

Die Welt der Naturstoffe: Untersuchungen von Esterverbindungen und Acyltransferasen am Modellsystem *Arabidopsis thaliana*

The world of esterified plant natural products: Studies on Acyltransferases using *Arabidopsis thaliana* as a model system

D&Auria, John

Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena

Korrespondierender Autor

E-Mail: dauria@ice.mpg.de

Zusammenfassung

Pflanzen bilden spezielle Substanzen, um die Wechselwirkungen mit ihrer Umwelt zu koordinieren. Um die Diversität dieser chemischen Verbindungen zu vergrößern, werden „Leitstrukturen“ durch verschiedene Enzymfamilien modifiziert. Eine der wichtigsten Modifikationen ist die Bildung von Estern mittels Acyltransferasen. Durch Verwendung modernster Analysemethoden wurden Gene, Enzyme und Produkte der speziellen BAHD-Acyltransferase-Familie charakterisiert. Das sequenzierte Genom der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* stellt eine Reihe von BAHD-Acyltransferasen zur Verfügung.

Summary

Plants make a diverse array of chemicals in order to mediate the many interactions they have with their environment. To increase the diversity of these compounds, core structures are modified by certain families of enzymes. One of the most important modifications is the formation of esters, catalyzed by acyltransferases. We have used modern techniques to characterize the genes, enzymes, and products of a family of plant acyltransferases known as the BAHD family. The sequenced genome of the model plant *Arabidopsis thaliana* presents the opportunity to study a number of BAHD members.

Einführung

Pflanzen haben viele Strategien entwickelt, um mit ihrer biotischen und abiotischen Umwelt zu interagieren. Diese Interaktionen werden durch chemische Substanzen vermittelt, die unter der Bezeichnung sekundäre oder spezielle Stoffwechselprodukte bekannt sind. Diese chemischen Verbindungen haben unterschiedlichste Funktionen, vom Anlocken der Bestäuber bis hin zur Abwehr von Fraßfeinden. Seit Menschengedenken wurden pflanzliche Sekundärmetabolite sowohl als Geschmacks- und Aromastoffe als auch für medizinische Zwecke verwendet. Immer mehr erweist sich eine wachsende Zahl von pflanzlichen Naturstoffen auch als hilfreich in der Behandlung von schweren Krankheiten wie zum Beispiel Krebs.

Trotz der großen Anzahl sekundärer Stoffwechselprodukte aus dem Pflanzenreich –mindestens 50.000 – gibt

es nur wenige Stoffwechselwege, die zur Synthese der Grundgerüste dieser Verbindungen führen. Viele Pflanzenbiochemiker beschäftigen sich nun mit der sowohl wichtigen wie auch faszinierenden Fragestellung: Wie kann solch eine enorme Vielfalt an Verbindungen entstehen, obwohl die grundlegenden Stoffwechselwege so begrenzt sind? In der Tat, den größten Beitrag zur Vervielfältigung und „Verzierung“ molekularer Grundgerüste aus dem Sekundärstoffwechsel leisten unzählige verschiedene Arten von Enzymen, die den Pflanzen zur Verfügung stehen. Diese Enzyme katalysieren biochemische Grundreaktionen wie Decarboxylierungen, Oxidationen/Reduktionen, Hydroxylierungen, Ringschlüsse (Zyklisierungen), Methylierungen und Acylierungen [1].

Die Modifizierung von sauerstoff- und stickstoffhaltigen Substraten mittels Acylierung, um Ester oder Amine zu produzieren, ist eine der häufigsten Modifikationen im pflanzlichen Sekundärmetabolismus. Die neuesten Erkenntnisse aus der Pflanzengenom-Sequenzierung und die immer größer werdende Anzahl an Enzymen, die in verschiedenen Pflanzenarten charakterisiert wurden, haben gezeigt: Die Enzyme, die Acylierungsreaktionen katalysieren, sind nicht nur zahlreich, sondern gehören oft auch umfangreichen Proteinfamilien an. Die aktivierten Acyl-Donoren, die in diesen Reaktionen benötigt werden, kommen aus verschiedenen Quellen wie zum Beispiel Acylzuckern, Acyl-Carrier-Proteinen oder Acyl-Coenzym A-Thioestern. Genauso wie die Enzyme, die diese Substrate umsetzen, so gehören auch diejenigen Enzyme, die die Acyl-Donoren herstellen, zu unterschiedlichen Proteinfamilien.

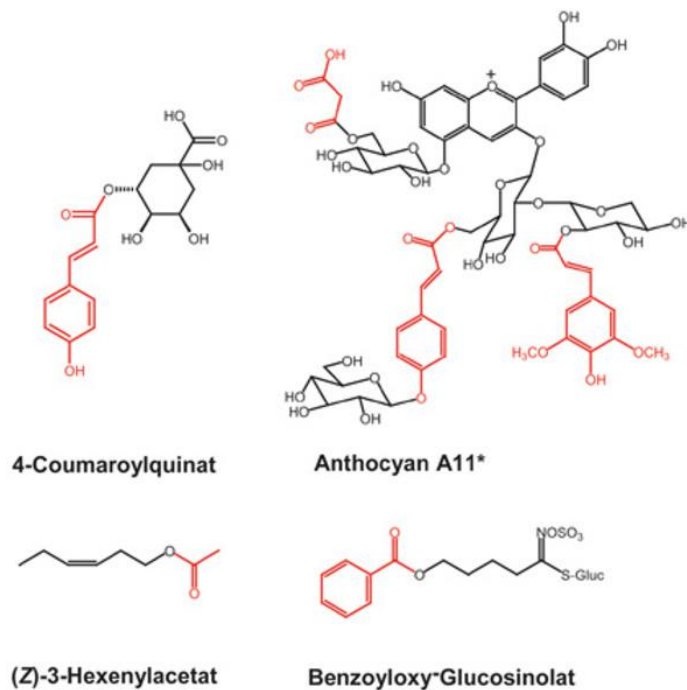
Die laufenden Sequenzierungs-Projekte haben, zusammen mit der vorliegenden biochemischen Evidenz, zur Entdeckung einer Familie von Acyltransferasen mit dem Namen BAHD geführt. (Der Name ist von den ersten vier Enzymen, die entdeckt worden waren, abgeleitet.) Diese BAHD-Acyltransferasen nutzen CoA-Thioester und katalysieren die Bildung spezieller pflanzlicher Metabolite. Mindestens 50 verschiedenen Acyltransferasen konnte, basierend auf genetischen und/oder biochemischen Experimenten, eine Funktion zugewiesen werden [2]. Viele weitere Acyltransferase-kodierende Sequenzen aus einer Vielzahl von Pflanzenarten existieren in öffentlichen Gen- und Genexpressions-Datenbanken. Die Herausforderungen, die es nun zu bewältigen gilt, sind die Charakterisierung dieser Enzyme, ihre Integration in ein umfassendes Verständnis der Vorgänge, die zum Anstieg ihrer Diversifizierung führten, und die Beantwortung der Frage, welche Rolle die von ihnen synthetisierten Pflanzensekundärstoffe spielen.

***Arabidopsis thaliana*: Ein Modellsystem zum Verständnis des Acyltransfers in Pflanzen**

Die Art *Arabidopsis thaliana* – vielen bekannt als Acker-Schmalwand – ist ein beliebtes Modellsystem für Untersuchungen verschiedener Aspekte der Pflanzenbiologie, von der Atmung bis zur Fortpflanzung. Bis vor kurzem schien es jedoch zweifelhaft, ob diese Pflanzenart (oder überhaupt andere Arten) als geeignetes Modell für Untersuchungen des pflanzlichen Sekundärmetabolismus dienen kann. Allerdings hat die vollständige Genomsequenzierung dieser kleinen, mit Senf und Raps verwandten Pflanze gezeigt, dass Enzymfamilien vorhanden sind, die spezielle Metabolite weiter umwandeln können [3]. Die Mehrzahl dieser potenziellen Gene und Enzyme ist noch nicht charakterisiert, wobei sich hingegen mit der Verbesserung der chemischen Analysemethoden die Anzahl der in ihrer Struktur aufgeklärten Sekundärmetabolite in den letzten Jahren mehr als verdreifacht hat.

Die Forschung der Wissenschaftler aus der Abteilung Biochemie am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie (Jonathan Gershenzon) fokussiert auf die biochemische Beschreibung von Acyltransferasen in *Arabidopsis*. Diese Enzyme sind möglicherweise verantwortlich für die Bildung vieler veresterter Naturstoffe, die kleine flüchtige Verbindungen, größere Pigmente und Abwehrstoffe gegen Pilzbefall (sogenannte Phytoalexine) umfassen. **Abbildung 1** zeigt Beispiele bekannter veresterter Metabolite, die in *Arabidopsis* identifiziert wurden.

In den folgenden Abschnitten werden wir einige der Methoden und Ergebnisse vorstellen, die bei der Identifizierung derjenigen Gene und Enzyme geholfen haben, welche verantwortlich für die Bildung dieser Verbindungen sind.

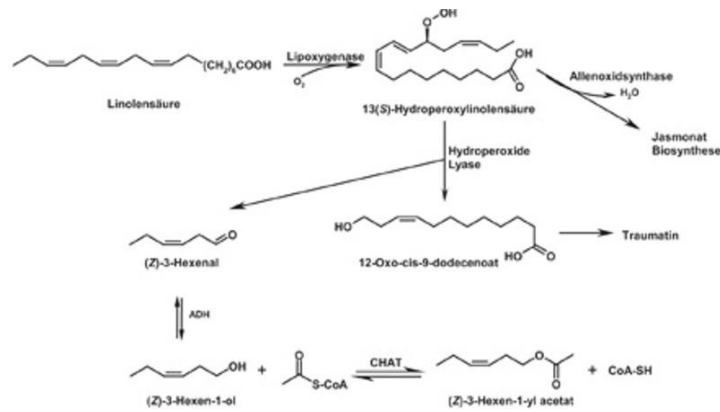


Beispiele veresteter Sekundärmetabolite, die in *Arabidopsis thaliana* gefunden wurden. Die Strukturen, die rot hervorgehoben sind, zeigen die Acyl-Reste, die ihren jeweiligen Coenzym A-Thioestern entsprechen. * Cyanidin 3-O-[2-O(2-O(sinapoyl)-beta-D-xylopyranosyl)-6-O-(4-O-(beta-D-glucopyranosyl)-p-coumaroyl-beta-D-glucopyranosid) 5-O-[6-O-(malonyl) beta-D-glucopyranosid]

© Max-Planck-Institut für chemische Ökologie/D'Auria

Wie die Bildung von grünen Blattduftstoffen gesteuert wird

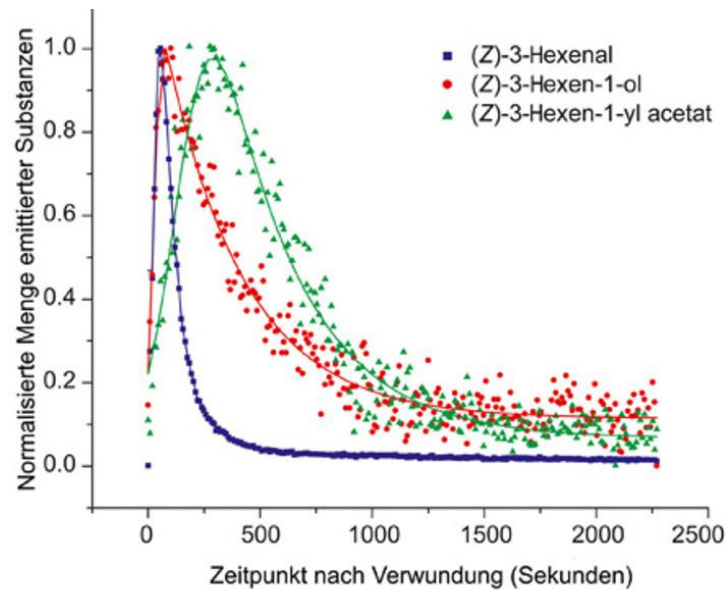
Grüne Blattduftstoffe – *Green Leaf Volatile* (GLVs) – bezeichnen eine Klasse von Verbindungen, die überall im Pflanzenreich gefunden werden. Die am häufigsten dokumentierten GLVs werden von Linolen- und Linolsäure abgeleitet [4]. Ihre Biosynthese umfasst im ersten Schritt die Bildung eines Hydroperoxids, katalysiert durch das Enzym Lipoxygenase, gefolgt von einer Spaltung an C₁₂, die durch eine Hydroperoxid-Lyase vermittelt wird. Die Produkte dieser Spaltung sind eine nichtflüchtige C₁₂-Säure sowie ein flüchtiger C₆-Aldehyd (**Abb. 2**). Die Abgabe von grünen Blattduftstoffen erfolgt in der Regel durch vegetatives Pflanzengewebe, das von Herbivoren angefressen oder auf eine andere Art verletzt wurde (Rasenmäher!). Allerdings wurden diese Verbindungen auch als flüchtige Bestandteile von Blüten und Früchten vieler verschiedener Pflanzenarten identifiziert. Die ökologische Bedeutung der grünen Pflanzenduftstoffe ist vielfältig. So wird inzwischen weitläufig angenommen, dass diese Verbindungen als luftübertragbare Signale dienen, welche die Feinde der Herbivoren anlocken sollen – und so die Pflanze vor Fraß schützen können [5]. Darüber hinaus zeigen GLVs eine antibakterielle und antifungale Wirkung.



Die Bildung von „Grünen Blattduftstoff-Estern“ (GLVs) startet am Lipoxygenase-Signalweg. Der nach Spaltung der 13(S)-Hydroperoxylinolensäure entstehende Aldehyd (Z)-3-Hexenal wird durch Alkoholdehydrogenase (ADH) reduziert. Der dabei gebildete Alkohol wird verestert, und in *Arabidopsis thaliana* entsteht so ein wesentlicher Duftstoff dieser Pflanze, das (Z)-3-Hexen-1-yl-Acetat, der von einer BAHD-Acyltransferase (CHAT) synthetisiert wird.

© Max-Planck-Institut für chemische Ökologie/D'Auria

Durch eine spezielle Methode, *biochemical genomics*, wurde das Enzym identifiziert, das verantwortlich für die Entstehung des (Z)-3-Hexen-1-yl-Acetats ist [6]. Es wurde (Z)-3-Hexen-1-ol-Acetyltransferase (CHAT) genannt und ist mit anderen flüchtige Ester bildenden Acyltransferasen aus der BAHD-Familie verwandt. Eine vollständige biochemische Charakterisierung des Proteins zeigte, dass CHAT – wie viele andere BAHD-Acyltransferasen – verschiedene kurzkettige Alkohole als Substrate verwenden konnte [7]. Die Menge an CHAT-Enzym stieg infolge mechanischer Verwundung an (Anschneiden der Blätter mit einer Rasierklinge), und es kam zu einer verstärkten Produktion des Esters, wenn die Pflanzen ein zweites Mal verwundet wurden. Darüber hinaus wurde das CHAT-kodierende Gen mit den Genen, die die Enzyme des Lipoxygenase-Signalwegs kodieren, koreguliert (vgl. **Abb. 2**). Somit ist die Pflanze, wenn sie verwundet wird, in der Lage, ausreichend (Z)-3-Hexen-1-yl-Acetat zu produzieren, indem sie nicht nur die Menge des CHAT-Enzyms, sondern auch der im Biosyntheseweg stromaufwärts liegenden Enzyme vergrößert. Um die Bildung und Emission von GLVs nach mechanischer Verwundung vollständig zu verstehen, wurde zusätzlich eine neue Echtzeit-Methode zur Analyse von flüchtigen Verbindungen verwendet, die so genannte Proton-Transfer-Reaktions-Massenspektrometrie (PTRMS). Die Messungen zeigten und bestätigten, dass dem CHAT-Enzym nach mechanischer Verwundung ausreichend (Z)-3-Hexen-1-ol zur Verfügung gestellt wird und es innerhalb von 500 Sekunden nach der ersten Verwundung die größte Menge an (Z)-3-Hexen-1-yl-Acetat produziert (**Abb. 3**). Die Bildung des Aldehyds (Z)-3-Hexenal) und des Alkohol-Substrats (Z)-3-Hexen-1-ol) gehen der Esterbildung voraus, wie es entsprechend der Abfolge des Stoffwechselweges zu erwarten war.



Proton-Transfer-Reaktions-Massenspektrometrie (PTRMS)-Analyse der GLV-Emission in Folge mechanischer Verwundung intakter *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen. Die Bildung der drei Duftstoffe (Z)-3-Hexenal, (Z)-3-Hexen-1-ol und (Z)-3-Hexen-1-yl-Acetat, die in *A. thaliana* gefunden wurden, ist in Form von normalisierten Spitzenwerten in blau, rot und grün dargestellt. © Max-Planck-Institut für chemische Ökologie/D'Auria

Arabidopsis-Anthocyane werden durch Veresterung modifiziert

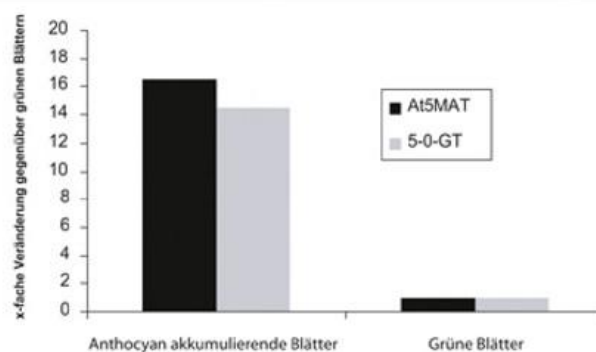
Pflanzen bilden auch ein breites Spektrum von chemischen Verbindungen, die als Pigmente dienen. Diese Pigmente sorgen für Färbungen, die von hellrosa bis dunkelblau und lila reichen, und sind für Pflanzen in vielerlei Hinsicht von Nutzen. Besonders wichtig ist ihre Schutzfunktion, denn sie sorgen dafür, dass wichtige Gewebe vor schädlichen UV-Strahlen geschützt werden. Allerdings haben Pigmente auch eine Signalfunktion für Bestäuber, die durch die Blütenfarben angelockt werden – unerlässlich für die Pflanzen im Hinblick auf eine erfolgreiche Befruchtung und Fortpflanzung. Eine der wichtigsten Klassen von pflanzlichen Pigmentverbindungen sind die Anthocyane.

Anthocyane sind eine große Klasse von glycosylierten Flavonoiden, die verantwortlich für nahezu alle Lila-, Blau- und Rosafärbungen angiospermer Blätter und Blüten sind, zusätzlich bewirken sie auch viele Rot- und Orangefärbungen. In der Literatur wird von mehr als 500 verschiedenen, in der Natur vorkommenden Anthocyanen berichtet [8]. Die Mehrzahl der Diversifikationen in den Anthocyan-Strukturen ist zurückzuführen auf die Kopplung von zusätzlichen Zuckermolekülen an die Grundstruktur, die aus drei Ringen besteht, sowie auf die Acylierung der Zucker durch kurzkettige aliphatische Säuren oder Hydroxycinnaminsäuren, die aus der Aminosäure Phenylalanin hervorgehen.

In unseren anfänglichen Versuchen, die BAHD-Mitglieder in *A. thaliana* zu charakterisieren, führten wir eine chemische Analyse von Blättern durch, die dem Stressfaktor Trockenheit ausgesetzt waren. Wir konnten bestimmen und bestätigen, dass das Haupt-Anthocyan-Pigment, das gebildet wurde und durch das sich die Blätter dunkelrot verfärbten, ein Cyan-Derivat ist, das durch Acylgruppen an drei Stellen modifiziert wurde (Anthocyan A11, siehe **Abb. 1**).

Im Anschluss an diese Beobachtung wurden diejenigen BAHD-Gene genauer untersucht, die aktiviert worden waren, als sich die Blätter von grün zu dunkelrot verfärbten. Identifiziert wurde ein BAHD-Gen, dessen

Transkriptmenge sich während dieser Verfärbung um mehr als das 20fache vergrößerte. Interessanterweise war ein weiteres Gen, das ein Enzym kodiert, welches ein Zuckermolekül an die Grundstruktur bindet (5-O-GT), mit der Transkript-aktivierten BAHD-Acyltransferase eng koreguliert (**Abb. 4**). Die biochemische Charakterisierung des BAHD-Enzyms zeigte, dass es sich um eine Anthocyan-5-O-glucosid-6''-O-Malonyltransferase (At5MAT) handelt [9].



Pflanzen der Art *Arabidopsis thaliana*, die Trockenheit ausgesetzt sind, verfärben ihre Blätter aufgrund der Produktion von Anthocyan-Pigmenten von grün nach dunkelrot. Die obere Abbildung zeigt den deutlichen Farbunterschied, der sich durch Trockenstress entwickelt. Diejenigen Gene, die die spezielle BAHD-Acyltransferase At5MAT und eine Glucosyltransferase (5-O-GT) kodieren, werden im Verlauf der Verfärbung koordiniert hochreguliert (Anstieg der Transkriptmengen), wie man der Graphik unten entnehmen kann.

© Max-Planck-Institut für chemische Ökologie/D'Auria

Die katalytischen Eigenschaften eines Enzyms sind vom aktiven Zentrum im Protein abhängig, das von den dort vorhandenen Aminosäureresten bestimmt wird. Untersuchungen des At5MAT-Proteins zeigten, dass nicht nur seine Nutzung des Malonyl-CoA als Substrat sehr spezifisch ist, sondern auch, dass diese Malonyl-Gruppe nur an das 5'-Zuckermolekül bindet, das im Anthocyanmolekül vorhanden ist. Um zu verstehen, was diese hohe Selektivität bewirkt, wurde das At5MAT-Protein in großen Mengen hergestellt, gereinigt und Bedingungen unterworfen, unter denen es eine kristalline Matrix bilden kann. In Zusammenarbeit mit Mitarbeitern aus dem Labor von Joseph P. Noel am Salk Institute in San Diego, Kalifornien, wurden die At5MAT-Kristalle Röntgenstrahlen ausgesetzt, um die dreidimensionale Struktur des Proteins aufzuklären. Inzwischen liegt ein dreidimensionales Modell der Acyltransferase vor mit am aktiven Zentrum gebundenem Malonyl CoA (**Abb. 5**). Dieses Modell ermöglicht die Vorhersage, welche Aminosäurereste für die Katalyse und die Besonderheit der

Acyl-Modifizierung bedeutsam sind. Die nun folgende Erzeugung von Mutanten, die substituierte Aminosäuren enthalten, wird helfen zu verstehen, wie die At5MAT-Acyltransferase ihre besondere katalytische Selektivität erlangt. Das detaillierte Verstehen des Katalyseprozesses dieses Enzyms soll weiterhin ermöglichen, mithilfe daraus abgeleiteter Modelle potenzielle Substrate ähnlicher BAHD-Acyltransferase-Mitglieder vorherzusagen.



Modell der dreidimensionalen Struktur des BAHD-Mitglieds At5MAT, das für die Malonyl-Modifizierung von Anthocyan in *Arabidopsis thaliana* verantwortlich ist. Das rote Molekül stellt das ko-kristallisierte Malonyl CoA-Substrat dar, dessen aliphatischer Abschnitt in das aktive Zentrum des Enzyms eingebettet ist. β -Faltblatt- und α -Helix-Strukturen sind blau beziehungsweise gelb, weitere Aminosäureketten in grün dargestellt.

©

Ausblick

Unser Verständnis darüber, wie Ester-Bildung zur Diversifizierung des sekundären Pflanzenstoffwechsels beiträgt, hat sich in den vergangenen Jahren bedeutend vergrößert. Mit neuen Techniken aus der Modellsystembiologie und -biochemie ist es inzwischen möglich geworden, die Funktionen einzelner Mitglieder der BAHD-Acyltransferase-Familie aufzuklären. Sobald die Besonderheiten ihrer Katalysfunktionen verstanden sind und erkannt wurde, welche Aminosäuren für die Synthese der speziellen sekundären Pflanzenmetabolite verantwortlich sind, kann begonnen werden zu untersuchen, wie diese Enzyme evolviert sind, um immer wieder neue Substrate zu binden, und wie dieser Prozess letztendlich die Diversität der sekundären Pflanzenmetabolite immer mehr vergrößert hat.

Weiterhin haben die Wissenschaftler Methoden auf der Basis transgener Pflanzen entwickelt, die ausgewählte acylierte Verbindungen nicht mehr produzieren können. Mit deren Hilfe können die biologischen Funktionen, die die Substanzen während der Interaktion der Pflanze mit ihrer Umwelt übernehmen, studiert und manifestiert werden.

Originalveröffentlichungen



[Nach](#) [Erweiterungen](#) [suchen](#)[Bilder](#)[erweiterung](#)[Channel](#)[ticker](#)[Datei](#)[liste](#)[HTML-](#)

[Erweiterung](#)[Jobticker](#)[Kalendererweiterung](#)[Linkerweiterung](#)[MPG.PuRe-ReferenzMitarbeiter](#) (Employee Editor)[Personenerweiterung](#)[Publikationserweiterung](#)[Teaser](#) mit [Bild](#)[Textblockerweiterung](#)[Veranstaltungstickererweiterung](#)[Videoerweiterung](#)[Videolistenerweiterung](#)[YouTube-Erweiterung](#)

[1] **E. Pichersky, D. R. Gang:**

Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: An evolutionary perspective.

Trends in Plant Science 5, 439-445 (2000).

[2] **J. C. D'Auria:**

Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD.

Current Opinion in Plant Biology 9, 331-340 (2006).

[3] **J. C. D'Auria, J. Gershenzon:**

The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed.

Current Opinion in Plant Biology 8, 308-316 (2005).

[4] **K. Matsui:**

Green leaf volatiles: Hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism.

Current Opinion in Plant Biology 9, 274-280 (2006).

[5] **G. Arimura, C. Kost, W. Boland:**

Herbivore-induced, indirect plant defences.

Biochimica et Biophysica Acta 1734, 91-111 (2005).

[6] **J. C. D'Auria, F. Chen, E. Pichersky:**

Characterization of an acyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri*.

Plant Physiology 130, 466-476 (2002).

[7] **J. C. D'Auria, E. Pichersky, A. Schaub, A. Hansel, J. Gershenzon:**

Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (Z)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana*.

The Plant Journal 49, 194-207 (2007).

[8] **O. M. Andersen, M. Jordheim:**

The anthocyanins.

Flavonoids, 471-551 (2006).

[9] **J. C. D'Auria, M. Reichelt, K. Luck, A. Svatos, J. Gershenzon:**

Identification and characterization of the BAHD acyltransferase malonyl CoA: Anthocyanidin 5-O-glucoside-6''-O-malonyltransferase (At5MAT) in *Arabidopsis thaliana*.

FEBS Letters 581, 872-878 (2007).