convert these plant toxins to pro-toxins and to sequester them for their own chemical defense, and (iii) to use them in certain cases for the biosynthesis of sex pheromones.

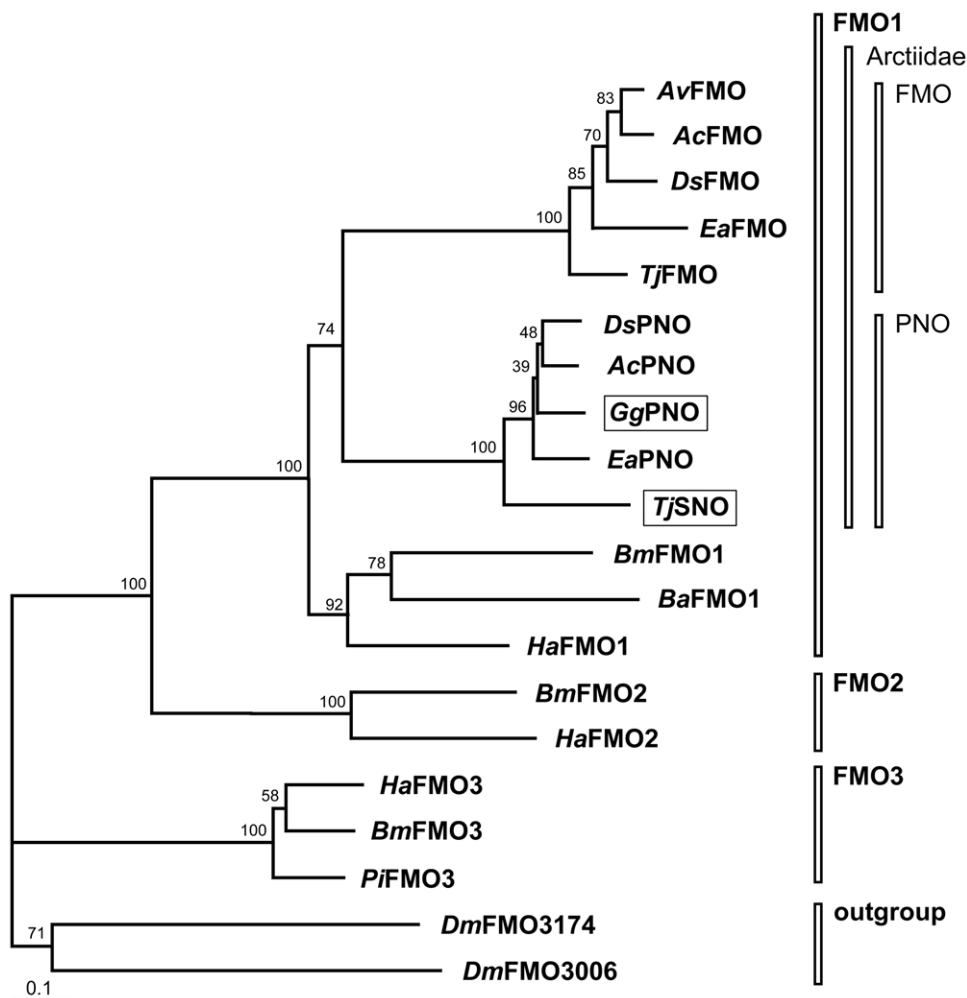
### Optimization of heterologous expression of soluble and active PNO in *E. coli*

Using an alignment of FMO sequences of *D. melanogaster*, *A. gambiae*, and *T. jacobaeae* for degenerate primer design, we have been able to identify five full-length cDNA sequences of arctiid FMOs (Table 1) in addition to several sequence fragments. All sequences have been classified as FMO, because of their sequence similarities and characteristic sequence motifs, i.e., two dinucleotide-binding signatures (Rossmann folds) for FAD and NADP and the FMO-identifying motif FxGxxxHxxx(Y/F) [2,56]. In addition to these three fingerprint sequences for FMO (motifs 1 to 3 in Figure 2), we have identified another motif (motif 4 in Figure 2) representing an insertion of six amino acids that is most characteristic for these sequences in the PNO cluster of Arctiid sequences (Figure 4). A primer constructed on this sequence motif (primer P17, Figure 2) has enabled us to restrict the amplification of FMO homologs to sequences belonging to this sequence cluster. We have used this strategy successfully for the identification of sequence fragments of the putative PNO of *A. caja*, *A. villica*, *D. sannio*, and *E. acraea*. The PNO identified from the generalist *G. geneura* is also characterized by this sequence insertion and has been selected for heterologous expression and functional characterization. In a previous study, attempts to express the SNO of *T. jacobaeae* heterologously in *E. coli* were hampered by the formation of inclusion bodies. For biochemical analysis, the inclusion bodies had to be solubilized under denaturing conditions followed by a renaturation procedure requiring several dialysis steps [1].

Nevertheless, the yield of active enzyme was low in comparison with activities observed for the native enzyme (0.5 nkat/mg in comparison to 77.6 nkat/mg [1]). As expression of *GgPNO* in *E. coli* also results in inclusion body formation, we have optimized the expression system. The supplementation of the medium with betaine in the presence of sorbitol, the coexpression of *E. coli* chaperons that have proved to be helpful previously [57], and a drastic reduction of the expression temperature to 4°C have all led to the expression of soluble and active protein. The specific activity of about 55 nkat/mg almost equals the value of 77.6 nkat/mg that has been described for the native SNO of *Tyria jacobaeae* [1].

### *GgPNO* encodes a PA *N*-oxygenase with extended substrate specificity

The SNO of the specialist *T. jacobaeae* (*TjSNO*) is characterized by a high substrate specificity for PAs that are toxic because of the following structural features: (i) an 1,2-double bond in the ring system, (ii) an allylic esterified hydroxyl group at C9, and (iii) a free or esterified hydroxyl group at C9 [22]. The same high specificity has been established for the recombinant SNO that is heterologously expressed in *E. coli* [1]. In contrast, the PNO of *G. geneura* accepts a wider range of substrates. In addition to the alkaloids accepted by *TjSNO*, the 1,2-saturated PA phalaenopsine is *N*-oxygenized. The only PA that is not accepted by *Grammia* PNO and *Tyria* SNO is senkirkine, an otonecine derivative that cannot be *N*-oxygenized because of a methyl group at the ring-bound nitrogen. Feeding experiments of *G. geneura* have shown that senkirkine cannot be detoxified by *N*-oxidation and is neither sequestered nor metabolized [58]. 1,2-saturated PAs are devoid of the characteristic double bond, and therefore, they are regarded as non-toxic at least as far as bioactivation-mediated toxicity is concerned. However, the observations that 1,2-saturated PAs are accumulated in the plant preferentially in reproductive and young tissues [59,60,61] and that these structures might mediate antifedant activity and neurotoxic effects [62,63] suggest an ecological role for these alkaloids. The finding that phalaenopsine is *N*-oxygenized by *Grammia* PNO is in good agreement with the described ability of the larvae of *G. geneura* to sequester and metabolize these 1,2-saturated PAs into insect PAs. The observation that these insect PAs are transferred via metamorphosis to the adult stage has been interpreted as support for their ecological role for the insect, most probably in the chemical defense of the insect [58]. Of note, atropine, a tropane alkaloid produced by certain solanaceous plants as part of their chemical defense against herbivores [64] is also accepted by *Grammia* PNO as a substrate. This wide substrate specificity is in accord with the finding that *Grammia* feeds as a generalist on a wide variety of food plants. Approximately 80 different species of about 50 taxonomically disparate families have been counted by Singer et al. [65], of which several are avoided by other generalist insects because of their toxicity, including species containing various types of PAs. Differences with respect to substrate specificity have also been described for CYPs as counterdefense enzymes of the specialist *Papilio polyxenes*, which feeds exclusively on furanocoumarin-containing plants and of the generalist *Helicoverpa zea*, which feeds on hundreds of types of host plant [66]. The toxicological challenge of generalized feeding is considerable with respect to the tremendous diversity of plant defense compounds. Specialization on a narrow range of host plants is interpreted as an adaptive strategy to plant toxins, involving more specialized detoxification enzymes [66]. Future research has to show the number and kind of enzymes that are involved, in addition to PNO, in the detoxification of plant-derived toxins in polyphagous Arctiids.



**Figure 4. Rooted neighbor-joining tree of amino acid sequences derived from cDNA encoding lepidopteran FMOs with two sequences of *D. melanogaster* as the outgroup.** The framed sequences were experimentally characterized as SNO and PNO, respectively, whereas the others should be regarded as putative FMO-coding cDNA. Branch lengths are proportional to the number of substitutions per site (scale: 0.1 substitutions per site). Bootstrap proportions resulted from 1000 replicates. *Ac*, *Arctia caja*; *Av*, *Arctia villica*; *Ba*, *Bicyclus anynana*; *Bm*, *Bombyx mori*; *Dm*, *Drosophila melanogaster*; *Ds*, *Diacrisia sannio*; *Ea*, *Estigmene acrea*; *Gg*, *Grammia geneura*; *Ha*, *Helicoverpa armigera*; *Pi*, *Plodia interpunctella*; *Tj*, *Tyria jacobaeae*. doi:10.1371/journal.pone.0010435.g004

Remarkably, *Grammia* PNO also accepts glutathione, a substrate described for yeast FMO but that is not accepted by the SNO of *Tyria*. By oxidation of glutathione and other biological alcohols, yeast FMO provides the oxidizing equivalents that are essential for the proper folding of disulfide-containing proteins at the endoplasmic reticulum [67,68]. Currently, we do not know whether this activity is a unique feature of the PNO of *Grammia*, or whether this conversion is an inherent activity of lepidopteran FMOs, suggesting a similar physiological role for lepidopteran FMOs as described for yeast and postulated for the FMOs of mammals and of *Trypanosoma cruzi* [69,70]. The observation that the SNO of *T. jacobaeae* is expressed not only in the fat body, but also in the head of the larvae, suggests that the respective genes are pleiotropic and not only involved in PA *N*-oxygenation.

#### Duplication of a FMO-encoding gene as a key innovation in the Arctiids for adaptation to PA-containing plants

The identification of several lepidopteran FMO-like sequences in this project has enabled us to construct a neighbor-joining tree of this gene family present in this order of insects. The branching

pattern of this tree shows three well-supported clusters that we have named FMO1 to FMO3, each containing one of the three FMO-coding sequences present in the *Bombyx mori* genome. Incorporation of EST sequence data of other lepidopteran species available in the databases supports these three clusters (data not shown). Two of these EST sequences that have shown the lowest degree of missing sequence in our alignment have been included in the phylogenetic analysis. The finding that the genomes of *D. melanogaster* and *A. gambiae* contain only two FMO-like sequences that do not cluster with FMO sequences of the Lepidoptera suggests that lepidopteran FMO form a lineage-specific group. A similar observation is described by Hao et al. [3] who has reconstructed a phylogeny of 104 FMO sequences of 34 species belonging to various metazoan phyla. The mammalian FMOs encompassing the five types FMO1–FMO5 show a monophyletic origin, well separated from the clades containing the fish FMO or the invertebrate FMO-like sequences. Therefore, the different lineages of animals do not have truly orthologous genes. Instead, diversification of the *fmo* genes occurred independently in the lineages by gene duplications, resulting in gene copies some of



which were lost again, with others evolving different functions and metabolizing different substrates [3,71]. Within the Lepidoptera, the gene duplication that resulted in the origin of FMO1 and FMO2 is well supported by the position of both genes close to each other on the chromosome 25 in the *B. mori* genome. Another gene duplication seems to be specific for the lineage of the Arctiids and has resulted in a cluster of FMO sequences of unknown function and in a separate cluster, encompassing sequences of which two have been shown to be involved in the *N*-oxygenation of plant-derived PAs, i.e., the SNO of *T. jacobaeae* and the PNO of *G. geneura*. Therefore, this gene duplication can be interpreted as a “key innovation” within this lineage according to the interpretation of Berenbaum et al. [72], it being the prerequisite for the evolution of the biochemical basis for the multifaceted adaptations of tiger moths to PA-containing plants. Indeed, in 1999, Weller et al. [52] postulated that the ability to sequester PAs from the larval diet should have arisen at an ancestral node early in the Arctiid family.

Of note, all FMO-like sequences that have been identified from arctiid species can be grouped into the two arctiid-specific clusters within the FMO1 group. No single sequence has been identified that clusters with FMO2 and FMO3 of other lepidopteran species, although the degenerate primers used for our approach were at least at the beginning of our study, not specific for lepidopteran FMO. For the design of the degenerate primers, we have used an alignment of only one lepidopteran FMO (*Tj*SNO) and of four FMOs from two dipteran genomes. Work is in progress to test whether this arises from using mainly fat body tissues for cDNA preparations or whether the arctiids are indeed devoid of any sequences orthologous to FMO2 and FMO3 of *B. mori* because of a loss of the respective genes. In this regard, the branch length of the arctiid FMO sequences are notably longer than those of the PNO-sequence cluster or of other lepidopteran FMO1, suggesting a higher substitution rate within these FMO-coding sequences. A challenge for the future will be to assign a specific function to this arctiid-specific sequence cluster and to compare it with the FMO1 sequences of other lepidopteran species.

## References

- Naumann C, Hartmann T, Ober D (2002) Evolutionary recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for the detoxification of host plant-acquired pyrrolizidine alkaloids in the alkaloid-defended arctiid moth *Tyria jacobaeae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6085–6090.
- Alfieri A, Malito E, Orru R, Fraaije MW, Mattevi A (2008) Revealing the moonlighting role of NADP in the structure of a flavin-containing monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 6572–6577.
- Hao D, Chen S, Mu J, Xiao P (2009) Molecular phylogeny, long-term evolution, and functional divergence of flavin-containing monooxygenases. *Genetica* 137: 173–187.
- Cashman JR (2002) Flavin monooxygenases. In: Ioannides C, ed. *Enzyme Systems that Metabolize Drugs and Other Xenobiotics*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. pp 67–93.
- Suh JK, Poulsen LL, Ziegler DM, Robertus JD (2000) Redox regulation of yeast flavin-containing monooxygenase. *Arch Biochem Biophys* 381: 317–322.
- Zhang M, Robertus JD (2002) Molecular cloning and characterization of a full-length flavin-dependent monooxygenase from yeast. *Arch Biochem Biophys* 403: 277–283.
- Schlaich NL (2007) Flavin-containing monooxygenases in plants: looking beyond detox. *Trends Plant Sci* 12: 412–418.
- Ziegler DM (2002) An overview of the mechanism, substrate specificities, and structure of FMOs. *Drug Metab Rev* 34: 503–511.
- Ziegler DM (1993) Recent studies on the structure and function of multisubstrate flavin-containing monooxygenases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33: 179–199.
- Cashman JR (2005) Some distinctions between flavin-containing and cytochrome P450 monooxygenases. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 599–604.
- Feyereisen R (2005) Insect Cytochrome P450. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, eds. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Amsterdam: Elsevier. pp 1–77.
- Scharf ME, Scharf DW, Bennett GW, Pittendrigh BR (2004) Catalytic activity and expression of two flavin-containing monooxygenases from *Drosophila melanogaster*. *Arch Insect Biochem Physiol* 57: 28–39.
- Tijet N, Helvig C, Feyereisen R (2001) The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: Annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene* 262: 189–198.
- Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, Biswas S, Schuler MA, et al. (2006) A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol Biol* 15: 615–636.
- Hung CF, Berenbaum MR, Schuler MA (1997) Isolation and characterization of CYP6B4, a furanocoumarin-inducible cytochrome P450 from a polyphagous caterpillar (Lepidoptera: Papilionidae). *Insect Biochem Mol Biol* 27: 377–385.
- Li W, Schuler MA, Berenbaum MR (2003) Diversification of furanocoumarin-metabolizing cytochrome P450 monooxygenases in two papilionids: Specificity and substrate encounter rate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 2: 14593–14598.
- Harrison TL, Zangerl AR, Schuler MA, Berenbaum MR (2001) Developmental variation in cytochrome P450 expression in *Papilio polyxenes* in response to xanthotoxin, a hostplant allelochemical. *Arch Insect Biochem Physiol* 48: 179–189.
- Petersen RA, Zangerl AR, Berenbaum MR, Schuler MA (2001) Expression of CYP6B1 and CYP6B3 cytochrome P450 monooxygenases and furanocoumarin metabolism in different tissues of *Papilio polyxenes* (Lepidoptera: Papilionidae). *Insect Biochem Mol Biol* 31: 679–690.
- Hartmann T, Ober D (2000) Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. In: Leeper FJ, Vederas JC, eds. *Topics in Current Chemistry*. Berlin/Heidelberg: Springer. pp 207–244.
- Hartmann T, Ober D (2008) Defense by pyrrolizidine alkaloids: developed by plants and recruited by insects. In: Schaller A, ed. *Induced Plant Resistance to Herbivory*. Berlin: Springer Science+Business Media B.V. pp 213–231.
- Mattocks AR (1986) *Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids*. London: Academic Press.
- Lindigkeit R, Biller A, Buch M, Schiebel HM, Boppré M, et al. (1997) The two faces of pyrrolizidine alkaloids: The role of the tertiary amine and its N-oxide in

## Supporting Information

**Figure S1** Amino acid alignment of flavin-dependent monooxygenases of various lepidopteran species.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010435.s001 (0.04 MB PDF)

**Table S1** Sequences of primers used for the identification and cloning of cDNAs of flavin-dependent monooxygenases of the Lepidoptera.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010435.s002 (0.02 MB PDF)

**Table S2** PCR-based strategy for identification of partial FMO-like sequences of various lepidopteran species.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010435.s003 (0.01 MB PDF)

**Table S3** Accession numbers of all nucleotide sequences that have been identified within this project and that have been taken from the databases.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0010435.s004 (0.01 MB PDF)

## Acknowledgments

We thank K. Vrieling (Van der Klaauw Laboratorium, Leiden, The Netherlands) for his help in collecting *T. jacobaeae* larvae at the beginning of this project, E. Bernays (University of Arizona, Tucson, USA) and M. Singer (Wesleyan University, Middletown, USA) for providing the larvae of *G. geneura* and *E. acraea*, and H. Vogel (Max Planck Institute for Chemical Ecology, Jena, Germany) for cDNA sequences of *H. armigera* libraries. We are also grateful to T. Hartmann (Technical University Braunschweig, Germany) for helpful discussions and to B. Schemmerling, M. Doose, C. Theuring, and A. Backenköhler for their excellent technical assistance.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SS LW DL HM GP DO. Performed the experiments: SS LW DL HM. Analyzed the data: SS LW DL DGH DO. Contributed reagents/materials/analysis tools: DGH GP. Wrote the paper: DGH DO.

- chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. *Eur J Biochem* 245: 626–636.
23. Narberhaus I, Zintgraf V, Dobler S (2005) Pyrrolizidine alkaloids on three trophic levels - evidence for toxic and deterrent effects on phytophages and predators. *Chemecology* 15: 121–125.
  24. Fu PP, Xia Q, Lin G, Chou MW (2004) Pyrrolizidine alkaloids - genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug Metab Rev* 36: 1–55.
  25. Conner WE, Eisner T, van der Meer RK, Guerrero A, Meinwald J (1981) Precopulatory sexual interactions in an arctiid moth (*Utheisa ornatrix*): Role of a pheromone derived from dietary alkaloids. *Behav Ecol Sociobiol* 9: 227–235.
  26. Eisner T, Meinwald J (1995) The chemistry of sexual selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 50–55.
  27. Dussourd DE, Ubik K, Harvis C, Resch J, Meinwald J, et al. (1988) Biparental defensive endowment of eggs with acquired plant alkaloid in the moth *Utheisa ornatrix*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5992–5996.
  28. Conner WE, Roach B, Benedict E, Meinwald J, Eisner T (1990) Courtship pheromone production and body size as correlates of larval diet in males of the arctiid moth *Utheisa ornatrix*. *J Chem Ecol* 16: 543–552.
  29. Hare JF, Eisner T (1993) Pyrrolizidine alkaloid deters ant predators of *Utheisa ornatrix* eggs: Effects of alkaloid concentration, oxidation state, and prior exposure of ants to alkaloid-laden prey. *Oecologia* 96: 9–18.
  30. Bezzerides A, Yong T-H, Bezzerides J, Husseini J, Ladau J, et al. (2004) Plant-derived pyrrolizidine alkaloid protects eggs of a moth (*Utheisa ornatrix*) against a parasitoid wasp (*Trichogramma ostrinae*). *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9029–9032.
  31. Krasnoff SB, Roelofs WL (1989) Quantitative and qualitative effects of larval diet on male scent secretions of *Exstigmene acrea*, *Phragmatobia fuliginosa*, and *Pyrrharctia isabella* (Lepidoptera: Arctiidae). *J Chem Ecol* 15: 1077–1093.
  32. Schulz S (2009) Alkaloid-derived male courtship pheromones. In: Conner WE, ed. *Tiger Moth and Woolly Bears*. New York: Oxford University Press. pp 145–153.
  33. Singer MS, Mace KC, Bernays EA (2009) Self-medication as adaptive plasticity: increased ingestion of plant toxins by parasitized caterpillars. *PLoS ONE* 4: e4796.
  34. Bergomaz R, Boppré M (1986) A simple instant diet for rearing Arctiidae and other moths. *Journal of the Lepidopterists' Society* 40: 131–137.
  35. Ober D, Hartmann T (1999) Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14777–14782.
  36. Ober D, Hartmann T (1999) Deoxyhypusine synthase from tobacco: cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of an enzyme with extended substrate specificity. *J Biol Chem* 274: 32040–32047.
  37. Grubor VD (2003) The roles of cytochrome P450s in pyrethroid resistance in the AN02 strain of *Helicoverpa armigera* [PhD Thesis]. Melbourne, Australia: University of Melbourne.
  38. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, et al. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server. In: Walker JM, ed. *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press. 988 p.
  39. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340: 783–795.
  40. Horton P, Nakai K (1997) Better prediction of protein cellular localization sites with the  $\kappa$  nearest neighbors classifier. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 5: 147–152.
  41. Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300: 1005–1016.
  42. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer ELL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J Mol Biol* 305: 567–580.
  43. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876–4882.
  44. Felsenstein J (2001) PHYLIP, Phylogeny Inference Package (Univ. of Washington, Seattle), Version 3.6(alpha2).
  45. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406–425.
  46. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990) Use of T<sub>7</sub> RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185: 60–89.
  47. Caspers P, Stieger M, Burn P (1994) Overproduction of bacterial chaperones improves the solubility of recombinant protein tyrosine kinases in *Escherichia coli*. *Cell Mol Biol* 40: 635–644.
  48. Conner WE, Weller SJ (2004) A quest for alkaloids: the curious relationship between tiger moth and plants containing pyrrolizidine alkaloids. In: Cardé RT, Millar JG, eds. *Advances in Insect Chemical Ecology*. Cambridge: Cambridge University Press. pp 248–282.
  49. Blackwell JR, Horgan R (1991) A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett* 295: 10–12.
  50. Jean D, Monique L, Jean-Antoine L, Florence M, Francine P, et al. (1989) Larval fat body-specific gene expression in *D. melanogaster*. *Dev Genet* 10: 220–231.
  51. Lawton MP, Cashman JR, Cresteil T, Dolphin CT, Elfarra AA, et al. (1994) A nomenclature for the mammalian flavin-containing monooxygenase gene family based on amino acid sequence identities. *Arch Biochem Biophys* 308: 254–257.
  52. Weller SJ, Jacobson NL, Conner WE (1999) The evolution of chemical defences and mating systems in tiger moths (Lepidoptera: Arctiidae). *Bot J Linn Soc* 68: 557–578.
  53. Despres L, David J-P, Gallet C (2007) The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends Ecol Evol* 22: 298–307.
  54. Guengerich FP (2002) Cytochrome P450. In: Ioannides C, ed. *Enzyme Systems that Metabolize Drugs and Other Xenobiotics*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. pp 33–65.
  55. Cashman JR (1995) Structural and catalytic properties of the mammalian flavin-containing monooxygenase. *Chem Res Toxicol* 8: 165–181.
  56. Eswaramoorthy S, Bonanno JB, Burley SK, Swaminathan S (2006) Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9832–9837.
  57. Michalski C, Mohagheghi H, Nimtz M, Pasteels J, Ober D (2008) Salicyl alcohol oxidase of the chemical defense secretion of two chrysomelid leaf beetles: molecular and functional characterization of two new members of the glucose-methanol-choline oxidoreductase gene family. *J Biol Chem* 283: 19219–19228.
  58. Hartmann T, Theuring C, Beuerle T, Bernays EA, Singer MS (2005) Acquisition, transformation and maintenance of plant pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Grammia geneva*. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 1083–1099.
  59. Anke S, Gonde D, Kaltenecker E, Hansch R, Theuring C, et al. (2008) Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in *Phalaenopsis* orchids: developmental expression of alkaloid-specific homospermidine synthase in root tips and young flower buds. *Plant Physiol* 148: 751–760.
  60. Frölich C, Hartmann T, Ober D (2006) Tissue distribution and biosynthesis of 1,2-saturated pyrrolizidine alkaloids in *Phalaenopsis* hybrids (Orchidaceae). *Phytochemistry* 67: 1493–1502.
  61. Nurhayati N, Gondé D, Ober D (2009) Evolution of pyrrolizidine alkaloids in *Phalaenopsis* orchids and other monocotyledons: Identification of deoxyhypusine synthase, homospermidine synthase and related pseudogenes. *Phytochemistry* 70: 508–516.
  62. Reina M, Gonzalez-Coloma A, Gutierrez C, Cabrera R, Henriquez J, et al. (1997) Bioactive saturated pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium floridum*. *Phytochemistry* 46: 845–853.
  63. Becker DP, Flynn DL, Moormann AE, Nosal R, Villamil CI, et al. (2006) Pyrrolizidine esters and amides as 5-HT<sub>4</sub> receptor agonists and antagonists. *J Med Chem* 49: 1125–1139.
  64. Rhoades DF (1979) Evolution of plant chemical defense against herbivores. In: Rosenthal GA, Janzen DH, eds. *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. New York: Academic Press. pp 1–55.
  65. Singer MS, Bernays EA, Carrière Y (2002) The interplay between nutrient balancing and toxin dilution in foraging by a generalist insect herbivore. *Anim Behav* 64: 629–643.
  66. Li X, Baudry J, Berenbaum MR, Schuler MA (2004) Structural and functional divergence of insect CYP6B proteins: From specialist to generalist cytochrome P450. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2939–2944.
  67. Suh JK, Robertus JD (2000) Yeast flavin-containing monooxygenase is induced by the unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 121–126.
  68. Suh JK, Poulsen LL, Ziegler DM, Robertus JD (1999) Yeast flavin-containing monooxygenase generates oxidizing equivalents that control protein folding in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2687–2691.
  69. Ziegler DM, Poulsen LL (1977) Protein disulfide bond synthesis: a possible intracellular mechanism. *Trends Biochem Sci* 2: 79–81.
  70. Agosin M, Ankley GT (1987) Conversion of N,N-dimethylaniline to N,N-dimethylaniline-N-oxide by a cytosolic flavin-containing enzyme from *Trypanosoma cruzi*. *Drug Metab Dispos* 15: 200–203.
  71. Overby LH, Buckpitt AR, Lawton MP, Atta AAE, Schulze J, et al. (1995) Characterization of flavin-containing monooxygenase 5 (FMO5) cloned from human and guinea pig: Evidence that the unique catalytic properties of FMO5 are not confined to the rabbit ortholog. *Arch Biochem Biophys* 327: 275–284.
  72. Berenbaum MR, Favret C, Schuler MA (1996) On defining “key innovations” in an adaptive radiation: cytochrome P450s and Papilionidae. *Am Nat* 148: S139.

### 3 PROJEKTTEIL II

#### **Identifizierung und Charakterisierung der Flavin-abhängigen Monooxygenasen in der afrikanischen Heuschrecke *Zonocerus variegatus***

PAs sind Sekundärstoffe aus Pflanzen, die als Abwehrstoffe gegen Herbivoren dienen. Durch Jahrmillionen Koevolution haben eine Reihe von Insekten unterschiedliche Mechanismen entwickelt, um sich an die toxischen PAs anzupassen, einige nutzen sie sogar als eigene Wehrstrategie gegen Fressfeinde. Einige Insekten, wie *Spodoptera littoralis* (Noctuidae), besitzen einen effektiven Mechanismus zur Exkretion von toxisch wirkenden PAs. Arctiiden hingegen haben nicht nur die Fähigkeit, diese wirkungsvolle chemische Barriere zu überwinden, sondern können ihrerseits PAs zur eigenen Verteidigung im Körper sequestrieren. Die Integration von pflanzlichen PAs in die eigene Abwehr ist ein Phänomen, das in vielen, auch nicht direkt verwandten phylogenetischen Gruppen vorkommt. So gehören PA-sequestrierende Arten vereinzelt in Taxa wie Kapitel 1.4.1 dargestellt (Hartmann & Witte, 1995). Einige der für die Detoxifizierung der PAs verantwortlichen PA-N-Oxygenasen (PNOs) wurden in Arctiiden (*T. jacobaeae*, *A. caja*, *A. villica*, *G. geneura*) identifiziert. Die Suche nach einer PNOs in einer von den Arctiiden weit entfernten Gruppe, den Orthoptera (Heuschrecken: z.B. *Z. variegatus*) wäre demnach interessant. In diesem Projektteil werden die Identifikation und funktionelle Charakterisierung einer PNO aus *Z. variegatus* beschrieben. Zuerst wurden drei FMOs (ZvFMOa, ZvFMOc, ZvPNO) auf molekularer Ebene in *Z. variegatus* identifiziert. Phylogenetische Analysen zeigen, dass die PNO von *Z. variegatus* unabhängig von den PNOs in Arctiiden entstanden ist, aber den gleichen Entgiftungsmechanismus aufweist. Weiterhin wurden die drei FMOs auf ihre Eigenschaften bezüglich Temperatur- und pH-Abhängigkeit sowie Substratspezifität untersucht. Eine Optimaltemperatur von 42 °C und ein optimaler pH-Wert von 9,0 wurden für die PNO aus *Z. variegatus* nachgewiesen. Wie in Kapitel 2.2 dargestellt, wurde bei der PNO aus dem Generalisten *G. geneura* ein breites Substratsspektrum nachgewiesen. Daher wurden als Substrate PAs verschiedener Strukturtypen sowie das Tropan-



Alkaloid Atropin und Cysteamin, das Substrat der Hefe FMO (Suh, et al., 1996), verwendet. Genau wie bei dem Generalisten *G. geneura* wurde ein breites Substratsspektrum nachgewiesen. Dieses ermöglicht wahrscheinlich das extrem polyphage Verhalten von *Z. variegatus*. Neben der PNO der *Z. variegatus* wurden die Substrate auch von ZvFMOa und ZvFMOc akzeptiert, jedoch mit 400-fach geringerer spezifischer Aktivität. Vermutlich gehen alle drei Gene auf eine Genduplikation zurück, PNO wurde im weiteren Verlauf für die *N*-Oxygenierung der pflanzlichen PAs optimiert, die beiden FMOs mit unbekannter Funktion nochmals dupliziert.

Die Ergebnisse sind in nachfolgender Publikation veröffentlicht. Die in der Publikation enthaltenen Arbeiten, mit Ausnahme des Nachweises der PA-*N* Oxide mit LC-MS, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit angefertigt.

# Independent Recruitment of a Flavin-Dependent Monooxygenase for Safe Accumulation of Sequestered Pyrrolizidine Alkaloids in Grasshoppers and Moths

Linzhu Wang<sup>1‡</sup>, Till Beuerle<sup>2</sup>, James Timbilla<sup>3</sup>, Dietrich Ober<sup>1\*</sup>

**1** Biochemical Ecology and Molecular Evolution, Botanical Institute and Botanical Garden, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Germany, **2** Institute for Pharmaceutical Biology, Technical University Braunschweig, Braunschweig, Germany, **3** Queensborough Community College, City University of New York, New York, New York, United States of America

## Abstract

Several insect lineages have developed diverse strategies to sequester toxic pyrrolizidine alkaloids from food-plants for their own defense. Here, we show that in two highly divergent insect taxa, the hemimetabolous grasshoppers and the holometabolous butterflies, an almost identical strategy evolved independently for safe accumulation of pyrrolizidine alkaloids. This strategy involves a pyrrolizidine alkaloid *N*-oxygenase that transfers the pyrrolizidine alkaloids to their respective *N*-oxide, enabling the insects to avoid high concentrations of toxic pyrrolizidine alkaloids in the hemolymph. We have identified a pyrrolizidine alkaloid *N*-oxygenase, which is a flavin-dependent monooxygenase, of the grasshopper *Zonocerus variegatus*. After heterologous expression in *E. coli*, this enzyme shows high specificity for pyrrolizidine alkaloids of various structural types and for the tropane alkaloid atropine as substrates, a property that has been described previously for a pyrrolizidine alkaloid *N*-oxygenase of the arctiid moth *Grammia geneura*. Phylogenetic analyses of insect flavin-dependent monooxygenase sequences suggest that independent gene duplication events preceded the establishment of this specific enzyme in the lineages of the grasshoppers and of arctiid moths. Two further flavin-dependent monooxygenase sequences have been identified from *Z. variegatus* sharing amino acid identities of approximately 78% to the pyrrolizidine alkaloid *N*-oxygenase. After heterologous expression, both enzymes are also able to catalyze the *N*-oxygenation of pyrrolizidine alkaloids, albeit with a 400-fold lower specific activity. With respect to the high sequence identity between the three *Z. variegatus* sequences this ability to *N*-oxygenize pyrrolizidine alkaloids is interpreted as a relict of a former bifunctional ancestor gene of which one of the gene copies optimized this activity for the specific adaptation to pyrrolizidine alkaloid containing food plants.

**Citation:** Wang L, Beuerle T, Timbilla J, Ober D (2012) Independent Recruitment of a Flavin-Dependent Monooxygenase for Safe Accumulation of Sequestered Pyrrolizidine Alkaloids in Grasshoppers and Moths. PLoS ONE 7(2): e31796. doi:10.1371/journal.pone.0031796

**Editor:** Carlos Eduardo Winter, Universidade de São Paulo, Brazil

**Received:** July 15, 2011; **Accepted:** January 13, 2012; **Published:** February 20, 2012

This is an open-access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the Creative Commons CC0 public domain dedication.

**Funding:** The authors have no support or funding to report.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: dober@bot.uni-kiel.de

‡ Current address: Botanik I, University of Würzburg, Würzburg, Germany

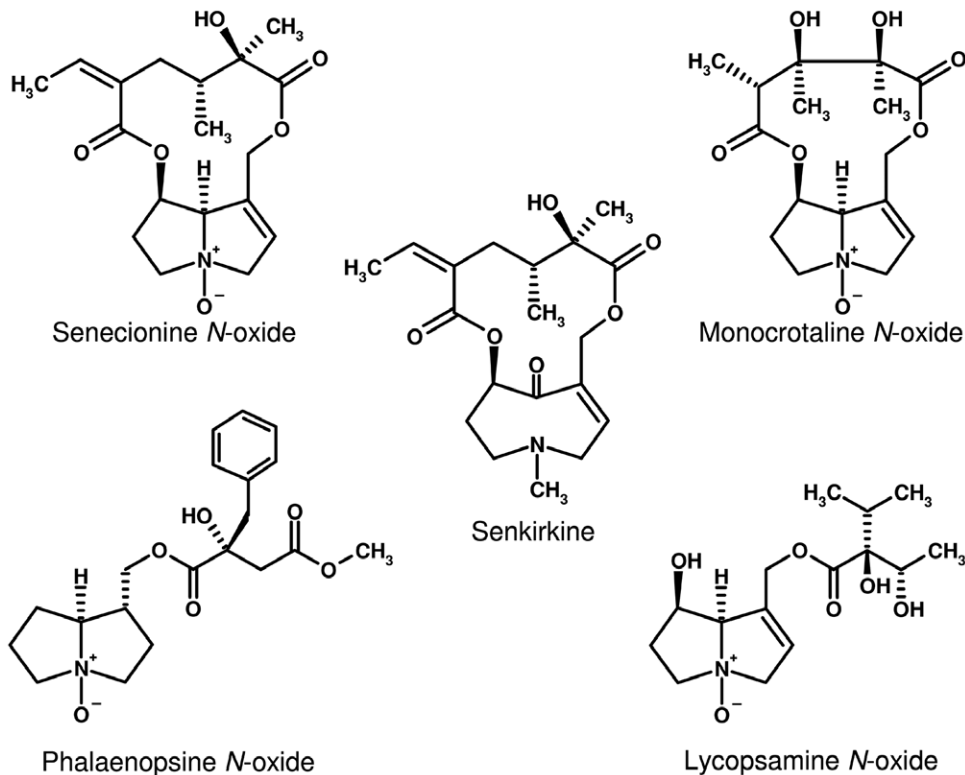
## Introduction

Chemical defense against herbivory is essential for plants to be able to survive in their natural habitat. During evolution, many insect herbivores have developed counterstrategies to cope with these toxic compounds. In some cases, they have even acquired these chemicals for their own benefit. One of the best studied examples of plant toxins sequestered by adapted insects are the pyrrolizidine alkaloids (PAs) that are found in certain lineages scattered within the angiosperms [1]. PAs occur in plants usually in their polar non-toxic *N*-oxide form (Figure 1). After ingestion by a vertebrate or insect herbivore, the *N*-oxides are easily reduced to the protoxic free base, the substrate for cytochrome P450-mediated bioactivation [2,3].

Strategies for PA sequestration in adapted insects have evolved in various insect lineages under the identical selection pressure to avoid higher concentrations of PAs in the form of their free base in the hemolymph (for recent reviews see [1,3,4,5]). Leaf beetles of the genus *Platyphora* (Chrysomelidae, Coleoptera) have developed a

strategy to transfer the free base from the hemolymph into defense secretions with such an efficiency that all other tissues outside the secretory glands are almost devoid of PAs [6]. In the related leaf beetle genus *Oreina* (Chrysomelidae, Coleoptera), the reduction of ingested PAs is suppressed. Instead, the *N*-oxides are directly absorbed and accumulated in their hemolymph and defense glands [7,8]. A third strategy to handle sequestered PAs is the stabilization of the PAs by enzyme-catalyzed *N*-oxidation of the alkaloids within the insect. This mechanism is realized in larvae of the tiger moth family (Arctiidae, Lepidoptera) [9–13], in several *Longitarsus* flea beetle species [14,15], and in the grasshopper genus *Zonocerus* [13,16]. Recently, we have been able to show that the enzyme responsible for the *N*-oxygenation of PAs in arctiids belongs to the family of flavin-dependent monooxygenases (FMOs) [12,13] and was recruited by gene duplication early in this lineage during the adaptation to PA-containing plants [17]. To date, these PA *N*-oxygenases are the only functional characterized FMOs of insects.

FMOs are well characterized in vertebrates, where they are involved in the detoxification of nucleophilic nitrogen- and sulfur-



**Figure 1. Structures of characteristic pyrrolizidine alkaloids.** Structures are given in the N-oxide form with the exception of the otonecine derivative, senkirkine.

doi:10.1371/journal.pone.0031796.g001

containing xenobiotics [18]. Although insects have to cope with a wide variety of xenobiotics, none of these so-called microsomal multi-substrate FMOs has been detected in insects, suggesting that the xenobiotic metabolism is guaranteed by cytochrome P450 monooxygenases (CYPs). Despite the different mechanism by which these two classes of monooxygenases operate, both convert lipophilic compounds into more hydrophilic metabolites that are readily excreted and have reduced bioactivity [3,18]. Both, FMOs and CYPs have been shown to catalyze the N-oxygenation of PAs in vertebrates [19,20].

Here, we report that PA N-oxygenation as one strategy for insect adaptation to PA-containing food plants evolved independently in the grasshopper *Z. variegatus* and the arctiid moths. We show that convergent evolution resulted in two almost identical systems. This identity refers to the findings that, in both cases, an FMO has been recruited, and that the respective enzymes show almost identical substrate specificity.

## Materials and Methods

### Collection and rearing of *Zonocerus*

Larvae and adults of *Zonocerus variegatus* were collected in the vicinity of Accra, Ghana, and reared in the laboratory under a light/dark regime of 16/8 h at 20 to 25°C. Egg pots were incubated in moist sand at a constant temperature of 30°C. Nymphs and adults were fed with leaves of *Rubus fruticosus* unless otherwise stated. Leaves of *R. fruticosus* are regarded as non-toxic as they do not contain PAs.

### RNA isolation and cDNA synthesis

Adult insects were dissected, and fat body tissue was frozen in liquid nitrogen before total RNA was isolated by using TRIZOL®

reagent (Invitrogen); 2 µg RNA was used for cDNA synthesis with Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) and an oligo(dT)<sub>17</sub> primer (P1, 0.1 µM; Table S1) at 55°C in a total volume of 20 µl.

### Identification and expression of FMO-like cDNA sequences

Degenerate primers P2 and P3 (for primer sequences see Table S1) were designed based on an alignment of FMO sequences of the lepidopteran species *Arctia caja*, *A. villica*, *Tyria jacobaeae*, and *Grammia geneura* (Syn.: *G. incorrupta*) in combination with two FMO-like sequences identified in each of the genomes of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. In a semi-nested PCR approach, 3 µl of *Z. variegatus* cDNA was amplified with AccuTaq LA polymerase (Sigma) and primer pair P2/P1 by using a touch-down protocol with decreasing annealing temperatures from 60°C to 52°C (−0.5°C per cycle for 16 cycles and 52°C constant for 20 further cycles). The reaction was diluted 1:100, and 3 µl was used as template for the second PCR with primer pair P2/P3 and a decreasing annealing temperature from 55°C to 47°C in a total volume of 25 µl. The resulting fragment of 473 bp was subcloned by using the pGEM-T Easy vector (Promega). Sequencing revealed similarity to the FMO-encoding sequences of insects. Gene-specific primers were designed and used for 3'- and 5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE, P4–P7) as described previously [21]. 3'-RACE resulted in the identification of two sequences covering the 3'-cDNA end and sharing 86% sequence identity. One of these sequences overlapped with the fragment identified with the degenerate primers and with the 5'-RACE fragment and was assembled to the full-length sequence (Z-FMOa). According to the second 3'-end cDNA, gene-specific

primers (P8–P10) were designed that were used for identification by 5′-RACE. The resulting second full-length sequence was named  $\zeta v$ FMOc. For the amplification of the full open reading frames (ORFs) of  $\zeta v$ FMOa and  $\zeta v$ FMOc, primer pairs P11/P12 and P13/P14 were used, respectively, at an annealing temperature of 55°C with Platinum *pf*x DNA polymerase (Invitrogen), which possesses proof-reading activity. The resulting fragments were digested with NdeI/XhoI and cloned into an NdeI/XhoI-linearized pET22b vector for heterologous expression with a C-terminal hexahistidine tag in *E. coli* BL21(DE3). Restriction of the fragment resulting from amplification with primer pair P13/P14 ( $\zeta v$ FMOc) indicated that the PCR product was not homogeneous, as a fragment was detected that contained an internal, non-predicted restriction site for XhoI. Cloning of this fragment into the pGEM-T easy vector, screening with XhoI, and sequencing resulted in the identification of another FMO-encoding sequence, termed  $\zeta v$ PNO. For this sequence, the 3′- and 5′-cDNA ends were identified by RACE with the primers P15–P19. The full ORF of  $\zeta v$ PNO was amplified with primer pair P20/P21 at 55°C with Platinum *pf*x DNA polymerase, digested with BsaI and NotI, and cloned into an NcoI/NotI-linearized pET28a vector for expression with a C-terminal hexahistidine tag in *E. coli* BL21(DE3). Expression of the recombinant proteins  $\zeta v$ FMOa,  $\zeta v$ FMOc, and  $\zeta v$ PNO was induced with 0.1 mM isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside at 30°C, before the proteins were purified by metal chelate affinity chromatography by using Ni<sup>2+</sup>-nitrilotriacetic acid-agarose (Qiagen). For determination of the native  $M_r$ , the purified enzyme was applied to a Superdex200HighLoad column (GE Healthcare) using 20 mM glycine/NaOH buffer pH 9.0 containing 200 mM NaCl. As reference proteins thyroglobulin (669 kDa), ferritin (440 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), and chymotrypsinogen A (25 kDa) have been used.

### Sequence analysis

Comparison of amino acid sequences was performed with the Bestfit software of the Wisconsin Sequence Analysis Package (version10, Genetics Computer Group, Madison, WI). An alignment of amino acid sequences (Figure S1) was generated with ClustalX [22] and used to estimate phylogenies with the PHYLIP program package [23]. The maximum likelihood tree was calculated with PROML by using the Jones-Taylor-Thornton model for amino acid changes [24]. Bootstrap values were estimated with the programs SEQBOOT and CONSENSE. The bootstrap estimates are the result of 1000 replicates. The sequences reported in this paper have been submitted to the EMBL Nucleotide Sequence Database with the accession numbers FR696371 ( $\zeta v$ FMOa), FR696372 ( $\zeta v$ FMOc), and FR696373 ( $\zeta v$ PNO).

### Assay for PA N-oxygenase activity

Enzyme activity was assayed in a 100 mM glycine/NaOH buffer pH 9 containing 0.2 mM NADPH at 37°C photometrically or in a radioassay as described previously [12]. All substrates were assayed at a concentration of 0.2 mM by using the photometric assay or the radioassay (0.023  $\mu$ Ci/assay), except for retronecine, supinidine, and isoretronecanol, which were tested as <sup>3</sup>H-labeled substrates, and phalaenopsine as a <sup>14</sup>C-labeled substrate in the radioassay (0.023 and 0.045  $\mu$ Ci/assay, respectively). For enzyme kinetics, initial rates were determined by varying the concentration of alkaloid (1–40  $\mu$ M for senecionine, 4–60  $\mu$ M for monocrotaline and atropine, and 0.1–1.5 mM for heliotrine and phalaenopsine) while maintaining the concentration of NADPH at 200  $\mu$ M. The identity of senecionine N-oxide, seneciphylline N-oxide, monocrotaline N-oxide, phalaenopsine N-oxide, and atropine N-oxide was confirmed by liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS). For LC-MS analysis, samples were diluted by using 50%

acetonitrile containing 1% formic acid. Solutions were infused directly into a 3200 QTrap MS instrument (Applied Biosystems/MDS Sciex). The mass spectrometer was equipped with an electrospray ionization interface (ESI, Turbo V) and was operated in positive-ion mode and enhanced product ion (EPI) scan mode. Ionization and EPI conditions were optimized individually for each compound in its non-oxidated form, and the obtained settings were used to analyze extracts of the corresponding enzymatic assays. Nitrogen was used as a curtain and auxiliary gas.

## Results

### Identification and Heterologous Expression of PA N-Oxygenase of *Z. variegatus*

In contrast to the arctiid moths in which the PA N-oxygenase is a soluble protein in the hemolymph, the alkaloid N-oxygenating activity in the grasshopper *Z. variegatus* is associated with the fat body [13]. Separate incubation of a particulate fraction and the supernatant obtained from the insects fat body with <sup>14</sup>C-seneciphylline showed that N-oxygenation activity is detectable in the soluble fraction, but not in the pellet. These results indicate that PNO is expressed as a soluble protein, excluding the involvement of a membrane-bound CYP. Therefore, we hypothesized that the enzyme might belong to the FMOs in this species. Using cDNA preparations of fat body tissue of *Z. variegatus*, we applied a polymerase chain reaction (PCR)-based approach, in order to identify FMO-encoding cDNA sequences. Degenerate primers were designed according to an alignment of FMO sequences of *Drosophila melanogaster* and *Anopheles gambiae* present in the database and of four arctiid species identified recently in our group, *viz.*, *Arctia caja*, *A. villica*, *Tyria jacobaeae*, and *Grammia geneura* [17]. Three cDNA sequences were identified,  $\zeta v$ FMOa,  $\zeta v$ FMOc, and  $\zeta v$ PNO, with open reading frames of 1242 bp, 1245 bp, and 1242 bp in length, encoding proteins with a subunit size of 47,726 Da, 47,939 Da, and 47,793 Da, respectively. The isoelectric point of the three proteins is predicted to be 6.6, 6.2, and 6.0, respectively. The sequence motifs most characteristic for FMO, *viz.*, the nucleotide-binding sites (Rossmann folds, consensus GxGxxG) for binding of FAD as a prosthetic group and of the NADPH cofactor, respectively, and the FMO-identifying sequence (consensus FxGxxxHxxxY/F) are highly conserved in sequence position in comparison with the FMOs of other eukaryotes [25–28] (Figure S1). For none of the three sequences an N-terminal signal peptide was predicted as it was shown to be present in the SNO of *Tyria jacobaeae* and the FMOs of other arctiid species [12,17]. No transmembrane helices were detected as they are present in mammalian FMOs close to the C-terminus for membrane attachment [29]. The FMO-like sequences of *Z. variegatus* share amino acid identities of 77% to 78% between each other and identities of 35% to 40% to the sequences encoding the senecionine N-oxygenase of *T. jacobaeae* (Lepidoptera), to the FMOs of *Drosophila melanogaster* (Diptera), and to the human FMO1 (Table 1).

### Biochemical Characterization of PA N-Oxygenase of *Z. variegatus*

After the expression and purification by metal chelate affinity chromatography,  $\zeta v$ FMOa,  $\zeta v$ FMOc, and  $\zeta v$ PNO showed, in assays for PA N-oxygenation, specific activities of 123 pkat/mg, 146 pkat/mg, and 59 nkat/mg, respectively (100 mM glycine/NaOH buffer pH 9.0 with 0.2 mM senecionine as substrate). The identity of the reaction product as senecionine N-oxide was confirmed by LC-MS (liquid chromatography with mass spectrometry). Therefore,  $\zeta v$ PNO was designated as PA N-oxygenase

**Table 1.** Degree of identity between amino acid sequences encoding FMOs of *Z. variegatus*, other insects, and the FMO1 of human.

(%)	ZvFMOa	ZvFMOc	ZvPNO	TjSNO	DmFMO3006	DmFMO3174	HsFMO1
ZvFMOa	100	77.0	77.8	35.2	36.4	36.3	39.8
ZvFMOc			77.0	35.3	38.2	36.6	38.8
ZvPNO				36.3	38.2	37.1	37.7

For comparison, the full coding regions were used. TjSNO, Senecionine N-oxygenase of *Tyria jacobaeae*; DmFMO3006 and DmFMO3174, FMO sequences of unknown function present in the genome of *Drosophila melanogaster*; HsFMO1, FMO1 of human.  
doi:10.1371/journal.pone.0031796.t001

(PNO). Recombinant ZvPNO shows a pH optimum of 9.0 in potassium phosphate buffer (10 mM), Tris/HCl buffer (10 mM), and in glycine/NaOH buffer (100 mM), respectively (Figure S2). Using the potassium phosphate-based buffer system (pH9.0) in the standard assay, linear rates of product formation were maximal at a temperature of 42°C. Using a temperature range of 20–42°C, the activation energy was estimated to be 70.7 kJ/mol. The molecular mass of the heterologously expressed protein has been estimated by gel filtration chromatography to be 91,200 Da, indicating that the active enzyme is a homodimer.

**Substrate Specificity of Recombinant FMO of *Z. variegatus***

*Z. variegatus* is a generalist feeding on a wide array of food plants and encountering a huge diversity of plant allelochemicals [30]. Therefore, in testing the substrate specificity of recombinant ZvFMOa, ZvFMOc, and ZvPNO, we used, in addition to various structures of PAs, other alkaloids and compounds known to be accepted as substrates of mammalian and yeast FMO (Table 2). With regard to ZvPNO, PA structures of the five main structural types are N-oxygenized. The otonecin derivative senkirkine, which carries a methyl group at the ring-bound nitrogen, is not a substrate (Figure 1). Atropine, a tropane alkaloid common to certain solanaceous plants, is converted to its N-oxide form with almost the same activity as the best substrates tested, e.g., senecionine and seneciphylline. Of the substrates described for mammalian FMOs and for the FMO from *Saccharomyces cerevisiae*, cysteamine is accepted by the PNO of *Zonocerus*, whereas L-cysteine, dimethylaniline, hydroxylamine, or glutathione are not substrates. ZvFMOa and ZvFMOc show low but unequivocal activity with most of the substrates that show activity with ZvPNO.

For ZvPNO, enzyme kinetics have been established by using selected substrates representing the major classes of PAs and of atropine. The apparent Km values of 1.1 μM (senecionine), 11.9 μM (monocrotaline), 263.9 (heliotrine), 837.6 μM (phalae-nopsine), and 9.8 μM (atropine) show that the PNO has a higher affinity to the macrocyclic diesters senecionine and monocrotaline than to the monoesters heliotrine and phalae-nopsine. The affinity to the tropane alkaloid atropine is in the same range as that for the macrocyclic diester type. The values for the catalytic efficiency (kcat/Km) support the interpretation that senecionine is the most efficient substrate for the PNO followed by monocrotaline and atropine (Table 3).

**Comparative Sequence Analysis of Insect FMOs**

The amino acid sequences of the three FMOs of *Z. variegatus* and of various FMOs of insects have been used for phylogenetic analysis (Figure 2). The sequences form well-supported individual clusters with regard to the sequences of the Diptera (*D. melanogaster*

**Table 2.** Substrate specificity of recombinant flavin-dependent monooxygenases of *Z. variegatus*.

Substrate	Specific activity (nkat/mg)			
	GgPNO	ZvPNO	ZvFMOa	ZvFMOc
<b>Pyrrolizidine alkaloids</b>				
<b>Senecionine type</b>				
Senecionine	55.0	32.0	0.1	0.1
Seneciphylline	53.2	29.4	0.6	0.1
Senecivernine	-	24.0	1.3	0.6
Retrorsine	-	18.6	1.5	0.5
Senkirkine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Monocrotaline type</b>				
Monocrotaline	90.2	23.4	1.5	0.9
Axillarine	62.2	18.6	n.d.	n.d.
Axillaridine	-	11.8	n.d.	n.d.
<b>Lycopsamine type</b>				
Heliotrine	44.2	19.5	n.d.	n.d.
Rinderine	38.8	11.5	1.3	0.4
Indicine	-	4.8	n.d.	n.d.
<b>Triangularine type</b>				
Sarracine	-	16.0	0.4	0.3
<b>Phalae-nopsine type</b>				
Phalae-nopsine	17.1	9.6	n.d.	n.d.
<b>Necine bases</b>				
Retronecine	n.d.	10.2	n.d.	0.1
Heliotridine	-	n.d.	n.d.	n.d.
Supinidine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Other alkaloids</b>				
Ephedrine	-	n.d.	n.d.	n.d.
Nicotine	n.d.	2.3	0.3	0.4
Atropine	18.9	29.1	0.3	n.d.
<b>Other substrates</b>				
Dimethylaniline	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cysteamine	n.d.	7.0	0.5	0.1
L-Cysteine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hydroxylamine	-	n.d.	n.d.	n.d.
Glutathione	37.0	n.d.	n.d.	n.d.

n.d., not detectable; -, not tested.  
PA N-oxygenase (ZvPNO) and two related FMOs of *Z. variegatus* (ZvFMOa and ZvFMOc) have been assayed in comparison to the previously characterized recombinant PA N-oxygenase (GgPNO) of *G. geneura* (Arctiidae, Lepidoptera) [17].  
doi:10.1371/journal.pone.0031796.t002

**Table 3.** Enzyme kinetics of recombinant ZvPNO.

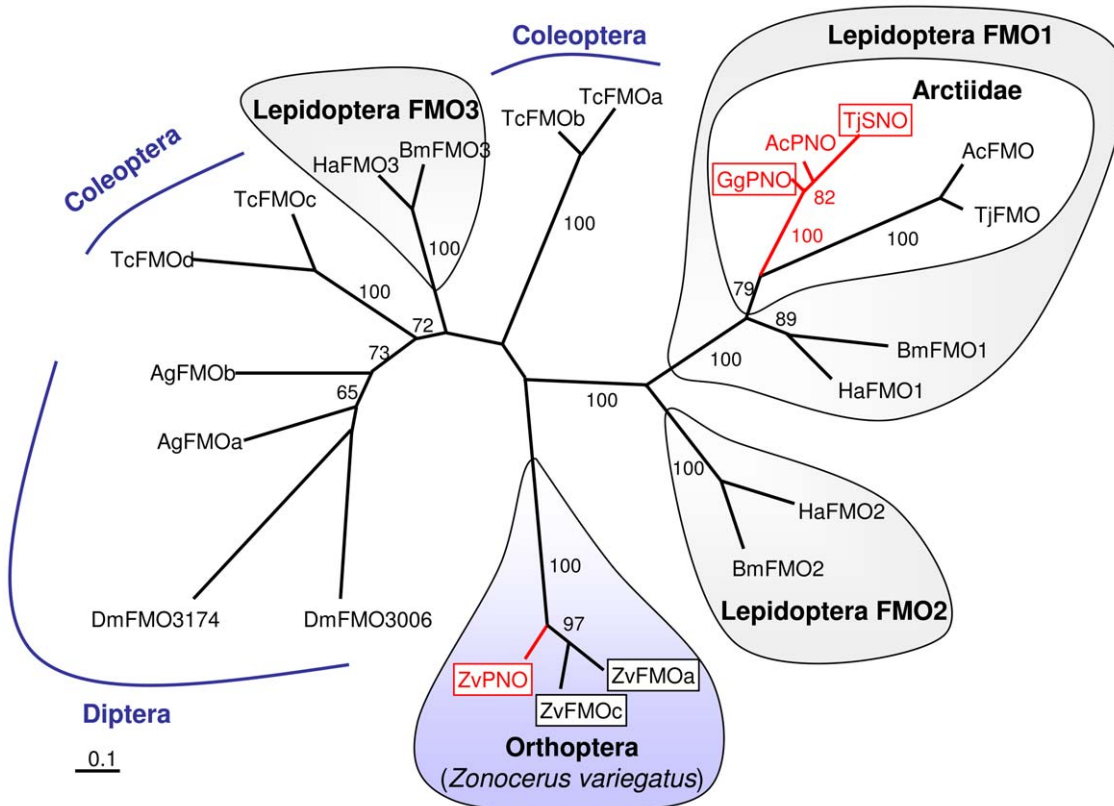
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ (nkat/mg)	$k_{cat}$ (1/s)	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{s}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{l}$ )
senecionine	1.08±0.07	20.73±0.24	0.99	916 666
monocrotaline	11.93±0.76	19.99±0.40	0.96	80 469
heliotrine	263.89±10.06	2.49±0.03	0.12	454
phalaenopsine	837.61±77.37	2.66±0.11	0.13	155
atropine	9.83±1.04	7.68±0.23	0.37	37 640

For calculations a molecular mass of ZvPNO of 47793 g/mol was used.  
doi:10.1371/journal.pone.0031796.t003

and *A. gambiae*) and of *Z. variegatus*, two clusters for the sequences of *Tribolium castaneum*, and three separate clusters for lepidopteran sequences, recently termed FMO1 to FMO3 [17]. Within the Lepidoptera, gene duplication events have been shown to be responsible for the separation of the related FMO1 and FMO2 cluster and, within the Arctiids, for two separated clusters, of which one encodes the PA *N*-oxygenases [17]. The tree topology clearly supports two independent origins of PA *N*-oxygenizing enzymes in insects, one early in the arctiid lineage and one in grasshoppers.

**Discussion**

Our studies show that, in Arctiids and in the grasshopper *Z. variegatus*, FMOs were recruited independently as *N*-oxygenases for the safe handling of plant-derived PAs in these insects. Therefore, PA *N*-oxygenation in insects seems to be a unique feature of FMOs. Of note, CYPs in insects form a far larger gene family than FMOs (the genomes of *D. melanogaster* and *B. mori* encode 83 and 86 putative CYPs, respectively, in contrast to only 2 and 3 putative FMOs, respectively [12,17,31,32]) and are well-known for their importance in the metabolism of natural and artificial xenobiotics, including insecticides [33]. Specific and inducible CYP-encoding genes in *Papilio* butterflies (Papilionidae, Lepidoptera) for the detoxification of furanocoumarins represent only one of several fascinating examples of gene evolution during adaptation of insects to plant allelochemicals [34,35]. The array of substrates of the respective enzymes has been shown to be correlated with the feeding habits of the insects, *i.e.*, a broad substrate specificity in generalists that feed on a wide diversity of host plants containing a broad spectrum of allelochemicals, and a narrow substrate specificity in specialist insects that feed on only one or a few plant species [36]. The same has been shown for FMOs involved in PA *N*-oxygenation of a specialist and a generalist arctiid species [17]. Concretely, the respective enzyme of the specialist *T. jacobaeae* is highly specific for PAs of the toxic senecionine type, the



**Figure 2.** Unrooted maximum-likelihood tree of amino acid sequences derived from cDNA encoding FMOs of various insect species. Framed sequences were heterologously expressed and functionally analyzed. The other sequences should be regarded as putative FMO-coding cDNA. Branch lengths are proportional to the number of amino acid substitutions per site (scale: 0.1 substitutions per site). Bootstrap proportions resulted from 1000 replicates and are given for values >50. Ac, *Arctia caja*; Ag, *Anopheles gambiae*; Bm, *Bombyx mori*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Gg, *Grammia geneura*; Ha, *Helicoverpa armigera*; Tc, *Tribolium castaneum*; Tj, *Tyria jacobaeae*; Zv, *Zonocerus variegatus*. Accession numbers for all sequences are listed in Figure S1.  
doi:10.1371/journal.pone.0031796.g002

predominant PA type of its almost exclusive food plant *Jacobaea vulgaris* (syn. *Senecio jacobaea*). In contrast, the *N*-oxygenase of the generalist *G. geneura* (Syn.: *G. incorrupta*) accepts a wider range of substrates, including the non-toxic 1,2-saturated PA phalaenopsine and the tropane alkaloid atropine [17]. Most interestingly, the substrate specificity of the PA *N*-oxygenase of *G. geneura* is almost identical to that and of the PNO of *Z. variegatus* that also accepts atropine as a substrate. We postulate that the almost identical substrate specificity of the PA *N*-oxygenases of the two unrelated insects is the result of convergent evolution under identical selection pressure of generalist feeding. The wide substrate specificity of the PA *N*-oxygenase of *Z. variegatus* correlates with the extremely polyphagous behavior of this grasshopper, which is ranked as one of the most important economically pests of agriculture in west and central Africa [37,38].

Of note, the *N*-oxygenation of PAs in specialized insects is not a detoxification mechanism that converts xenobiotics into more polar metabolites for efficient excretion from the body. Instead, this enzymatic conversion allows the sequestration of these plant toxins in a deactivated, metabolically safe form [5]. The recruitment of an enzyme that catalyzes PA *N*-oxygenation can be regarded as a “key innovation” during the insect’s adaptation to PA-containing food plants [17]. In arctiids, this enzyme was the prerequisite for the evolution of several further, highly specific adaptations, such as the positive feeding response triggered by traces of PAs sensed by specialized taste receptors, the ability to transfer the alkaloids from the larvae to the adult stage, and the insect’s behavior that ensures optimal egg protection by PAs of both parents governed by PA-derived pheromones [5,39].

The high degree of sequence identity of the PA *N*-oxygenase to two further FMOs identified from *Z. variegatus*, and the fact that the latter two enzymes are also able to catalyze the *N*-oxygenation of alkaloids, albeit with a much lower specific activity, indicate the close relationship of these sequences. The data suggest a duplication of an ancestor gene encoding an FMO of unknown function that already possessed the ability to *N*-oxygenize PAs, most probably as a side activity. One of the gene copies was recruited and optimized for *N*-oxygenation of plant-derived PAs. The finding that PAs are strong phagostimulants for *Zonocerus* [40] suggests a central role of PAs in the insect’s ecology. Further research has to show whether

this is also the case for the *N*-oxygenation of further plant-derived toxins, such as atropine or nicotine, that are accepted as a substrate by the PNO of *Z. variegatus*.

## Supporting Information

**Figure S1 Amino acid alignment of flavin-dependent monooxygenases of various insect species.** Only the central part of the alignment that was used for the estimation of the phylogenies is shown, spanning the region from amino acid position 5 to 402 with respect to *Zv*PNO. The sequence motifs for binding of FAD and NADPH and the FMO-identifying sequence are boxed. The accession numbers of the three FMO sequences of *Zonocerus variegatus* and of all sequences taken from the databases are given at the end of the alignment. (PDF)

**Figure S2 PNO activity in three buffer systems with pH variation.** Enzyme activities have been determined with senecionine as substrate at 37°C. (PDF)

**Table S1 Sequences of primers used for the identification and cloning of cDNAs of flavin-dependent monooxygenases of *Zonocerus variegatus*.** Recognition sites of restriction endonucleases used for cloning are underlined. (DOC)

## Acknowledgments

We thank S. Adom, P. Adjei, and U. S. Issah for the identification and collection of *Zonocerus* individuals at Ghana, M. Doose and B. Schemmerling for her excellent technical assistance, C. Theuring (Technical University Braunschweig) for providing us most of the substrates, M. Schilhabel (IKMB, Kiel University) for sequencing support, and T. Hartmann for helpful discussions.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LW DO JT. Performed the experiments: LW TB. Analyzed the data: LW TB DO. Contributed reagents/materials/analysis tools: JT TB. Wrote the paper: DO. LC-MS experiments: TB.

## References

- Hartmann T, Ober D (2008) Defense by pyrrolizidine alkaloids: developed by plants and recruited by insects. In: Schaller A, ed. Induced Plant Resistance to Herbivory. Berlin: Springer Science+Business Media B.V. pp 213–231.
- Mattocks AR (1986) Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids. London: Academic Press.
- Langel D, Ober D (2011) Evolutionary recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for stabilization of sequestered pyrrolizidine alkaloids in arctiids. *Phytochemistry* In Press. DOI: 10.1016/j.phytochem.2010.1012.1014.
- Hartmann T, Ober D (2000) Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. In: Leeper FJ, Vederas JC, eds. Topics in Current Chemistry. Berlin, Heidelberg: Springer. pp 207–244.
- Hartmann T (2009) Pyrrolizidine alkaloids: the successful adoption of a plant chemical defense. In: Conner WE, ed. Tiger Moths and Woolly Bears Behavior, Ecology, and Evolution of the Arctiidae. New York: Oxford University Press. pp 55–81.
- Hartmann T, Theuring C, Witte L, Pasteels JM (2001) Sequestration, metabolism and partial synthesis of tertiary pyrrolizidine alkaloids by the neotropical leaf-beetle *Platyphora boucardi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 1041–1056.
- Pasteels JM, Rowell-Rahier M, Randoux T, Brackman JC, Daloze D (1988) Pyrrolizidine alkaloids of probable host-plant origin in the pronotal and elytral secretion of the leaf beetle *Oreina cacaliae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 49: 55–58.
- Ehmke A, Rowell-Rahier M, Pasteels JM, Hartmann T (1991) Sequestration of ingested <sup>14</sup>C-senecionine *N*-oxide in the exocrine defensive secretions of chrysomelid beetles. *Journal of Chemical Ecology* 17: 2367–2380.
- von Nickisch-Roseneck E, Wink M (1993) Sequestration of pyrrolizidine alkaloids in several arctiid moths (Lepidoptera: Arctiidae). *Journal of Chemical Ecology* 19: 1889–1903.
- Rothschild M, Aplin RT, Cockrum PA, Edgar JA, Fairweather P, et al. (1979) Pyrrolizidine alkaloids in arctiid moths (Lep.) with a discussion on host plant relationships and the role of these secondary plant substances in the Arctiidae. *Biological Journal of the Linnean Society* 12: 305–326.
- Hartmann T, Biller A, Witte L, Ernst L, Boppré M (1990) Transformation of plant pyrrolizidine alkaloids into novel insect alkaloids by arctiid moths (Lepidoptera). *Biochemical Systematics and Ecology* 18: 549–554.
- Naumann C, Hartmann T, Ober D (2002) Evolutionary recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for the detoxification of host plant-acquired pyrrolizidine alkaloids in the alkaloid-defended arctiid moth *Tyria jacobaea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 6085–6090.
- Lindigkeit R, Biller A, Buch M, Schiebel HM, Boppré M, et al. (1997) The two faces of pyrrolizidine alkaloids: The role of the tertiary amine and its *N*-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. *European Journal of Biochemistry* 245: 626–636.
- Dobler S, Haberer W, Witte L, Hartmann T (2000) Selective sequestration of pyrrolizidine alkaloids from diverse host plants by *Longitarsus* flea beetles. *Journal of Chemical Ecology* 26: 1281–1298.
- Narberhaus I, Theuring C, Hartmann T, Dobler S (2003) Uptake and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in *Longitarsus* flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) adapted and non-adapted to alkaloid-containing host plants. *Journal of Comparative Physiology B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 173: 483–491.
- Bernays EA, Edgar JA, Rothschild M (1977) Pyrrolizidine alkaloids sequestered and stored by the aposomatic grasshopper, *Zonocerus variegatus*. *Journal of Zoology* 182: 85–87.
- Schlmeier S, Wang L, Langel D, Heckel DG, Mohagheghi H, et al. (2010) Flavin-dependent monooxygenases as a detoxification mechanism in insects: new insights from the arctiids (Lepidoptera). *PLoS One* 5: e10435.



18. Cashman JR (2005) Some distinctions between flavin-containing and cytochrome P450 monooxygenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338: 599–604.
19. Huan J-Y, Miranda CL, Buhler DR, Cheeke PR (1998) Species differences in the hepatic microsomal enzyme metabolism of the pyrrolizidine alkaloids. *Toxicology Letters* 99: 127–137.
20. Williams DE, Reed RL, Kedzierski B, Ziegler DM, Buhler DR (1989) The role of flavin-containing monooxygenase in the *N*-oxidation of the pyrrolizidine alkaloid senecionine. *Drug Metabolism and Disposition* 17: 380–386.
21. Ober D, Hartmann T (1999) Deoxyhypusine synthase from tobacco: cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of an enzyme with extended substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry* 274: 32040–32047.
22. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876–4882.
23. Felsenstein J (2005) PHYLIP, Phylogeny Inference Package (Univ. of Washington, Seattle), Version 3.6.
24. Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8: 275–282.
25. Cashman JR (1995) Structural and catalytic properties of the mammalian flavin-containing monooxygenase. *Chemical Research in Toxicology* 8: 165–181.
26. Fraaije MW, Kamerbeek NM, van Berkel WJH, Janssen DB (2002) Identification of a Baeyer-Villiger monooxygenase sequence motif. *FEBS Letters* 518: 43–47.
27. Eswaremoorthy S, Bonanno JB, Burley SK, Swaminathan S (2006) Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 9832–9837.
28. Alfieri A, Malito E, Orru R, Fraaije MW, Mattevi A (2008) Revealing the moonlighting role of NADP in the structure of a flavin-containing monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 6572–6577.
29. Phillips IR, Dolphin CT, Clair P, Hadley MR, Hutt AJ, et al. (1995) The molecular biology of the flavin-containing monooxygenases of man. *Chemico-Biological Interactions* 96: 17–32.
30. Chapman RF, Page WW, McCaffery AR (1986) Bionomics of the variegated grasshopper (*Zonocerus variegatus*) in West and Central Africa. *Annual Review of Entomology* 31: 479–505.
31. Tijet N, Helvig C, Feyereisen R (2001) The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: Annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene* 262: 189–198.
32. Ai J, Yu Q, Cheng T, Dai F, Zhang X, et al. (2010) Characterization of multiple *CYP9A* genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Molecular Biology Reports* 37: 1657–1664.
33. Feyereisen R (2005) Insect Cytochrome P450. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS, eds. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Amsterdam: Elsevier. pp 1–77.
34. Hung CF, Berenbaum MR, Schuler MA (1997) Isolation and characterization of CYP6B4, a furanocoumarin-inducible cytochrome P450 from a polyphagous caterpillar (Lepidoptera: Papilionidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27: 377–385.
35. Li W, Schuler MA, Berenbaum MR (2003) Diversification of furanocoumarin-metabolizing cytochrome P450 monooxygenases in two papilionids: Specificity and substrate encounter rate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 Suppl 2: 14593–14598.
36. Li X, Baudry J, Berenbaum MR, Schuler MA (2004) Structural and functional divergence of insect CYP6B proteins: From specialist to generalist cytochrome P450. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 2939–2944.
37. Bernays EA, Chapman RF (2000) Plant secondary compounds and grasshoppers: beyond plant defenses. *Journal of Chemical Ecology* 26: 1773–1794.
38. Kekeunou S, Weise S, Messi J, Tamo M (2006) Farmers' perception on the importance of variegated grasshopper (*Zonocerus variegatus* (L.)) in the agricultural production systems of the humid forest zone of Southern Cameroon. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2: 17.
39. Eisner T, Meinwald J (1995) The chemistry of sexual selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 50–55.
40. Boppré M, Fischer OW (1994) *Zonocerus* und *Chromolaena* in West Africa. A chemocological approach towards pest management. In: Krall S, Wilps H, eds. *New Trends in Locust Control*. Eschborn: GTZ. pp 107–126.



## 4 PROJEKTTEIL III

### Induktion und Lokalisation der FMOs in Arctiiden und Orthoptera

#### 4.1 Einleitung

In einem Ökosystem interagieren Pflanzen und Insekten auf vielfältige Art und Weise. Sehr komplexe Interaktionen von Pflanzen und Insekten haben sich im Verlauf der Evolution ausgebildet, um das Überleben der jeweiligen Art zu sichern, wobei die Pflanzen stetig ihre Strategien zur Verteidigung optimieren und die Insekten auf der anderen Seite ihre Strategien anpassen müssten. Die Pflanzen entwickelten nicht nur morphologische Strukturen für die physische Verteidigung wie Dornen, Stacheln und Trichome, Kutikula (auch für die Verdunstungsschutz), Wachsfilme und Kristalle, sondern auch chemische Verteidigungsmechanismen, wie toxische Sekundärmetabolite (Howe und Schaller, 2002). Green und Ryan, (1972) konnten früh zeigen, dass in Tomaten und Kartoffeln durch Insekten vermittelte Schäden oder mechanische Verwundung induzierbare Proteinase-Inhibitoren als eine direkte Verteidigung gegen Herbivoren akkumuliert werden. Besonders imponieren die Pflanzen durch die von ihnen gebildeten, vielfältigen, nicht ubiquitär auftretenden und sogar artspezifischen Sekundärstoffe in der Abwehr von Mikroorganismen, Viren und Herbivoren. Die biologische Funktion pflanzlicher Sekundärstoffe ist häufig erst im Wechselspiel mit schädigenden Organismen zu verstehen. Ein typisches Beispiel stellt eine *Nicotiana*-Art (*Nicotiana attenuata*) dar, die auf Fraßschäden verschiedener Insekten mit einer erhöhten Bildung von Nicotin reagieren kann. Dieses Alkaloid wird offenbar nach Induktion durch Schädigungen vermehrt gebildet und soll in höherer Konzentration weitere Fraßschäden unterbinden (Halitschke et al., 2001). Jedoch ist es Insekten im Verlauf einer Koevolution mit den sekundärstoffhaltigen Pflanzen gelungen, diese Barrieren zu überwinden. So können die Raupen von *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) die Nicotin-haltigen Blätter von *N. attenuata* verdauen, ohne geschädigt zu werden. Das enthaltene Nicotin können sie zur eigenen Verteidigung nutzen (Kessler und Baldwin, 2002). *N. attenuata* hat im

Gegenzug eine weitere Abwehrstrategie entwickelt. Nach dem Angriff von *M. sexta* wird Ethylen produziert und dadurch direkt die Nikotin-Biosynthese inhibiert. Das Nicotin in *N. attenuata* wird nicht induziert, um die Abwehrfähigkeit von *M. sexta* gegen Fraßfeinde herabzusetzen (Winz und Baldwin, 2001). Diese Fraßfeinde werden durch Duftsignale der Tabakpflanze gezielt angelockt. An der Interaktion von *N. attenuata* und *M. sexta* läßt sich der wechselseitige Wettkampf von Pflanze und Fraßfeind erkennen (Kessler und Baldwin, 2002). Durch die vorangegangene Fütterung von Nicotin konnte eine Induzierbarkeit und erhöhte enzymatische Aktivität des CYP450-Enzyms (CYP4- und CYP9-Familien) in Darm aus *M. sexta* nachgewiesen werden (Snyder et al., 1993; Stevens et al., 2000). Nach einer Fütterung mit Blättern der Gattung *Nicotiana* mit einer hohen Nicotinkonzentration (0,75%) wurden 9 von 12 mikrosomalen Enzymen in Mitteldarm 1,4 bis 10-fach stärker gebildet. Die gesamte Expression der CYP450s und der NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase (Cytochrom c reductase) wurden ebenfalls erhöht.

PAs werden als Sekundärstoffe in Pflanzen gegen Herbivoren gebildet. Es ist bekannt, dass einige PA-adaptierte Insekten nicht nur PAs sequestrieren können, sondern diese zur eigenen Verteidigung einsetzen. Einige Insektenarten können durch PNOs die toxischen PAs in für sie ungiftige PA-N-Oxide überführen. Interessant ist nun, ob solche FMOs in Insekten auch durch PAs induzierbar sind. Um dies zu untersuchen, wurden die folgenden Arbeiten mit einem Generalisten der Arctiiden, *A. caja*, und einem Generalisten der Heuschrecken, *Z. variegatus*, durchgeführt.

Neben der Induktion der FMOs wurde in diesem Projektteil auch die Lokalisation der FMOs in Arctiiden und Orthoptera untersucht. Aus verschiedenen Arctiiden konnten SNOs aus der Hämolymphe isoliert werden. Nach der Identifizierung der cDNA aus *T. jacobaeae*, *G. geneura* und *A. caja* konnten N-terminale Signalsequenzen prognostiziert werden, die auf einen vesikulären Transport der SNOs hindeuten (Naumann, 2003; Sehlmeier, 2010). Werden die SNOs von Hämocyten der Hämolymphe exprimiert oder werden sie von Zellen anderer Gewebe exprimiert und danach in die Hämolymphe abgegeben? Naumann (2003) konnte den Fettkörper als bevorzugtes

Expressionsgewebe der SNO in *T. jacobaeae* identifizieren. Sehmeyer (2010) konnte beweisen, dass die Transkription der PNO bei *A. caja* nicht nur im Fettkörper, sondern darüber hinaus auch im Kopf stattfindet. Um zu prüfen und vergleichen, ob die SNO nur im Fettkörper oder auch in anderen Geweben (z.B. Kopf) exprimiert wird, sollte die Lokalisation der SNO in *T. jacobaeae* noch mal detaillierter untersucht werden. Von Interesse ist auch, wie sich die Gewebespezifität der Expression in einem Spezialisten der Arctiiden, *T. jacobaeae*, und einem Generalisten der Heuschrecken, *Z. variegatus*, unterscheidet.

Von den drei identifizierten FMOs aus *Z. variegatus* dient eine zur Detoxifizierung der PAs. Bei verschiedenen Arctiiden konnten SNOs in der Hämolymphe isoliert werden. Für *Z. variegatus* (Orthoptera) gab es Hinweise, die PNO-Aktivität nicht mit der Hämolymphe, sondern mit dem Fettkörper verbunden ist (Biller, 1993; Lindigkeit et al., 1997). Die drei FMOs (ZvFMOa, ZvFMOc, ZvPNO) in *Z. variegatus* sind allerdings lösliche cytosolische Enzyme ohne Signalpeptid für den vesikulären Transport des Proteins. Auch Membrandomänen sind nicht nachgewiesen. Es stellt sich die Frage, ob die FMOs in *Z. variegatus* direkt im Fettkörper oder von Zellen anderer Gewebe exprimiert werden. Von Interesse ist auch, ob und in wie fern eine Gabe von PAs zu einem Unterschied der Gewebespezifität der Expression der drei FMOs bei *Z. variegatus* führt.

## 4.2 Material und Methoden

### 4.2.1 Herkunft und Haltung der Insekten

Eine Reihe verschiedener PA-adaptierter Insekten wurden im Rahmen dieses Projektteils untersucht.

#### Arctia caja L.

Die Larven (in mittleren Häutungsstadium) von *A. caja* wurden aus Zuchten der Universität Hamburg bezogen. Als Futtermaterial dienten Löwenzahnblätter aus der Umgebung des Instituts. Die Tiere wurden unter den gleichen Bedingungen wie *T. jacobaeae* bei 20-25 °C gehalten.

#### Zonocerus variegatus L.

Die Larven (im mittleren Häutungsstadium) von *Z. variegatus* wurden in der Nähe von Accra (Ghana) gesammelt und nach Kiel transportiert. Die Tiere wurden in einem Umluftraum der Tierstätte bei 20-25 °C und bei Hell-Dunkel-Wechsel von 16 und 8 Stunden gehalten. Eigelege wurden in feuchtem Sand in einer konstanten Temperatur von 30 °C inkubiert. Larven und Adulte wurden mit Blättern von *Rubus fruticosus* gefüttert.

#### Tyria jacobaeae L.

Die Larven (5. / 6. Larvenstadium) der *T. jacobaeae* wurden im Juli 2008 in Meijendal, einer Dünenlandschaft in der Nähe von Leiden/Niederlande, gesammelt und nach Braunschweig gebracht. *S. jacobaea* aus der Umgebung des Instituts wurden als Futter verwendet. Im Labor wurden die Tiere unter Umluftbedingungen bei 20-25 °C gehalten.

#### Besondere Fütterung:

Für die Induktion mit PAs wurden je zwei Gruppen der Insekten untersucht, von denen eine Gruppe mit PA-freien Brombeerblättern, die andere Gruppe mit PA-haltigen Blüten und Blättern von *S. jacobaea* eine Woche lang gefüttert wurde.

#### 4.2.2 Reverse-Transkription-(RT)-PCR

Gesamt-RNA wurde aus frischen Larven oder spezifischen Larven-Geweben mit der TRIZOL®-Methode isoliert (Kapitel 5.2.2). Für die cDNA-Synthese (copy DNA) wurde 1 µg Gesamt-RNA in der reversen Transkription eingesetzt. cDNA wurde mit dem Oligo(dT)-Primer (5'-dGTC GAC TCG AGA ATT CTT (TTT)<sub>5-3'</sub>) mittels der Reversen Transkriptase Superscript III (Invitrogen) synthetisiert. Um die Bildung von unspezifischen Amplifikaten durch mögliche Kontaminationen auszuschließen, wurde eine Negativkontrolle verwendet, bei der ein aquivalentes Volumen Wasser statt cDNA für PCR-Ansatz eingesetzt wurde. Genspezifische Primer (Tab. 4-1, 4-2, 4-3 und 4-4) wurden für die Amplifizierung der FMOs in der RT-PCR verwendet. Die PCR erfolgte in einem 50 µl Ansatz. Während der 35 Zyklen wurden 5 µl Aliquots nach 10, 15, 20, 25, 30 und 35 Zyklen entnommen und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

**Tab. 4-1: Verwendete RT-PCR Primer für Induktion der FMOs in *A. caja***

**Primer 4-1:**

5'-dTATAATTAATGCAATCTAGCCCAACGTCTCGAGTAT-3' T<sub>m</sub>=66,1 °C

**Primer 4-2:**

5'-dTATAGTCGACGTCGTCAAAAGGACATATTTCTTTACTTG-3' T<sub>m</sub>=67,4 °C

**Tab. 4-2: Verwendete RT-PCR Primer für Induktion der FMOs in *Z. variegatus*****ZvFMOa:****Primer 4-3:**5'-dTATACATATGCGTCAGGTCGCTGTATTGGGAGCA-3' T<sub>m</sub>= 69,5 °C**Primer 4-4:**5'-dTATCTCGAGTATCTTTTCATAATTTTCGTTGTGCGACAAT-3' T<sub>m</sub>= 65,2 °C**ZvFMOc:****Primer 4-5:**5'-dTATACATATGCGTCGGGTGGCTGTATTGGGAGC-3' T<sub>m</sub>= 70,7 °C**Primer 4-6:**5'-dTATCTCGAGGTATATCTTTTTATAATTTTCGTTGTGCGATT-3' T<sub>m</sub>= 64,3 °C**ZvPNO:****Primer 4-7:**5'-dTATAGGTCTCACATGCGTCGGGTGGCTGTATTGGGAG-3' T<sub>m</sub>= 73,9 °C**Primer 4-8:**5'-dTATAGCGGCCGCGTATATCTTTTTATAATTTTCGTTGTGCGATA-3' T<sub>m</sub>= 68,5 °C**Primer 4-9:**5'-dATGTGGTGTACTGTAGACGAGAAGTA-3' T<sub>m</sub>= 61,9 °C**Primer 4-10:**5'-dGTGTGTACACATTTAGAATATCACTAAATCTC-3' T<sub>m</sub>= 61,8 °C

**Tab. 4-3: Verwendete RT-PCR Primer für Lokalisation der FMOs in *T. jacobaeae*****Primer 4-11:**

5'-dTATATAGGTCTCCTCGAGAAAAGAAGTTCAGCGTCTCGAGTATGCATTATT-3'

T<sub>m</sub>=72,6°C**Primer 4-12:**

5'-dTATAAGATCTCTAATGGTGATGGTGATGGTGATCGTCATAGGGACATACTTCTTCCCTT-3'

T<sub>m</sub>=75°C**Tab. 4-4: Verwendete RT-PCR Primer für Lokalisation der FMOs in *Z. variegatus*:****ZvFMOa:****Primer 4-13:**5'-dCTTTCAGAAATAGACGGGTACTGGTAA-3' T<sub>m</sub>= 61,9 °C**Primer 4-14:**5'-dTATCTCGAGTATCTTTTCATAATTTTCGTTGTCGACAAT-3' T<sub>m</sub>= 63,4 °C**ZvFMOc:****Primer 4-15:**5'-dCTTCTGGACATGAACTGGCTCTTGT-3' T<sub>m</sub>= 63 °C**Primer 4-16:**5'-dTATCTCGAGGTATATCTTTTTATAATTTTCGTTGTCGATT-3' T<sub>m</sub>= 60,7 °C**ZvPNO:****Primer 4-17:**5'-dAGGTTTTGAAGTACTTTGATAACTTCAC-3' T<sub>m</sub>= 60,7 °C**Primer 4-18:**5'-dATGTGGTGTTACTGTAGACGAGAAGTA-3' T<sub>m</sub>= 61,9 °C**Primer 4-19:**5'-dTGTACACATTTAGAATATCACTAAATCTC-3' T<sub>m</sub>= 61,8 °C

Die RT-PCR wurde mit der Platinum®*Pfx*-DNA-Polymerase (Invitrogen) und mit dem Temperaturprogramm 1 oder mit der GoTaq®-DNA-Polymerase (Promega) und mit dem Temperaturprogramm 2 durchgeführt.

Temperaturprogramm 1:

<u>94 °C</u>	<u>5 min</u>	}	35 Zyklen
94 °C	45 sec		
55 °C	1,5 min		
<u>68 °C</u>	<u>4 min</u>		
68 °C	10 min		

Temperaturprogramm 2:

<u>95 °C</u>	<u>2 min</u>	}	35 Zyklen
95 °C	30 sec		
56 °C	1 min		
<u>68 °C</u>	<u>4 min</u>		
68 °C	10 min		



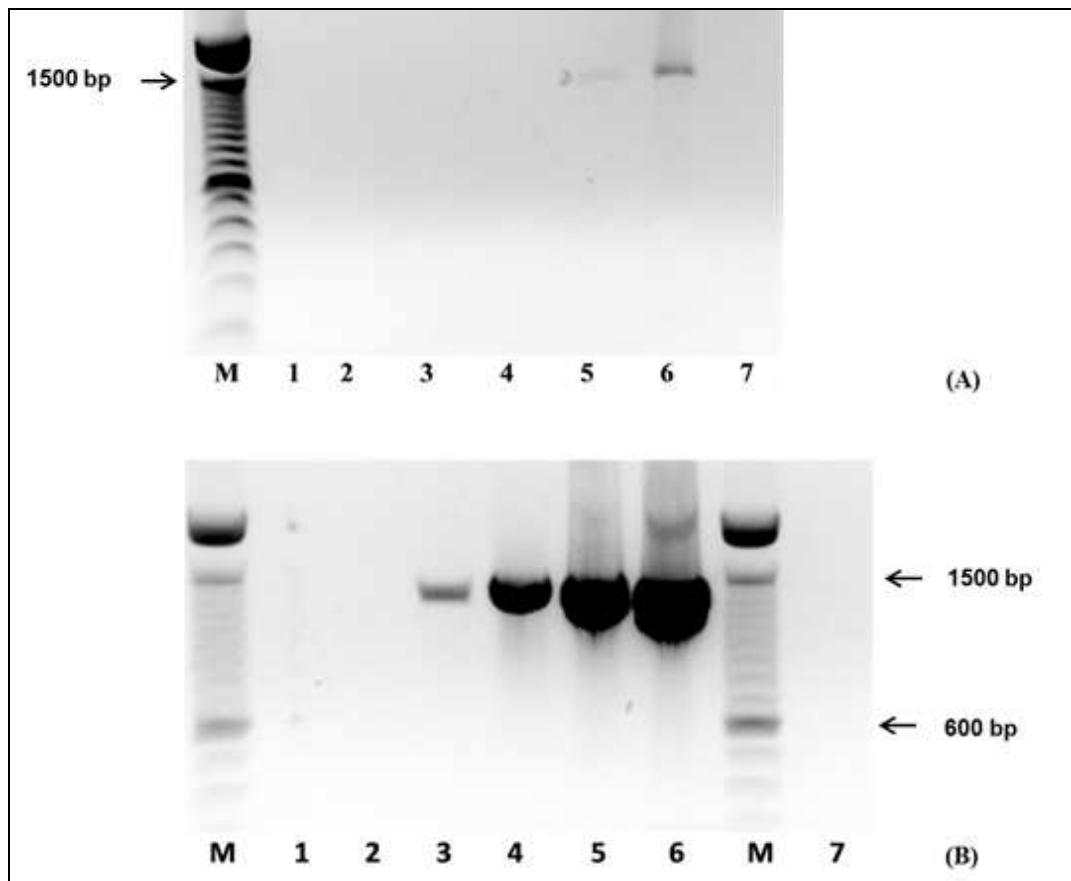
## 4.3 Ergebnisse

### 4.3.1 Induktion der PNO in Insekten

#### 4.3.1.1 Induktion der PNO in *A. caja* (Arctiiden)

Um zu untersuchen, ob das für die PA-Detoxifizierung verantwortliche Enzym, die PNO, induzierbar ist, wurden Raupen mittels einer Reverse-Transkription-(RT)-PCR untersucht. Hierfür wurden zwei Gruppen von *A. caja*-Raupen unterschiedlich gefüttert. Eine Gruppe wurde mit PA-freien Brombeerblättern gefüttert, die andere Gruppe mit PA-haltigen Blüten und Blättern von *S. jacobaea*. Nach einer Woche Fütterung wurde Gesamt-RNA aus ganzen Tieren isoliert, und cDNA synthetisiert (Kapitel 4.2.2). Forward Primer 4-1 und Reverse Primer 4-2 (Tab. 4-1 in Kapitel 4.2.2) wurden für die Amplifizierung einer PNO in der RT-PCR eingesetzt. Die RT-PCR wurde mit der Platinum®Pfx-DNA-Polymerase (Invitrogen) und mit dem Temperaturprogramm 1 (Kapitel 4.2.2) durchgeführt.

Abbildung 4.1 (A) und (B) zeigen die Ergebnisse dieser RT-PCR in *A. caja*. Das erste Amplifikat war nach Zyklus 20 im Ansatz der cDNA aus mit *S. jacobaea* gefütterten *A. caja* zu sehen. Im Vergleichsansatz der cDNA aus mit Brombeerblättern gefütterten Tieren entstand im gesamten untersuchten Zeitraum erst nach 35 Zyklen ein schwaches Amplifikat. Das früh und stark auftretende Amplifikat im Ansatz der cDNA aus mit PA-haltigen *S. jacobaea* gefütterten Tieren deutet darauf hin, dass die Expression der für die Detoxifizierung von PAs verantwortliche PNO in *A. caja* durch Kontakt mit PA-haltiger Nahrung induzierbar ist. Durch dieses induzierte Enzym erreicht *A. caja* eine erhöhte Entgiftungsfähigkeit gegen toxische PAs.



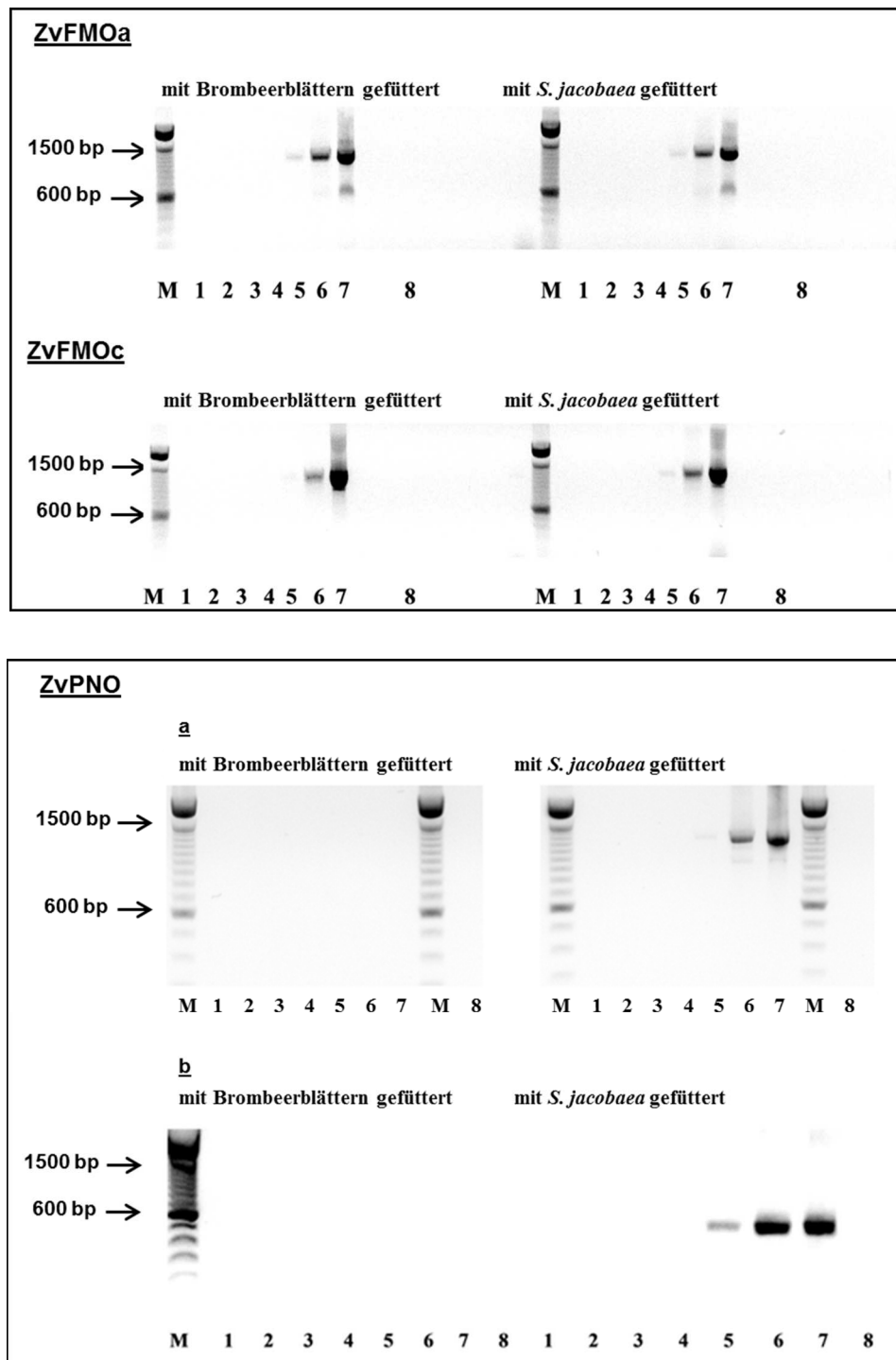
**Abbildung 4.1: RT-PCR mit cDNA aus mit Brombeerblättern gefütterten *A. caji* (A) und cDNA aus mit *S. jacobaea* gefütterten *A. caji* (B):** Mit den für die PNO spezifischen Primern 4-1 und 4-2 wurde RT-PCR bei zwei Gruppen *A. caji* durchgeführt. Eine Gruppe wurde mit PA-freien Brombeerblättern gefüttert und die andere Gruppe wurde mit PA-haltigen Blättern von *S. jacobaea* gefüttert. Jeweils nach 10, 15, 20, 25, 30 und 35 Zyklen wurden Aliquots von 5 µl entnommen und auf ein Agarosegel (1,0 %ig) aufgetragen. Färbung mit Ethidiumbromid. **M** = 100 bp Leiter, **1** = 10 Zyklen, **2** = 15 Zyklen, **3** = 20 Zyklen, **4** = 25 Zyklen, **5** = 30 Zyklen, **6** = 35 Zyklen **7** = Negativkontrolle (ein aquivalentes Volumen Wasser statt cDNA bei der PCR-Ansatz).

#### 4.3.1.2 Induktion der PNO in *Z. variegatus* (Orthoptera)

In *Z. variegatus* wurden drei FMOs identifiziert. Es sollte geklärt werden, ob alle drei durch PA-haltige Futterpflanzen induzierbar sind oder ob das möglicherweise nur für die Detoxifikation zuständige PNO der Fall ist. Um diese Frage zu beantworten, wurde ebenfalls eine RT-PCR durchgeführt. Dafür wurden zwei Gruppen von *Z. variegatus* wie bereits in Kapitel 4.3.1.1 für *A. caja* beschrieben durchgeführt. Als spezifische Primer zur Amplifizierung der FMOs durch RT-PCR wurden die Primer 4-3 und 4-4 für ZvFMOa, Primer 4-5 und 4-6 für ZvFMOc sowie Primer 4-7 und 4-8 (Ansatz a) und Primer 4-9 und Primer 4-10 (Ansatz b) für ZvPNO (Tab. 4-2 in Kapitel 4.2.2) eingesetzt.

Die RT-PCR für ZvFMOa und ZvFMOc wurde mit der Platinum®Pfx-DNA-Polymerase (Invitrogen) und mit dem Temperaturprogramm 1 durchgeführt. Für ZvPNO wurde mit der GoTaq®-DNA-Polymerase (Promega) und mit dem Temperaturprogramm 2 gearbeitet (Kapitel 4.2.2).

Abbildung 4.2 zeigen die unterschiedlichen Ergebnisse der RT-PCR für ZvFMOa, ZvFMOc und ZvPNO in *Z. variegatus*. Für ZvFMOa und ZvFMOc wurden die Amplifikate nach 25 Zyklen in beiden Gruppen sowohl aus mit *S. jacobaea* gefütterten auch mit Brombeerblättern gefütterten *Z. variegatus* gleichzeitig nachgewiesen. Mit PA-freien Brombeerblättern gefütterte *Z. variegatus* zeigt die gleich starke Expression von ZvFMOa und ZvFMOc im Vergleich zu mit PA-haltigen Pflanzen gefütterte *Z. variegatus*. Deshalb sind offensichtlich beide Enzyme, ZvFMOa und ZvFMOc, auch nicht durch PA-haltige Pflanzen induzierbar. Im Vergleichsansatz für ZvPNO sind deutlich Unterschiede zu sehen. Das erste Amplifikat war nach Zyklus 25 im Ansatz der cDNA aus mit *S. jacobaea* gefütterten *Z. variegatus* zu sehen. In weiteren Zyklen bis 35 wurde erwartungsgemäß mehr Amplifikat gebildet. Im Gegensatz dazu entstand im Ansatz der cDNA aus mit Brombeerblättern gefütterten Tieren auch nach maximaler Zyklenzahl kein Amplifikat. Dies deutet darauf hin, dass nur ZvPNO als für die Entgiftung zuständiges Enzym durch PA-haltige Pflanzen induzierbar ist. Damit wurde *Z. variegatus* erhöhte Entgiftungsfähigkeit gegen toxische PAs erhalten.



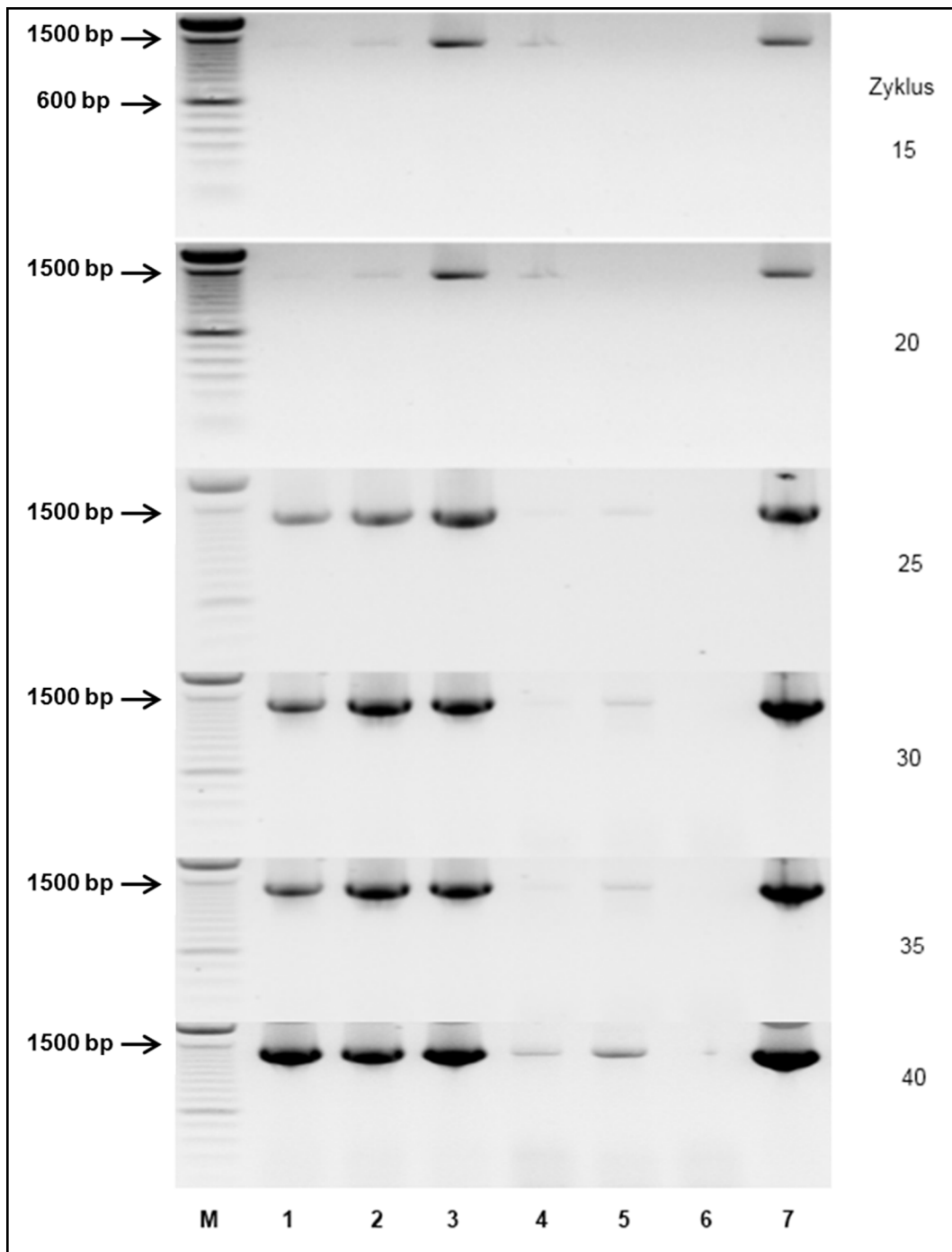
**Abbildung 4.2: RT-PCR mit cDNA aus mit Brombeurblättern gefütterten und mit *S. jacobaea* gefütterten *Z. variegatus*:** Mit den spezifischen Primern 4-3 und 4-4 für ZvFMOa, Primern 4-5 und 4-6 für ZvFMOc sowie Primern 4-7 und 4-8 (Ansatz a) und Primern 4-9 und 4-10 (Ansatz b) für ZvPNO wurden die RT-PCR durchgeführt. Jeweils nach 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 35 Zyklen wurden Aliquots von 5 µl entnommen und in einem Agarosegel (1,0 %ig) getrennt. Färbung mit Ethidiumbromid. **M** = 100 bp Leiter, **1** = 5 Zyklen, **2** = 10 Zyklen, **3** = 15 Zyklen, **4** = 20 Zyklen, **5** = 25 Zyklen, **6** = 30 Zyklen **7** = 35 Zyklen **8** = Negativkontrolle (ein äquivalentes Volumen Wasser statt cDNA beim PCR-Ansatz).

## 4.3.2 Lokalisation der SNO in Insekten

### 4.3.2.1 Gewebespezifische Expression der SNO in *T. jacobaeae*

Untersuchungen zur gewebespezifischen Expression der SNO in *T. jacobaeae*, besonders im Kopf, der Ort die Expression der SNO bis Moment nicht getestet, wurden an Raupen mittels RT-PCR durchgeführt. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Kopf, Fettkörper, Darm, Hämolymphe und Integument von frischen Raupen isoliert und die cDNA wurde wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben synthetisiert. Das Primerpaar Forward Primer 4-11 und Reverse Primer 4-12 wurde für die Amplifizierung der SNO in der RT-PCR eingesetzt (Tab. 4-3 in Kapitel 4.2.2). Die RT-PCR wurde mit der GoTaq-DNA-Polymerase (Promega) und mit dem Temperaturprogramm 2 (Kapitel 4.2.2) durchgeführt.

Abbildung 4.3 zeigt die Ergebnisse dieser RT-PCR in verschiedenen Geweben von *T. jacobaeae*. Das erste Amplifikat war nach Zyklus 15 im Ansatz der cDNA aus dem Fettkörper deutlich zu sehen. In Proben aus dem Kopf, Intergument und Hämolymphe traten vor 15 Zyklen nur schwache Amplifikate auf. Nach weiteren Zyklen traten Amplifikate auch in den anderen Ansätzen auf. Jeweils in Kopf, Intergument zeigte sich ab dem 25. Zyklus ein deutliches Signal. In den Ansätzen mit cDNA aus Darm waren Amplifikate erst nach 40 Zyklen deutlich zu sehen. Die Amplifikate im Integument könnten durch Verunreinigung des Gewebes mit Fettkörper während der Präparation zurückzuführen sein. Dieser ist eng mit dem Integument verbunden, was eine saubere Präparation erschwert. Das frühe und starke Auftreten eines Amplifikats im Ansatz der cDNA aus Fettkörper und Kopf deutet darauf hin, dass hier die Orte der stärksten Expression der SNO liegen.

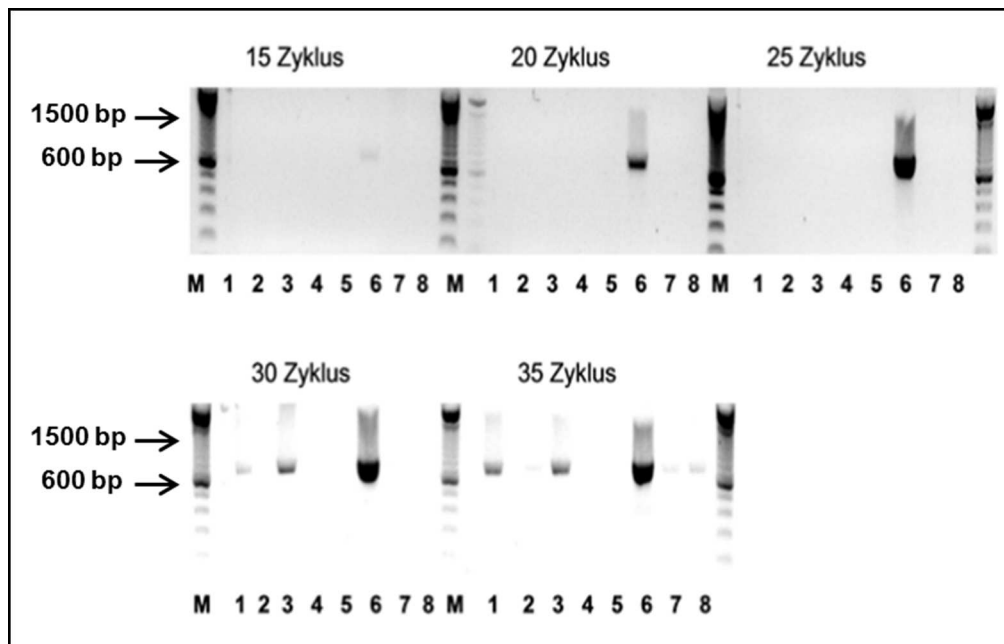
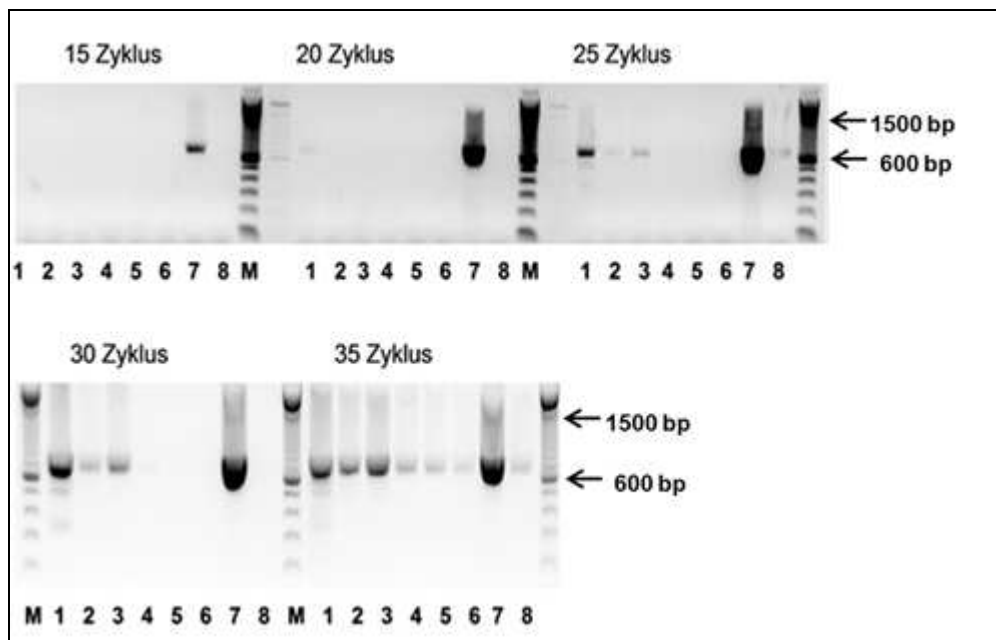


**Abbildung 4.3: RT-PCR mit cDNA aus verschiedenen Geweben aus *T. jacobaeae*:**

Mit SNO-spezifischen Forward Primer 4-11 und Reverse Primer 4-12 wurden 5 µl-Aliquots jeweils nach Zyklus 15, 20, 25, 30, 35 und 40 entnommen und in einem Agarosegel (1,5 %ig) getrennt. Färbung mit Ethidiumbromid. **M** = 100 bp Leiter, **1** = Kopf, **2** = Integument, **3** = Fettkörper, **4** = Hämolymphe, **5** = Darm, **6** = Negativkontrolle (mit Wasser statt cDNA), **7** = Positivkontrolle (Expressionskonstrukt mit cDNA von SNO aus *T. jacobaeae*).

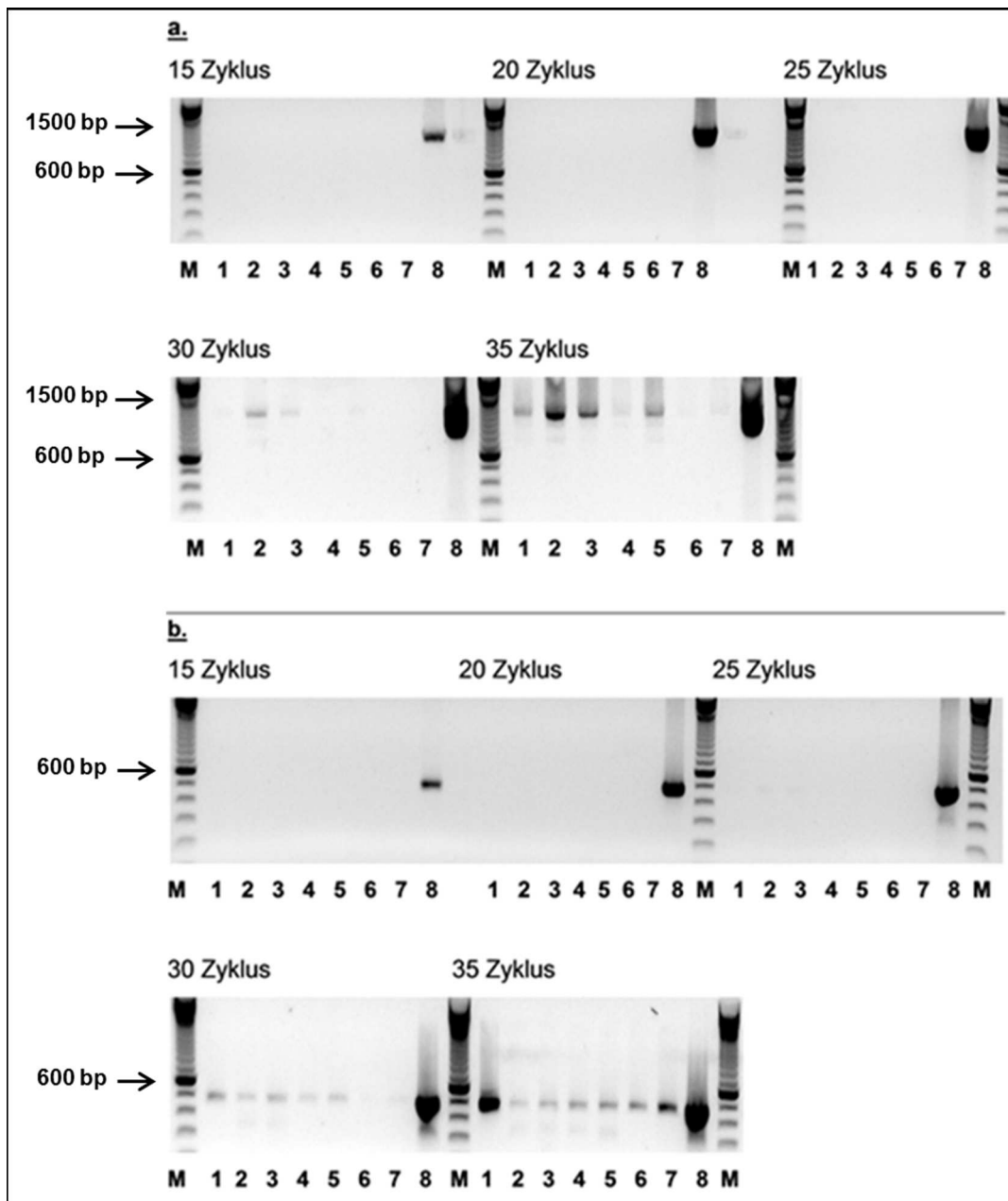
#### **4.3.2.2 Gewebespezifische Expression der FMOs in *Z. variegatus***

Von den drei identifizierten FMOs aus *Z. variegatus* dient eine, die PNO, zur Detoxifizierung der PAs. Von Interesse ist, ob und in wie fern eine Gabe von PAs zu einer Veränderung der Gewebespezifität der Expression der drei FMOs führt. Zu diesem Zweck wurden Tiere von *Z. variegatus* in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe wurde eine Woche mit der PA-haltigen Pflanze *S. jacobaea* gefüttert und die andere wurde mit PA-freien Brombeerblättern gefüttert. Danach wurden RT-PCRs für alle drei FMOs durchgeführt. Hierfür wurde zunächst Gesamt-RNA aus Fettkörper, Darm, Hämolymphe und Integument von frischen Raupen isoliert, und die cDNA wurde wie in Kapitel 4.2.2 synthetisiert. Zur Amplifizierung wurden genspezifische Primer eingesetzt: Primer 4-13 und 4-14 für ZvFMOa, Primer 4-15 und 4-16 für ZvFMOc und Primer 4-17 und 4-19 sowie Primerpaar 4-18 und 4-19 für ZvPNO (Tab. 4-4 in Kapitel 4.2.2). Die RT-PCR wurde mit der GoTaq-DNA-Polymerase (Promega) und mit dem Temperaturprogramm 2 (Kapitel 4.2.2) durchgeführt.

**ZvFMOa:****ZvFMOc:**

**Abbildung 4.4: RT-PCR mit cDNA aus verschiedenen Geweben von PA-induzierten *Z. variegatus*-Tieren:** Mit den für die FMOs spezifischen Primern 4-13 und 4-14 für ZnFMOa, Primern 4-15 und 4-16 für ZnFMOc wurden 5 µl-Aliquots jeweils nach Zyklus 15, 20, 25, 30 und 35 entnommen und in einem Agarosegel (1,5 %ig) getrennt. Färbung mit Ethidiumbromid. M = 100 bp Leiter, 1 = Kopf, 2 = Integument, 3 = Fettkörper, 4 = Eier, 5 = Darm, 6 = Kontrolle (Expressionskonstrukt mit cDNA von ZnFMOa), 7 = Kontrolle (Expressionskonstrukt mit cDNA von ZnFMOc), 8 = Kontrolle (Expressionskonstrukt mit cDNA von ZvPNO).



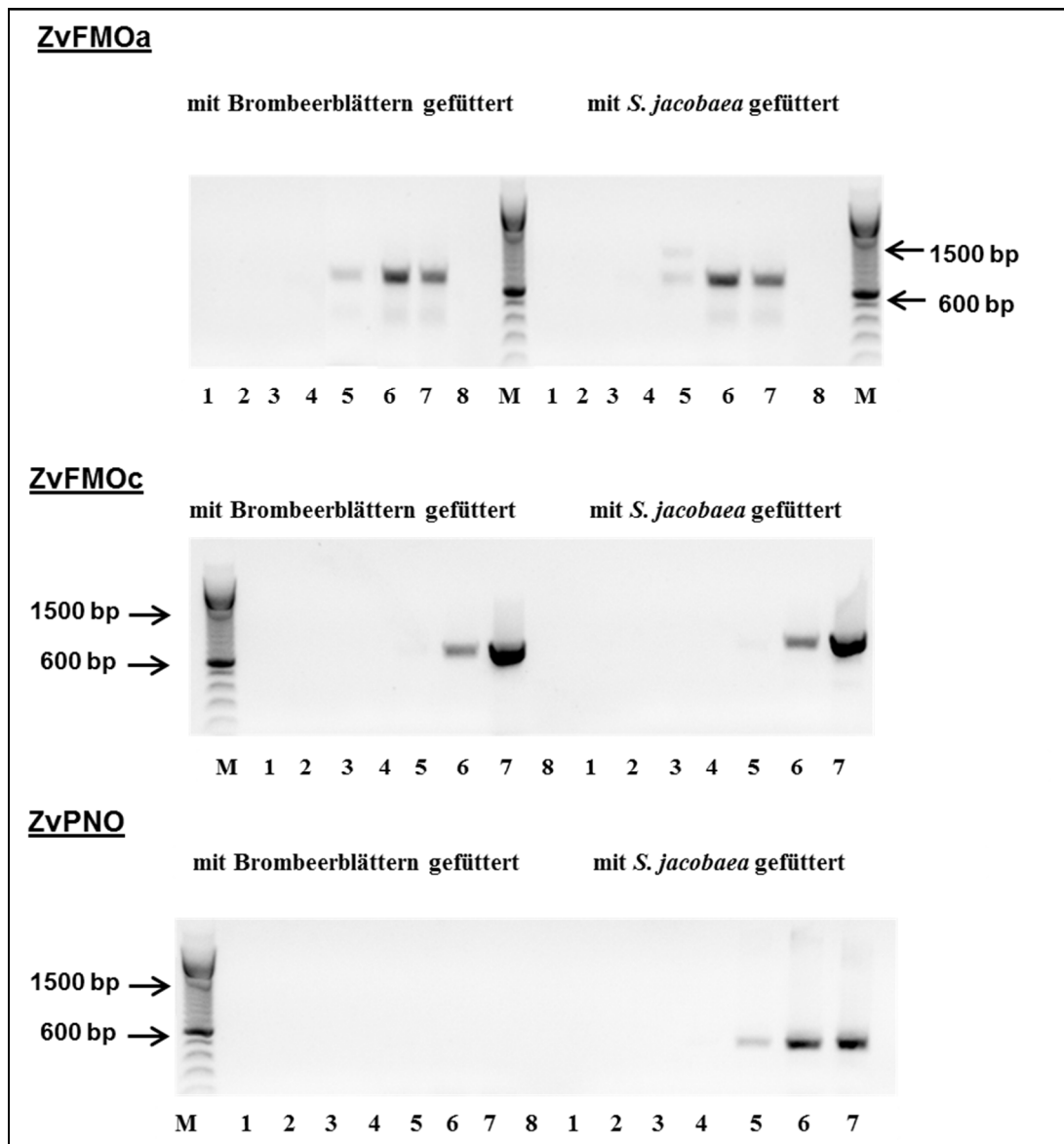
**ZvPNO:**

**Abbildung 4.5: RT-PCR mit cDNA aus verschiedenen Geweben von PA-induzierten *Z. variegatus*-Tieren:** Mit den für ZvPNO spezifischen Primern a. Primern 4-17 und 4-19 oder b. Primern 4-18 und 4-19 wurden 5 µl-Aliquots jeweils nach Zyklus 15, 20, 25, 30 und 35 entnommen und in einem Agarosegel (1,5 %ig) getrennt. Färbung mit Ethidiumbromid. M = 100 bp Leiter, 1 = Kopf, 2 = Integument, 3 = Fettkörper, 4 = Eier, 5 = Darm, 6 = Kontrolle (Expressionskonstrukt mit cDNA von ZvFMOa), 7 = Kontrolle (Expressionskonstrukt mit cDNA von ZvFMOc), 8 = Kontrolle (Expressionskonstrukt mit cDNA von ZvPNO).

Abbildung 4.4 zeigt das Ergebnis dieser RT-PCR in verschiedenen Geweben der zwei FMOs (ZvFMOa, ZvFMOc) von *S. jacobaea* gefütterten *Z. variegatus*-Tieren. Für das Enzym ZvFMOa war ein Amplifikat nur im Ansatz der cDNA aus Fettkörper und Kopf nach Zyklus 30 sichtbar. In anderen Geweben sind keine Amplifikate nachweisbar. Für ZvFMOc war das Amplifikat zuerst im Ansatz der cDNA aus dem Kopf nach 25 Zyklen gut zu sehen. Das Amplifikat kam auch in Integument und Fettkörper nach 25 Zyklen vor.

Abbildung 4.5 zeigt das Ergebnis des Enzymes ZvPNO von *S. jacobaea* gefütterten *Z. variegatus*-Tieren. Ansatz a. Mit den Primern 4-17 und 4-19 waren die Amplifikate nach 30 Zyklen in der cDNA des Integumentes und des Fettkörpers zu sehen. Nach 35 Zyklen treten die Amplifikate auch in der cDNA aus Kopf, Integument, Fettkörper, Eiern und Darm auf. Ansatz b. Mit den Primern 4-18 und 4-19 ist die Situation ähnlich wie in Ansatz a. Nach 30 Zyklen war die größte Menge Amplifikat in der cDNA-Probe des Kopfes und Fettkörper zu verzeichnen. Nach 35 Zyklen wurde unspezifische Amplifikat bei der Expressionskonstrukte mit cDNA von ZvFMOc aufgetreten. Deshalb könnte viel verstärkte Amplifikat im Kopf durch unspezifische PCR Produkte verursacht werden. Drei FMOs der *Z. variegatus* werden somit im Fettkörper und Kopf verstärkt exprimiert, was darauf hindeutet, dass hier der Ort der stärksten Expression der FMOs ist. Die im Integument, Eiern und Darm auftretenden Amplifikate könnten durch Verunreinigung der Gewebe mit Fettkörpergewebe verursacht worden sein.

Die drei identifizierten FMOs aus *Z. variegatus* werden alle im Kopf exprimiert. Von Interesse ist nun, ob die Expressionsstärke dieser FMOs durch Induktion mit PAs beeinflussbar ist. Zu diesem Zweck wurden RT-PCR mit Kopfgewebe durchgeführt. Gesamt-RNA wurde zunächst aus dem Kopfgewebe isoliert und die cDNA wurde wie in Kapitel 4.2.2 synthetisiert. Zur Amplifizierung wurden genspezifische Primer eingesetzt: Primer 4-13 und 4-14 für ZvFMOa, Primer 4-15 und 4-16 für ZvFMOc und Primer 4-18 und 4-19 für ZvPNO (Tab. 4-4 in Kapitel 4.2.2). Die RT-PCR wurde mit der GoTaq-DNA-Polymerase (Promega) und mit dem Temperaturprogramm 2 (Kapitel 4.2.2) durchgeführt.



**Abbildung 4.6: RT-PCR mit cDNA aus dem Kopfgewebe von PA-induzierten und PA-frei angezogenen *Z. variegatus*-Tieren:** Mit den spezifischen Primern 4-13 und 4-14 für *ZvFMOa*, Primern 4-15 und 4-16 für *ZvFMOc* sowie Primern 4-18 und 4-19 für *ZvPNO* wurden die RT-PCR durchgeführt. Jeweils nach 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 35 Zyklen wurden Aliquots von 5  $\mu$ l entnommen und in einem Agarosegel (1,0 %ig) getrennt. Färbung mit Ethidiumbromid. **M** = 100 bp Leiter, **1** = 5 Zyklen, **2** = 10 Zyklen, **3** = 15 Zyklen, **4** = 20 Zyklen, **5** = 25 Zyklen, **6** = 30 Zyklen **7** = 35 Zyklen **8** = Negativkontrolle (ein äquivalentes Volumen Wasser statt cDNA beim PCR-Ansatz).

Abbildung 4.6 zeigt die unterschiedlichen Ergebnisse der RT-PCR für ZvFMOa, ZvFMOc und ZvPNO im Kopfgewebe der *Z. variegatus*. Nach 25 Zyklen für ZvFMOa und nach 30 Zyklen für ZvFMOc wurden die Amplifikate in beiden Gruppen sowohl aus mit *S. jacobaea* gefütterten auch mit Brombeerblättern gefütterten *Z. variegatus* gleich stark detektiert. Im Vergleichsansatz für ZvPNO sind deutlich Unterschiede zu sehen. Das erste Amplifikat war nach Zyklus 25 im Ansatz der cDNA aus mit *S. jacobaea* gefütterten *Z. variegatus* zu sehen. In weiteren Zyklen bis 35 wurde erwartungsgemäß mehr Amplifikat gebildet. Im Gegensatz dazu entstand im Ansatz der cDNA aus mit Brombeerblättern gefütterten Tieren nach maximaler Zyklenzahl kein Amplifikat. Damit zeigt die ZvPNO im Kopfgewebe die gleiche Induzierbarkeit durch PAs wie im Fettgewebe (Abbildung 4.2 in Kapitel 4.3.1.2). Es müsste noch genaue untersucht werden, ob die Expression im Kopf auch auf Teile des Fettkörpers zurückzuführen ist.

## 4.4 Diskussion

Die durch pflanzliche Allelochemikalien induzierten Cytochrom-P450-Enzyme in *Helicoverpa zea* wurden intensiv erforscht (Li et al., 2002). Eine Reihe von Phytochemikalien wie z.B. Coumarin, Indol-3-Carbinol oder Xanthotoxin führten zur Hochregulation von CYP6B8 in *H. zea* (Zeng et al., 2007). In diesem Projektteil wurde nachgewiesen, dass die für die Detoxifizierung von PAs verantwortlichen PNOs in *A. caji* (Arctiiden) und *Z. variegatus* (Orthoptera) durch *S. jacobaea* induzierbar sind. Im Vergleich der drei FMOs aus *Z. variegatus* wurde gezeigt, dass zwei FMOs (ZvFMOa und ZvFMOc) nicht induzierbar sind. Die Ergebnisse zeigen, dass die PA-adaptierten Insekten spezifisch ein Enzym induzieren, um eine erhöhte Entgiftungsfähigkeit gegen toxische PAs zu erreichen.

CYP6B8 und CYP321A1 von *H. zea* haben ein breites Substratspektrum und können auch durch synthetische Chemikalien, wie  $\beta$ -Naphthoflavone und die Insektizide Diazinon induziert werden (Wen et al., 2009). In diesem Projektteil wurde *S. jacobaea* als PA-Pflanze für die Induktion verwendet. Verschiedene PA-Substrate zeigten unterschiedliche Enzymaktivitäten in Arctiiden (Kapitel 2.2). Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob mit unterschiedlichen PA-Substraten der Induktionsgrad auch unterschiedlich ist. Das Tropan-Alkaloid Atropin wurde durch ZvPNO in *Z. variegatus* umgesetzt, aber nicht durch SNO in *T. jacobaeae* und PNO in *A. caji* entgiftet. Ob ZvPNO von *Z. variegatus*, SNO von *T. jacobaeae* und PNO von *A. caji* durch Atropin als Substrat induzierbar sind, wäre noch interessant zu untersuchen.

Untersuchungen an *D. melanogaster* für die dort identifizierte FMO-2 belegen ebenfalls eine Expression im Kopf (Scharf et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass SNO in *T. jacobaeae* und PNO in *Z. variegatus* wie auch in *A. caji* im Kopf transkribiert wurden. Für die ZvFMOa und ZvFMOc aus *Z. variegatus* könnte gezeigt werden, dass sie als lösliche cytosolische Enzyme bevorzugt im Kopf und Fettkörper transkribiert werden. Sowohl die PNO in *A. caji* als auch in *Z. variegatus* wurden nur in mit PA-haltigen Pflanzen induzierten Tieren nachgewiesen. Zudem konnte noch

gezeigt werden, dass die PNO aus *Z. variegatus* sowohl im Kopf als auch im Fettkörper induziert wird.

## 5 PROJEKTTEIL IV

### Identifizierung und Klonierung der FMOs aus *Danaus plexippus*

#### 5.1 Einleitung

Der Monarch *D. plexippus* ist ein Überwinterungsschmetterling, der in Nordamerika den Sommer bevorzugt im Norden der USA und im Süden Kanadas verbringt. Zur Überwinterung können Monarchfalter über tausende von Kilometern in den Süden (vor allem Kalifornien, Mexiko) wandern. Die Monarchfalter nutzen einen magnetischen Kompass und die Sonne zur Orientierung und Navigation (Etheredge et al., 1999). Im März paaren sich die Monarchfalter und begeben sich auf den Rückflug. Auf ihrem Flug legen die Weibchen ihre Eier auf der Blattunterseite eines Schwalbenwurzgewächses (Asclepiadoideae: *Asclepias curassavica*) ab. Die in den Fraßpflanzen enthaltenen Herzglykoside (Cardenolide) sind giftig und werden in den Körpern der Raupen und Falter zum Teil eingelagert, wodurch die Tiere für Fressfeinde ungenießbar oder giftig werden (Frick und Wink, 1995; Holzinger und Wink, 1996).

Die Monarchfalter, *D. plexippus*, konnten im Laufe der Evolution sowohl toxische Herzglykoside aus der Pflanzenfamilie Asclepiadaceae als auch PAs aus verwelkten oder beschädigten Pflanzen sammeln und für sich selbst nutzen (Reichstein et al., 1969; Pliske, 1975).

Die Raupen der Monarchfalter nehmen hauptsächlich die Herzglykoside aus Asclepiadaceae-Pflanzen auf, da diese ihr Hauptnahrungsmittel darstellen, und akkumulieren und speichern diese. Zur Steigerung ihrer biologischen Fitness haben Monarchfalter evolutiv eine Technik (PA-Pharmakophagie) entwickelt, PAs aus PA-haltigen verwelkten oder beschädigten Pflanzen zu sammeln und im Körper speichern zu können (Pliske, 1975; Edgar et al., 1976; Boppre, 1978). Wenn Insekten bestimmte sekundäre Stoffe gezielt aufsuchen und aufnehmen, sie aber nicht für ihren Betriebsstoffwechsel benötigen, sondern vielmehr spezifisch zur Steigerung ihrer biologischen Fitness nutzen, bezeichnet man diese Insekten, wie z.B. den Monarch, als pharmakophag (Boppre, 1995).

Kelley et al., (1987) hat als Erste bewiesen, dass PAs in dem mexikanischen Überwinterungsmonarch *D. plexippus* (Lepidoptera, Nymphalidae) sequestriert werden. Des Weiteren hatten Stelljes und Seiber (1990) im kalifornischen Überwinterungs-monarch nachgewiesen, dass dieser PAs sequestriert. Der adulte Monarch kann nur von verletzten oder trockenen Teilen von PA-haltigen Pflanzen aus verschiedenen Taxa, vor allem der Boraginaceae (*Heliotropium*, *Cynoglossum*), Fabaceae (*Crotalaria*) und Asteraceae (*Eupatorium*, *Ageratum*) angelockt werden und PAs extrahieren. PAs können zunächst nur die Männchen als Schutzstoffe verwenden. Eisner et al., (2002) haben herausgefunden, dass Danainen-Männchen PAs bei der Paarung auf die Weibchen übertragen können. Damit können die Weibchen selbst chemisch geschützt werden und auch Alkaloide als Schutz vor Fraßfeinden in die Eier einlagern (Eisner et al., 2002).

Um die toxische PAs nach ihrer Aufnahme zu überwinden, hat der Monarchfalter einen effektiven Mechanismus entwickelt. Die Mechanismen der PA-Sequestrierung wurden mit Hilfe von Untersuchungen an Lepidopteren (Unterfamilie Arctiidae), die PAs durch *N*-Oxygenierung entgiften, gut dokumentiert (Biller, 1993; Weller et al., 1999; Hartmann, 1999a, 2004; Hartmann und Ober, 2000; Naumann et al., 2002). Ob es ein für die Detoxifizierung zuständiges Enzym im Monarch gibt, das PAs in ihre *N*-Oxid-Form umwandelt oder ob der Monarchfalter eine andere Strategie, wie effiziente Pumpen/Carrier entwickelt hat, ist noch unklar. In der folgenden Arbeit wurden erstmals FMOs auf molekularer Ebene untersucht. Im Rahmen dieses Projektteils wurden zwei Flavin-abhängige Monooxygenasen (DpFMO1 und DpFMO2) im Monarchfalter nachgewiesen. Für die Identifizierung und Charakterisierung dieser Enzyme muss noch weiter geforscht werden.



## 5.2 Material und Methoden

### 5.2.1 Herkunft und Haltung der Insekten

*Danaus plexippus* L. ist ein mit den Signalfarben orange und schwarz gefärbter Monarchfalter aus der Familie Nymphalidae, Unterfamilie Danainae und der Gattung *Danaus*.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Larven des Monarchs aus Amerika gekauft und in einem Umluftraum bei 20 bis 25 °C und bei Hell-Dunkel-Wechsel von 16 und 8 Stunden gehalten. Die Raupen wurden mit *Asclepias curassavica* (Asclepiadaceae) gefüttert bis sie sich zur Stürzpuppe entwickelt. Nach ca. zwei Wochen schlüpfte der Monarchfalter und wurde mit verwelkendem *H. indicum* (Boraginaceae) gefüttert.

### 5.2.2 Gesamt-RNA-Isolierung

In dieser Arbeit wurden die Gesamt-RNA aus frischen Larven und Monarchfaltern mit der TRIZOL®-Methode (Invitrogen) isoliert. Die TRIZOL®-Methode kann zur Präparation von Gesamt-RNA aus tierischem, pflanzlichem und bakteriellem Gewebe angesetzt werden. Weil TRIZOL® Phenol und Guanidin-Isothiocyanat enthält, ist die Verwendung für die Isolierung von Gesamt-RNA besonders vorteilhaft und hat sich gerade für Isolation von RNA aus Insekten in der Arbeitsgruppe bewährt. Die Durchführung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers. Die Proben wurden zuerst in flüssigem Stickstoff zermörsert. Anschließend wurden die Proben mit TRIZOL® -Reagenz versetzt und zentrifugiert. Danach wurde Chloroform in den Überstand zugegeben. Die RNA in den wässrigen Phasen wurde abpipettiert und mit Isopropanol ausgefällt.

### 5.2.3 Quantifizierung von RNA und DNA

Zur Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA wurde die Probe in eine 10 mm Quarzküvette und mit Hilfe des UV-VIS Spectrophotometers (Utraspec 2100 pro, Amersham Pharmacia Biotech) bei Wellenlängen von 230, 260, und 280 nm vermessen. Bei 260 nm entspricht eine Absorption von 1 einer RNA-Konzentration von 33 µg/ml, einer ssDNA-Konzentration von 40 µg/ml und einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml. Zusätzlich wurde die Protein- und

Phenolverunreinigung bei 280 nm und die Kohlenhydratenverunreinigung bei 230 nm erfasst. Über die Quotienten  $E_{260}/E_{280}$ , bzw.  $E_{260}/E_{230}$  wird die Reinheit der Probe ermittelt. Die Konzentration lässt sich mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten über das Lambert-Beersche Gesetz berechnen.

### **5.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase Chain Reaction (PCR, Polymerase Kettenreaktion) bezeichnet eine Technik, bei der von bestimmten Abschnitten der DNA, die zwischen zwei Oligonucleotiden (Forward-Primer und Reverse Primer) liegen, eine Vielzahl von Kopien mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase amplifiziert werden können. Zur Vervielfältigung der DNA wird ein vorgegebenes Temperaturprogramm (PCR Zyklus) in einem PCR Thermo-Cycler kontinuierlich durchlaufen. Der Zyklus der PCR beinhaltet folgende Phasen: 1. Die Denaturierung (Denaturation): In dieser Phase wird durch Einwirken einer hohen Temperatur der DNA Doppelstrang in die zwei Einzelstränge aufgetrennt. 2. Das Annealing: In diesem Schritt werden die Primer an die entsprechenden DNA-Abschnitte der beiden DNA-Einzelstränge angelagert. Die Annealing-Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primern. 3. Die Elongation: In dieser Phase werden die Primer anhand der vorliegenden DNA-Matrize in 3' Richtung verlängert. Die Elongationsdauer wird entsprechend der Größe des Templates gewählt.

Bei schwierigen Amplifikaten wurde ein sogenanntes "Touchdown-Programm" verwendet. Hierbei wurde eine bestimmte Annealing-Temperatur im ersten Zyklus gewählt, die üblicherweise oberhalb der berechneten Schmelztemperatur der eingesetzten Primer lag. Im PCR-Verlauf wurde die Annealing-Temperatur bei jedem Zyklus um  $-0,5^{\circ}\text{C}$  verringert, bis sie unterhalb der Schmelztemperatur der Primer lag. Der zweite Teil des Temperaturprogramms erfolgte bei einer konstanten Annealing-Temperatur für weitere 20 Zyklen. Eine weitere Möglichkeit ist die nested PCR, die zur Erhöhung der Spezifität der PCR-Reaktion führt. Die Primer einer nested PCR lagern sich innerhalb des DNA-Abschnitts an, der in einer ersten PCR von dem ersten Primerpaar abgesteckt wurde. Für das Template der nested PCR wurde der erste PCR-Produkt 1:100 verdünnt eingesetzt.

**Temperaturprogramm 1 für Akku-Taq-DNA-Polymerase (Sigma):**

<u>95 °C 15 sec</u>	}	33 Zyklen
95 °C 15 sec		
58 °C 20 sec (Nested PCR 55 °C)		
<u>68 °C 20 min</u>		
68 °C 10 min		

**Temperaturprogramm 2 für „Touchdown-Programm“ der Akku-Taq-DNA - Polymerase (Sigma):**

<u>95 °C</u>	15 min	
95 °C	15 sec	
50-42 °C	jew. 20 sec insg. 20 Zyklen, pro Zyklus erfolgte eine Absenkung der Annealing-Temperatur um 0,5 °C	
<u>68 °C</u>	10 min	}
95 °C	15 sec	
42 °C	20 sec	
<u>68 °C</u>	10 min	
68 °C	10 min	10 Zyklen

**Temperaturprogramm 3 für GoTaq-DNA-Polymerase (Promega):**

<u>95 °C</u>	2 min	}	35 Zyklen
95 °C	30 sec		
52 °C	1 min (Nested PCR 55 °C)		
<u>68 °C</u>	4 min		
68 °C	10 min		

## 5.2.5 Identifikation der FMOs von *D. plexippus* (DpFMOs)

### 5.2.5.1 Sequenzsuche mit degenerierten Primern für DpFMOs

Für die Identifizierung der FMOs im Monarchfalter wurden die degenerierten Primer, die bereits erfolgreich zur Identifizierung von FMOs bei Arctiden eingesetzt wurden, verwendet (Sehlmeyer, 2010). Die degenerierten Primer wurden basierend auf konservierten Regionen der Sequenzen von vier FMOs aus Insekten (jeweils zwei FMOs aus den Genomen von *D. melanogaster* und *Anopheles gambiae* sowie die SNO-Sequenz von *T. jacobaeae*) entworfen.

**Tab. 5-1: degenerierte Primer**

**Primer 5-1 als Forward-primer:**

5'-dGG(AGCT) GG(AGCT) ACI TGG(AC)G(AGCT) TA- 3'

Forwardprimer (256 x degeneriert) basiert auf eine konservierte Region bei *T. jacobaeae* (AS 61-66).

**Primer 5-2 oder Primer 5-3 als Reverse-Primer:**

**Primer 5-2:**

5' -dGG (AGCT)CC (AGCT)GC ICC (AGT)AT (AGT)AT- 3'

Reverse-Primer (192 x degeneriert) basiert auf die NADPH-Bindungsstelle bei *T. jacobaeae* (AS 213–218). Die Aminosäuresende dem Primer ist Isoleucin, basiert auf AS206 bei *D. melanogaster* FMO3174.

**Primer 5-3:**

5' - GG (AGCT)CC (AGCT)GC ICC (AGT)AT (AGCT)AC- 3'

Reverse-Primer (192 x degeneriert) basiert auf die NADPH-Bindungsstelle bei *T. jacobaeae* (AS 213–218). Die Aminosäuresende dem Primer ist Valin, basiert auf AS213 bei *T. jacobaeae*.

*D. pexippus* gehört zu der Familie der Nymphalidae. Um FMOs in *D. pexippus* zu finden, wurden die degenerierten Primer (Tab. 5-1) basierend auf einer konservierten Region (Primer 5-1) und einer NADPH-Bindungsstelle (Primer 5-2 und Primer 5-3) in Arctiiden ausgewählt.

### **5.2.5.2 Full-length-cDNA der DpFMO2**

#### **Amplifizierung des 5'-Endes der cDNA der DpFMO2**

Die schnelle Amplifizierung von cDNA-Enden (RACE: Rapid Amplification of cDNA Ends) ist ein Verfahren zur Amplifikation einer cDNA bis zum 3'- oder 5'-Ende aus einem mRNA-Template. Zur Amplifizierung des 5'-Endes der cDNA der DpFMO2 wurde die Gesamt-RNA zuerst von der Monarch-Raupe isoliert. Auf der Grundlage der identifizierten DNA-Sequenz wurde der genspezifische Primer 5-5 entworfen, der zur ersten cDNA-Synthese eingesetzt wurde. Das erzeugte cDNA-Molekül wurde nach Abbau der RNA enzymatisch mit Hilfe der terminalen Desoxynukleotidyltransferase (TdT) um mehrere dC-Nukleotide angefügt. Diese cDNA diente dann in einer nachfolgenden PCR als Matrize. Die PCR wurde unter Verwendung des Ankerprimers AAP als Forward-Primer und dem Primer 5-6 als Reverse Primer durchgeführt. Für die Nested-PCR wurde der Ankerprimer AUAP als Forward-Primer und der Primer 5-4 als Nested-PCR Reverse Primer verwendet. Schließlich konnte das 5'-Ende der DpFMO2 vollständig amplifiziert werden. Die PCR und Nested-PCR wurde mit dem Temperaturprogramm 3 der GoTaq-DNA-Polymerase (Kapitel 5.2.4) durchgeführt.

**Tab. 5-2: Primer für 5`-Ende der DpFMO2:****Primer 5-4:**

5'-dCGAGGGTTTTACTGACGTAA-3' Tm=55,3 °C

**Primer 5-5:**

5'-dCTGGTTGACATTCACCATATA-3' Tm=54 °C

**Primer 5-6:**

5'-dTCTCCTCGTAGGTACCATCTTTAAATAT-3' Tm=60,7 °C

**Anker Primer: AAP**

5'-dATACACCTGCAGCTCGAGTATATGGGGGGGGG -3' Tm=73,7 °C

**Anker Primer: AUAP**

5'-dATACACCTGCAGCTCGAGTATAT-3' Tm=68 °C

### 5.2.5.3 Full-length-cDNA der DpFMO1

Um die full-length-cDNA der anderen FMO (DpFMO1) vollständig aus *D. plexippus* zu amplifizieren, wurden genspezifische Primer für die 3'-Race und 5'-Race auf FMO1 (Acession Nr.: EY266914) aus der Datenbank Sequenzfragment entworfen.

**Tab. 5-3: Primer für 3'-Ende und 5'-Ende der DpFMO1:**

**3'-Race Primer:**

**Primer 5-7:**

5'-dTCCCGAAGCGTTCTGAAGGTCGAAAG-3' Tm=66,3 °C

**Primer 5-8:**

5'-dGCACAGTCACCATCTCAAATACAATCA-3' Tm=60,7 °C

**5'-race Primer :**

**Primer 5-9:**

5'-dAGATGACTCCATTCTTCACAA-3' Tm=54 °C

**Primer 5-10:**

5'-dGGAGAATTTTCGGTTGATTGTATTTGAGA-3' Tm=60,7 °C

**Primer 5-11:**

5'-dAGTTTCGCTGTGATGTTGTTTCAGTTGA-3' Tm=61,9 °C

#### **5.2.5.3.1 Amplifizierung des 3'-Endes der cDNA der DpFMO1**

Die Gesamt-RNA wurden aus dem gesamten Monachfalter isoliert. Um genomische DNA aus der Gesamt-RNA-Präparation zu entfernen, wurde ein zusätzlicher externer DNase-Verdau mit DNase I (Invitrogen) angeschlossen. Mit dem genspezifischen Primern 5-7 und dem Oligo(dT)-Primer für die erste PCR sowie dem Primern 5-8 und dem Oligo(dT)-Primer für die Nested- PCR wurden das 3'-Ende der cDNA erfolgreich amplifiziert. Hierbei wurde die GoTaq-DNA Polymerase (Promega) mit dem Temperaturprogramm 3 (Kapitel 5.2.4) durchgeführt.

#### **5.2.5.3.2 Amplifizierung des 5'-Endes der cDNA der DpFMO1**

Für die Amplifizierung des 5'-Endes der cDNA der DpFMO1 wurden die genspezifischen 5'-Race-Primer 5-9; 5-10 und 5-11 verwendet. Der genspezifische Primer 5-9 wurde zur ersten cDNA-Synthese eingesetzt. Das erzeugte cDNA-Molekül wurde nach Abbau der RNA enzymatisch mit Hilfe der terminalen Desoxynukleotidyltransferase (TdT) um mehrere dC-Nukleotide angefügt. Diese cDNA diente dann in einer nachfolgenden PCR als Matrize. Die erste PCR wurde mit dem Primer 5-10 und dem Anker-Primer AAP durchgeführt. Mit dem Primer 5-11 und dem Anker-Primer AUAP wurde die Nested-PCR durchgeführt. Das Erste PCR-Produkt wurde als Template verwendet. Akku-Taq-DNA-Polymerase wurde mit dem Temperaturprogramm 2 (Kapitel 5.2.4) eingesetzt.



## 5.2.6 Computergestützte Sequenzanalyse

Das GCG Wisconsin Softwarepaket dient zur Analyse von Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen. Die Gesellschaft für wissenschaftliche Datenverarbeitung in Göttingen (GWDG) bietet diesen GCG-Server an. Außerdem sind auch andere Programme für diesen Zweck über das World Wide Web als freie Software zugänglich.

**GCG** Softwarepaket zur Sequenz-Analyse und Bearbeitung. GWDG verfügt über diesen Server:

<http://gcg.gwdg.de>

**Chromas** Software zur Öffnung und Analyse der DNA-Sequenzierung als Chromatogramm-Datei (.scf). Kann kostenlos aus dem Internet heruntergeladen werden.

<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>

**Genedoc** Software für die Erstellung und den Vergleich von Alignments .

<http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>

**NCBI** (National Center for Biotechnology Information)

**BLAST®:** *Basic Local Alignment Search Tool*, erlaubt den Vergleich einer Protein- oder DNA-Sequenz mit Sequenz-Datenbanken. Damit können die Sequenzen auf die funktionelle und evolutionäre Beziehung hin entschlüsselt/zurückverfolgt werden.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

**Restriktion** Restriktionsanalyse der DNA-Sequenzen

<http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/RestrictionMapper.pl>

**TreeView** Software zur Analyse und Darstellung der Phylogenien.  
<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>

**CBS** (Center for Biological Sequence Analysis)

Zur Vorhersage verschiedener Sequenzeigenschaften.

<http://www.cbs.dtu.dk>

**SignalP 3.0 Server:**

Programm zur Vorhersage von Signalpeptiden in Sequenzen von gram-positiven und -negativen Prokaryonten und von Eukaryonten.

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>

**NetOGlyc 3.1:**

Programm zur Vorhersage von GalNAc-O Glycosylierungsstellen in Säuger-Proteinen.

**NetNGlyc 1.0:**

Programm zur Vorhersage von GalNAc-N Glycosylierungsstellen in Säuger-Proteinen.

**Target P 1.1:**

Vorhersage der subzellulären Translokation der eukaryontischen Proteine

**TMHMM v.2.0:**

Vorhersage von Transmembran-Helices in Proteinen

**ExPASy ProtParam:**

Vorhersage verschiedener physikalischer und Chemischer Proteineigenschaften: z.B. Isoelektrischer Punkt und Molekularmasse.

<http://www.expasy.org/>

**PSORT II:** Programm zur Vorhersage eines Signalpeptids in einer Proteinsequenz von Pro- und Eukaryonten sowie der intrazellulären Proteinlokalisierung.

<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>

**Brenda** Informationsdatenbank für Enzyme.

<http://www.brenda-enzymes.org/>

**Fasta** Dieses Tool bietet einen Sequenzähnlichkeitsvergleich gegen Protein- oder DNA Datenbanken.

<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>

**Vector NTI Advance:**

Die Software bietet eine einzigartige, multi-modulare, integrierte Sequenzanalyse und Datenmanagement Tools.

**Vector NTI:** Ein Tool für Sequenzanalysen, Restriktionsmap, Vektormap, rekombinantes molekulares Design usw.

**Align X:** Erstellung multiples Sequenz-Alignments von Proteinen und DNA. ContigExpress, GenomBench, BioAnnotator in Software inklusive.

## 5.3 Ergebnisse

### 5.3.1 PCR mit degenerierten Primern

Da für die FMOs vom Monarch-Falter der Expressionsort unbekannt war, wurde die RNA vom gesamten Falter isoliert und diese mit der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die erste PCR wurde mit den Primern 5-1 und dem Oligo(dT)-Primer durchgeführt. Um die Ausbeute des spezifischen PCR-Produkts zu erhöhen, wurde ein zweistufiges Semi-Nested-Verfahren eingesetzt. Bei der Nested-PCR wurden die Primer 5-1 und 5-2 sowie Primer 5-1 und 5-3 (Kapitel 5.2.5.1, Tab. 5-1) und die 1:100 verdünnte cDNA aus der ersten PCR-Reaktion als Matrize in der zweiten Reaktion verwendet. Mit der ersten PCR konnte eine spezifische Bande etwa 1300 bp amplifiziert werden. Mit der Nested-PCR konnte erfolgreich eine spezifische Bande mit etwa 600 bp amplifiziert werden. Hierfür wurde die Akku-Taq-DNA-Polymerase (Sigma) und das Temperaturprogramm 1 (Kapitel 5.2.4) verwendet.

Die spezifischen Banden aus beiden PCR-Reaktionen wurden in den pGEM-T-Easy-Vektor kloniert und sequenziert. Nach Auswertung mit der GCG-Software und einem Vergleich mit den bekannten Insekten-FMOs durch BLAST konnten die zwei gefundenen DNA-Fragmente als Teil einer FMO-Sequenz identifiziert werden. Das 600 bp-Fragment stellte sich als Teil der 1300 bp-Fragments heraus, dass eine hohe Ähnlichkeit zu einem Fragment der FMO2 (Accession Nr.: EY272684) zutrifft.

### 5.3.2 Full-length-cDNA der DpFMO2

Mit dem degenerierten Primer und dem Oligo-(dT) Primer ist es gelungen, Fragmente von FMO-Sequenzen im Monarchenfalter zu finden. Um die vollständige cDNA der FMO zu identifizieren, wurde das fehlende 5'-Ende mit Hilfe der 5'-RACE-Technik amplifiziert (Kapitel 5.2.5.2). Das resultierende 625 bp lange Fragment wurde in einen pGEM-T-Easy-Vektor kloniert und nach der Sequenzierung als das fehlende 5'-Ende identifiziert. Die Full-length-cDNA der DpFMO2 wurde aus den identifizierten 5'-Ende und 1300 bp lange Fragment (Kapitel 5.3.1) vollständig zusammengesetzt. Die Full-length-cDNA der DpFMO2 aus *D. plexippus* konnte als ein FMO identifiziert werden.

1	ATTGATTAATTATTGTTATAAAGACCAGTACATTTGTGCTCCTGCTTTTAATTACGGACC	60
61	GCATGTATCGTTAGAGAGAAAATGTTTTGTTTCTTATATTAAGTGTATTAGTGCGAAT	120
1	<b>M F L F L I L S V I S A N</b>	14
121	ATTAGTTTAGCGACGACATAGTGAAGGGGAATATATCAAAACAAAGAGTATGC	180
15	<b>I S L A T T Y H S E K G N I S K Q R V C</b>	34
181	ATTATTGGCGCCGGCTAGCCGGCTGACATCTGGGAAATACCTGCAGGATGAAGGCATC	240
35	<b>I I G A G L A G</b> L T S G K Y L Q D E G I	54
<b>FAD-Bindungsstellen</b>		
241	AATTTTATCATACTAGAAGCTACGAAATACTTCGGCGGGACCTGGCGTTACGATCCCAGG	300
55	N F I I L E A T K Y F G G T W R Y D P R	74
301	GTCGGATATGATGAAAACGGTTTACCTTTCACACACAAGCATGTATAAACTTGAGGACA	360
75	V G Y D E N G L P L H T S M Y K H L R T	94
361	AATCTACCGAAGCCACAATGGAAGTGAAGGCTTCCCTGTACCGAAAGATATGCCATCC	420
95	N L P K P T M E L R G F P V P K D M P S	114
421	TTTCCGAAGTGGTCAATTTATTACGAATATATCAAAGACTATGTAAAGCATTTCGGCTTA	480
115	F P K W S I Y Y E Y I K D Y V K H F G L	134
481	GAAAAGCACATAATGTTTGAACACAACGTGGAAGTGGTTTCGAGAGTTGGAGATGCATGG	540
135	E K H I M F E H N V E L V S R V G D A W	154
541	AGGTTGAAGTACAAGAATTTAGTTTTCGGGAGAAAACCTTGAGCAGGAATTTGATTTTGTCT	600
155	R V K Y K N L V S G E N F E Q E F D F V	174
601	ATCGTCGGGACTGGTCATTACAGTGTCTAATCTGCCGGATGTACCTCATGAAGACCTT	660
175	I V G T G H Y S D P N L P D V P H E D L	194
661	TTTAAAGGCACTATAATGCACAGTCCAGACTACAGAGACCGGATCGCTTCAAGGATCGT	720
195	<b>F K G T I M H S H D Y</b> R E P D R F K D R	214
<b>Konserviertes Sequenz-Motiv</b>		
721	CGAGTTCTGATCGTTGGTGCCGGACCTTCAGGGATGGACATAGCCATAGATGTGGCTTAC	780
215	R V L I V <b>G A G P S G</b> M D I A I D V A Y	234
<b>NADPH-Bindungsstellen</b>		
781	GTCAGTAAAACCCCTCGTCCACAGCCACCACAGCCCCGGCTTCGGAACCGATTCTTCCCC	840
235	V S K T L V H S H H S P G F G T D S F P	254
841	CAACATTACATCCAAAAACGGACATACGAGAGTACAATGAGACCGGCGTATATTTAAA	900
255	Q H Y I Q K P D I R E Y N E T G V I F K	274
901	GATGGTACCTACGAGGAGATCGATGACGTCAATTTATTGTACGGGATACAAAATAATTAC	960
275	D G T Y E E I D D V I <b>Y C T G Y</b> K Y N Y	294
<b>Vertebraten-FMOs Sequenz-Motiv</b>		
961	ACATTCTGGACGACAGCTGCGGTCTGACCGTGACTCCTCGACGCTGACTCCGCTCTAC	1020
295	T F L D D S C G L T V T P R S V T P L Y	314
1021	AAGTATATGGTGAATGTCAACCAGCCCCTACTATGATGGTTATGGGCTGTAGTGAAAGCC	1080
315	K Y M V N V N Q P T M M V M G L I V K A	334
1081	TGTGTTGTAGTCGCTTTGGATGCACAATCGAGATACCGACGGCGTTGATAAAAGGAAAT	1140
335	C V V V A L D A Q S R Y A T A L I K G N	354
1141	TTTACATTGCCACCAAAGAAGCGATGATGGCCGAGTTTCAAATCGCTTGGACGACGTC	1200
355	F T L P P K E A M M A E F Q N R L D D V	374
1201	TTGTCTAAGGGGCGTCTATATCGGACGTACATTTTTGTCCGACAAAGAAGACGGCTAC	1260
375	L S K G R P I S D V H F L S D K E D G Y	394
1261	TACATGGCGTTGACGGCAGAATCTGGGATAGATAGAGTGGCCAGTGATGTTCAAAAATA	1320
395	Y M A L T A E S G I D R V P P V M F K I	414
1321	CGAAACGTAGACACTAAGGCAAAACTGGACGATATTTACAGTACAGGAACTACGCCTAC	1380
415	R N V D T K A K L D D I Y T Y R N Y A Y	434
1381	AGTGTCAATTGACGACGCAATTTTGTAAAGAACACTAGAGAATAATACTTGATGAATAACG	1440
435	S V I D D S N F V R T L E N N T *	451
1441	AACCATCGTGTATTTATTTTAAACAAATGTCGATGTGAACATGCTGTACATATGTGA	1500
1501	AGTAATCTGGTGTGACAGATTAAGTAATAATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1551

**Abbildung 5.1: DNA- und Aminosäuresequenz der DpFMO2 von *D. plexippus*.** Das Signalpeptid liegt in den ersten 17 Aminosäuren (AS) des ORF (grün). Die FAD-Bindungsstellen (blau) sind im Bereich des 5'-Endes zwischen AS 37 und 42. FMOs-Konservierte Bereiche sind zwischen AS 195 und 205 (Lila). Die NADP-Bindungsstellen (Orange) liegen weiter stromabwärts, zwischen den AS 220 und 225. Der für Vertebraten-FMOs Motivbereich liegt zwischen AS 286 und 290. Ein \* zeigt das Stopp-Codon.

### 5.3.3 Full-length-cDNA der DpFMO1

Die bis jetzt gefundene cDNA der FMO (DpFMO2) ist ähnlich zur FMO2 (Acession Nr.: EY272684). Um die full-length-cDNA der anderen FMO aus der Datenbank FMO1 (Acession Nr.: EY266914) vollständig aus *D. plexippus* zu amplifizieren, wurden Experimente wie in Kapitel 5.2.5.3 durchgeführt. Das 876 bp lange Nested-PCR-Produkt der 3'-Enden und das 828 bp lange Nested-PCR-Produkt der 5'-Enden wurden in den pGEM-T Easy Vektor kloniert und sequenziert. Die full-length-cDNA von DpFMO1 wurde aus den identifizierten 3'- und 5'-Enden und dem Sequenzfragment der FMO1 (Acession Nr.: EY266914) vollständig zusammengesetzt. Die Full-length-cDNA der DpFMO1 aus *D. plexippus* konnte als zweite FMO identifiziert werden.

1	TTTTTTTTGAGTTTCGAACGTCCGCCGACGCGTCTTTTAGAAAATAAAATATTTAAAGAC	60
61	TTTGATGTATTTAAAAACATGACTCCAATAAACATAAGGACTTGTGTGTGTTGACGGTT	120
1	<b>M T P I N I R T C V L L T V</b>	14
121	CTTAAAAATTATTTGTACAAACGGATTATCCTTGCCACCATCACACTCTTGCGTCATTGGG	180
15	<b>L K I I C T N G L S L P P S H S C V I G</b>	34
181	GCTGGCTATTACAGGCTGGCTGCGGCGAGATATTTAAAGGAATTCGGCCTCAAATTCACC	240
35	<b>A G Y S G</b> L A A A R Y L K E F G L K F T	54
<b>FAD-Bindungsstellen</b>		
241	GTGTTCGAAGCCTCCCGCATGTTGGTGGGACTTGGCGCTTCGATCCCAACGTTGGTCTT	300
55	V F E A S R D V G G T W R F D P N V G L	74
301	GACGTGATGGCATCCCTGTCCACCACAAGCCAATATAAAATATTTAAGGACCAACACTCCA	360
75	D A D G I P V T T S Q Y K Y L R T N T P	94
361	AGACAAACTATGGAATTTAATGGCTATCCTTTTCCGAACGCGACCCCCACATTCCCAACT	420
95	R Q T M E F N G Y P F P N A T P T F P T	114
421	GGCACTTGCTTTTACAAATACATCAAATCATTCGTAAGAAATTTGATTGAAGAACAAC	480
115	G T C F Y K Y I K S F V K K F D L K N N	134
481	ATTCAATTGCGTAGCTTAGTGACTTCCGTTTCCCGGTTAAATACCATTGGGATCTGGTG	540
135	I Q L R S L V T S V S R V K Y H W D L V	154
541	TATTTAACACCGAGGATCGTCAGGAGTACGGCGTCGACTGTGACTTTGTGATCATCGCC	600
155	Y F N T E D R Q E Y G V D C D F V I I A	174
601	AACGGACAGTATGTCAGGCTGTGGTACCAAATTTTATGGTTTAGAGGCATTTGAAGGT	660
175	N G Q Y V R P V V P N F I G L E A F E G	194
661	ACAGTCATGCACAGTCATGATTACAAAGGTCCCGAAGCGTTTCAAGGTCGAAAGGTTCTC	720
195	<b>T V M H S H D Y</b> K G P E A F E G R K V L	214
<b>Konserviertes Sequenz-Motiv</b>		
721	CTAGTGGGGGGCGGGCCTCGGGTCTGGACTGGCCGTTCAACTGAACAACATCACGGCG	780
215	L V <b>G A G A S G</b> L D L A V Q L N N I T A	234
<b>NADPH-Bindungsstellen</b>		
781	AAACTGGTGCACAGTACCATCTCAAATACAATCAACCGAAATTCCTCCGATAAGTACGTA	840
235	K L V H S H H L K Y <b>N Q P K F S</b> D K Y V	254
<b>PNO-spezifische Bereich</b>		
841	AAGAAGCCGGATATTTAAAGTGTGTTGTAAGAATGGAGTCATCTTCGAAGACGGCAGCTTC	900
255	K K P D I K V F V K N G V I F E D G S F	274
901	GAGGAGGTGGAACATGTTATTCTTGCTACAGGATACGAGTTTCGACCAACCGTTCTTAGAC	960
275	E E V E H V I <b>L A T G Y</b> E F D Q P F L D	294
<b>Vertebraten-FMOs Sequenz-Motiv</b>		
961	GACACCAGCGGTTTGACGCGCACTGAAAAGTTTGTGTTGCCTTTGTATAGGAACATTATC	1020
295	D T S G L T R T G K F V L P L Y R N I I	314
1021	AACATAGCTCACCCAGCATGATGTTCTGGGTGTCGTCATGAGTTATCACGAGAACC	1080
315	N I A H P S M M F L G V V N G V I T R T	334
1081	ATGGACGTTTCAGGCTGAGTACATAGCGTCTGTTGATTGCTGGAAAATTTAAACTTCCGTC	1140
335	M D V Q A E Y I A S L I A G K F K L P S	354
1141	CAAGACGAGATGTTAGAAAAGTTGGCTTAAACACGTTCACTCCTTGAAGTATAATTCCAAT	1200
355	Q D E M L E S W L K H V H S L K Y N S N	374
1201	AAGATACTTTACGTCACACTATCGGCAAGAGATGGACAATTATTTTCGTAATTTGACA	1260
375	K I L Y V N T I G K E M D N Y F G N L T	394
1261	GAAGAGGCTGGAGTAACAAGAGTGCTGCCGGTGTGTCGGATATAAGAGATTTTAATGCC	1320
395	E E A G V T R V L P V L S D I R D F N A	414
1321	GAAAATCGTCTTGAAGATCTCCTTAATTACAGAGATTACGATTTTCGAGATCATCGACGCG	1380
415	E N R L E D L L N Y R D Y D F E I I D A	434
1381	AACAACTATAAGAGGTGGTATAACGGCGGTGGGGAAAGAGCGGAGGAGTGCTTTATTGAA	1440
435	N N Y K R W Y N G G G E R A E E C F I E	454
1441	GAGTAGAGTGTATGAACGAATGAAGGTGCTGTGAGATGAATCAATGGACGTATGCAGCGT	1500
455	E *	456
1501	TTCGAGCGATCCTTTAAAAACGATACGTTACAGAATGTTAATAAAATAAGAAAAATGTTA	1560
1561	TTTATATGACTTAATTAACGTAACAAATACAGAGATTGTGTGAAATAAATATGTAGAG	1620
1621	TACTAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1648

**Abbildung 5.2: DNA- und Aminosäuresequenz der DpFMO1 von *D. plexippus*.** Das Signalpeptid liegt in den ersten 24 Aminosäuren (AS) des ORF (grün). Die FAD-Bindungsstellen (blau) sind im Bereich des 5'-Endes zwischen AS 34 und 39 vorzufinden. Die NADP-Bindungsstellen (Orange) liegen weiter stromabwärts, zwischen den AS 217 und 222. Konservierte Motivbereiche sind zwischen AS 192 und 202. Die PNO-spezifischen Bereiche (rot) sind zwischen AS 245 und 250. Der für Vertebraten-FMOs Motivbereich (pink) liegt zwischen AS 282 und 286. Ein \* zeigt das Stopp-Coden.

### 5.3.4 Eigenschaften der *D. plexippus* FMOs

Zwei FMOs (DpFMO1 und DpFMO2) wurden in *D. plexippus* identifiziert. Um die beiden full-length-cDNA-Sequenzen genau zu analysieren, wurden diese auf ihre Eigenschaften und Strukturmerkmale hin mit Hilfe von Computerprogrammen untersucht.

#### Sequenzeigenschaften:

Die Sequenzeigenschaften der *D. plexippus* FMOs wurden zum Vergleich mit der SNO aus *T. jacobaeae* in folgender Tabelle zusammengefasst.

**Tabelle 5-4: Die Sequenzeigenschaften von zwei FMOs aus *D. plexippus* im Vergleich zur SNO aus *T. jacobaeae*:**

Insekten FMO	Gesamt- länge	Signal- peptid	FAD-	NADPH-	FMO-Motiv
			Bindungsstellen GAGYSG	Bindungsstellen GAGPSG	
<i>D. plexippus</i> DpFMO1	455 AS	24 AS	AS 34 bis 39	AS 217 bis 222	AS 192 bis 202
<i>D. plexippus</i> DpFMO2	450 AS	17 AS	AS 37 bis 42	AS 220 bis 225	AS 195 bis 205
<i>T. jacobaeae</i> TjSNO	456 AS	22 AS	AS 32 bis 37	AS 215 bis 220	AS 190 bis 200

Ein FMOs-Sequenzvergleich ergab zwei Sequenz-Motiv und hoch konservierte Nukleotidbindungsstellen für FAD (GAGYSG) und NADPH (GAGPSG) (Cashman, 1995). Für DpFMO1 konnte zwischen den AS 34 und 39 eine Bindungsstelle für FAD, weiter stromabwärts, zwischen den AS 217 und 222 eine NADPH-Bindungsstelle identifiziert werden. Ähnlich wie für DpFMO1 konnte auch für DpFMO2 zwischen AS 37 bis 42 eine FAD Bindungsstelle und zwischen AS 220 bis 225 eine NADPH-Bindungsstelle gefunden werden. Ein



hoch konservierter Motivbereich **YKGKTMHSHDY** für TjSNO konnte für DpFMO1 (**FEGTVMHSHDY**) und DpFMO2 (**FKGTIMHSHDY**) nachgewiesen. Der charakteristische **FATGY**-Motivbereich (Lawton und Philpot, 1993) für Vertebraten-FMOs konnte in modifizierter Form als **LATGY** wie TjSNO in DpFMO1 und in modifizierter Form als **YCTGY** in DpFMO2 nachgewiesen werden.

Verglichen mit Arctiden waren die Identitäten auf Aminosäuresequenz von DpFMO1 46,3% zur SNO aus *T. jacobaeae*, 46,7% zur PNO aus *G. geneura*, 46,8% zur PNO aus *A. caja* und 28,4% zur PNO aus *Z. variegatus*. Die Aminosäuresequenz der DpFMO2 ist zu 37,6% mit der SNO der *T. jacobaeae*, 31,6% zur SNO der *G. geneura*, 37,9% mit der SNO der *A. caja* und sogar nur zu 31,6% mit der SNO der *Z. variegatus* identisch. Das bedeutet je geringer der Verwandtschaftsgrad desto geringer ist ihre Identität.

Mit dem Programm SignalP 3.0 konnten N-terminale Signalpeptide für den vesikulären Transport des Proteins in *D. plexippus* FMOs vorhergesagt werden. Des Weiteren konnten mit dem Programm TMHMM v.2.0 keine transmembranen Helices ermittelt werden. Also diese FMOs scheinen löslich zu sein, identisch mit dem *G. geneura*. Zu den Vertebraten-FMOs, die mit einer Transmembrandomäne in den Membranen fixiert sind. Deshalb wurde eine extrazelluläre Lokalisation des Proteins prognostiziert. Durch NetNGly 1.0 konnten N-Glykosylierungsstellen an den Positionen 231 und 392 in DpFMO1 und an den Positionen 13, 26, 266 und 353 in DpFMO2 vorhergesagt werden. Jedoch konnten keine O-Glykosylierungen mit Hilfe der NetOGlyc 3.1-Analyse vorhergesagt werden.

#### **Vorhergesagte physikalische Eigenschaften:**

Durch das Programm ProtParam auf dem ExPASy-Server konnten die physikalischen Eigenschaften vorhergesagt werden. Es wurde eine Molekularmasse für das DpFMO1 Protein von 51,6 kDa und für das DpFMO2 Protein von 51,2 kDa vorhergesagt. Der isoelektrische Punkt (pI) wurde auf 6,0 für die DpFMO1 und auf 5,9 für die DpFMO2 berechnet.



Abbildung 5.3: Alignment der einigen aus bekannten Flavin-abhängigen Monooxygenasen von Insekten mit Software Vector-NTI Advance. Sequenzbezeichnungen: *A. caja* FMO (*AcFMO*), *A. caja* PNO (*AcPNO*), *G. geneura* PNO (*GgPNO*), *T. jacobaeae* SNO (*TjSNO*), *D. plexippus* (*DpFMO1* und *DpFMO2*), *Z. variegatus* PNO (*ZvPNO*). Motiv Bereich: Motiv 1, FAD-Bindungsstelle; Motiv 2, FMO konserviertes-Motiv; Motiv 3, NADPH-Bindungsstelle; Motiv 4, PNO-spezifischer Bereich außer *AcFMO*, *DpFMO2* und *ZvPNO*; Degenerierte Primer Bereiche: Primer 5-1 und Primer 5-3.

Durch die Analyse der Eigenschaften der isolierten DNA-Sequenz aus *D. plexippus* konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um eine lösliche, extrazelluläre FMO handelt. Zum Vergleich der Aminosäuresequenz der DpFOM1 und DpFMO2 aus *D. plexippus* wurde ein Alignment zusammen mit *A. caja* FMO (AcFMO), *A. caja* PNO (AcPNO), *G. geneura* PNO (GgPNO), *T. jacobaeae* SNO (TjSNO), und *Z. variegatus* PNO (ZvPNO) erstellt (Abbildung 5.3). Dieses Alignment zeigt, dass es bei allen FMOs konservierte Sequenzbereiche für FAD- (**GAGYSG** FÜR DpFMO1 und **GAGLAG** für DpFMO2) und NADPH-Bindungsstellen (**GAGASG** für DpFMO1 und **GAGPSG** für DpFMO2) gibt. Besonders gut zu beobachten war dies, wenn der PNO spezifische Bereich mit dem PNO (**NQPDFP**) der anderen Insekten (z.B. *A. caja* PNO, *G. geneura* PNO und *T. jacobaeae* SNO), und mit den FMOs des *D. plexippus* verglichen wurde. Man konnte eine modifizierte Form als **NQPKFS** in DpFMO1 finden, jedoch keine in DpFMO2 und AcFMO nachweisen. Deshalb könnte vermutlich DpFMO1 für die Detoxifizierung der PAs zuständig sein. Um genau sagen zu können, ob es sich bei den gefundenen FMO-Sequenzen DpFMO1 und DpFMO2 um das für die Detoxifizierung verantwortliche Enzym handelt, müssten die *D. plexippus* FMOs in einen Expressionsvektor kloniert und die Enzymaktivität charakterisiert werden.

## 5.4 Diskussion

### 5.4.1 Herzglykoside (CGs) und Pyrrolizidin-Alkaloide (PAs): doppelte Sicherung in *Danaus plexippus*

In einer Welt voller Feinde müssen Insekten die biologische Fitness erhöhen, damit letztlich ihre Fortpflanzung mit Erfolg gekrönt ist. Im Laufe der Evolution hat der Monarchfalter, *D. plexippus*, eine Fähigkeit entwickelt, um gegen seine Feinde vorzugehen: Auf der einen Seite nutzt *D. plexippus* die toxischen CGs aus seinen Nahrungspflanzen der Asclepiadaceae als Wehrstoffe (Frick und Wink, 1995). Auf der anderen Seite verwendet *D. plexippus* PAs aus verwelkten oder beschädigten Pflanzen als eigenen Schutz, unabhängig von seinen Nahrungspflanzen (Edgar et al., 1976). CGs und PAs können als doppelte Sicherung in *D. plexippus* akkumuliert werden, um die biologische Fitness und den Fortpflanzungserfolg zu steigern (Edgar et al., 1974; Rothschild et al., 1978). Die Raupen der Monarchfalter ernähren sich von Schwalbenwurzgewächsen (Asclepiadaceae) und können so zwar keine PAs, jedoch toxische Herzglykoside akkumulieren und speichern. Diese verbleiben in den Tieren und schützen dann auch die Falter vor vielen potentiellen Freßfeinden. Die Raupen des Monarchfalters sind nicht nur resistent gegen die sequestrierten Herzglykoside, sondern können diese sogar gegen ihre Feinde einsetzen (Frick und Wink, 1995; Holzinger und Wink, 1996). Die Larven des Monarchfalters selektieren aus den komplexen Komponenten der Cardenolide, die in ihren Nahrungspflanzen vorkommen, nur die polaren Cardenoliden, aber keine lipophilen apolaren Glykoside (Brower et al., 1988; Malcolm und Brower, 1989). Für eine Carrier-vermittelte Aufnahme ist ein Transport der polaren Glykoside durch die Biomembran erforderlich. Herzglykoside kommen offenbar nicht in allen Geweben des Monarchfalters vor, sondern bevorzugt im Exoskelett, in den Flügeln, in der Kutikula und im Fettkörper (Brower et al., 1988; Frick und Wink, 1995).

Vordergründig wird die Pflanze von den Insekten als Nahrungsressource verwendet, wenngleich sie auch als Quelle für Schutzstoffe dient. Die Herzglykoside schützen den Monarchen gegen einige Vögel (z.B. blaue Eichelhäher) aber nicht gegen andere Insekten (z.B. Wespen) und Säugetiere

(z.B. Hirsche, Mäuse) (Brower, 1984). Deshalb war es für die Tiere wahrscheinlich evolutiv von Vorteil nicht nur CGs, sondern auch PAs zur chemischen Verteidigung zu nutzen. Boppre (1986) stellte die Theorie auf, dass die PAs durch ihren bitteren Geschmack Räuber abschrecken und nach ihrer Bioaktivierung toxisch wirken. Die zusätzlichen giftigen PAs bei adulten Monarchen stellen eine weitere chemische Verteidigung gegen Säugetiere, und so eine weitere evolutive Anpassung gegen Freßfeinde dar.

#### 5.4.2 Anpassungsmechanismus der *D. plexippus*

*D. plexippus* muss einen Anpassungsmechanismus sowohl für die CGs als auch für PAs entwickelt haben. An den Sequestriermechanismen für CGs im Monarchfalter wurde viel geforscht und aufgeklärt, so wurde z.B. festgestellt, dass CGs die ubiquitäre Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, die für die Aufrechterhaltung des zellulären Potentials verantwortlich ist, nicht hemmen können. Durch die DNA-Sequenzanalyse der CG (Ouabain)-Bindestelle der  $\alpha$ -Untereinheit der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase konnte im Monarchen die Aminosäure Histidin statt Asparagin an der Position 122 ausgemacht werden, was den Monarchen von anderen nicht adaptierten Insekten und Säugetieren unterscheidet (Frick und Wink, 1995; Holzinger und Wink, 1996). Der Monarchfalter muss auch für PAs einen zusätzlichen Anpassungsmechanismus entwickelt haben, der dafür sorgt, dass sie ihn nicht selbst schädigen. Im Körper des *D. plexippus* aus Nordamerika wurden verschiedene PAs z.B. Makrozyklische Diester: Senecionin, Integerrimin, Seneciphyllin und Monoester: Ehinatin, Intermedin, Lycopsamin sowie Pyrrolizidin-*N*-Oxide entdeckt, diese wurden durch TLC, GC und GC/MS nachgewiesen (Kelley et al., 1987). Daher muss ein für die Detoxifizierung zuständiges Enzym im *D. plexippus* vorhanden sein.

In dieser Arbeit wurden zunächst FMOs auf molekularer Ebene untersucht. Zwei FMOs, DpFMO1 und DpFMO2, wurden in *D. plexippus* identifiziert. Die Kenntnis der Nukleinsäuresequenz erlaubt möglicherweise auch eine phylogenetische Einordnung des Enzyms zu den Lepidopteren. In weiteren Arbeiten können weitere FMOs im Monarchen ausgemacht und untersucht werden. Die full-length-cDNA muss in *E. coli* transformiert und exprimiert

werden, um die kodierten Enzyme charakterisieren zu können. Wie diese Enzyme zur Anpassung an PA-haltige Pflanzen rekrutiert wurden, kann nur auf diese Weise aufgeklärt werden. Interessant ist es zudem auch andere Danaiden, wie den *Danaus chrysippus* zu untersuchen. So benötigt *D. chrysippus* vielmehr PAs als Vorstufe für die Biosynthese der Pheromon-Komponenten (Schneider et al., 1975). Daher muss auch hier ein für die Detoxifizierung zuständiges Enzym vorhanden sein. *D. chrysippus* und *D. plexippus* könnten somit sowohl auf molekularer Ebene also auch durch ein PA-Substratspektrum genau verglichen werden. Hierdurch könnte der Substratspezifität besser verstanden werden.

#### **5.4.3 Pheromone in Danaiden außer beim *Danaus plexippus*:**

Über je mehr PAs männliche Danaiden (z.B. männliche-Falter von *Danaus gillippus*) verfügen, desto mehr Dihydropyrrolizine können sie als Pheromone produzieren. Somit werden Männchen mit einem hohen PA-Gehalt von den Weibchen deutlich bevorzugt gegenüber solchen mit einem geringeren PA-Gehalt ausgewählt (Conner et al., 2000). Die Pheromone von Danaiden können von einem Männchen durch sogenannte Pheromon-Transfer-Partikel, die ein Bukett flüchtiger Substanzen enthalten, auf die mit Chemorezeptoren ausgestatteten Fühler des Weibchens übertragen werden (Boppre, 1978). Ein großer Teil der Weibchen-PAs werden weiter auf die Eier übertragen (Dussourd et al., 1991). Ein Beispiel stellt der *Danaus chrysippus* dar, dieser lockt die Weibchen durch den sogenannten „Teuren Sex“ an, hierbei enthält der Duftpinsel eine riesige Menge an Pheromonkomponenten (bis zu 500 µg) (Boppre, 1995). Die riesige Menge an Pheromonkomponenten ist eindrucksvoll, so besitzen im Vergleich die weiblichen Sexuallockstoffe von Nachtfaltern in extrahierbaren Mengen nur maximal 1 µg. Im Gegensatz zu anderen Danaiden können Monarchfalter keine Pheromone produzieren und sogar ihre Haarbüschel sind für eine erfolgreiche Paarung nicht erforderlich (Pliske, 1975). Statt um das Weibchen mit Düften im Flug zu werben, gibt es beim Monarchfalter oft eine rabiaterere Methode, um die Paarung zu erzwingen. Diese Entdeckung bedeutet, dass die Nutzbarmachung von PAs aus PA-haltigen

Pflanzen dem Monarchen vielleicht noch andere wichtige Funktionen evolutiv verliehen hat, neben der Abschreckung von Raubtieren und der Schutzwirkung gegen Feinde, um deren Überlebenschancen zu verbessern.

## 6 DISKUSSION ZUM GESAMTPROJEKT

### 6.1 Funktion der Cytochrom-P450 Monooxygenase (CYP450) und Flavin-abhängigen Monooxygenase (FMO)

Die CYP450 und FMO sind wichtige Enzyme, die an vielen chemischen Reaktionen in Organismen beteiligt sind. Die Katalysfunktionen der CYP450 spielen in vielen Prozessen eine Rolle, sowohl in Entwicklungsprozessen als auch bei der Entgiftung von zahlreichen schädlichen Verbindungen aus der Umwelt (Chung et al., 2009). In Säugetieren, zum Beispiel beim Menschen, wurden zahlreiche CYP450 mit verschiedenen Funktionen charakterisiert. Sie sind im Metabolismus von Pestiziden und Xenobiotika, auch bei hormonellen, wachstumsregulierenden Prozessen und Stoffwechsel der Phytotoxizität beteiligt. Beispielweise sind CYP17A1 und CYP19A1 am Steroidmetabolismus beteiligt und produzieren Androgene und Östrogene (Hakki und Bernhardt, 2006). Ein anderes Beispiel ist CYP4F2, das die  $\omega$ -Hydroxylierung der  $\gamma$ -Tocopherole und Tocotrienole von Vitamin E katalysiert, die damit als polare Metabolite mit dem Urin ausgeschieden werden können. Ebenfalls wurden pflanzliche CYP450 identifiziert, die für die Katalyse der Synthese vieler Verbindungen, einschließlich Phenylpropanoiden, Lipiden, Phytohormonen, und Carotinoiden eine Rolle spielen (Schuler und Werck-Reichhart, 2003; Inoue, 2004). Im Gegensatz zu Säugetieren und Pflanzen ist die Funktion von CYP450 in Insekten weniger gut verstanden. In *D. melanogaster* wurden sechs P450 nachgewiesen, die an der Biosynthese des Insektenhormons 20-Hydroxyecdysol beteiligt sind. Chung et al., (2009) konnte zahlreiche CYP450 in *D. melanogaster* in Fettkörper, Malpighischen Tubuli und Mitteldarm mit Hilfe der in-situ-Hybridisierung nachweisen, die möglich an Entgiftungs- und Entwicklungsphysiologischen Prozessen beteiligt sind.

Im Gegensatz zu CYP450 wurden FMO nur in einer geringen Anzahl in einigen Spezies identifiziert. In Mensch, Affe, Ratte, Fischen, Pflanzen, Hefe (*S. cerevisiae*), Bakterien und Insekten wurden FMOs nachgewiesen (Schlenk und Buhler, 1991; Ziegler, 1993; Cashman, 1995; Lindigkeit et al., 1997; Katchamart et al., 2000; El-Alfy und Schlenk, 2002; Naumann et al., 2002; Scharf et al.,

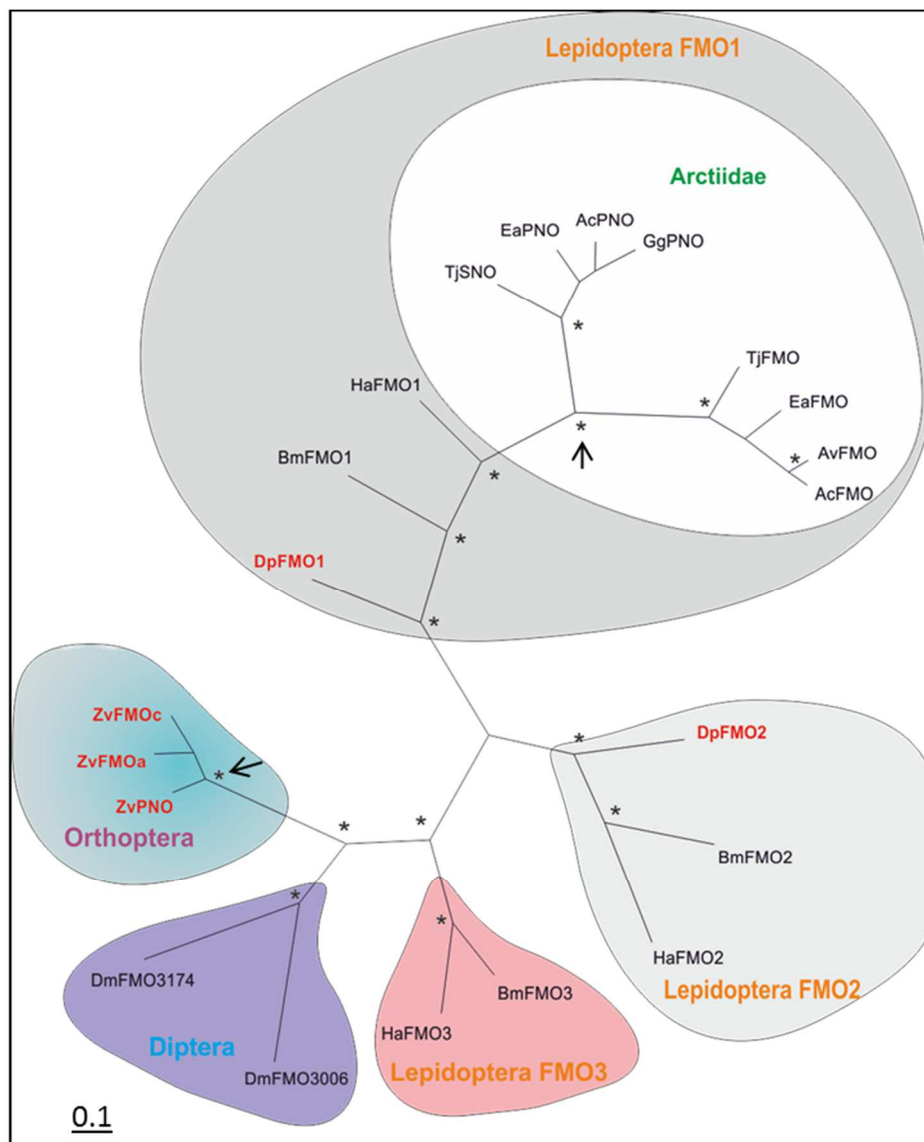


2004; Schlaich, 2007). Beim Menschen gibt es fünf unterschiedliche FMOs, die in der Xenobiotika-Metabolisierung eine Rolle spielen und die Oxidation nucleophiler Chemikalien und Drogen zu harmlosen und polaren Metaboliten katalysieren, die anschließend leicht ausgeschieden werden können (Cashman, 1995). Durch eine mikrosomale Präparation der Leber aus der Ratte konnte eine FMO gefunden werden, die für die Entgiftung von Nicotin aus Pflanzen zu Nicotin-*N*-Oxid zuständig ist (Katchamart et al., 2000). Bei der FMO von *S. cerevisiae* wurde eine Funktion zur Bereitstellung von Redoxäquivalenten für die Zelle erkannt (Suh et al., 1999). FMOs aus Fischen der Art *Oryzias latipes* werden durch höhere Salzgehalte induziert und setzen Trimethylamin zur Oxidationsform um, um damit das osmotische Milieu regulieren (El-Alfy und Schlenk, 2002). Die pflanzlichen FMOs können einen Schritt in der Biosynthese von Auxin oder im Stoffwechsel der Glucosinolate katalysieren (Schlaich, 2007). Das YUCCA Gen, das in *Arabidopsis* für eine FMO codiert, kann in andere Pflanzen transformiert werden. Damit lässt sich in den Pflanzen z.B. das Wachstum sowie die Pathogen-, Schädlings- und Herbizidresistenz erhöhen. Damit ist es für die Landwirtschaft von höchstem Interesse (Zhao et al., 2001). Insekten FMOs wurden zuerst in *D. melanogaster* (DmFMO-1 und DmFMO-2) mit unterschiedlichen Funktionen nachgewiesen. Bei DmFMO-2 wurde eine stärkere katalytische Kompetenz bei der Methinazol Sulfoxidation im Vergleich zur DmFMO1 beobachtet. Interessanterweise konnte die DmFMO-1 im Kopf der Adulten Tiere lokalisiert werden, was darauf hindeutet, dass DmFMO-1 eine deutliche physiologische Rolle in *D. melanogaster* spielt (Scharf et al., 2004). In *Bombyx mori* (Lepidoptera) konnten bislang nur drei FMOs identifiziert werden. SNO, eine FMO aus *T. jacobaeae* (Lepidoptera) wurde als erste Insekten-FMO auf molekularer Ebene identifiziert und auf ihre Enymseigenschaften hin charakterisiert (Lindigkeit et al., 1997; Naumann et al., 2002). Wie die anderen FMOs ist auch SNO an der Xenobiotika-Metabolisierung beteiligt. Pflanzen bilden PAs als Abwehrstoffe. PAs werden durch die SNO von *T. jacobaeae* zur metabolisch unschädlichen PA-*N*-Oxid-Form umgesetzt. Um die Funktion der FMOs und Anpassungsstrategien in Insekten zu erforschen, wurden weitere FMOs aus Lepidoptera, z.B. *G. geneura*, *A. caja*, *A. villica* (Arctiiden, Lepidoptera) untersucht (Sehlmeyer, 2010). In vorliegender Arbeit wurden noch weitere FMOs aus *Z.*

*variegatus* (Orthoptera) untersucht. Drei FMOs wurden in *Z. variegatus* identifiziert. Zudem wurden FMOs aus *G. geneura*, *A. caja*, *A. villica*, *Z. variegatus* und in *T. jacobaeae* nachgewiesen also aus Arten, die die gleiche Anpassungsstrategie, PA-N-Oxidation, an PAs gewählt haben. Die beiden Insektengruppen (Arctiiden und Orthoptera) verwenden den gleichen Enzymtyp, die FMO, für die PA-N-Oxidation.

## 6.2 Phylogenie der FMOs

Die mehreren identifizierten Insekten-FMOs aus den Lepidoptera, Orthoptera und Diptera ermöglichen es, einen phylogenetischen Baum zu erstellen und die FMO-Genfamilie zu analysieren. Die Sequenzen bilden drei einzelne Cluster in Bezug auf die Sequenzen der Lepidoptera (Arctiidae und Nymphalidae), die Sequenzen der Diptera (*D. melanogaster*) und die Sequenzen der Orthoptera (*Z. variegatus*). Drei separate Cluster für die Sequenzen der Lepidoptera (FMO1 bis FMO3) sind klar abgetrennt. Innerhalb der Lepidoptera wurde die Entstehung der FMOs durch Genduplikation belegt. So ist die PNO aus einer FMO1 durch Genduplikation hervorgegangen. In Orthoptera (*Z. variegatus*) wurde eine PNO aus FMO Genkopien rekrutiert. Die zwei unabhängigen Ursprünge der PNOs wurden in Lepidoptera (Arctiiden) und Orthoptera (*Z. variegatus*) in dem phylogenetischen Baum dargestellt. In diesem phylogenetischen Baum ist noch interessant zu finden, dass die beiden FMOs aus *D. plexippus*, zu den Lepidoptera-FMOs ähnlich sind, und zwar DpFMO1 zu den Lepidoptera-FMO1 und DpFMO2 zu den Lepidoptera-FMO2. Um zu prüfen ob eine der beiden *D. plexippus*-FMOs mit der postulierten PNO identisch ist, ist die biochemische Charakterisierung der Enzyme notwendig. Dadurch könnten die PNOs aus Arctiidae und Nymphalidae der Lepidoptera besser verglichen werden. Es ist möglich, dass PNOs aus unterschiedlichen Familien der Lepidoptera auch unabhängig rekrutiert wurden. Weitere FMOs der Nymphalidae sollten in diesem Zusammenhang noch identifiziert und untersucht werden.



**Abbildung 6.1: Phylogenetische Analyse der Aminosäuresequenzen mit Homologien zu den FMOs der Lepidoptera.** Die Sequenzen wurden mit der Software Vector-NTI Advance und BioEdit v.7.0.5 analysiert. Der Baum wurde mit PUAP 4beta10 Software mit maximum Parsimony-Modell erstellt. Die Unterstützung für internen Verzweigungen der Bäume wurde durch Bootstrap-Proportion (BP) mit 1000 Wiederholungen errechnet, BP Werte über 90% sind an der Verzweigungen mit \* angegeben. Die eingerahmten Sequenzen wurden FMO1, FMO2, FMO3 der Lepidoptera und andere Gruppe (Orthoptera und Diptera) FMOs gezeigt. PNOs der Arctiidae wurde also eingerahmt. In dieser Arbeit identifizierite FMOs (DpFMO1 und DpFMO2) aus *D. plexippus* (Lepidoptera) und FMOs (ZvFMOa, ZvFMOc und ZvPNO) aus *Z. variegatus* (Orthoptera) wurden besonders mit roter Farbe gekennzeichnet. ↑, Ursprung der PNOs. Ac, *Arctia caja*; Av, *Arctia villica*; Bm, *Bombyx mori*; Dp, *Danaus plexippus*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Ea, *Estigmene acrea*; Gg, *Grammia geneura*; Ha, *Helicoverpa armigera*; Tj, *Tyria jacobaeae*; Zv, *Zonocerus variegatus*.

### 6.3 Ausblick

In dieser Arbeit wurden zwei FMOs (DpFMO1 und DpFMO2) aus *D. plexippus* auf molekularer Ebene identifiziert. Um sicher sagen zu können, ob es sich bei den gefundenen FMO-Sequenzen DpFMO1 und DpFMO2 um die für die Detoxifizierung verantwortlichen Enzyme handelt, müssen eine Expression und Reinigung durchführen, und danach die Enzymaktivität charakterisiert werden. Eine Untersuchung der Substratspezifitäten wäre interessant. Damit könnte bestimmt werden, wie breit das Substratspektrum von *D. plexippus* ist, ein Polyphage, der sowohl an CGs als auch an PAs angepasst ist. Damit könnte die Substratspezifität der polyphagen Danaiden (*D. plexippus*), Ordoptera (*Z. variegatus*) und Arctiiden (*G. geneura*) verglichen werden, womit auch der Anpassung an Sekundärstoffe enthaltigen Pflanzen besser verstanden werden könnte. Zur Aufklärung des evolutionären Ursprungs der FMOs ist die Identifizierung weiterer Sequenzen innerhalb der Danaiden erforderlich. Weil *D. chrysippus* PAs als Vorstufen für die Biosynthese seiner Pheromon-Komponenten benötigt, und daher ein für die Detoxifizierung zuständiges Enzym vorhanden sein muss, eignet sich diese Art als nächstes Versuchsinsekt. Damit könnten *D. chrysippus* und *D. plexippus* sowohl auf molekularer Ebene als auch bezüglich ihres PAs-Substratspektrums genau verglichen werden.

An der Interaktion von *N. attenuata* und *M. sexta* konnte eine induzierbare und erhöhte enzymatische Aktivität des CYP450-Enzyms (CYP4 und CYP9 Familien) aus *M. sexta* nachgewiesen werden (Snyder et al., 1993). Die Induktion der FMOs aus *A. caji* wurde untersucht. Ebenfalls wurden FMOs (ZvFMOa und ZvFMOc) und PNO aus *Z. variegatus* auf ihre Induktionsfähigkeit hin untersucht. Offensichtlich sind die PNOs aus *A. caji* und der *Z. variegatus*, die für die Detoxifizierung von PAs verantwortlichen sind, durch PAs induzierbar. Interessant wäre zu untersuchen, ob die anderen Alkaloide oder Substrate, z.B. Atropin oder Glutathion auch die PNO der *Z. variegatus* induzieren können. Interessant ist auch die Frage, ob und wie sich FMOs mit unbekannter Funktion, durch andere Substrate induziert werden können.

Die FMO ist eine NADPH und/oder NADH-abhängige Monooxygenase. In der vorliegenden Arbeit wurde eine SNO aus *T. jacobaeae* gefunden, die nur mit NADPH als Kofaktor funktionsfähig ist. Im Gegensatz dazu kann die PNO von *Z. variegatus* NADPH und NADH als Kofaktor verwenden. Suh et al., (1999) konnte eine yFMO aus *S. cerevisiae* nachweisen, deren Enzymaktivität mit NADPH 12-fach höher als mit NADH als Kofaktor ist. Durch die Mutation von Lys219 zu Ala219 konnte Lys219 als wichtig für die NADPH-abhängige Aktivität nachgewiesen werden (Suh et al., 1999). In dieser Arbeit wurde für die PNO der *Z. variegatus* ebenfalls nachgewiesen, dass die Enzymaktivität mit Senecionin als Substrat mit NADPH als Kofaktor 8 Fach höher als mit NADH verlief. Es bleibt zu untersuchen, ob Lys220, aufgrund von Alignment mit yFMO aus *S. cerevisiae* identifiziert, in der PNO der *Z. variegatus* dieselbe Bedeutung wie in der yFMO besitzt. Hierfür müsste im nächsten Schritt eine Mutante hergestellt, und deren Aktivität bestimmt werden.

FMOs sind nach dem CYP450 das wichtigste Monooxygenase-System. Um die Funktion der FMOs besser zu verstehen, wurden Kristallstrukturen der SpFMO aus *Schizosaccharomyces pombe* (Eswaramoorthy et al., 2006) und mFMO aus *Methylophaga sp.* Stamm SK1 (Alfieri et al., 2008) untersucht. Beide wiesen sehr ähnliche Strukturen auf. Mit ihnen konnten die FAD- und NADPH-Bindungsstellen, der Enzym-FAD-NADPH-Komplex und Enzym-FAD-Substrat-Komplex gut erforscht werden. Um die Kristallstrukturen der Insekten-FMOs zu untersuchen, würde das hoch reine Protein benötigt. Es ist möglich, PNO sowie ZvFMOa und ZvFMOc von *Z. variegatus*, durch FPLC (Fast protein liquid chromatography) zu reinigen. Mit den hochreinen Proteinen ließen sich die Strukturen aufklären, und mit mFMO aus *Methylophaga sp.* und SpFMO aus *S. pombe* vergleichen. Damit könnten die FMOs aus Insekten auf struktureller und katalytischer Ebene besser erklärt und verstanden werden.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Die FMOs in verschiedener PAs-adaptierten Insekten wurde identifiziert und charakterisiert. Die Ergebnisse sind hier in vier Projektteile gegliedert.

### PROJEKTTEIL I

- Ein Expressionssystem wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Zur Expression von rekombinanten Insekten-FMO in *E. coli* BL21(DE3) wurden zahlreiche Variationen der Expressionsbedingungen durch die Kombination von wichtigen Einflussfaktoren für die Löslichkeit und Aktivität des Enzyms durchgeführt. Schließlich konnte das lösliche Protein mit Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden.
- Nach der Reinigung wurde das Enzym mit verschiedenen PAs als Substrat durch Radio- und photometrische Assays charakterisiert. Ein Vergleich der PNO aus dem Generalisten *G. geneura* mit der SNO aus dem Spezialisten *T. jacobaeae* ergab eine deutlich erweiterte Substratspezifität im Generalisten.

### PROJEKTTEIL II

- Durch den Einsatz von degenerierten Primern, die von bekannten FMOs abgeleitet wurden, konnten erstmalig drei unbekannte FMOs aus dem Fettkörper von *Z. variegatus* identifiziert werden.
- Weiterhin wurden drei FMOs auf ihre Eigenschaften bezüglich Temperatur-, pH-Abhängigkeit und Substratspezifität untersucht.
- Für die PNO aus *Z. variegatus* wurde ein breites Substratspektrum nachgewiesen.
- Neben der PNO aus *Z. variegatus* wurden für ZvFMOa und ZvFMOc 400-fach geringere spezifische Aktivitäten nachgewiesen. Vermutlich gehen alle drei Gene auf eine Genduplikation zurück, PNO wurde im weiteren Verlauf für die N-Oxygenierung der pflanzlichen PAs optimiert, die beiden FMOs (ZvFMOa and ZvFMOc) mit unbekannter Funktion nochmals dupliziert.

**PROJEKTTEIL III**

- Mittels RT-PCR wurde die Induktion der FMOs in *A. caja* durch PA-haltiges Futter untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die PNO in *A. caja* durch Kontakt mit PA-haltiger Nahrung induzierbar ist.
- Ebenfalls wurden drei FMOs mit unterschiedlicher Enzymaktivität in *Z. variegatus* auf Induzierbarkeit durch PAs untersucht. Nur das für die Detoxifizierung zuständige Enzym ZvPNO wird durch die Fütterung mit *S. jacobaea* induziert. Beide Enzyme, ZvFMOa und ZvFMOc, sind nicht durch PA-haltige Pflanzen induzierbar.
- Durch eine RT-PCR wurden die Gewebespezifität der SNO in *T. jacobaeae* und ebenfalls der FMOs in *Z. variegatus* untersucht. Fettkörper und Kopfgewebe wurden als bevorzugte Expressionsorte identifiziert.

**PROJEKTTEIL IV**

- Es wurden zwei unbekannte FMOs (DpFMO1 und DpFMO2) im Monarchfalter (*D. plexippus*) identifiziert.
- Außerdem, konnte eine modifizierte Form des PNO-spezifischen Bereichs als **NQPKFS** in DpFMO1 identifiziert werden, der jedoch in DpFMO2 fehlt. Um genau sagen zu können, ob eine der beiden *D. plexippus*-FMOs die Funktion einer PNO besitzt, müssten die FMOs biochemisch charakterisiert werden.

## SUMMARY

The FMOs of several PA-adapted insects have been identified and characterized. The results are shown in the following four project parts.

### PROJECT PART I

- An expression system was established in this work. In order to get the soluble and active enzyme, variations of the heterologous expression conditions of recombinant insect-FMO in *E. coli* BL21 (DE3) were carried out. Finally, the soluble protein was purified by metal-chelate affinity chromatography.
- The enzyme was characterized with different PAs as substrate by radio- and photometric assays after purification. The substrate specificity of the PNO of the generalist arctiid *G. geneura* was much broader than the related enzyme of the specialist *T. jacobaeae*.

### PROJECT PART II

- Three FMO genes from the fat body of *Z. variegatus* were firstly identified, which were amplified by PCR with degenerate primers that derived from the already known FMOs.
- Furthermore, three FMOs were studied on their properties in terms of temperature, pH-dependence and substrate specificity.
- The PNO from *Z. variegatus* demonstrated broad substrate spectrum.
- In addition to the PNO of *Z. variegatus* were two further FMOs (ZvFMOa and ZvFMOc) 400-fold lower specific activity of the enzymes detected. We speculated that all three genes (PNO, ZvFMOa and ZvFMOc) were due to one gene duplication. PNO was optimized for the *N*-oxygenation of the plant PAs and the other two FMOs (ZvFMOa and ZvFMOc) with unknown function were duplicated again.



**PROJECT PART III**

- The induction of FMOs was investigated by feeding on PA-containing food with a RT-PCR approach. The results indicated that the PNO of *A. caji* was induced by PA-containing food.
- Three FMOs of *Z. variegatus* with different enzyme activity were also investigated for inducibility by PAs. Only the enzyme ZvPNO which is responsible for detoxification was induced by the feeding of *S. jacobaea*, but the other two FMOs (ZvFMOa and ZvFMOc) were not inducible by PA-containing plants.
- A semiquantitative RT-PCR approach was used to identify the tissue specificity of SNO of *T. jacobaeae* and FMOs of *Z. variegatus*. Finally, the head and fat body were identified as the preferred expression tissue.

**PROJECT PART IV**

- Two unknown FMOs (DpFMO1 and DpFMO2) of the Monarch butterfly (*D. plexippus*) were identified.
- In addition, a modified form of the PNO specific area as **NQPKFS** in DpFMO1, but not in DpFMO2 was identified. In order to confirm that, whether one of the two *D. plexippus*-FMOs has the functional of the PNO, the enzyme would be biochemical characterized.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Alfieri, A., Malito, E., Orru, R., Fraaije, M. W. und Mattevi, A.** (2008) Revealing the moonlighting role of NADP in the structure of a flavin-containing monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 6572-6577
- Anke, S., Gonde, D., Kaltenecker, E., Hansch, R., Theuring, C. und Ober, D.** (2008) Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in *Phalaenopsis* orchids: developmental expression of alkaloid-specific homospermidine synthase in root tips and young flower buds. *Plant Physiol.* **148**: 751-760
- Anke, S., Niemueller, D., Moll, S., Hansch, R. und Ober, D.** (2004) Polyphyletic origin of pyrrolizidine alkaloids within the Asteraceae. Evidence from differential tissue expression of homospermidine synthase. *Plant Physiol.* **136**: 4037-4047
- Aplin, R. und Rothschild, M.** (1972) Poisonous alkaloids in the body tissues of the Garden Tiger moth (*Arctia caja* L.) and the Cinnabar moth (*Tyria (=Callimorpha) jacobaeae* L.) (Lepidoptera). In: De Vries, A., Kochva, E. (Eds.). *Toxins of Animal and Plant Origin 2* Gordon & Breach Sci. Pub., New York: 579-595
- Biller, A.** (1993) Metabolisierung und Speicherung pflanzlicher Pyrrolizidin-alkaloide durch adaptierte und nicht adaptierte Insekten. Dissertation, TU-Braunschweig
- Blackwell, J. R. und Horgan, R.** (1991) A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett.* **295**: 10-12
- Boppre, M.** (1978) Chemical communication, plant relationships, and mimicry in the evolution of danaid butterflies. *Ent. exp. & appl.* **24**: 64-77
- Boppre, M.** (1986) Insects Pharmacophagously Utilizing Defensive Plant Chemicals (Pyrrolizidine Alkaloids). *Naturwissenschaften* **73**: 17-26
- Boppre, M.** (1995) Pharmakophagie: Drogen, Sex und Schmetterlinge Für viele Insekten sind Pflanzen weit mehr als Nährstoffquellen. *Biologie in unserer Zeit* **25**: 8-17
- Boppre, M., Colegate, S. M. und Edgar, J. A.** (2005) Pyrrolizidine alkaloids of *Echium vulgare* honey found in pure pollen. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 594-600
- Böttcher, F., Adolph, R. und Hartmann, T.** (1993) Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. *Phytochem.* **32**: 679-689

- Böttcher, F., Ober, D. und Hartmann, T.** (1994) Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids: Putrescine and spermidine are essential substrates of enzymatic homospermidine formation. *J. Chem. Canadian* **72**: 80-85
- Brower, L. P.** (1984) Chemical defence in butterflies. *The biology of butterflies.* (ed. by Vane-Wright, R. I. und Ackery, P. R.) Academic Press, London **11**: 109-134
- Brower, L. P., Pelson, C. J., Seiber, J. N., Fink, L. S. und Bond, C.** (1988) Exaptation as an alternative to coevolution in the cardenolide-based chemical defense of monarch butterflies (*Danaus plexippus* L.) against avian predators. *Chemical Mediation of Coevolution* (ed. by Spencer, K. C.) Academic Press, New York.: 447-475
- Cashman, J. R.** (1995) Structural and catalytic properties of the mammalian flavin-containing monooxygenase. *Chem. Res. Toxicol.* **8**: 166-181
- Caspers, P., Stieger, M. und Burn, P.** (1994) Overproduction of bacterial chaperones improves the solubility of recombinant protein tyrosine kinases in *Escherichia coli*. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **40**: 635-644
- Cheeke, P. R.** (1988) Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. *J. Anim. Sci.* **66**: 2343-2350
- Chen, K. Y. und Liu, A. Y. C.** (1997) Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. *Biol. Signals* **6**: 105-109
- Chen, T., Mei, N. und Fu, P. P.** (2010) Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *J. Appl. Toxicol.* **30**: 183-196
- Chung, H., Sztal, T., Pasricha, S., Sridhar, M., Batterham, P. und Daborn, P. J.** (2009) Characterization of *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 5731-5736
- Cole, P. A.** (1996) Chaperone-assisted protein expression. *Structure* **4**: 239-242
- Conner, W. E., Boada, R., Schroeder, F. C., Gonzalez, A., Meinwald, J. und Eisner, T.** (2000) Chemical defense: bestowal of a nuptial alkaloidal garment by a male moth on its mate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 14406-14411
- Croteau, R., Kutchan, T. M. und Lewis, N. G.** (2000) Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry & molecular biology of plants* (Buchanan, B., Gruissem, R. und Jones, R., Eds.). American Soc. Plant Phys., Rockville Maryland: 1250-1318
- Crout, D. H., Davies, N. M., Smith, E. H. und Whitehouse, D.** (1972) Pyrrolizidine alkaloids. The biosynthesis of senecic acid. *J. Chem. Soc. Perkin. 1* **5**: 671-680

- Culvenor, C. C., Edgar, J. A. und Smith, L. W.** (1981) Pyrrolizidine alkaloids in honey from *Echium plantagineum* L. J. Agric. Food Chem. **29**: 958-960
- Dussourd, D. E., Harvis, C. A., Meinwald, J. und Eisner, T.** (1991) Pheromonal advertisement of a nuptial gift by a male moth (*Utetheisa ornatrix*). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 9224-9227
- Edgar, J. A., Cockrum, P. A. und Frahn, J. L.** (1976) Pyrrolizidine alkaloids in *Danaus plexippus* L. and *Danaus chrysippus* L. Experientia **32**: 1535-1537
- Edgar, J. A., Culvenor, C. C. und Pliske, T. E.** (1974) Coevolution of Danaid butterflies with their host plants. Nature **250**: 646-648
- Ehmke, A., Kirsten von Borstel und Hartman, T.** (1988) Alkaloid *N*-oxides as transport and vacuolar storage compounds of pyrrolizidine alkaloids in *Senecion vulgaris* L. . Planta **176**: 83-90
- Ehmke, A., Rowell-Rahier, M., Pasteels, J. M. und Hartmann, T.** (1991) Sequestration of ingested [<sup>14</sup>C]senecionine *N*-oxide in the exocrine defensive secretion of chrysomelid beetles. J. Chem. Ecol. **17**: 2367-2379
- Eisner, T., Rossini, C., Conzalez, A., Lyengar, V. K., Siegler, M. V. S. und Smedley, S. R.** (2002) Paternal investment in egg defence, Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition. (ed. Hilker, M. und Meiners, T) Blackwell, Oxford: 91-116
- EI-Alfy, A. T. und Schlenk, D.** (2002) Effect of 17 $\beta$ -estradiol and testosterone on the expression of flavin-containing monooxygenase and the toxicity of aldicarb to Japanese medaka, *Oryzias latipes*. Toxicol. Sci. **68**: 381-388
- Eswaramoorthy, S., Bonanno, J. B., Burley, S. K. und Swaminathan, S.** (2006) Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**: 9832-9837
- Etheredge, J. A., Perez, S. M., Taylor, O. R. und Jander, R.** (1999) Monarch butterflies (*Danaus plexippus* L.) use a magnetic compass for navigation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 13845-13846
- Ferguson, L. R. und Philpott, M.** (2008) Nutrition and Mutagenesis. Annu. Rev. Nutr. **28**: 313-329
- Frei, H., Luethy, J., Brauchli, J., Zweifel, U., Wuergler, F. E. und Schlatter, C.** (1992) Structure/activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. Chem. Biol. Interact **83**: 1-22

- Frick, C. und Wink, M.** (1995) Uptake and Sequestration of ouabain and other cardiac glycosides in *Danaus plexippus* (Lepidoptera: Danaidae): Evidence of a carrier-mediated process. *J. Chem. Ecol.* **21**: 557-574
- Frölich, C.** (1996) Vorkommen, Verteilung und Biosynthese von Pyrrolizidinalkaloiden in Boraginaceae und Orchidaceae Dissertation, TU Braunschweig
- Frölich, C., Hartmann, T. und Ober, D.** (2006) Tissue distribution and biosynthesis of 1,2-saturated pyrrolizidine alkaloids in *Phalaenopsis* hybrids (Orchidaceae). *Phytochem.* **67**: 1493-1502
- Frölich, C., Ober, D. und Hartmann, T.** (2007) Tissue distribution, core biosynthesis and diversification of pyrrolizidine alkaloids of the lycopsamine type in three Boraginaceae species. *Phytochem.* **68**: 1026-1037
- Graser, G. und Hartmann, T.** (2000) Biosynthesis of spermidine, a direct precursor of pyrrolizidine alkaloids in root cultures of *Senecio vulgaris* L. . *Planta* **211**: 239-245
- Green, T. R. und Ryan, C. A.** (1972) Wound-Induced Proteinase Inhibitor in Plant Leaves: A Possible Defense Mechanism against Insects. *Science* **175**: 776-777
- Griffin, D. S. und Segall, H. J.** (1986) Genotoxicity and cytotoxicity of selected pyrrolizidine alkaloids, a possible alkenal metabolite of the alkaloids, and related alkenals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **86**: 227-234
- Hakki, T. und Bernhardt, R.** (2006) CYP17- and CYP11B-dependent steroid hydroxylases as drug development targets. *Pharmacol. Ther.* **111**: 27-52
- Halitschke, R., Schittko, U., Pohnert, G., Boland, W. und Baldwin, I. T.** (2001) Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. III. Fatty acid-amino acid conjugates in herbivore oral secretions are necessary and sufficient for herbivore-specific plant responses. *Plant Physiol.* **125**: 711-717
- Hartmann, T.** (1996) Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Ent. Exp. & Appl.* **80**: 177-188
- Hartmann, T.** (1999a) Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta* **207**: 483-495
- Hartmann, T.** (2004) Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology. *Planta* **219**: 1-4

- Hartmann, T.** (2007) From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochem.* **68**: 2831-2846
- Hartmann, T. und Dierich, B.** (1998) Chemical diversity and variation of pyrrolizidine alkaloids of the senecionine type: biological need or coincidence? *Planta* **206**: 443-451
- Hartmann, T. und Ober, D.** (2000) Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. *Top. Curr. Chem.* **209**: 207-243
- Hartmann, T. und Ober, D.** (2008) Defense by Pyrrolizidine Alkaloids: Developed by Plants and Recruited by Insects. Induced Plant Resistance to Herbivory, Schaller, A. (Ed.), Springer Science+Business Media B.V.: 213-231
- Hartmann, T., Sander, H., Adolph, R., und Toppel, G.** (1988) Metabolic links between the biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids and polyamines in root cultures of *senecio vulgaris*. *Planta* **175**: 82-90
- Hartmann, T., Theuring, C., Schmidt, J., Rahier, M. und Pasteels, J. M.** (1999b) Biochemical strategy of sequestration of pyrrolizidine alkaloids by adults and larvae of chrysomelid leaf beetles. *J. Insect Physiol.* **45**: 1085-1095
- Hartmann, T., Theuring, C., Witte, L. und Pasteels, J. M.** (2001) Sequestration, metabolism and partial synthesis of tertiary pyrrolizidine alkaloids by the neotropical leaf-beetle *Platyphora boucardi*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**: 1041-1056
- Hartmann, T. und Witter, L.** (1995) Chemistry, biology and chemoecology of the pyrrolizidine alkaloids. S. W. Pelletier, Herausgeber, Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives, Pergamon Press Band **9**: 155-233
- Hartmann, T. und Zimmer, M.** (1986) Organ-specific distribution and accumulation of pyrrolizidine alkaloids during the life history of two annual *Senecio* species. *Plant Physiol.* **122**: 67-80
- Holzinger, F. und Wink, M.** (1996) Mediation of cardiac glycoside insensitivity in the monarch butterfly (*Danaus plexippus*): Role of an amino acid substitution in the ouabain binding site of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *J. Chem. Ecol.* **22**: 1921-1937
- Hooper, P. T., Keeler, R. F., van Kampen, K. R. und James, L. F.** (1978) Pyrrolizidine alkaloid poisoning Pathology with particular reference to differences in animal and plant species. In *Effects of Poisonous Plants on Livestock*. Academic Press, New York.: 161-176

- Howe, G. A. und Schaller, A.** (2002) Induced Plant Resistance to Herbivory. Chapter 1: Direct Defenses in Plants and Their Induction by Wounding and Insect Herbivores. Springer Science+Business Media B.V.: 7-29
- Huan, J. Y., Miranda, C. L., Buhler, D. R. und Cheeke, P. R.** (1998) The roles of CYP3A and CYP2B isoforms in hepatic bioactivation and detoxification of the pyrrolizidine alkaloid senecionine in sheep and hamsters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **151**: 229-235
- Huan, J. Y., Miranda, C. L., Buhler, D. R. und Cheeke, P. R.** (1998) Species differences in the hepatic microsomal enzyme metabolism of the pyrrolizidine alkaloids. *Toxicol. Lett.* **99**: 127-137
- Inoue, K.** (2004) Carotenoid hydroxylation-P450 finally! *Trends Plants Sci.* **9**: 515–517
- Jiang, Y., Fu, P. P. und Lin, G.** (2006) Hepatotoxicity of naturally occurring pyrrolizidine alkaloids. *As. J. Pharmacodyn. Pharmacolin.* **6**: 187-192
- Katchamart, S., Stresser, D. M., Dehal, S. S., Kupfer, D. und Williams, D. E.** (2000) Concurrent flavin-containing monooxygenase down-regulation and cytochrome P-450 induction by dietary indoles in rat: implications for drug-drug interaction. *Drug Metab. Dispos.* **28**: 930-936
- Kelley, R. B., Seiber, J. N., Jones, A. D., Segall, H. J. und Brower, L. P.** (1987) Pyrrolizidine alkaloids in overwintering monarch butterflies (*Danaus plexippus*) from Mexico. *Experientia* **43**: 943-946
- Kempf, M., Beuerle, T., Buhringer, M., Denner, M., Trost, D., von der Ohe, K., Bhavanam, V. B. und Schreier, P.** (2008) Pyrrolizidine alkaloids in honey: Risk analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Mol. Nutr. Food Res.* **52**: 1193-1200
- Kessler, A. und Baldwin, I. T.** (2002) Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**: 299-328
- Langel, D.** (2007) Biosynthesis of the Unique Necic Acid Moiety in Lycopsamine Type Pyrrolizidine Alkaloids –a Molecular Approach-. Dissertation, TU-Braunschweig
- Lawton, M. P. und Philpot, R. M.** (1993) Functional characterization of flavin-containing monooxygenase 1B1 expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* and analysis of proposed FAD- and membrane-binding domains. *Biol. Chem.* **268**: 5728 – 5734
- Li, X. C., Berenbaum, M. R. und Schuler, M. A.** (2002) Plant allelochemicals differentially regulate *Helicoverpa zea* cytochrome P450 genes. *Insect. Mol. Biol.* **11**: 343-351

- Lilie, H., Schwarz, E. und Rudolph, R.** (1998) Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**: 497-501
- Lindigkeit, R., Biller, A., Buch, M., Schiebel, H. M., Boppre, M. und Hartmann, T.** (1997) The two facies of pyrrolizidine alkaloids: the role of the tertiary amine and its *N*-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. *Eur. J. Biochem.* **245**: 626-636
- Luckner, M.** (1990) Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants, and Animals. Gustav Fischer Verlag GmbH, Jena. Auflage **3**
- Malcolm, S. B. und Brower, L. P.** (1989) Evolutionary and ecological implications of cardenolide sequestration in the monarch butterfly. *Experientia* **45**: 284-295
- Mattocks, A. R., Driver, H. E., Barbour, R. H. und Robins, D. J.** (1986) Metabolism and toxicity of synthetic analogues of macrocyclic diester pyrrolizidine alkaloids. *Chem. Biol. Interact* **58**: 95-108
- Miranda, C. L., Chung, W., Reed, R. E., Zhao, X., Henderson, M. C., Wang, J. L., Williams, D. E. und Buhler, D. R.** (1991) Flavin-containing monooxygenase: a major detoxifying enzyme for the pyrrolizidine alkaloid senecionine in guinea pig tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**: 546-552
- Mothes, K.** (1955) Physiology of alkaloids. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **6**: 393–432
- Mukhopadhyay, A.** (1997) Inclusion bodies and purification of proteins in biologically active forms. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **56**: 61-109
- Narberhaus, I., Zintgraf, V. und Dobler, S.** (2005) Pyrrolizidine alkaloids on three trophic levels – evidence for toxic and deterrent effects on phytophages and predators. *Chemoecol.* **15**: 121-125
- Naumann, C.** (2003) Klonierung und Expression einer für die Detoxifizierung von Pyrrolizidinalkaloiden verantwortlichen Flavin-abhängigen Monooxygenase aus *Tyria jacobaeae*. Dissertation, TU-Braunschweig
- Naumann, C., Hartmann, T. und Ober, D.** (2002) Evolutionary recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for the detoxification of host plant-acquired pyrrolizidine alkaloids in the alkaloid-defended arctiid moth *Tyria jacobaeae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 6085-6090
- Nawaz, H. R., Malik, A., Muhammad, P., Ahmed, S. und Riaz, M.** (2000) Chemical constituents of *Ajuga parviflora*. *Z. Naturforsch.* **55b**: 100-103
- Niemueller, D., Reimann, A. und Ober, D.** (2012) Distinct cell-specific expression of homospermidine synthase involved in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in three species of the boraginales. *Plant Physiol.* **159**: 920-929



- Ober, D.** (2005) Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism. *Trends Plant Sci.* **10**: 444-449
- Ober, D., Gibas, L., Witte, L. und Hartmann, T.** (2003) Evidence for general occurrence of homospermidine in plants and its supposed origin as by-product of deoxyhypusine synthase. *Phytochem.* **62**: 339-344
- Ober, D., Harms, R., Witte, L. und Hartmann, T.** (2003) Molecular evolution by change of function. Alkaloid-specific homospermidine synthase retained all properties of deoxyhypusine synthase except binding the eIF5A precursor protein. *J. Biol. Chem.* **278**: 12805-12812
- Ober, D. und Hartmann, T.** (1999) Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 14777-14782
- Ober, D. und Hartmann, T.** (2000) Phylogenetic origin of a secondary pathway: the case of pyrrolizidine alkaloids. *Plant Mol. Biol.* **44**: 445-450
- Park, M. H., Joe, Y. A. und Kang, K. R.** (1998) Deoxyhypusine synthase activity is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**: 1677-1683
- Park, M. H., Lee, Y. B. und Joe, Y. A.** (1997) Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biol. Signals* **6**: 115-123
- Pliske, T. E.** (1975) Courtship Behavior of the Monarch Butterfly, *Danaus plexippus* L. . *Ann. Entomol. Soc. Am.* **68**: 143-151
- Reichstein, T., von Euw, J., Parsons, J. A. und Rothschild, M.** (1969) Heart poisons in the Monarch butterfly. *Science* **161**: 861-866
- Reimann, A., Nurhayati, N., Backenkohler, A. und Ober, D.** (2004) Repeated evolution of the pyrrolizidine alkaloid-mediated defense system in separate angiosperm lineages. *Plant Cell* **16**: 2772-2784
- Roitman, J. N.** (1983) Pyrrolizidine alkaloids from *Amsinckia menziesii*. *Aust. J. Chem.* **36**: 769-778
- Rosorius, O., Reichart, B., Kratzer, F., Heger, P., Dabauvalle, M. C. und Hauber, J.** (1999) Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J. Cell. Sci.* **112**: 2369-2380
- Rothschild, M., Marsh, N. und Gardiner, B.** (1978) Cardioactive substances in the monarch butterfly and *Euploea core* reared on leaf-free artificial diet. *Nature* **275**: 649-650

- Rowell-Rahier, M., Witte, L., Ehmke, A., Hartmann, T. und Pasteels, J. M.** (1991) Sequestration of plant pyrrolizidine alkaloids by chrysomelid beetles and selective transfer into the defensive secretions. *Chemoecol.* **2**: 41-48
- Sachs, J.** (1868) Lehrbuch der Botanik nach dem gegenwärtigen Stand der Wissenschaft In. Leipzig Wilhelm Engelmann
- Sander, H. und Hartmann, T.** (1989) Site of synthesis, metabolism and translocation of senecionine *N*-oxide in cultured roots of *Senecio erucifolius*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **18**: 19–32
- Scharf, M. E., Scharf, D. W., Bennett, G. W. und Pittendrigh, B. R.** (2004) Catalytic activity and expression of two flavin-containing monooxygenases from *Drosophila melanogaster*. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **57**: 28-39
- Schein, C. H. und Noteborn, M. H. M.** (1988) Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Bio/Technology* **6**: 291-294
- Schlaich, N. L.** (2007) Flavin-containing monooxygenases in plants: looking beyond detox. *Trends Plant Sci.* **12**: 412-418
- Schlenk, D. und Buhler, D. R.** (1991) Role of flavin-containing monooxygenase in the in vitro biotransformation of aldicarb in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica* **21**: 1583-1589
- Schneider, D., Boppre, M., Schneider, H., Thompson, W. R., Boriack, C. J., Petty, R. L. und Meinwald, J.** (1975) A pheromone precursor and its uptake in male *danaus* butterflies. *J. comp. Physiol.* **97**: 245-256
- Schuler, M. A. und Werck-Reichhart, D.** (2003) Functional genomics of P450s. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 629-667
- Sehlmeyer, S.** (2010) Flavin-abhängige Monooxygenasen aus *N*-Oxygenierenden Arctiiden. Dissertation, TU Braunschweig
- Snyder, M. J., HSU, Err-Lieh und Feyereisen, R.** (1993) Induction of cytochrome P-450 activities by nicotine in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Chem. Ecol.* **19**: 2903-2916
- Stebbins, G. L.** (1974) Flowering plants: evolution above the species level Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts
- Stelljes, M. E. und Seiber, J. N.** (1990) Pyrrolizidine alkaloids in an overwintering population of monarch butterflies (*Danaus plexippus*) in California. *J. Chem. Ecol.* **16**: 1459-1470.

- Stevens, J. L., Snyder, M. J., Koener, J. F. und Feyereisen, R.** (2000) Inducible P450s of the CYP9 family from larval *Manduca sexta* midgut. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**: 559-568
- Suh, J. K., Poulsen, L. L., Ziegler, D. M. und Robertus, J. D.** (1996) Molecular cloning and kinetic characterization of a flavin-containing monooxygenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **336**: 268-274
- Suh, J. K., Poulsen, L. L., Ziegler, D. M. und Robertus, J. D.** (1999) Lysine 219 participates in NADPH specificity in a flavin-containing monooxygenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **372**: 360-366
- Suh, J. K., Poulsen, L. L., Ziegler, D. M. und Robertus, J. D.** (1999) Yeast flavin-containing monooxygenase generates oxidizing equivalents that control protein folding in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 2687-2691
- Tandon, B. N., Tandon, H. D., Tandon, R. K., Narndranathan, M. und Joshi, Y. K.** (1976) An epidemic of veno-occlusive disease of liver in central India. *Lancet* **2**: 271-272
- Toppel, G., Witte, L., Riebesehl, B., Borstel, K. v. und Hartmann, T.** (1987) Alkaloid patterns and biosynthetic capacity of root cultures from some pyrrolizidine alkaloid producing *Senecio* species. *Plant Cell Rep.* **6**: 466–469
- Van Dam, N. M. und Vrieling, K.** (1994) Genetic variation in constitutive and inducible pyrrolizidine alkaloid levels in *Cynoglossum officinale* L.. *Oecologia* **99**: 374-378
- Van Dam, N. M., Vuister, L. W., Bergshoeff, C., vos, H. d. und Meijden, e. V. D.** (1995) The "Raison Detre" of pyrrolizidine alkaloids in *Cynoglossum officinale*: deterrent effects against generalist herbivores. *Chem. Ecol.* **21**: 507-523
- Weber, S.** (1997) Untersuchungen zur Biosynthese der Pyrrolizidin-Alkaloide vom Lycopsamin-Typ an Wurzelkulturen von *Eupatorium clematideum*. Dissertation, TU Braunschweig
- Weller, S. J., Jacobson, N. L. und Conner, W. E.** (1999) The evolution of chemical defences and mating systems in tiger moths (Lepidoptera: Arctiidae). *Biol. J. Linn. Soc.* **68**: 557-578
- Wen, Z., Zeng, R. S., Niu, G., R., B. M. und Schuler, M. A.** (2009) Ecological Significance of Induction of Broad-Substrate Cytochrome P450s by Natural and Synthetic Inducers in *Helicoverpa zea*. *Chem. Ecol.* **35**: 183-189

- Wink, M.** (2004) Phytochemical Diversity of Secondary Metabolites. Encyclopedia of Plant & Crop, Science: 915-919
- Winz, R. A. und Baldwin, I. T.** (2001) Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. IV. Insect-Induced ethylene reduces jasmonate-induced nicotine accumulation by regulating putrescine *N*-methyltransferase transcripts. Plant Physiol. **125**: 2189-2202
- Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Maekawa, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T. und Ishii, S.** (1995) Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. J. Biol. Chem. **270**: 25328-25331
- Zeng, R. S., Wen, Z., Niu, G., Schuler, M. A. und Berenbaum, M. R.** (2007) Allelochemical induction of cytochrome P450 monooxygenases and amelioration of xenobiotic toxicity in *Helicoverpa zea*. J. Chem. Ecol. **33**: 449-461
- Zhao, Y., Christensen, S. K., Fankhauser, C., Cashman, J. R., Cohen, J. D., Weigel, D. und Chory, J.** (2001) A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. Science **291**: 306-309
- Ziegler, D. M.** (1993) Recent studies on the structure and function of multisubstrate flavin-containing monooxygenases. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **33**: 179-199

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Geburtsdatum 14.10.1975  
Geburtsort Heilongjiang, China  
Staatsangehörigkeit deutsch

## Studium

09/1996 ~ 07/2000 Bachelor of Science in Pharmazeutischer Chemie  
Shenyang Pharmazeutische Universität, China

09/2000 ~ 09/2002 DSH Vorbereitung  
Beijing Sprache Universität  
Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

10/2002 ~ 04/2003 Diplom Pharmazie, ein Semester  
Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

04/2003 ~ 09/2005 Master of Science Studium, Hauptfach: Biochemie  
Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

10/2005 ~ 02/2010 Promotionsstudium unter der Betreuung von Professor Dr.  
Dietrich Ober  
Botanisches Institut und Botanischer Garten  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (05/2006~09/2009)  
zuvor: Institut für Pharmazeutische Biologie  
Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
(10/2005~04/2006)

Seit 06/2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin  
Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, Botanik I  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**Publikationen**

**Linzhu Wang, Till Beuerle, James Timbilla, Dietrich Ober** (2012). Independent recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for safe accumulation of sequestered pyrrolizidine alkaloids in grasshoppers and moths. PLoS ONE 7(2): e31796.

**Sven Sehlmeier, Linzhu Wang, Dorothee Langel, David G. Heckel, Hoda Mohagheghi, Georg Petschenka, Dietrich Ober** (2010). Flavin-Dependent Monooxygenases as a Detoxification Mechanism in Insects: New Insights from the Arctiids (Lepidoptera). PLoS ONE 5(5): e10435.

**Wang, L., Große, T., Stevens, H., Brinkhoff, T., Simon, M., Liang., L, Bitzer, J., Bach, G., Zeeck, A., Tokuda, H., Lang, S.** (2006). Bioactive hydroxyphenylpyrrole-dicarboxylic acids from a new marine *Halomonas* sp.: production and structure elucidation. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 72(4): 816-822

**Jens Bitzer, Thomas Große, Linzhu Wang, Siegmund Lang, Winfried Beil, Axel Zeeck** (2006). New Aminophenoxazinones from a Marine *Halomonas* sp.: Fermentation, Structure Elucidation, and Biological Activity. J. Antibiot. (Tokyo). 59: 86-92

## ERKLÄRUNG

Ich versichere an Eides statt, dass ich bis zum heutigen Tage weder an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel noch an einer anderen Hochschule ein Promotionsverfahren endgültig nicht bestanden habe oder mich in einem entsprechenden Verfahren befinde.

Ferner versichere ich an Eides statt, dass ich die Inanspruchnahme fremder Hilfen aufgeführt habe, sowie, dass ich die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen entnommen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Teile der Arbeit sind in folgenden Publikationen enthalten:

**Sven Sehlmeier, Linzhu Wang, Dorothee Langel, David G. Heckel, Hoda Mohagheghi, Georg Petschenka, Dietrich Ober** (2010). Flavin-Dependent Monooxygenases as a Detoxification Mechanism in Insects: New Insights from the Arctiids (Lepidoptera). PLoS ONE 5: e10435.

**Linzhu Wang, Till Beuerle, James Timbilla, Dietrich Ober** (2012).

Independent recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for safe accumulation of sequestered pyrrolizidine alkaloids in grasshoppers and moths. PLoS ONE 7: e31796.

Kiel, 30. Oktober 2012

Linzhu Wang