



Christian Landmann (Autor)

Funktionelle Charakterisierung von Enzymen des Sekundärstoffwechsels in Lavendel (*Lavandula angustifolia*) und Erdbeere (*Fragaria x ananassa*)

Christian Landmann

**Funktionelle Charakterisierung von
Enzymen des Sekundärstoffwechsels in
Lavendel (*Lavandula angustifolia*) und
Erdbeere (*Fragaria x ananassa*)**



 Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/1657>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

A Einleitung

1 Sekundärstoffwechsel

1.1 Einteilung in Primär- und Sekundärstoffwechsel

Die Begriffe „Sekundärmetabolismus“ und „sekundärer Pflanzeninhaltsstoff“ sind historisch geprägt (Richter, 1996). Im 19. Jahrhundert fasste man unter diesen Begriffen die Substanzen zusammen, die nach den damaligen wissenschaftlichen Erkenntnissen keine physiologische Funktion erfüllten. Man betrachtete sie als Endprodukte des Stoffwechsels, die als „innere Sekrete“ und Gegenstück zu tierischen Ausscheidungen entstanden und zum Teil in spezialisierten Geweben abgelagert wurden. Von diesen Verbindungen grenzte man den Primärmetabolismus ab, der in allen Pflanzen auf gleiche Weise das unmittelbare Überleben sicherte.

Mit dem heutigen Wissen über die pflanzlichen Biosynthesewege ist eine eindeutige Trennung zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus nur schwer möglich. Im Allgemeinen erfüllen Stoffe, die man als Sekundärmetaboliten bezeichnet, zwei Bedingungen: Sie sind nur in einer begrenzten Zahl von Spezies zu finden und ihnen kommt keine klare Funktion bei Wachstum und Entwicklung zu (D’Auria und Gershenzon, 2005). Eine Einteilung nach chemischer Struktur oder nach bestimmten Biosynthesewegen ist dagegen nicht möglich, denn es sind die gleichen Vorläufersubstanzen, sehr ähnliche enzymatische Reaktionen und Verbindungen der gleichen Klassen, die im Primär- und im Sekundärstoffwechsel eine Rolle spielen (Richter, 1996). Selbst einzelne Verbindungen können Funktionen in beiden Bereichen übernehmen. So ist Canavanin, eine giftige Aminosäure, in den Samen einiger Leguminosenarten enthalten und schützt sie vor Insektenfraß. Andererseits wird die Substanz während der Keimung abgebaut und sichert die Versorgung des Keimlings mit Stickstoff.

Abgesehen von diesen Überlappungen wird der Sekundärstoffwechsel durch einige Besonderheiten charakterisiert, die ihn vom Primärstoffwechsel unterscheiden. Viele Verbindungen aus dem Sekundärbereich werden nur in spezialisierten Zellen gebildet bzw. gespeichert und häufig werden sie durch die Kondensation von Grundbausteinen synthetisiert, die aus unterschiedlichen Biosynthesewegen stammen (Richter, 1996; Kutchan, 2005). Ein weiteres typisches Merkmal der Sekundärmetabolite liegt in der Vielfalt struktur- und funktionsähnlicher Substanzen, die in einer Pflanze auftreten und durch Modifizierung einer einzigen

Ausgangsverbindung entstehen. Aus Sicht der Evolution besteht zudem ein wesentlicher Unterschied in der vergleichsweise hohen Variabilität und der raschen Veränderung auf der genetischen Ebene des Sekundärstoffwechsels (Pichersky und Gang, 2000). Dementsprechend kann man den Primärmetabolismus als universell, uniform und konservativ bezeichnen, während der Sekundärmetabolismus singulär, vielfältig und adaptiv erscheint (Richter, 1996).

1.2 Vielfalt des Sekundärmetabolismus

Pflanzen synthetisieren eine immense Zahl monomerer und polymerer Verbindungen, wovon etwa 50000 Strukturen zu den niedermolekularen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zählen (De Luca und St. Pierre, 2000). Diese Stoffe werden in einige wenige Hauptklassen eingeteilt. Zu den Isoprenoiden (Terpenoiden) zählt man die flüchtigen Mono- und Sesquiterpene ebenso wie die Saponine (glycosylierte Sterole) und die farbgebenden Carotinoide (Richter, 1996). Eine weitere sehr große Klasse stellen die rund 12000 bekannten Alkaloide dar, deren Bildung hauptsächlich von nur fünf verschiedenen Aminosäuren, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Lysin und Ornithin, ausgeht (De Luca und St. Pierre, 2000). Außerdem enthalten Pflanzen phenolische Verbindungen und davon abgeleitete Strukturen wie Phenolcarbonsäuren, Phenylpropane und Flavonoide (Richter, 1996). Weitere, kleinere Gruppen umfassen zum Beispiel die Stilbene, Betacyane oder Betaxanthine.

Die Biosynthese dieser Verbindungen wird von einer entsprechend großen Zahl von Enzymen gewährleistet. Etwa 15-25 % der 20000-60000 Gene einer Pflanze dürften für diese Proteine codieren (Pichersky und Gang, 2000). Drei Enzymfamilien, die Glucosyltransferasen, Terpensynthasen und Acyltransferasen, werden in dieser Arbeit ausführlicher beschrieben (Kapitel A-2 bis A-4). In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, deren Genom sequenziert ist, wurden Gene sehr vieler weiterer Enzymfamilien identifiziert, die am Sekundärmetabolismus beteiligt sind (Tab. A-1) (D'Auria und Gershenzon, 2005). Allerdings sind über 90 % dieser Enzyme noch nicht biochemisch charakterisiert.

Der Sekundärmetabolismus stellt also einen wesentlichen Bestandteil des pflanzlichen Stoffwechsels dar, in den beachtliche Ressourcen fließen und der sich im Laufe der Evolution offenbar bewährt hat. Dementsprechend erfüllen die Sekundärmetabolite Funktionen, die die Existenz und den Fortbestand der Art in der Umwelt sichern (Richter, 1996). So dienen die flüchtigen Verbindungen und Farbpigmente in Blüten als Lockstoffe für bestäubende Insekten, während giftige

Substanzen Fraßfeinde und Pflanzenpathogene abhalten (Pichersky und Gang, 2000). Farb- und Aromastoffe in Früchten signalisieren Tieren, dass sie eine Belohnung in Form von Zuckern, Vitaminen und Aminosäuren erwartet und helfen auf diese Weise die Samen zu verbreiten. Den Sekundärmetaboliten werden somit überwiegend ökologische, auf externe Parameter gerichtete Funktionen zugeordnet. Vor allem in den letzten Jahren wurde aber zunehmend die Bedeutung dieser Stoffe auch für interne Abläufe wie Wachstum und Entwicklung der Pflanze oder die Abwehr von abiotischem Stress erkannt (D’Auria und Gershenzon, 2005). So scheinen Flavonoide direkt an der Steuerung des Transportes des Phytohormons Auxin (Indolessigsäure) beteiligt zu sein. Ebenso wurden sowohl Phenylpropanoide als auch Flavonole in Zusammenhang mit dem Schutz der Zellen vor UV-B-Strahlung gebracht. Jasmonsäure, Salicylsäure und Brassinosteroide wurden lange als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe betrachtet, bevor man ihre wichtigen Funktionen in den internen pflanzlichen Signalwegen verstand. Viele Verbindungen aus dem Sekundärstoffwechsel erfüllen also auch primäre Funktionen.

Tab. A-1: Auswahl von Genfamilien, deren korrespondierende Enzyme am Sekundärmetabolismus in *Arabidopsis thaliana* beteiligt sind (D’Auria und Gershenzon, 2005).

Genfamilie	Anzahl	Gebildete Sekundärmetabolite
Acyltransferasen		
Serin-Carboxy-Peptidase-ähnlich	53	Hydroxyzimtsäureester
BAHD-Familie	64	Acylierte Anthocyane, aliphatische und aromatische Ester
Methyltransferasen		
SABATH-Familie	24	Aliphatische und aromatische Methylester
Typ I O-Methyltransferasen	6	Flavonoid-Methylether
Carboxymethyl-Esterasen	20	Carbonsäuren
Cytochrom P450 Monooxygenasen	272	Hydroxylierte Phenylpropanoide, Glucosinolate
Glutathion-S-Transferasen	48	Glutathion-Konjugate
Aldehyd-Dehydrogenasen	14	Aromatische und aliphatische Säuren
Terpensynthasen	30	Mono-, Sesqui-, Diterpene
Oxidosqualencyclasen	13	Triterpene
Glycosyltransferasen	107	Glycoside
Glycosidhydrolasen (Familie I)	47	Aglycons (z. B. Flavonole, Phenylpropanoide)
Pathogen-induzierte Lipase-ähnliche Enzyme	6	Von Fettsäuren abgeleitete Komponenten
Acylgruppen-aktivierende Enzyme/ CoA-Ligasen	63	CoA-Thioester, Aminosäuren-Konjugate

1.3 Funktionelle Charakterisierung von Enzymen des Sekundärmetabolismus

Mit der Verfügbarkeit genetischer Methoden ergaben sich auch für die Forschung am Sekundärmetabolismus neue Möglichkeiten (Memelink, 2005; Rohloff und Bones, 2005). In groß angelegten Studien wurden tausende von Mutantpflanzen erzeugt und ihre Metabolite auf qualitative und quantitative Veränderungen untersucht. Da sich das mutierte Gen problemlos bestimmen lässt, das eine Veränderung verursacht, ist die schnelle funktionelle Zuordnung einer großen Zahl von Genen möglich. Es kann aber keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, für welchen molekularen Mechanismus ein Gen jeweils verantwortlich ist. Das Gen könnte ein Enzym codieren, das einen Schritt in der Biosynthese des veränderten Metaboliten übernimmt, oder es könnte eine regulative Funktion einnehmen. Weitere Erkenntnisse über die Funktion eines Gens lassen sich aus dessen Expressionsprofil ableiten (Fridman und Pichersky, 2005). Gene, die nur in spezifischen Geweben, in bestimmten Entwicklungsstadien oder unter speziellen äußeren oder inneren Bedingungen exprimiert werden, hängen mit den damit verbundenen, biologischen Abläufen zusammen. Häufig basiert die Zuordnung der Funktion einer neuen Gensequenz auch auf der Homologie zu bereits biochemisch charakterisierten Sequenzen. Diese Annotierung gibt zwar wertvolle Hinweise, welcher Gen- bzw. Proteinklasse die Sequenz angehört, ist jedoch meist ungenau und kann die Substrat- oder Produktspezifitäten eines Enzyms nicht sicher vorhersagen.

Daher sind zusätzlich zu genetischen Kenntnissen biochemische Daten von entscheidender Bedeutung (Fridman und Pichersky, 2005). Ist die Gensequenz bekannt, ist es mit molekularbiologischen Methoden möglich, große Mengen an reinem, rekombinantem Enzym zu erzeugen und dieses biochemisch zu charakterisieren. Gegenüber der klassischen Aufreinigung von Enzymen aus pflanzlichen Proteinextrakten hat diese Vorgehensweise entscheidende Vorteile. Denn mit der klassischen Technik ist es häufig nicht möglich, Proteine mit ähnlichen Eigenschaften zu trennen. Gerade im Sekundärstoffwechsel existieren aber Enzyme mit unterschiedlicher Produktspezifität, die sich nur geringfügig voneinander unterscheiden. Zudem benötigt man deutlich weniger Pflanzenmaterial. Dies ist insbesondere bei der Untersuchung des Sekundärmetabolismus von Vorteil, da die beteiligten Enzyme oft in spezialisierten Geweben gebildet werden und nur in geringer Menge enthalten sind (Croteau, 1987). Wenn die Reaktion eines Enzyms *in vitro* charakterisiert wurde, kann die Funktion *in vivo* wiederum mit genetischen

Methoden bestätigt werden, indem dieses Enzym in transgenen Pflanzen spezifisch herabreguliert oder überexprimiert wird, und die Veränderung der Metabolite analytisch erfasst wird (Lunkenbein et al., 2006a).

Durch die Untersuchung von Pflanzen mit rein analytischen Methoden entstand umfangreiches Wissen über deren sekundäre Inhaltsstoffe. Da aber die Zusammensetzung in verschiedenen Geweben ebenso wie in unterschiedlichen Entwicklungsstadien variiert, werden je nach Wahl des analytischen Verfahrens möglicherweise wichtige Substanzen nicht erfasst (Fridman und Pichersky, 2005). Die Charakterisierung von Enzymen aus *Arabidopsis thaliana*, deren genetische Sequenzen lediglich aus der vollständigen Sequenzierung des Genoms bekannt waren, ermöglichte die erstmalige Entdeckung von Sekundärmetaboliten (D'Auria und Gershenzon, 2005; Fridman und Pichersky, 2005). So wurde eine spezifisch in Wurzeln exprimierte 1,8-Cineolsynthase *in vitro* charakterisiert. Erst danach konnte man das Produkt dieses Enzyms durch hochsensitive PTR-MS (Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry) auch in der Pflanze nachweisen. Aufgrund derartiger Ergebnisse nimmt die Zahl der nachgewiesenen Sekundärmetabolite ständig zu. Die Verknüpfung der Informationen über Gene (*Genomics*), Enzyme (*Proteomics*) und Metabolite (*Metabolomics*) wird daher in Zukunft die treibende Kraft in der Erforschung des Sekundärmetabolismus sein (Fridman und Pichersky, 2005).

2 Glucosyltransferasen

2.1 Einteilung

Die Modifikation von Molekülen durch Glycosylierung stellt eine der wichtigsten Reaktionen in der Natur dar und wird von den Mitgliedern einer Enzym-Superfamilie, den Glycosyltransferasen katalysiert. Sie übertragen Zuckereinheiten von aktivierten Donormolekülen auf die funktionellen Gruppen von Alkoholen, Thiolen, Aminen und Säuren und bilden O-, S- und N-glycoside sowie Glucoseester. Die Akzeptorsubstrate sind äußerst unterschiedlich und rangieren von kurzkettigen Alkanolen bis hin zu langkettigen, komplexen Polysacchariden.

Nach den Empfehlungen der *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) wurden die Glycosyltransferasen entsprechend ihrer Substrat- und Produktspezifitäten in Klassen eingeteilt (EC 2.4.x.y). Da in dieses System Enzyme jedoch nur dann befriedigend eingeordnet werden können, wenn sie vollständig charakterisiert sind und dabei stark substratspezifisch sind, wurde ein zweites System eingeführt, das auf der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen basiert (Campbell et al., 1997; Coutinho et al., 2003). Bisher (Stand: Januar 2007) sind auf diese Weise 87 Familien in der CAZy-Datenbank (*Carbohydrate-Active Enzymes*) identifiziert worden. Innerhalb einer Familie sind Enzyme gruppiert, die zwar unterschiedliche Substrat- und Produktspezifitäten aufweisen können, bei denen aber der molekulare Reaktionsmechanismus konserviert ist. Ausgehend von den vergleichsweise wenigen charakterisierten Glucosyltransferasen werden dadurch Rückschlüsse auf andere Enzyme ermöglicht, von denen lediglich Sequenzinformationen bekannt sind. Im Folgenden wird nur auf die Mitglieder der Familie 1, eine der größten, eingegangen. Es handelt sich um UDP-Glycosyltransferasen (UGTs), die einen UDP-aktivierten Zucker auf kleine (d. h. monomere), häufig hydrophobe Moleküle des Sekundärmetabolismus übertragen.

2.2 Reaktionen und Struktur

Die von den Glycosyltransferasen katalysierte Reaktion ist formal eine nucleophile Substitution, bei der das Akzeptormolekül als Nucleophil am anomeren C-Atom des aktivierten Zuckermoleküls angreift. Dabei kann die Konfiguration am C-Atom entweder unverändert bleiben oder sich unter Inversion ändern, sodass man dementsprechend in retentierende und invertierende Glycosyltransferasen einteilt (Charnock et al., 2001). Alle UGTs der Familie 1 reagieren invertierend (Abb. A-1).

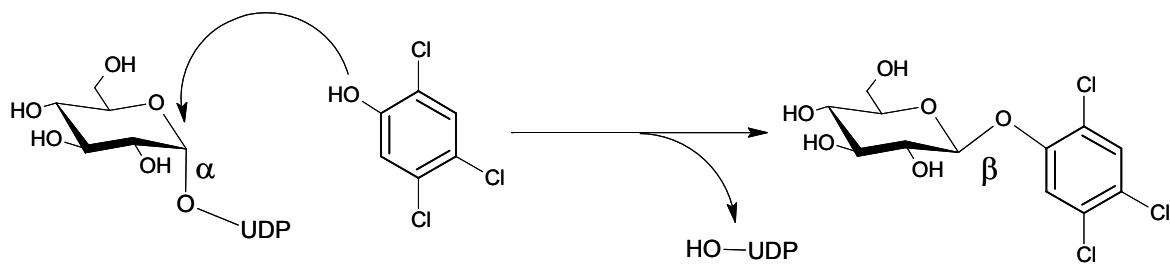


Abb. A-1: Reaktionsmechanismus der invertierenden UGTs am Beispiel von UDP-Glucose und 2,4,5-Trichlorphenol. Die Konfiguration des anomeren C-Atoms ändert sich von α zu β .

Als Donorsubstrat akzeptieren die UGTs UDP-aktivierte Zucker, in den meisten Fällen UDP-Glucose. Dabei erwiesen sich die Enzyme als relativ substratspezifisch und reagieren meist nur mit einem Donorsubstrat (Vogt und Jones 2000). Allerdings zeigt gerade die neuere Literatur, dass pflanzliche Glycosyltransferasen zum Teil auch mehrere verschiedene aktivierte Zucker transformieren können (Flint et al., 2005; Offen et al., 2006).

Dagegen wurde bei fast allen bisher charakterisierten Glucosyltransferasen des Sekundärmetabolismus gezeigt, dass sie mit mehr als nur einem Akzeptorsubstrat reagieren. Die Substratspezifität ist also in den meisten Fällen gering und kann sich z. B. auf eine Substanzklasse beziehen, aber auch noch wesentlich weiter gefasst sein. So katalysierte das Enzym UGT84B1 aus *Arabidopsis thaliana* die Bildung des Indoleessigsäure-Glucoseesters mit der höchsten spezifischen Aktivität, konjugierte aber nur wenig schlechter auch die Derivate Indolpropylsäure und Indolbutylsäure sowie die strukturell deutlich unterschiedliche Zimtsäure (Jackson et al., 2001). Ähnliche Enzyme wurden unter anderem in Tabak (Fraissinet-Tachinet et al., 1998; Lee and Raskin, 1999), *Dorotheanthus bellidiformis* (Vogt et al., 1999) und *Beta vulgaris* (Isayenkova et al., 2006) beschrieben. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass die Glucosyltransferasen eher regioselektiv oder regiospezifisch als substratspezifisch reagieren (Vogt und Jones, 2000; Isayenkova et al., 2006).

Erst kürzlich wurden die ersten Kristallstrukturen pflanzlicher Glucosyltransferasen aufgeklärt und halfen dabei, die molekulare Grundlage für die Substratspezifitäten zu klären (Shao et al., 2005; Offen et al., 2006). Bereits früher wurde eine Konsensussequenz, die sogenannte PSPG-Box (*Plant Secondary Product Glucosyltransferase Box*), postuliert, die sich am C-Terminus aller UGTs befindet