

1 Einleitung

Auf Anregung von A. Kössel aus dem Jahre 1891 unterscheidet man zwischen dem Primär- und dem Sekundärstoffwechsel (Kössel, 1891). Im Gegensatz zu dem für Wachstum und Entwicklung aller Organismen essentiellen Primärstoffwechsel ist der Sekundärstoffwechsel in dieser Hinsicht entbehrlich. Seine Funktion ist vielmehr für alle Wechselwirkungen des Individuums mit seiner Umwelt notwendig, zum Beispiel bei der Abwehr potenzieller Feinde oder unerwünschter Konkurrenten, aber auch zur Anlockung von Bestäubern. Aus dieser Situation heraus entwickelte sich im Laufe der Evolution eine Vielzahl an Sekundärstoffwechselprodukten. Bis heute sind über 200.000 dieser Sekundärstoffe bekannt (Hartmann, 1985; Hartmann, 1996). Während man bis in die 70er Jahre des 20. Jahrhunderts der Meinung war, Sekundärstoffe wären eine Art Abfall- oder Nebenprodukt des Primärstoffwechsels (Mothes, 1955; Luckner, 1990), ist man heute davon überzeugt, dass der Sekundärstoffwechsel unter dem permanenten Selektionsdruck einer feindlichen Umwelt durch ständige Optimierung und Weiterentwicklung von nützlichen Sekundärstoffen hervorgegangen ist. Der Sekundärstoffwechsel ist somit im Gegensatz zum Primärstoffwechsel für Wachstum und Entwicklung eines Organismus zwar entbehrlich, jedoch ist er für das Überleben einer Pflanze in ihrer Umwelt absolut notwendig (Swain, 1977; Hartmann, 1985; Hartmann 1996).

Viele dieser Sekundärstoffe werden schon seit langem pharmazeutisch genutzt. So wussten schon Ärzte der Antike, wie z. B. Hippokrates von Kos (460 – 377 v. Chr.), um die schmerzlindernde Wirkung des Safts aus Weidenrinde. Was sie nicht wussten ist, dass die schmerzlindernde Wirkung auf dem Inhaltsstoff Salicin beruht – dem Vorläufer der heute als Aspirin® bekannten Acetylsalicylsäure. Auch viele andere moderne Arzneimittel basieren auf Wirkstoffen, die dem pflanzlichen Sekundärstoffwechsel entstammen. Die heutzutage stärksten Analgetika leiten sich vom Morphin ab, einem Alkaloid des Schlafmohns. Eine weitere große und durch ihre Vielfalt interessante Gruppe der Alkaloide stellen die in unserer Arbeitsgruppe untersuchten Pyrrolizidin-Alkaloide (PAs) dar. Pyrrolizidin-Alkaloide eignen sich hervorragend als Modellsubstanzen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels, da sie eindrucksvoll belegen, dass der Sekundärstoffwechsel kein Produkt von Zufällen ist, sondern vielmehr die Grundlage für die Entwicklung eines streng selektierten Spektrums an biologisch wirksamen Substanzen darstellt (Hartmann, 1987).

1.1 Vorkommen und Wirkung der Pyrrolizidin-Alkaloide

PAs wurden in mehr als 6.000 Spezies des Pflanzenreichs gefunden (Chou und Fu, 2006), die nicht sehr eng miteinander verwandt sind. Zu über 95 % kommen sie jedoch in den Familien der Asteraceae, der Boraginaceae, der Orchidaceae und der Fabaceae vor. Einzelne Vorkommen liegen in den Familien der Ranunculaceae, der Convolvulaceae, der Celastraceae und der Santalaceae (Hartmann und Witte, 1995).

Bis heute sind mehr als 400 unterschiedliche PAs bekannt, die sich nach Hartmann und Witte in sechs Strukturtypen zusammenfassen lassen (Hartmann und Witte, 1995).

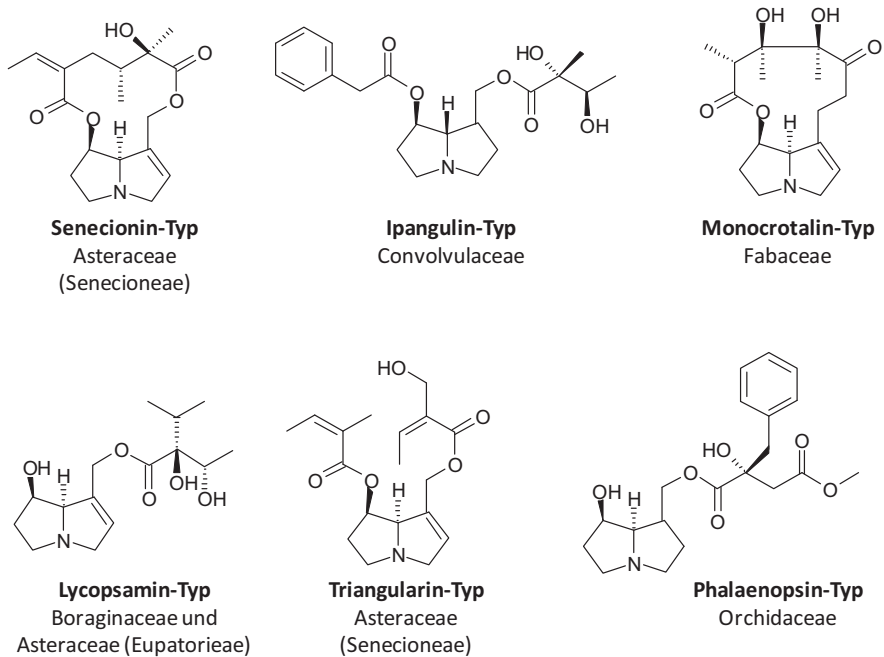


Abbildung 1: Die sechs Strukturtypen der PAs mit ihrem Vorkommen nach Hartmann und Witte (1995)

Während die PAs innerhalb der Asteraceae, der Boraginaceae und der Fabaceae überwiegend in Form ihrer *N*-Oxide vorkommen, sind die PAs in *Phalaenopsis spec.* (Orchidaceae) nur teilweise *N*-oxidiert. In den Convolvulaceae (Gattung *Ipomoea*) liegen die PAs sogar überwiegend in ihrer tertiären Form vor (Hartmann und Witte, 1995; Jenett-Siems et al., 1998; Frölich et al., 2006). Eine Ausnahme zum Vorkommen der PAs als *N*-Oxide stellen

die PAs in den Samen von *Crotalaria scassellatii* (Fabaceae) dar, die die PAs im lipophilen Milieu als tertiäre Amine gespeichert haben (Toppel et al., 1988; Chang und Hartmann, 1998).

Gut untersuchte Beispiele sind die PA-haltigen Pflanzen der *Senecio*-Arten, in denen die Wurzel als Ort der PA-Biosynthese in den Wurzeln identifiziert wurde. Senecionin-*N*-Oxid, als die erste PA-Grundstruktur dieser Synthese (Hartmann und Toppel, 1987; Hartmann et al., 1988), wird durch das Phloem zum Spross transportiert, wo die chemische Modifikation der Grundstruktur in das artspezifische Alkaloidprofil stattfindet (Hartmann und Toppel, 1987; Hartmann und Dierich, 1998). Die Akkumulation der PAs erfolgt in den Vakuolen der Zellen, wobei ein spezifischer Carrier für die Aufnahme der PAs in die Vakuole verantwortlich ist (Ehmke et al., 1988). Hauptsächlich werden die PAs in den für die Reproduktion wichtigen Organen, sowie jungen Pflanzenteilen gespeichert. So wurde in den Blütenköpfchen von *Senecio vulgaris* über 80 % der Gesamt-PA-Menge gefunden, womit die PA-Konzentration im Gegensatz zu den vegetativen Organen um den Faktor 30 größer war (Hartmann und Zimmer, 1986). Auch in anderen PA-haltigen Pflanzen zeigten sich die Blüten als Hauptspeicherort der PAs, wobei die Konzentration der PAs in den übrigen Organen innerhalb verschiedener Familien zu variieren scheint (Vandam et al., 1995).

Das vermehrte Auftreten von Vergiftungen des Weideviehs nach Aufnahme von PA-haltigen Pflanzen (White et al., 1973; Cheeke, 1994; Fletcher et al., 2009) trägt zum immer größer werdenden Bekanntheitsgrad der PAs bei und beweist die hervorragende Wirkung von PAs als Fraßschutz. Für die toxischen Eigenschaften der PAs auf Wirbeltiere wird die Doppelbindung in der 1,2-Position, eine veresterte allylische Hydroxylgruppe an Position 9 und eine freie oder ebenfalls veresterte Hydroxylgruppe an Position 9 verantwortlich gemacht (s. Abbildung 2). Die in den meisten Pflanzen primär vorkommenden, ungiftigen PA-*N*-Oxide sind auf Grund ihrer hydrophilen Eigenschaften nicht membranfähig. Gelangen sie jedoch durch orale Aufnahme in den Verdauungstrakt, werden sie im dortigen alkalischen Milieu durch unspezifische Reduktion in ihre tertiäre, hydrophobe und damit membranfähige Form überführt. Anschließend werden sie im Darm passiv resorbiert und in der Lunge und Leber durch mikrosomale Cytochrom P-450-Monooxygenasen in reaktive, alkylierende Pyrrolderivate umgesetzt. Die Produkte dieser vom Organismus eigentlich als Entgiftung genutzten Reaktion alkylieren Proteine und

Nukleinsäuren, was zu zytotoxischen und genotoxischen Effekten führt (Mattocks, 1970; Mattocks und Legg, 1980; Mattocks et al., 1986; Fu et al., 2004).

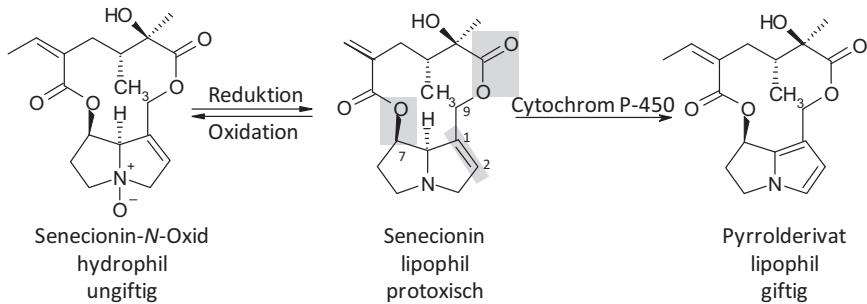


Abbildung 2: Unterschiedliche Formen der PAs bei der Giftungsreaktion im Körper. PAs liegen in den Pflanzen überwiegend als ungiftige *N*-Oxide vor, wie zum Beispiel Senecionin-*N*-Oxid. Bei Aufnahme werden sie im Darm zur tertiären, lipophilen Form reduziert und so passiv resorbiert. In der Leber oder Lunge findet die eigentliche Giftungsreaktion durch Cytochrom P-450-Monooxygenasen zum giftigen Pyrrolderivat statt. Für die giftigen Eigenschaften werden die grau unterlegten Molekülbereiche verantwortlich gemacht.

Verschiedene Tiere zeigen jedoch eine erhöhte Toleranz gegenüber der Toxizität der PAs. So wurde gezeigt, dass zum Beispiel Meerschweinchen und Hamster in der Leber eine mikrosomale flavinabhängige Multisubstrat-Monooxygenase besitzen, die tertiäre PAs effektiv in ihre polare, ungiftige *N*-Oxid-Form überführt (Miranda et al., 1991).

Ebenso wie auf Vertebraten wirken PAs auch auf Insekten giftig, da bei ihnen eine ähnliche Giftungsreaktion wie bei den Säugetieren abläuft. Auf ausgewachsene Tiere wirken PAs zytotoxisch, während sie auf Larven und Puppen mutagen wirken (Frei et al., 1992). Im Laufe der Evolution ist es jedoch einigen Insekten gelungen, sich an PAs in der Nahrung zu adaptieren und damit PA-haltige Pflanzen als eine exklusive Nahrungsquelle für sich zu erschließen. In unserer Arbeitsgruppe wird beispielsweise an dem Arctiid *Tyria jacobaeae* geforscht. Die Larven von *Tyria jacobaeae* besitzen in der Hämolymphe eine spezifische NADPH-abhängige flavinabhängige Monooxygenase, die Senecionin-*N*-Oxygenase. Die passiv in die Hämolymphe resorbierten tertiären PAs werden dort von dieser Monooxygenase vollständig in ungiftige *N*-Oxide überführt und können so in der Hämolymphe als wirksame Abwehrstoffe gegen potentielle Angreifer gespeichert werden (Lindigkeit et al., 1997). Die Larve signalisiert ihre Gefährlichkeit durch eine schwarz-gelbe Warnfärbung. Ein weiteres Beispiel der an PAs angepassten Insekten stellt der Bärenspinner (*Utetheisa ornatrix*) dar. Dieser nimmt als Larve die PAs seiner Hauptfutterpflanze,

Crotalaria spectabilis (Fabaceae), auf und transferiert sie während der Metamorphose über das Puppenstadium zum Schmetterling. Bei Nachwuchs werden die Eier mit den Alkaloiden vom Männchen und Weibchen vor Fraßfeinden geschützt (Dussourd et al., 1988). Desweiteren nutzt das Männchen die PAs zur Synthese von Pheromonen, mit denen es effektiv Weibchen anlockt (Dussourd et al., 1991).

1.2 Evolution der Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese

Durch eine Kombination von physiologischen *in vivo*-Hemmexperimenten und enzymatischen Studien wurde die Homospermidin-Synthase (HSS) als erstes spezifisches Enzym der PA-Biosynthese identifiziert (Böttcher, 1993). Neben dem Vorkommen der HSS in Pflanzen konnte das Enzym auch in bestimmten Bakterienarten nachgewiesen werden, die zu den α -Proteobakterien gehören. Vergleiche der kinetischen und physikalischen Eigenschaften der gereinigten nativen HSS aus *S. vernalis* und dem Bakterium *Blastochloris viridis* deuteten zwar zunächst auf eine enge phylogenetische Verwandtschaft der beiden Enzyme hin (Böttcher et al., 1994; Ober et al., 1996; Ober, 1997), nach erfolgreicher Klonierung und Überexpression der HSS aus *S. vernalis* und *Blastochloris viridis* zeigten die anschließenden vergleichenden Sequenzanalysen jedoch keinerlei Homologie auf Nukleinsäureebene (Tholl et al., 1996; Ober und Hartmann, 1999a). Stattdessen wies die pflanzliche HSS eine hohe Sequenzidentität zur Desoxyhypusin-Synthase (DHS) auf, einem ubiquitär in Eukaryonten und Archaeobakterien vorkommenden Enzym des Primärstoffwechsels ohne funktionellen Bezug zur PA-Biosynthese. Die DHS katalysiert den ersten von zwei Schritten in der posttranslationalen Aktivierung des eukaryontischen Initiationsfaktors 5A (eIF5A). In einer NAD^+ -abhängigen Reaktion wird dabei eine Aminobutyl-Einheit des Spermidins auf einen spezifischen Lysin-Rest des eIF5A-Vorläuferproteins übertragen. Die biologische Funktion des aktivierten eIF5As ist noch nicht vollständig aufgeklärt, es wurde jedoch an *Saccharomyces*-Zellen gezeigt, dass das aktivierte eIF5A für die Zellproliferation notwendig ist (Park et al., 1997). In Pflanzen wurde eine Beteiligung des aktivierten eIF5A bei der Samenkeimung (Moll et al., 2002; Wang et al., 2005b), Seneszenz und Apoptosis nachgewiesen (Wang et al., 2001).

Vergleichende enzymatische Charakterisierungen der rekombinanten DHS aus *Nicotiana tabacum* und *S. vernalis* mit der HSS aus *S. vernalis* und *S. vulgaris* zeigten, dass die DHS

mit annähernd der gleichen spezifischen Aktivität wie die HSS Spermidin und Putrescin zu Homospermidin umsetzen kann (Ober und Hartmann, 1999a, b; Ober et al., 2000; Ober et al., 2003b). Desweiteren wurde mit diesen Studien widerlegt, dass die pflanzliche HSS Putrescin sowohl als Aminobuty-Donor, als auch als Akzeptor zur Homospermidin-Synthese nutzen kann (Böttcher et al., 1994). Im Gegensatz zur bakteriellen HSS, die entweder Spermidin oder Putrescin als Aminobutyl-Donor verwenden kann (Ober et al., 1996), benötigt die pflanzliche HSS Spermidin als Aminobutyl-Donor für die Homospermidin-Synthese (Ober et al., 2000). Die hohe Identität auf Sequenzebene der cDNAs und der genomischen Strukturen, die Übereinstimmung wichtiger kinetischer Parameter und der gleiche Reaktionsmechanismus von HSS und DHS legen den Schluss nahe, dass die HSS und die DHS aus einem gemeinsamen proteinkodierenden Gen durch Duplikation hervorgegangen sind. Als Folge von Mutationen hat die neu entstandene Genkopie vermutlich die DHS-Aktivität verloren (s. Abbildung 3), wodurch sie dem enormen Selektionsdruck des hoch konservierten Primärstoffwechsels entzogen wurde. Die vorherige Nebenreaktion, die Aminobutylierung von Putrescin, wurde zur Hauptreaktion und das neu entstandene Enzym unterlag vermutlich seitdem als Teil der Biosynthese von effektiven Fraßschutz-Verbindungen dem Selektionsdruck der Herbivoren (Ober und Hartmann, 1999a; Ober und Hartmann, 2000).