

# Zusammenfassung

Anthrachinone und Anthrone, die nicht aus der Nahrung sequestriert werden, sind sehr ungewöhnliche Substanzen in Insekten und wurden bisher nur in Blattkäfern der Tribus Galerucini und in Schildläusen gefunden. Diese Polyketide schützen möglicherweise die Insekten vor natürlichen Feinden, da sie Prädatoren wie z.B. Ameisen und Vögel abschrecken und außerdem antimikrobiell und antiviral aktiv sind. Die Hauptfutterpflanzen der Galerucini enthalten keine Anthrachinone. Der Ursprung der Anthrachinone in den Galerucini ist somit unbekannt. Diese Polyketide werden entweder von dem Käfer selbst oder von endosymbiotischen Mikroorganismen produziert, da bekannt ist, dass einige Bakterien und Pilze Anthrachinone produzieren.

Das Hauptthema dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung des Ursprungs der Anthrone und Anthrachinone in Blattkäfern der Tribus Galerucini. Dafür wurden sowohl molekulare als auch chemische Methoden verwendet. Als Modellart eines Blattkäfers der Galerucini wurde dabei der Rainfarnblattkäfer (*Galeruca tanacetii*) verwendet, der in allen seinen Entwicklungsstadien (Eier, Larven und adulte Käfer) die 1,8-dihydroxylierten Anthrachinone Chrysophanol und Chrysazin und deren Vorstufen, die Anthrone Chrysarobin und Dithranol, enthält.

Zunächst wurde in den Eiern von *G. tanacetii* nach endosymbiotischen Mikroorganismen gesucht. Falls endosymbiotische Mikroorganismen die Anthrachinone in *G. tanacetii* produzieren, müssen diese vertikal von einer Generation auf die nächste übertragen werden. In Europa überwintern die im Herbst abgelegten Eier von *G. tanacetii*. Daher wurde eine Übertragung von möglichen Endosymbionten über das Eistadium vermutet, da eine Übertragung der Endosymbionten auf der Außenseite der Eier oder eine Kontamination des Habitats mit Endosymbionten wegen der ungünstigen abiotischen Bedingungen während der Winterdiapause der *G. tanacetii* Eier eine Gefahr für diese Mikroorganismen darstellen würde (*Chapter 1*). Deshalb wurden DNA-Proben von oberflächlich sterilisierten *G. tanacetii* Eiern mit der molekularen Methode der Polymerase

Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) auf das Vorkommen von bakterieller und/ oder pilzlicher DNA untersucht. Es konnten keine endosymbiotischen Bakterien außer *Wolbachia* gefunden werden. Wolbachien wurden schon in früheren Untersuchungen gefunden. Dieses alpha-Proteobakterium konnte im Ulmenblattkäfer (*Xanthogaleruca luteola*), einer zu den Galerucini nahe verwandten Art, nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden Wolbachien in Eiern des anthrachinon-freien Erlenblattkäfers (*Agelastica alni*), einem Vertreter der Tribus Sermlylini, gefunden. Außerdem konnten in den Eiern von *G. tanaceti* keine Pilze, die für eine Anthrachinonproduktion in Frage kämen, nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Anthrone und Anthrachinone in den Galerucini nicht von Endosymbionten produziert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von adulten Käfern mit Antibiotika die Anthrachinonsynthese nicht blockiert. Die Eier von so behandelten Käfern enthielten immer noch Chrysophanol, Chrysazin und die entsprechenden Anthrone. Diese Ergebnisse stützen die anhand der molekularen Daten aufgestellte Hypothese, dass keine endosymbiotischen Mikroorganismen für die Anthrachinonproduktion in den Galerucini verantwortlich sind. (Chapter 2)

Das Vorkommen von Wolbachien in den Eiern von *G. tanaceti* führte zu der Frage, ob diese Bakterien zu einem für anthrachinonhaltige Insekten spezifischen „*Wolbachia* Stamm“ gehören. Falls man spezifische Wolbachien nur in anthrachinonhaltigen Insekten gefunden hätte, könnte dies ein Hinweis sein, dass (1) diese Wolbachien möglicherweise Anthrachinone produzieren oder dass (2) diese Wolbachien tolerant oder resistent gegen diese antimikrobiell wirksamen Polyketide sind. Eine phylogenetische Analyse mit drei *Wolbachia* Genen (16S rDNA, *wsp* und *ftsZ*) von anthrachinonhaltigen und anthrachinon-freien Insekten konnte keinen „cluster“ von Wolbachien aus Arten mit Anthrachinonen aufzeigen. Demzufolge gibt es keinen Hinweis auf einen speziellen „*Wolbachia* Stamm“ oder eine spezielle „Supergruppe“ mit Anthrachinon-toleranten oder -resistenten Eigenschaften oder der Fähigkeit diese Anthrachinone zu bilden. (Chapter 3)

Ein weiterer Ansatz, um den Ursprung der Anthrachinone in *G. tanaceti* aufzudecken, besteht darin, den Faltungstyp der Polyketidkette (Oktaketid), die zum Chrysophanol führt, zu untersuchen. Prokaryoten weisen einen anderen Faltungstyp (Typ S) auf als Eukaryoten (Type F). Mit Hilfe von NMR Analysen, die das Einbaumuster von <sup>13</sup>C-markiertem Acetat in die Polyketidkette zeigen, kann der Faltungstyp bestimmt werden. Nach Verfütterung

von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Acetat an Larven des Rainfarnblattkäfers konnte anhand des Chrysophanols aus den Larven gezeigt werden, dass dieses über den eukaryotischen Faltungstyp F synthetisiert wird. Somit kommt nur der Käfer selbst oder ein Pilz als Anthrachinonproduzent in Frage. Außerdem konnte mit diesem Ergebnis die auf molekularen Daten basierende Hypothese wiederum bestätigt werden, dass endosymbiotische Bakterien als Produzenten der Anthrachinone ausgeschlossen werden konnten. Da mit den molekularen Methoden keine Pilze gefunden wurden, ist eine Produktion der Anthrone und Anthrachinone von dem Käfer selbst sehr wahrscheinlich. (Chapter 4)

Kenntnisse über den Produktionsort der Anthrachinone in *G. tanacetii* könnten bei der Suche nach einer Bestätigung, wer diese produziert (Käfer oder ein Endosymbiont), hilfreich sein. Um zu testen, ob die Anthrone und Anthrachinone in den Eiern produziert werden, wurden quantitative GC-MS Analysen durchgeführt. Die Eier hierfür wurden kurz nach der Eiablage im Herbst und kurz vor dem Schlupf der Larven im Frühling gesammelt. Gemessen wurden die Mengen der freien und gebundenen Polyketide. Einige Anthron- und Anthrachinonmengen nahmen signifikant während der Eientwicklung ab, während andere Mengen unverändert blieben. Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Anthrone und Anthrachinone eher von dem Embryo im Ei metabolisiert als von ihm produziert wurden. Die im weiblichen Käfer produzierten Polyketide wurden daher von der Mutter in die Eier transferiert. Zusätzlich konnten die Analysen zeigen, dass die Parasitierung der Eier durch eine eulophide Wespe einen signifikanten Effekt auf die Menge einiger Anthrone und Anthrachinone hatte, wobei andere Anthrone und Anthrachinone nicht beeinflusst wurden. (Chapter 5)

Abschließend wurde nach Genen für eine Polyketidsynthase (PKS) gesucht. PKS katalysieren die Biosynthese von Polyketiden wie z.B. die der Anthrone und Anthrachinone. Unabhängig davon, ob die Anthrachinone vom Käfer selbst oder von einem endosymbiotischen Mikroorganismus produziert werden, sollte man in *G. tanacetii* PKS Gene nachweisen können. Daher wurde mit Hilfe von PCR Methoden im Käfer nach Genen, die eine solche PKS codieren, gesucht. Dazu wurde die genomische DNA aus *G. tanacetii* Eiern extrahiert. Weiterhin wurde cDNA, die aus RNA aus den Fettkörpern von Larven gewonnen wurde, verwendet, da erwartet wurde, dass in den Larven ebenfalls Anthrachinone produziert werden (vergleiche Chapter 4). Degenerierte Primer für alle drei

PKS Typen wurden ausgewählt, um einen Teil der relativ konservierten Ketosynthase-Region (KS) zu amplifizieren. Es konnten keine PKS Gene gefunden werden, die für eine Biogenese der 1,8-dihydroxylierten Anthrachinone verantwortlich sein könnten. Da bislang noch keine PKS Gene in Tieren entdeckt wurden, war es schwierig vorherzusagen, welchen PKS Type man im Käfer erwarten konnte. Daher konnten die Primer nur anhand von bekannten Sequenzen aus Bakterien, Pilzen und Pflanzen entworfen werden. Diese Tatsache könnte möglicherweise der Grund dafür gewesen sein, dass die Primer zu stark degeneriert waren und daher kein PKS Gen im Käfer amplifiziert werden konnte. Weiterhin wurde nach Genen für sogenannte post-PKS Enzyme gesucht, in diesem Fall einer Anthronoxygenase (AknX). Eine japanische Arbeitsgruppe fand in *Streptomyces galilaeus* das Gen für eine Oxygenase, welche die Oxidation von Emodinantron zu dem Anthrachinon Emodin katalysiert. Emodin ist strukturell dem Chrysophanol aus *G. tanacetii* sehr ähnlich. Daher wurde diese Sequenz mit zwei anderen Sequenzen von verwandten Oxygenasen „aligned“, um Primer zu entwerfen, die ein Stück aus der Anthronoxygenase amplifizieren. Aber es konnte weder mit der genomischen DNA aus den Eiern noch mit der cDNA aus den Larven eine Oxygenase in *G. tanacetii* gefunden werden. Entweder waren die Primer zu degeneriert oder aber eine solche Oxygenase fehlt in *G. tanacetii*. (Chapter 6)

Zusätzlich zu den Anthrachinonen sind zahlreiche defensive Substanzen und Pheromone bei Insekten bekannt, die möglicherweise ebenfalls Polyketide sind. Häufig ist unbekannt, ob die Insekten selbst oder aber Endosymbionten diese Polyketide produzieren. Außerdem wurde bis auf eine Ausnahme bisher noch kein Enzym für die Polyketidsynthese aus den Insekten oder aus deren Endosymbionten isoliert. Die Ausnahme sind Staphylinidenarten, die das Polyketid Pederin enthalten, und dieses Pederin wird von endosymbiotischen Bakterien produziert. Die Bausteine von Substanzen, die über den Polyketidweg produziert werden, sind den Bausteinen von Substanzen sehr ähnlich, die über den Fettsäureweg produziert werden. Beide Wege unterscheiden sich aber durch ihre jeweiligen Enzyme. Während Polyketide von Polyketidsynthasen produziert werden, werden Fettsäuren mit Hilfe von Fettsäuresynthasen (FAS) synthetisiert. Außerdem ist die Polyketidsynthese ein anaerober Prozess, wohingegen der Fettsäureweg Sauerstoff benötigt. Da bei den meisten der möglichen Polyketide in Insekten nur die Bausteine durch Fütterungsexperimente mit markierten Vorstufen bekannt sind, ist es häufig schwer zu entscheiden, ob eine Substanz tatsächlich über den Polyketidweg oder aber über den Fettsäureweg produziert wird. In

*Chapter 7* wird auf diese Problematik besonders hingewiesen und die Notwendigkeit weitergehender Experimente betont. Zuerst werden die defensiven Substanzen und die Pheromone mit möglichem Polyketidursprung kurz zusammengefasst. Im weiteren werden die Gemeinsamkeiten und Unterschiede von PKS und FAS beschrieben. Da im Gegensatz zu den FAS keine PKS in Insekten bekannt sind, könnten Kenntnisse über die evolutionären Zusammenhänge beider Enzyme bei der Suche nach PKS Genen in den Insekten hilfreich sein. Für eine PKS-Suche in den Galerucini sollten besonders die pilzlichen Typ I PKS and die pilzlichen und pflanzlichen Typ III PKS in Betracht gezogen werde, da die Anthrachinone in diesen Käfern ein eukaryotisches Faltungsmuster aufweisen.