

1 Einleitung

1.1 PFLANZEN UND HERBIVOREN IM EVOLUTIONÄREN WETTRÜSTEN

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

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



Einleitung

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

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

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

ihrer Entwicklung. Daher gibt es unter den meisten cyanogenen Pflanzenarten Individuen oder Ökotypen mit geringerer oder keiner Bildung von cyanogenen Glucosiden. Diese Individuen sind zwar anfälliger für die meisten Fraßfeinde, werden jedoch von Spezialisten eher abgelehnt und haben damit unter bestimmten ökologischen Bedingungen einen evolutiven Vorteil (Zagrobelny & Møller, 2011). Im evolutionären Wettrüsten kann daher die genetische Innovation eines Interaktionspartners eine Adaptation des anderen Partners fördern, wodurch der erste Partner erneut zur Anpassung gezwungen ist. Dieser Mechanismus ist die Basis für die Entstehung zahlreicher Stoffwechselwege und für morphologische Veränderungen, die in der Herausbildung neuer Arten münden.

1.2 DAS GLUCOSINOLAT-MYROSINASE-SYSTEM DER BRASSICACEAE ALS DREHSCHLEIBE FÜR PFLANZEN-INSEKTEN-INTERAKTIONEN

1.2.1 Die Abwehrfunktion des pflanzlichen Glucosinolat-Myrosinase-Systems

Das Glucosinolat-Myrosinase-System stellt einen wichtigen Verteidigungsmechanismus von Pflanzen der Familien Brassicaceae, Capparaceae und Caricaceae der Ordnung Brassicales sowie in den nicht hiermit verwandten *Drypetes*-Arten der Putranjivaceae dar (Halkier & Gershenzon, 2006). Wie der Name besagt, besteht dieses Abwehrsystem aus zwei Komponenten, den Glucosinolaten und ihren spezialisierten Hydrolasen, den Myrosinasen.

Glucosinolate, die auch Senfölglycoside genannt werden, sind anionische Thiohydroximate mit einer *S*-verlinkten β -Glucopyranose, einem Sulfatester und einer variablen Seitenkette. Die Biosynthese der Seitenkette erfolgt aus verschiedenen Aminosäuren, die durch zyklische Reaktionsabfolgen verlängert oder modifiziert werden können (diskutiert in Sønderby *et al.*, 2010). Daher gibt es aliphatische Glucosinolate sowie aromatische, deren Struktur sich aus Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan herleitet. Insgesamt wurden bereits über 120 verschiedene Glucosinolatstrukturen beschrieben, deren Vorkommen sich in verschiedenen Pflanzenarten, Ökotypen oder pflanzlichen Geweben und Entwicklungsphasen unterscheidet (Agerbirk & Olsen, 2012, Fahey *et al.*, 2001). Glucosinolathaltige Pflanzen, deren charakteristischer Geruch und Geschmack durch die Glucosinolate bestimmt wird, sind wichtige Bestandteile der menschlichen Ernährung. Bereits in der Antike wurden ihnen gesundheitsfördernde Wirkungen zugeschrieben, die nach heutigem Wissenschaftsstand vor allem auf die Hydrolyseprodukte der Glucosinolate zurückzuführen sind (Fenwick & Heaney, 1983). Zu den Wirkungen gehören der Schutz vor oxidativem Stress und die Induktion des Stoffwechsels von körperfremden Substanzen ebenso wie die Verlangsamung von Tumorwachstum durch Hemmung von Zellzyklus und Angiogenese und die Induktion der Apoptose (Traka & Mithen, 2009).

Die Myrosinase katalysiert die Hydrolyse der Glucosinolate durch Spaltung der thioglucosidischen Bindung. Alle glucosinolathaltigen Pflanzenarten besitzen Myrosinasen, ebenso wie



einige auf glucosinolathaltigen Pflanzen lebende Tierarten, die diese zu ihrer Verteidigung gegen Räuber verwenden. Pflanzliche Myrosinasen sind Glycoproteine, die in Pflanzen in spezialisierten Idioblasten, den Myrosinzellen, vorkommen (Andréasson *et al.*, 2001). Diese sind meist Phloem-assoziiert und grenzen direkt an schwefelreiche S-Zellen, die Glucosinolate enthalten (Andréasson & Jørgensen, 2003, Sarsby *et al.*, 2012).

Das Glucosinolat-Myrosinase-System ist ein aktivierbares konstitutives Verteidigungssystem. Das heißt, beide Komponenten sind immer in der Pflanze vorhanden und werden nicht erst bei Bedarf gebildet. Die getrennte Lokalisation von Glucosinolaten und Myrosinasen bewirkt, dass der Pflanze nicht selbst durch die negativen Wirkungen der Hydrolyseprodukte geschadet wird, aber genügend Glucosinolate vorhanden sind, damit im Moment der Gewebeverletzung eine starke lokale Wirkung auftreten kann. Wird die Pflanze durch den Fraß eines Herbivoren verwundet, werden Myrosin- und S-Zellen aufgebrochen und setzen ihre Inhaltsstoffe frei. Die Myrosinase kommt in Kontakt mit ihrem Substrat und spaltet dieses an der thioglucosidischen Bindung, wodurch biologisch aktive Derivate gebildet werden. Es entsteht ein instabiles zweifach negativ geladenes Intermediat, das Thiohydroximat-*O*-Sulfonat, welches unter Eliminierung der Sulfatgruppe und einer Umlagerung ähnlich einer Lossen-Reaktion zum Isothiocyanat reagiert (s. Abb. 1.1, S. 5, Agerbirk *et al.*, 1998, Ettliger & Lundeen, 1957).

Durch bestimmte äußere Bedingungen wie die Anwesenheit von Eisen(II)-Ionen oder einen sehr niedrigen pH-Wert kann statt des Isothiocyanats das entsprechende Nitril des Glucosinolates gebildet werden (Wittstock & Burow, 2007). Auch vorhandene sogenannte spezifizierende Proteine können die Produktbildung aus dem instabilen Intermediat verändern, ohne selbst eine hydrolytische Aktivität gegenüber dem Glucosinolat zu besitzen (Wittstock & Burow, 2007). Hierzu gehört das Epithionitril-spezifisierende Protein, welches die myrosinasekatalysierte Hydrolyse von Alkenylglucosinolaten zu Epithionitrilen umleitet und die von anderen Glucosinolaten zu Nitrilen (Lambrix *et al.*, 2001, Petroski & Kwolek, 1985, Tookey, 1973). Weiterhin gibt es in einigen Brassicaceae das Thiocyanat-formende Protein, das zur Bildung von organischen Thiocyanaten führt, falls die Glucosinolate in der Lage sind, stabile Carbeniumionen zu bilden (Burow *et al.*, 2007, Kuchernig *et al.*, 2011). Das dritte bekannte pflanzliche spezifizierende Protein ist das Nitril-spezifisierende Protein, das die Glucosinolathydrolyse zur Bildung von einfachen Nitrilen anstelle der Isothiocyanate umleitet (Burow *et al.*, 2009, Abb. 1.1). Neben diesen spezifizierenden Proteinen aus Pflanzen besitzen auch einige spezialisierte Herbivoren von Brassicaceae wie der Kleine Kohlweißling *Pieris rapae* (Lepidoptera:Pieridae) ein Nitril-spezifisierendes Protein, sind also in der Lage, die Bildung von Isothiocyanaten zugunsten einer Nitrilbildung zu verringern (s. 1.2.3, Wittstock *et al.*, 2004).

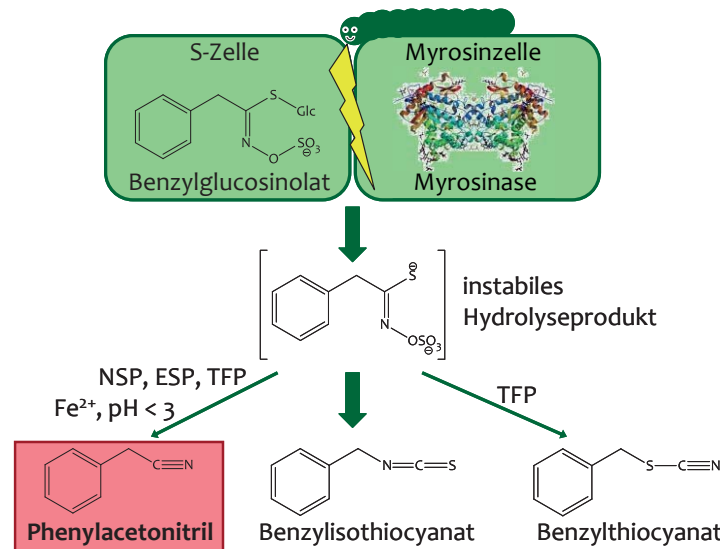


Abb. 1.1 Schematische Darstellung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems am Beispiel der Hydrolyse von Benzylglucosinolat. In intaktem Pflanzengewebe sind Glucosinolate in S-Zellen und die Myrosinase (PDB: 1MYR) in Myrosinzellen lokalisiert. Bei Gewebeerstörung, beispielsweise durch Herbivorenfraß, kommen Glucosinolat und Myrosinase zusammen. Durch Hydrolyse wird ein instabiles Intermediat gebildet, welches sich spontan zum Isothiocyanat umlagert. In Anwesenheit von spezifizierenden Proteinen der Pflanzen oder bestimmten äußeren Faktoren werden stattdessen Nitril- oder Thiocyanatderivate der Glucosinolate gebildet. Einige spezialisierte Herbivoren wie *Pieris rapae* besitzen ebenfalls ein Nitril-spezifisierendes Protein (NSP) (s. 1.2.3). ESP = Epithionitril-spezifisierendes Protein, TFP = Thiocyanat-formendes Protein.

Die entstehenden Hydrolyseprodukte sind biologisch wirksam. Für die Isothiocyanate wurde die abschreckende und schädliche Wirkung am besten untersucht. Sie sind antifungal (Virtanen, 1962) und antibakteriell wirksam (Fenwick & Heaney, 1983) und schädlich für die meisten Insekten, insbesondere Generalisten (Hopkins *et al.*, 2009, Lichtenstein *et al.*, 1964, Winde & Wittstock, 2011). Nitrile scheinen weniger schädlich für Herbivoren zu sein als die entsprechenden Isothiocyanate (Burow *et al.*, 2006a). Eine Funktion der pflanzlichen Nitril-bildenden spezifizierenden Proteine in der direkten Abwehr der Pflanze scheint daher unwahrscheinlich. Es wird angenommen, dass Pflanzen die alternativen Hydrolyseprodukte bilden, um Parasiten der Herbivoren anzulocken und sich damit indirekt gegen ihre Fraßfeinde zu wehren und um eiablegende Weibchen der spezialisierten Herbivoren weniger stark anzuziehen (Mumm *et al.*, 2008). In Untersuchungen mit Pflanzen mit unterschiedlichem Gehalt an Glucosinolaten oder abweichenden Myrosinaseaktivitäten konnten negative Einflüsse des Glucosinolat-Myrosinase-Systems auf die Fraßmenge und Larvalentwicklung von spezialisierten und generalistischen Herbivoren nachgewiesen werden (Li *et al.*, 2000, Müller *et al.*, 2010). Dennoch finden sich zahlreiche Herbivoren, die ohne negative Auswirkungen auf Pflanzen fressen, die durch das Glucosinolat-Myrosinase-System geschützt sind. Einige haben sich auf diese Pflanzen als einzige Futterquelle spezialisiert. Ihre Anpassungen, Glucosinolatentgiftungswege und Mechanismen zum Schutz vor der Entstehung der giftigen Isothiocyanate sind im folgenden Abschnitt dargestellt.



1.2.2 Anpassung von Generalisten und Spezialisten

Für Herbivoren, die auf glucosinolathaltigen Pflanzen fressen, sind drei generelle Methoden zur Vermeidung einer schädlichen Wirkung von Glucosinolatabbauprodukten bekannt, die in Tab. 1.1 aufgelistet sind. Diese sind die Vermeidung der erfolgreichen Hydrolyse der Substrate, beispielsweise durch spezielle Fraßmechanismen, Hemmung der Myrosinaseaktivität, Sequestrierung oder Metabolisierung der intakten Glucosinolate, die Veränderung der Glucosinolathydrolyse durch den Einsatz von spezifizierenden Proteinen und die Metabolisierung und Konjugation gebildeter Isothiocyanate (Winde & Wittstock, 2011).

Tab. 1.1 Prinzipien der Entgiftung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems in spezialisierten und generalistischen Herbivoren. Es sind Beispiele von Herbivoren angegeben, die diese Entgiftungsmechanismen anwenden, Quellen dazu sind im Text zu finden.

Ebene des Eingreifens	Abwehrmechanismus	Herbivor (Beispiel)
1 Vermeidung der Hydrolyse	a) Fraßtechnik	<i>Myzus persicae</i>
	b) Myrosinasehemmung	<i>Spodoptera exigua</i>
	c) Glucosinolatsequestrierung	<i>Brevicoryne brassicae</i>
	d) Glucosinolatmetabolisierung	<i>Plutella xylostella</i>
2 Veränderung der Hydrolyse	a) Nitril-spezifizierendes Protein	<i>Pieris rapae</i>
3 Isothiocyanatmetabolisierung	a) Glutathionkonjugation	<i>Spodoptera exigua</i>
	b) Malonsäurekonjugation	<i>Spodoptera exigua</i>

Der erstgenannte Mechanismus zur Umgehung einer schädlichen Wirkung von Isothiocyanaten erfolgt durch die Vermeidung der Bildung dieses Hydrolyseprodukts durch Verhinderung der myrosinasekatalysierten Glucosinolathydrolyse. Da Glucosinolate und Myrosinase erst bei Gewebeverletzung zusammenkommen, ist eine Fraßtechnik, bei der die Myrosinzellen größtenteils unverletzt bleiben, eine Möglichkeit die Hydrolyse zu verhindern. Ein Beispiel dafür ist die saugende Fraßtechnik von Blattläusen, bei der die Penetration des Pflanzengewebes interzellulär abläuft bis das Phloem erreicht wird (Tjallingii & Esch, 1993) und intakte Glucosinolate aufgenommen werden können. Diese Technik wird beispielsweise von der generalistischen Blattlaus *Myzus persicae* (Hemiptera:Aphididae) zur erfolgreichen Vermeidung von Isothiocyanatbildung aus aliphatischen und vielen aromatischen Glucosinolaten angewandt, sodass sie die intakten für eine Resorption zu polaren Glucosinolate mit dem Honigtau ausscheidet. Im Gegensatz hierzu werden einige indolische Glucosinolate nicht unverändert ausgeschieden, sondern unter Konjugation metabolisiert (Kim & Jander, 2007). Eine auf glucosinolathaltige Pflanzen spezialisierte Blattlaus, *Brevicoryne brassicae* (Hemiptera:Aphididae) vermeidet nicht nur die Hydrolyse der Glucosinolate während des Fressens, sondern sequestriert diese auch in ihrer eigenen Hämolymphe, wo sie gemeinsam mit der Blattlaus-eigenen Myrosinase der Abwehr von Räubern dienen (Jones *et al.*, 2001, Kazana *et al.*, 2007). Ein ähnlicher jedoch noch nicht vollständig aufgeklärter Sequestrierungsmechanismus findet in

der saugend fressenden Baumwanze *Murgantia histrionica* (Hemiptera:Pentatomidae) statt, die auf glucosinolathaltige Futterpflanzen spezialisiert ist und die über die Nahrung aufgenommenen Glucosinolate sequestriert (Aliabadi *et al.*, 2002). Überraschenderweise sind auch die kauenden Larven der Blattwespe *Athalia rosae* (Hymenoptera:Tenthredinidae) in der Lage, intakte Glucosinolate aufzunehmen und zu sequestrieren, wobei noch nicht geklärt werden konnte, wie bei einer kauenden Fraßtechnik die Glucosinolathydrolyse vermieden wird (Müller, 2009). Möglicherweise liegt hier eine Hemmung der pflanzlichen Myrosinaseaktivität durch Raupenproteine oder Umgebungsbedingungen vor, wie sie auch für die Generalisten *Spodoptera exigua* und *S. littoralis* (Lepidoptera:Noctuidae), die zum Teil intakte Glucosinolate mit dem Kot ausscheiden, beobachtet wurde (Winde, 2011).

In einigen Herbivorenarten werden intakte Glucosinolate metabolisiert, bevor es zur Hydrolyse kommen kann. Das am besten untersuchte Beispiel hierfür ist die Kohlschabe *Plutella xylostella* (Lepidoptera:Yponomeutidae), ein weiterer Spezialist für glucosinolathaltige Pflanzen. Raupen von *P. xylostella* spalten Glucosinolate durch eine im Darm konstitutiv vorliegende sekretierte Sulfatase. Es entstehen Desulfoglucosinolate, die kein Substrat für die pflanzliche Myrosinase sind, sodass keine Isothiocyanate gebildet werden können (Ratzka *et al.*, 2002). Da die Sulfatase in einem Überschuss vorliegt, hat der Glucosinolatgehalt keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Raupen, während bei einer Erhöhung der Myrosinaseaktivität in den Pflanzen nicht die vollständige Hydrolyse abgefangen werden kann, sodass negative Effekte für die Herbivoren auftreten (Li *et al.*, 2000). Auch für die generalistische Wüstenheuschrecke *Schistocerca gregaria* (Orthoptera:Acrididae) konnte eine Glucosinolatentgiftung durch Sulfat-
 abspaltung nachgewiesen werden. Hier wird die Sulfatase jedoch durch die Aufnahme von glucosinolathaltiger Nahrung induziert. Dies stellt einen Vorteil für den Generalisten dar, da bei Nahrungsaufnahme auf glucosinolatfreien Pflanzen die Kosten für das Entgiftungsprotein eingespart werden (Falk & Gershenzon, 2007). Da diese Form der Glucosinolatverstoffwechslung erfolgreich vor der Bildung schädlicher Isothiocyanate zu schützen scheint, wurde untersucht, ob sie auch in anderen, auf glucosinolathaltigen Pflanzen fressenden Generalisten und Spezialisten verbreitet ist. Eine Glucosinolatsulfataseaktivität konnte jedoch in keiner weiteren untersuchten Lepidoptera-Art, weder in Noctuidae noch in Pieridae, nachgewiesen werden (Wheat *et al.*, 2007).

Anstatt die Glucosinolathydrolyse durch die Myrosinase zu verhindern, wie es die oben genannten Anpassungsmechanismen machen, kann auch eine Umleitung der Hydrolyse unter Bildung von weniger schädlichen Endprodukten erfolgen. *P. rapae* und einige verwandte Glucosinolatspezialisten der Pieridae verwenden ein eigenes Nitril-spezififizierendes Protein, um die Isothiocyanatbildung zu vermeiden und stattdessen die Nitrilbildung zu fördern (Wittstock *et al.*, 2004). Dies ist in Abb. 1.1 auf S. 5 dargestellt und in Abschnitt 1.2.3 erläutert.

Ist bereits eine Hydrolyse erfolgt, können sich Herbivoren schützen, indem sie das schädliche Isothiocyanat schnell in einen ungefährlicheren Metaboliten umwandeln. Hierbei werden



häufig die Enzyme und Konjugationsmechanismen des Phase I- und Phase II-Stoffwechsels verwendet. Säugetiere schützen sich durch Glutathionkonjugation gegen über die Nahrung aufgenommene Isothiocyanate (Baillie & Slatter, 1991). Daher wurde ein ähnlicher Mechanismus auch für herbivore Insekten vorgeschlagen. Frühe Untersuchungen zeigten Glutathion-S-Transferase-Aktivität gegenüber Isothiocyanaten in Darmextrakten von Generalisten (Wadleigh & Yu, 1988), und jüngst konnten Glutathionkonjugate der Isothiocyanate als Neben- und Hauptentgiftungsprodukte im Kot von mehreren Generalistenarten wie *S. exigua* und *Trichoplusia ni* (Lepidoptera:Noctuidae) nachgewiesen werden (Schramm *et al.*, 2012, Winde, 2011). Daneben wurden weitere Isothiocyanat- und Isocyanatmetabolite wie Malonsäurekonjugate und Derivate von Glutathionkonjugaten gefunden (Schramm *et al.*, 2012, Winde, 2011).

1.2.3 *Pieris rapae* und das Nitril-spezifisierende Protein

Die Raupen des Kleinen Kohlweißlings, *P. rapae*, eines Spezialisten, ernähren sich ausschließlich von durch das Glucosinolat-Myrosinase-System geschützten Pflanzen. Dies wird ihnen durch das im Darm konstitutiv exprimierte Nitril-spezifisierende Protein ermöglicht. Wie in Abb. 1.1 auf S. 5 dargestellt und für das pflanzliche Nitril-spezifisierende Protein beschrieben, ist auch das analoge Protein aus *P. rapae* in der Lage, die myrosinasekatalysierte Hydrolyse von Glucosinolaten umzuleiten, sodass Nitrile anstelle der spontan entstehenden Isothiocyanate gebildet werden. Fressen Raupen von *P. rapae* auf glucosinolathaltigen Pflanzen, werden Nitrile und daraus abgeleitete Metabolite als Hauptausscheidungsprodukte in ihrem Kot gefunden (Agerbirk *et al.*, 2006, Vergara *et al.*, 2006, 2007, Wittstock *et al.*, 2004). Das für die Nitrilbildung verantwortliche Protein wurde zunächst im Mitteldarm der Raupen lokalisiert und dann aus Darmextrakten aufgereinigt (Wittstock *et al.*, 2004). Sequenzanalysen durch Edman-Abbau und massenspektrometrische Analyse des gereinigten Proteins in Kombination mit einer *P. rapae* EST-Datenbank (*expressed sequence tag*) identifizierten das Protein, welches keine Ähnlichkeit mit zuvor funktionell charakterisierten Proteinen aus anderen Organismen aufwies (Wittstock *et al.*, 2004). Das Nitril-spezifisierende Protein aus *P. rapae* besitzt wie die pflanzlichen spezifizierenden Proteine keine eigene hydrolytische Aktivität gegenüber Glucosinolaten sondern benötigt hierzu die Myrosinase, mit der es vermutlich eng interagiert (Wittstock *et al.*, 2004). Dabei scheint es jedoch weniger wie ein Cofaktor zu agieren sondern eine eigene katalytische Aktivität, vermutlich gegenüber dem instabilen Intermediat der Hydrolyse, zu besitzen. Dies deutete sich in Untersuchungen an, bei denen die Aktivität der Myrosinase in der Aktivitätsbestimmung des Nitril-spezifisierenden Proteins durch Zusatz von Ascorbinsäure erhöht wurde, wobei die absolute Menge an gebildetem Nitril konstant blieb (Burow *et al.*, 2006b). Biochemische Charakterisierungen zeigten ein breites Substratspektrum des Nitril-spezifisierenden Proteins der Raupen sowie eine leichte Aktivitätssteigerung bei Zugabe von Fe^{2+} -Ionen, während die in den pflanzlichen spezifizierenden Proteine aktivitätssteigernden Fe^{3+} -Ionen keinen Effekt aufwiesen (Burow *et al.*, 2006b).

Als Grund für die Bildung von Nitrilen anstelle von Isothiocyanaten und damit für die evolutive Entstehung des Nitril-spezififizierenden Proteins in Herbivoren wird die geringere Schädigung der Nitrile im Vergleich mit den Isothiocyanaten angesehen. Untersuchungen mit verschiedenen Generalisten zeigten einen negativen Einfluss von Isothiocyanaten auf Entwicklung, Wachstum und Futteraufnahme von Raupen im Vergleich zu Raupen, die mit nitrilbildenden Pflanzen gefüttert wurden (Burow *et al.*, 2006a, Lambrix *et al.*, 2001). Daher wird das Auftreten des Nitril-spezififizierenden Proteins in Arten der Pieridae und die Bildung von Nitrilen anstelle von Isothiocyanaten als evolutive Schlüsselinnovation im Sinne von Ehrlich und Raven (Ehrlich & Raven, 1964) angesehen, die es den Herbivoren ermöglichte, eine neue Gruppe von Futterpflanzen zu akzeptieren. Gegenüber Konkurrenten, die zur Umsetzung von Glucosinolaten zu Nitrilen nicht fähig waren, besaßen die Pieridae damit einen evolutiven Vorteil. Alle auf glucosinolathaltigen Pflanzen fressenden Pieridae wie beispielsweise auch *Anthocharis cardamines* besitzen daher ein Nitril-spezififizierendes Protein (Agerbirk *et al.*, 2006, Wheat *et al.*, 2007). Andere Pieridae, die den Wirtswechsel zu den Brassicales nicht ausführten, wie beispielsweise *Gonepteryx rhamni*, oder einen zweiten Wirtswechsel zu glucosinolatfreien Pflanzen vollzogen, können diese Reaktion nicht ausführen (Wheat *et al.*, 2007). Die Entstehung des Nitril-spezififizierenden Proteins in Pieridae wird zeitlich nur etwa zehn Millionen Jahre nach der Entstehung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems datiert, einem Zeitpunkt, zu dem vermutlich wenige andere spezifische Anpassungen an dieses pflanzliche Verteidigungssystem existierten (Beilstein *et al.*, 2010, Wheat *et al.*, 2007). Es wird angenommen, dass das Gen für das Nitril-spezififizierende Protein durch eine intragene Domänenverdopplung und eine darauffolgende Duplikation des vollständigen Gens aus einer dynamischen Genfamilie entstand, in der eine schnelle und erfolgreiche Anpassung möglich war und die damit die idealen Voraussetzungen für eine koevolutive Innovation boten (Fischer *et al.*, 2008). Im Zeitraum der Entstehung der neuen Fähigkeit und des Wirtswechsels zu den Brassicales entstand eine Vielzahl neuer Arten innerhalb der Pieridae, was im Einklang mit der Koevolutionstheorie wahrscheinlich auf diese Innovation zurückzuführen ist (Ehrlich & Raven, 1964, Franzke *et al.*, 2011, Wheat *et al.*, 2007).

Die durch das Nitril-spezififizierende Protein an das Glucosinolat-Myrosinase-System angepassten Herbivoren sind soweit spezialisiert, dass sie ausschließlich auf glucosinolathaltigen Pflanzen fressen. Dies ist wie die ausschließliche Eiablage auf glucosinolathaltigen Pflanzen durch sensorische Anpassungen bedingt. Glucosinolate dienen den Raupen von *P. rapae* als Fraßstimulans, wobei diskutiert wurde, ob die Einschränkung der Futterwahl nur eine in den ersten Stunden nach dem Raupenschlupf geprägte Abhängigkeit darstellt (Miles *et al.*, 2004, Renwick & Lopez, 1999). Damit den frisch geschlüpften Raupen die richtigen Futterpflanzen zur Verfügung stehen, erfolgt die Eiablage durch Weibchen bereits auf glucosinolathaltigen Pflanzen, die sie anhand von volatilen Hydrolyseprodukten wie Isothiocyanaten und von Glucosinolaten auf der Oberfläche der Blätter erkennen (Badenes-Pérez *et al.*, 2011, de Vos *et al.*, 2008). Daher führt die Bildung von Nitrilen anstelle von Isothiocyanaten in Pflanzen mit



spezifizierenden Proteinen zu einer geringeren Anlockung von eiblegenden Weibchen, was einen Schutz gegen Spezialisten darstellen könnte (Mumm *et al.*, 2008).

1.2.4 Stoffwechsel der aus Glucosinolaten gebildeten Nitrile in *Pieris rapae*

Die unter Einwirkung des Nitril-spezifisierenden Proteins im Raupendarm gebildeten Nitrile werden entweder im Körper der Raupen weiter metabolisiert oder direkt mit dem Kot ausgeschieden. Für aliphatische Glucosinolate konnte am Beispiel von 3-(Methylsulfinyl)propylglucosinolat und 4-(Methylsulfinyl)butylglucosinolat gezeigt werden, dass die unveränderten Nitrile mit dem Kot ausgeschieden werden (s. Abb. 1.2A, S. 12, Wittstock *et al.*, 2004). Bei von Phenylalanin oder Tyrosin abgeleiteten Glucosinolaten sind mehrere Stoffwechselwege bekannt, die zur Ausscheidung der Nitrile führen. Dazu zählen unspezifische Modifikations- und Konjugationsreaktionen, die vermutlich von Enzymen des Phase I- und Phase II-Stoffwechsels katalysiert werden und eine Erhöhung der Löslichkeit oder eine Verringerung der toxischen Wirkung von Intermediaten bewirken. Hierzu gehören Hydroxylierungen, Demethylierungen und Oxidationen ebenso wie die Konjugation mit Sulfat, Glycin oder Isoserin (s. Abb. 1.2B-E, S. 12, Agerbirk *et al.*, 2006, Agerbirk *et al.*, 2010a, Stauber *et al.*, 2012, Vergara *et al.*, 2006, 2007, Wittstock *et al.*, 2004). Daneben konnten auch Hydrolyseprodukte der Nitrile nachgewiesen werden, deren Bildung im Raupendarm durch pflanzliche Nitrilhydratasen oder Nitrilasen aus dem Futtermaterial katalysiert wird (s. Abb. 1.2B-E, S. 12, Agerbirk *et al.*, 2007, Agerbirk *et al.*, 2010a, Stauber *et al.*, 2012). Teilweise führen verschiedene Metabolisierungswege zur Entstehung derselben Ausscheidungsprodukte aus verschiedenen Glucosinolaten, während gleichzeitig aus einem Glucosinolat unterschiedliche Produkte gebildet werden können (s. Abb. 1.2C, S. 12, Agerbirk *et al.*, 2010a). Für die oben beschriebenen Reaktionen konnten teilweise Intermediate nachgewiesen werden, in den meisten Fällen sind die genauen Mechanismen und Zwischenschritte jedoch zurzeit nicht bekannt und werden nur angenommen. Wenige der beteiligten Enzyme konnten bislang isoliert und charakterisiert werden.

Für aus aliphatischen und hydroxylierten aromatischen Glucosinolaten abgeleitete Nitrile zeigen die bislang gefundenen Ausscheidungsprodukte, dass das Kohlenstoffgrundgerüst durch die Modifikations- und Konjugationsreaktionen nicht verändert wird. Im Gegensatz dazu wurden für Benzyl- und 2-Phenylethylglucosinolat unter anderem Metabolite im Kot von *P. rapae* gefunden, deren Kohlenstoffseitenkette um ein Atom verkürzt war (s. Abb. 1.2D und E, S. 12, Stauber *et al.*, 2012, Vergara *et al.*, 2006, 2007). So wurde nach Fraß auf Benzylglucosinolat-haltigem Pflanzenmaterial Hippursäure (*N*-Benzoylglycin) im Kot nachgewiesen, bei Fraß auf 2-Phenylethylglucosinolat-haltigem Pflanzenmaterial *N*-Phenylacetylglycin. Im Fall des Benzylglucosinolatmetabolismus handelt es sich bei dem verkürzten Metaboliten Hippursäure um das Hauptprodukt des Nitrilstoffwechsels (s. Abb. 1.2E, S. 12, Vergara *et al.*, 2007), während für 2-Phenylethylglucosinolat das durch C1-Verkürzung entstandene Produkt *N*-Phenylacetylglycin nur ein Nebenprodukt ist (Abb. 1.2D, S. 12, Stauber *et al.*, 2012). Untersuchungen mit isolierten