



# 1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Der Grundstoffwechsel ist in nahezu allen Pflanzen gleich und umfasst die Prozesse des Energie- und Baustoffwechsels. Von diesem Primärstoffwechsel, der vor allem den Metabolismus von Kohlenhydraten, Proteinen und Lipiden umfasst, unterscheidet man den sogenannten sekundären Stoffwechsel (HARTMANN, 1985). Die Bedeutung des Sekundärstoffwechsels liegt in der Interaktion der Pflanzen mit ihrer Umwelt. Die wichtigsten Funktionen sind die Abwehr von Herbivoren oder Pathogenen und von Pflanzen, die um Licht, Nährstoffe und Wasser konkurrieren. Darüber hinaus sind viele Sekundärstoffe wichtig für die Anlockung von bestäubenden und samenverbreitenden Tieren oder für den Schutz der Pflanze gegen abiotischen Stress (WINK, 2010).

Sekundärmetaboliten werden oft nur in bestimmten Geweben, Zellen oder Organen synthetisiert. Sie werden vor allem dort akkumuliert, wo sie für das Überleben und die Vermehrung der Pflanze von Bedeutung sind, nämlich in epidermalen und Rindengewebe, in Blüten, Früchten und Samen (WINK, 2010). Aufgrund der vielfältigen Funktionen wurden im Zuge der Evolution unzählige Substanzen entwickelt. Die wichtigsten Klassen sind: Polyphenole, Alkaloide, Terpene, nicht-proteinogene Aminosäuren und schwefelhaltige Verbindungen wie Glucosinolate, deren biosynthetische Vorstufen alle dem Primärstoffwechsel entstammen (HARTMANN, 1985).

Sekundäre Pflanzenstoffe finden seit langem Verwendung in der Medizin, als Aroma- und Duftstoffe oder als Farbstoffe (KOES et al., 1994). Der charakteristische Geschmack vieler Gewürze und pflanzlicher Lebensmittel ist auf das Vorhandensein spezifischer Sekundärstoffe zurückzuführen. Ebenso werden viele sekundäre Pflanzenstoffe in zunehmendem Maße Lebensmitteln und Kosmetika zugesetzt, um ihre positiven Wirkungen zu nutzen. So wird vielen Terpenoiden, Polyphenolen, Alkaloiden und schwefelhaltigen Verbindungen eine gesundheitsfördernde Wirkung zugeschrieben (CROZIER et al., 2006b). In diesem Sinne empfiehlt die Deutsche Gesellschaft für Ernährung fünf Portionen Obst und Gemüse am Tag, da die darin enthaltenen sekundären Pflanzenstoffe das Risiko von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs verringern sollen (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG E. V., 2005). Im medizinischen Bereich werden vor allem Reinsubstanzen eingesetzt, insbesondere Alkaloide, da diese



meist eine mehr oder weniger ausgeprägte pharmakologische Wirkung besitzen (HESSE, 2000).

Die Biosynthese der Sekundärstoffe kann durch viele exogene Faktoren beeinflusst werden. So ist schon lange bekannt, dass Gewürze, die von Pflanzen aus mediterranen Gebieten stammen, sehr viel aromatischer sind als entsprechende Gewürze aus gemäßigten Breiten. Gleiches gilt für Arzneipflanzen, die unter semiariden Bedingungen höhere Gehalte der jeweiligen Sekundärstoffe aufweisen als unter gemäßigten Bedingungen. Dieses Phänomen lässt sich auf den Trockenstress zurückführen, dem die Pflanzen in mediterranen Gebieten verstärkt ausgesetzt sind (SELMAR, 2008). Bisher sind jedoch nur wenige Informationen zur Wirkung von Stress - insbesondere Trockenstress - auf die Sekundärstoffsynthese und damit die Qualität der Gewürz- und Arzneipflanzen bekannt. Die vorliegende Arbeit ist in diese Thematik eingebettet. Im Fokus des Interesses steht dabei die Frage, inwiefern sich die Sekundärstoffgehalte durch Trockenstress oder durch die Applikation von Induktoren wie Methyljasmonat oder Salicylsäure steigern lassen und welche grundsätzlichen Prozesse dabei eine Rolle spielen. Um die Wirkung von Trockenstress auf die Biosynthese verschiedenster Sekundärstoffklassen erfassen zu können und allgemeine Aussagen zu treffen, sind grundsätzliche Kenntnisse der Biosynthese der Sekundärstoffe notwendig. Deshalb erfolgt im anschließenden Kapitel eine eingehende Darstellung ausgewählter Biosynthesewege sekundärer Pflanzenstoffe. Des Weiteren werden auch die komplexen physiologischen Prozesse, die unter abiotischem Stress in Pflanzen ablaufen, vorgestellt, um deren grundsätzliche Auswirkung auf den Sekundärstoffwechsel erfassen zu können.

Ziel dieser Arbeit ist es, sowohl den Einfluss von Trockenstress als auch die Wirkung von Induktoren wie Methyljasmonat und Salicylsäure auf die Gehalte verschiedener Sekundärstoffe zu analysieren. Um ein möglichst breites Spektrum an Sekundärstoffen einzubeziehen, wurden unterschiedliche Versuchspflanzen eingesetzt: Petersilie (Flavone, etherisches Öl), Thymian (Terpene), Johanniskraut (Flavonoide, Phloroglucine, Naphthodianthrone) und Schöllkraut (Alkaloide). Auf der Basis dieser Untersuchungen sollen allgemeine Aussagen abgeleitet werden, wie abiotischer Stress den pflanzlichen Sekundärstoffwechsel grundsätzlich beeinflusst und wie diese Erkenntnisse genutzt werden können, um die Qualität von Gewürz- und Arzneipflanzen zu erhöhen.

## 2 GRUNDLAGEN UND KENNTNISSTAND

### 2.1 Sekundäre Pflanzenstoffe

Es gibt eine enorme Vielfalt an Sekundärstoffen, die nach unterschiedlichen Kriterien klassifiziert werden können. Eine einfache Klassifizierung erfolgt nach der chemischen Struktur der Sekundärstoffe. Demnach gibt es drei Hauptgruppen: Phenole, Alkaloide und Terpene (CROZIER et al., 2006a). Obwohl die Sekundärstoffe einer Gruppe ähnliche Strukturen besitzen, kann die Biogenese unterschiedlich verlaufen. So können beispielsweise phenolische Verbindungen über den Shikimatweg, den Polyketidweg oder den Isoprenoidweg synthetisiert werden. Daher ist die Klassifizierung nach den biogenetischen Vorstufen - Shikimat, Acetat und Mevalonat bzw. Methylerythritolphosphat - häufig sinnvoller (DEWICK, 2009).

In der vorliegenden Arbeit erfolgt die Einteilung der Sekundärstoffe nach der chemischen Struktur. In diesem Kapitel werden Polyphenole, Alkaloide und Terpene sowie deren Biosynthese detailliert dargestellt.

#### 2.1.1 Polyphenole

Polyphenole sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Die aromatischen Verbindungen besitzen eine oder mehrere Hydroxylgruppen. Nach CROZIER et al. (2006a) lassen sie sich in Flavonoide und nichtflavonoide Polyphenole unterteilen (Abbildung 2.1).

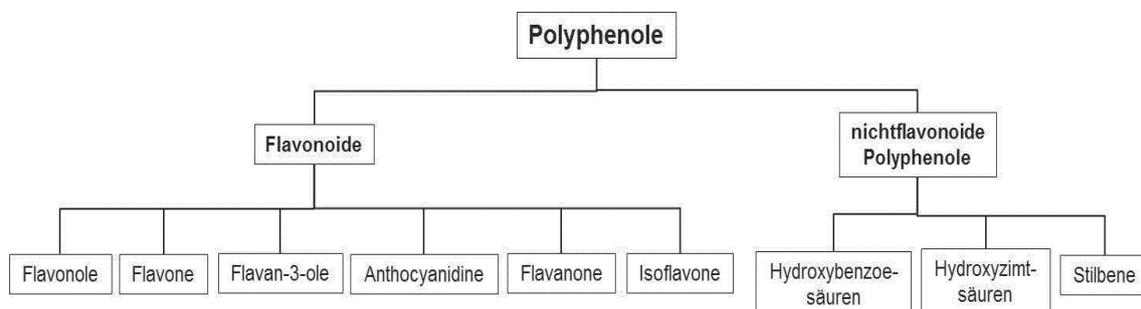


Abbildung 2.1: Klassifizierung der Polyphenole (nach CROZIER et al., 2006a)

Die meisten Polyphenole liegen glykosidisch gebunden oder mit organischen Säuren verestert vor (CROZIER et al., 2006a), wodurch ihr hydrophiler Charakter gesteigert wird. Polyphenole werden in der Regel in der Zellvakuole akkumuliert oder finden sich apoplastisch im Zellwandbereich (WINK, 1987).

### 2.1.1.1 Nichtflavonoide Polyphenole: Vorkommen und Funktionen

Die Gruppe der nichtflavonoiden Polyphenole umfasst die Stilbene und die Phenolcarbonsäuren, die sich in Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren unterteilen. Aufgrund ihrer Wirkung werden Hydroxybenzoesäuren auch als Gerbstoffe bezeichnet. Die Gerbstoffe lassen sich wiederum in zwei Gruppen einteilen, nämlich in die hydrolysierbaren, die sich von der Gallussäure ableiten, und in die kondensierten Gerbstoffe, die sich vom Catechin ableiten (CROZIER et al., 2006a).

Gallussäure ist die häufigste Verbindung der Hydroxybenzoesäuren und ist Bestandteil der hydrolysierbaren Gerbstoffe (=Gallotannine). Die wichtigsten Hydroxyzimtsäurederivate sind *p*-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure oder Sinapinsäure. In der Regel liegen diese als Ester der Chinasäure, Shikimisäure oder Weinsäure oder als Glykoside vor. So ist Chlorogensäure ein Ester aus Kaffeesäure und Chinasäure (KOES et al., 1994, CROZIER et al., 2006a). Meist sind Hydroxyzimtsäurederivate Vorstufen zu anderen Verbindungen, wie den Flavonoiden, Stilbenen, Cumarinen oder den aromatischen Alkaloiden (VOGT, 2010). Häufig sind die entsprechenden Endprodukte, wie beispielsweise die Stilbene, Phytoalexine; d.h. sie werden als Reaktion auf Pathogenbefall gebildet, wie z.B. das Resveratrol in Weinreben und Weintrauben (CROZIER et al., 2006a).

### 2.1.1.2 Flavonoide: Vorkommen und Funktionen

Die größte Gruppe der Polyphenole sind mit bislang über 3.000 bekannten Strukturen die Flavonoide. Der Flavangrundkörper (Abbildung 2.2) besteht aus zwei aromatischen Ringen (A und B) und einem heterocyclischen Ring (C). Flavonoide werden nach dem Grad der Oxidation des C-Rings unterteilt. Flavonoide sind im Pflanzenreich weit verbreitet und haben etliche Funktionen. Farbige Pigmente in Blüten, meist Anthocyane und Flavone, fungieren als visuelles Signal für Tiere und locken bestäubende Insekten oder samenverbreitende Vögel an (KOES et al., 1994).

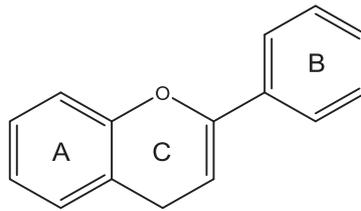


Abbildung 2.2: Flavangrundgerüst

Da Flavonoide UV-Licht stark absorbieren, schützen sie die Pflanze vor Schäden durch UV-Licht. In vielen Fällen wird die Biosynthese der Flavonoide durch Pathogenbefall induziert, so dass diese ebenfalls Phytoalexine darstellen. Oligomere wie die Tannine geben der Pflanze zusätzlich Struktur und sind als Gerbstoffe wichtige Faktoren bei der allgemeinen Pathogenabwehr im Rahmen hypersensitiver Reaktionen (KOES et al., 1994). Im Folgenden werden einige Flavonoidgruppen eingehender beschrieben.

#### 2.1.1.2.1 Flavone

Flavone kommen sowohl in Algen als auch in höheren Pflanzen vor. Meistens liegen sie als O- oder C-Glykoside in den Vakuolen vor und stellen gelbe Copigmente der Anthocyane in Blüten dar (CROZIER et al., 2006a). Häufig auftretende Flavone sind Apigenin und Luteolin. Apigenin kommt beispielsweise in hohen Konzentrationen in Petersilie (185 mg/100 g) und Sellerie (75 mg/100 g) vor (JUSTESEN et al., 1998).

#### 2.1.1.2.2 Flavonole

Mit über 450 bekannten Strukturen sind Flavonole die häufigsten Flavonoide. Oft liegen sie als O-Glykoside vor (IWASHINA, 2000). Flavonole werden im äußeren Bereich des Gewebes von z.B. Früchten oder Blättern akkumuliert, da ihre Biosynthese durch Licht angeregt wird (MANACH et al., 2004). Ein weit verbreitetes Flavonol ist Quercetin. Die glykosylierten Quercetinverbindungen Rutin, Hyperosid und Isoquercetrin sind die bedeutendsten Flavonoide in Johanniskraut (HÖLZL und PETERSEN, 2003).



### 2.1.1.2.3 Biflavonoide

Biflavonoide sind meist C-C-verknüpfte Dimere von Flavonen, Flavonolen, Flavanonen, Dihydroflavonolen oder Isoflavonen. Inzwischen wurden über 200 natürlich vorkommende Bi- und Triflavonoide beschrieben (IWASHINA, 2000). Johanniskraut enthält die Biflavonoide Amentoflavon (I3', II8-Biapienin) und I3, II8-Biapienin in den Blütenblättern (BERGHÖFER, 1987).

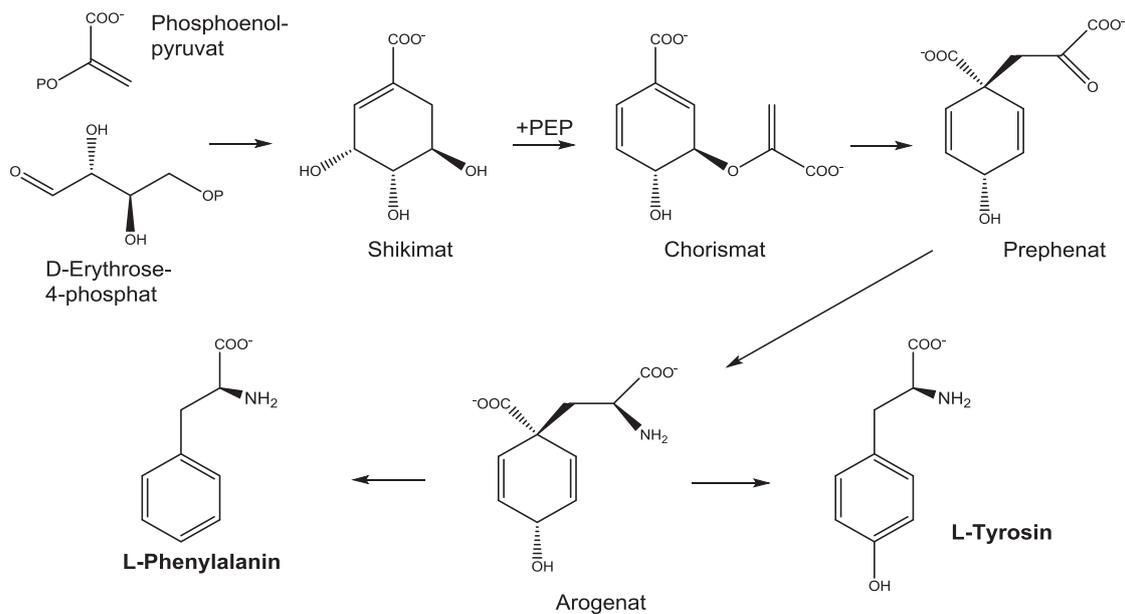
### 2.1.1.3 Biosynthese der Polyphenole

Die Biosynthese der Polyphenole beginnt mit der Synthese der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin über den Shikimatweg. Diese Aminosäuren dienen als Präkursoren für eine Vielzahl von sekundären Pflanzenstoffen wie den Flavonoiden, Benzoessäurederivaten, Zimtsäurederivaten oder den Cumarinen (VOGT, 2010). Die aromatischen Ringe der Flavonoide resultieren aus unterschiedlichen Biosynthesewegen. Während der B-Ring dem Shikimatweg entstammt, ist der A-Ring das Resultat einer Cyclisierung eines Polyketorestes, der dem Acetat-Malonat-Weg oder Poyketid-Weg entstammt (DEWICK, 2009).

#### 2.1.1.3.1 Biosynthese der aromatischen Aminosäuren: Der Shikimatweg

Die aromatischen Aminosäuren *L*-Phenylalanin, *L*-Tyrosin und *L*-Tryptophan werden enzymatisch über den Shikimatweg synthetisiert. Diesen Biosyntheseweg findet man sowohl in Pflanzen als auch in Mikroorganismen. Für Tiere und Menschen sind die aromatischen Aminosäuren dagegen essentiell, d.h. sie müssen mit der Nahrung aufgenommen werden und können nicht eigenständig synthetisiert werden (DEWICK, 2009).

Ausgehend von Phosphoenolpyruvat (PEP) aus dem Glucosestoffwechsel und *D*-Erythrose-4-phosphat aus dem Pentosephosphat-Zyklus wird über mehrere Schritte Shikimisäure enzymatisch gebildet (Abbildung 2.3). Nach der Addition eines weiteren Moleküls PEP entsteht Chorismat. Über eine Umlagerungsreaktion wird Prephenat gebildet, das nach Transaminierung zu Arogenat wird. Durch Decarboxylierung, Bildung des aromatischen Rings und Abspaltung der Hydroxylgruppe wird aus Arogenat Phenylalanin gebildet. Tyrosin entsteht dagegen nur durch Decarboxylierung und Bildung des aromatischen Rings (MAEDA und DUDAREVA, 2012).



**Abbildung 2.3: Vereinfachter enzymatischer Syntheseweg von Phenylalanin und Tyrosin über den Shikimatweg (nach MAEDA und DUDAREVA, 2012)**

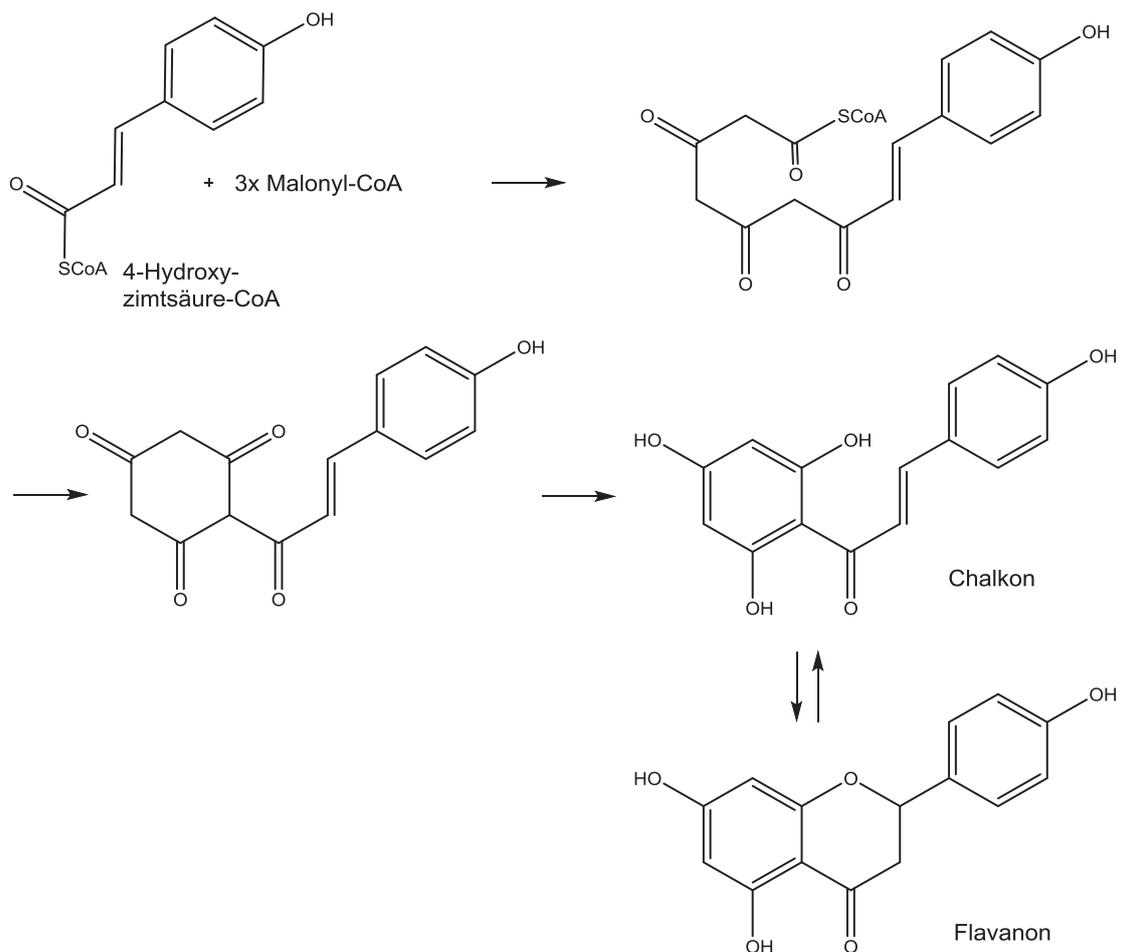
Die Biosynthese von Tryptophan zweigt beim Chorismat vom beschriebenen Shikimatweg ab (MAEDA und DUDAREVA, 2012).

### 2.1.1.3.2 Biosynthese von Zimtsäure- und Benzoessäurederivaten

Eine der wichtigsten Reaktionen beim Übergang vom Primär- zum Sekundärstoffwechsel ist die Bildung von Zimtsäure bzw. von *p*-Cumarsäure. Sie wird katalysiert durch die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL). Aus Phenylalanin und Tyrosin entstehen dabei die *trans*-Zimtsäure bzw. 4-Hydroxymethylzimtsäure (*p*-Cumarsäure; VOGT, 2010). Durch Hydroxylierungs- und Methylierungsreaktionen entstehen Hydroxymethylzimtsäuren wie Kaffeesäure oder Ferulasäure. Diese Zimtsäurederivate sind wichtige Vorstufen für eine Vielzahl unterschiedlicher Sekundärstoffe wie den Flavonoiden, Cumarinen, Lignan, Ligninen oder Stilbenen. Einige Hydroxybenzoessäuren, wie z.B. die Gallussäure, leiten sich direkt aus dem Shikimatweg ab, wohingegen andere aus Zimtsäurederivaten durch Abspaltung einer C<sub>2</sub>-Einheit an der Doppelbindung synthetisiert werden können (DEWICK, 2009).

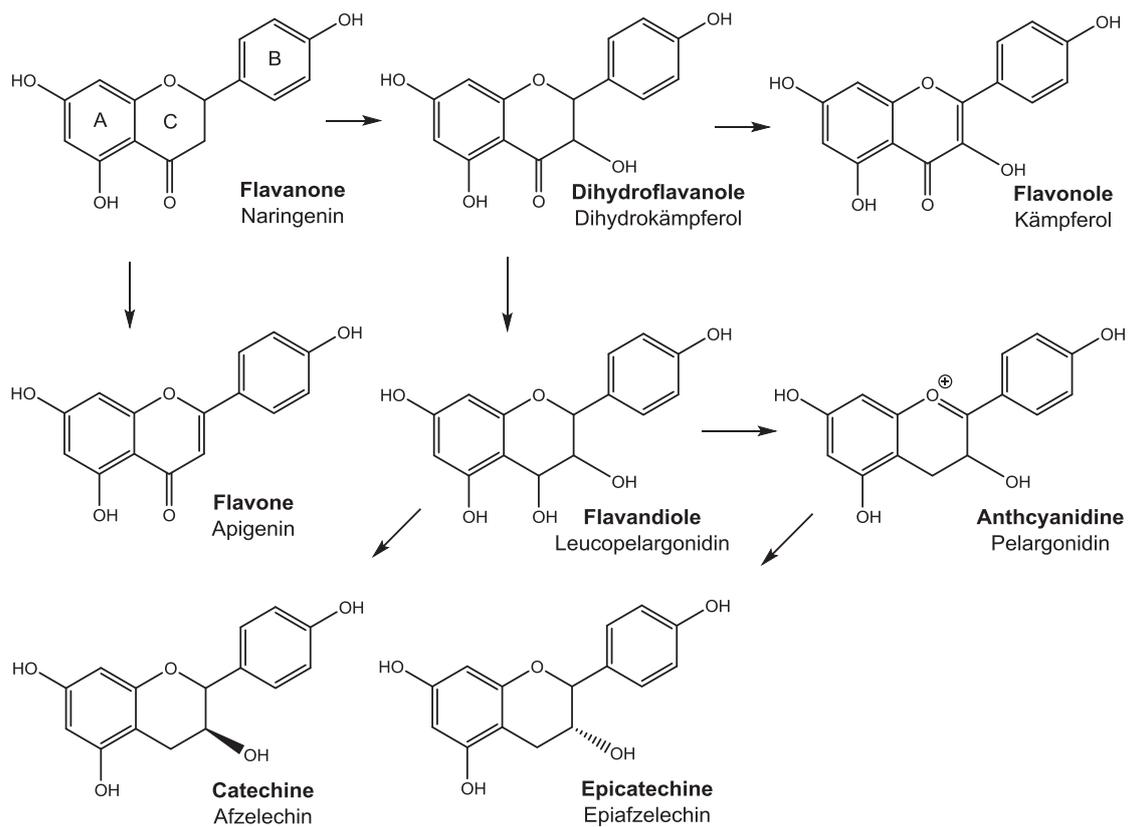
### 2.1.1.3.3 Biosynthese von Flavonoiden

Die Flavonoide werden ausgehend von 4-Hydroxyzimtsäure-CoA (= Cumaryl-CoA) synthetisiert. Die Kettenverlängerung erfolgt mit drei Molekülen Malonyl-CoA. Dabei entsteht ein Polyketid, welches zum Chalkon cyclisiert (Abbildung 2.4). Aus dem Chalkon entsteht durch Ringschluss ein Flavanon, das wiederum Ausgangssubstanz für alle weiteren Flavonoide ist (siehe Abbildung 2.5; DEWICK, 2009).



**Abbildung 2.4: Biosynthese des Chalkons ausgehend von 4-Hydroxyzimtsäure-CoA (nach DEWICK, 2009)**

Das Flavanon stellt die direkte Vorstufe für Dihydroflavanole, Flavone und Isoflavone dar. Das Dihydroflavanol kann enzymatisch in ein Flavonol oder ein Flavandiol umgewandelt werden. Das Flavandiol gilt wiederum als Vorstufe für Anthocyanidine und Catechine (Abbildung 2.5). Die Flavonoide können sich im Hydroxylierungsmuster unterscheiden, methyliert oder glykosyliert vorliegen (MACHEIX et al., 1990, DEWICK, 2009).



**Abbildung 2.5: Strukturen und Synthesewege der Flavonoide ausgehend vom Flavanon (nach MACHEIX et al., 1990 und DEWICK, 2009)**

#### 2.1.1.3.4 Regulation der Biosynthese

Wie bereits ausgeführt, haben viele Phenylpropanderivate eine große Relevanz für die vielfältigen Wechselwirkungen von Pflanzen mit der Umgebung. Ihre Biosynthese ist in der Regel entwicklungs- und gewebeabhängig (z.B. Blütenfarbstoffe, Verholzungen, Gerbstoffeinlagerungen). Darüber hinaus werden viele Phenylpropanderivate als Antwort auf bestimmte Umweltbedingungen synthetisiert. Wichtige Auslöser sind UV-Licht, Pathogenbefall, Verletzung der Pflanze, niedrige Temperaturen oder Nährstoffdefizite (DIXON und PAIVA, 1995). So wird z.B. die Akkumulation von Flavonen und Anthocyanen durch sichtbares Licht induziert (BEGGS et al., 1987) und die Behandlung von Zellkulturen (*Petroselinum hortense*) mit einem Pilzelicitor führte zur Biosynthese von Furanocumarinen (TIETJEN et al., 1983).



## 2.1.2 Alkaloide

Unter der Bezeichnung „Alkaloide“ versteht man stickstoffhaltige Verbindungen natürlichen Ursprungs, deren Biosynthese sich in der Regel von Aminosäuren ableitet. Sie haben meistens einen basischen Charakter. Insgesamt sind Alkaloide eine sehr heterogene Substanzklasse, die nicht leicht zu klassifizieren ist (HESSE, 2000). Bislang sind etwa 21.000 verschiedene Alkaloide bekannt (WINK, 2010). Sie kommen vor allem im Pflanzenreich vor, aber auch in Pilzen und Tieren sind Alkaloide bekannt. Viele Alkaloide haben eine physiologische Wirkung auf den tierischen oder menschlichen Organismus (HESSE, 2000). Abgrenzend zu den „echten“ Alkaloiden repräsentieren Protoalkaloide entsprechende Verbindungen ohne N-Heterocyclus, wohingegen die Pseudoalkaloide prinzipiell die gleichen Eigenschaften aufweisen wie die „echten“ Alkaloide (WATERMAN, 1998). Die Biosynthese der Pseudoalkaloide geht jedoch nicht auf Aminosäuren zurück, sondern auf andere Präkursoren wie Terpenoide oder Polyketide, wobei das Stickstoffatom hier erst später während der Biosynthese eingebaut wird (ROBERTS et al., 2010).

Die Klassifizierung der Alkaloide kann nach verschiedenen Kriterien erfolgen. Die wichtigsten Einteilungsmerkmale sind:

- die Biogenese, d.h. die zu Grunde liegende Aminosäure: z.B. Ornithin, Lysin, Tyrosin, Tryptophan;
- die botanische Herkunft: z.B. Tabakalkaloide, Mohnalkaloide, Lupinenalkaloide;
- die chemische Struktur: z.B. Indolalkaloide, Tropanalkaloide, Isochinolinalkaloide (HESSE, 2000, ROBERTS et al., 2010).

### 2.1.2.1 Vorkommen und Funktion

In 20-30 % aller höheren Pflanzen findet man Alkaloide. Diese liegen meist als Salze organischer Säuren vor (WINK, 1998). Während die meisten Pflanzenfamilien Alkaloide nur einer Klasse aufweisen, enthalten einige Pflanzenfamilien Alkaloide mehrerer Klassen. So findet man in Solanaceae neben den Pyridinalkaloiden auch Tropan- und Steroidalkaloide (BREITMAIER, 2008).

Es wird davon ausgegangen, dass Alkaloide in Pflanzen grundsätzlich wichtige Faktoren zur Abwehr von Herbivoren und Pathogenen darstellen. Allerdings gibt es bislang nur wenige Alkaloide, deren Funktion und Bedeutung im Detail experimentell belegt