

Biosynthese

Quassinoide – wie invasive Pflanzen Abwehrstoffe bilden

JAKOB FRANKE
INSTITUT FÜR BOTANIK, UNIVERSITÄT HANNOVER

The tree of heaven (*Ailanthus altissima*) is a widespread invasive plant. It secretes specialized metabolites, so called quassinoids, into the soil to inhibit competing plants. Quassinoids therefore bear biotechnological potential for plant protection as well as medicinal applications. Here, I describe how reconstitution of biochemical pathways in the model plant *Nicotiana benthamiana* enables the discovery of genes for quassinoid biosynthesis as a prerequisite for biotechnological applications.

DOI: 10.1007/s12268-023-1977-9
© Der Autor 2023

■ Obwohl der Götterbaum (*Ailanthus altissima*) vielen Menschen nicht bekannt ist, lässt er sich mit geschultem Auge fast überall in Zivilisationsnähe entdecken. Nicht umsonst wird der Götterbaum seit 2019 von der Europäischen Union auf der Liste der gebietsfremden invasiven Arten geführt. Dadurch sind die Mitgliedsstaaten gefordert,

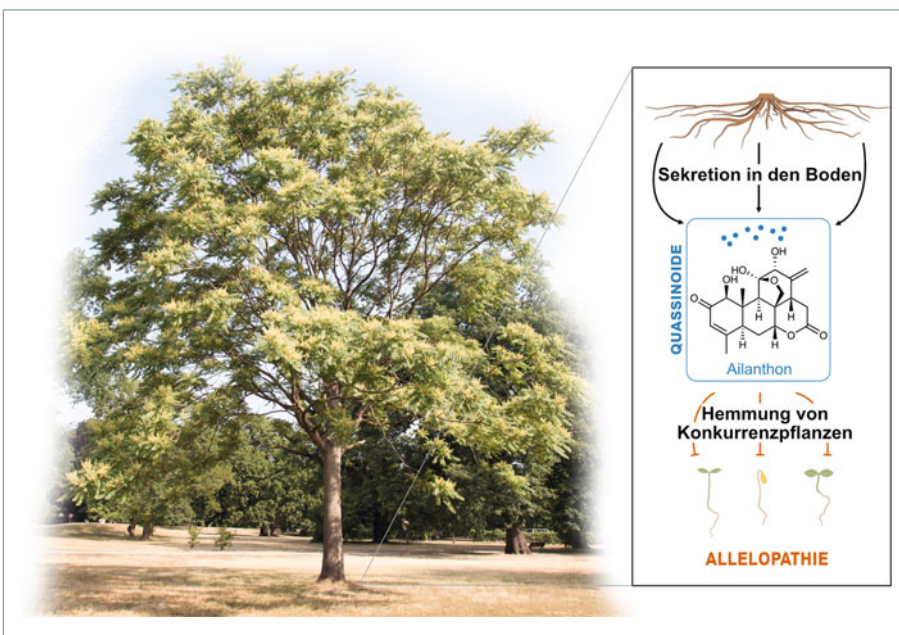
die weitere Ausbreitung zu bekämpfen. Ein wichtiger Faktor für den ökologischen Erfolg des Götterbaums sind spezielle Metabolite, die Quassinoide, die vom Götterbaum gebildet und zur Inhibierung anderer Pflanzen in den Boden abgegeben werden (Abb. 1). Dabei vermögen Quassinoide sowohl die Keimung fremder Samen zu verhindern als auch das

weitere Wachstum von Konkurrenzpflanzen einzuschränken – ein Phänomen namens Allelopathie [1].

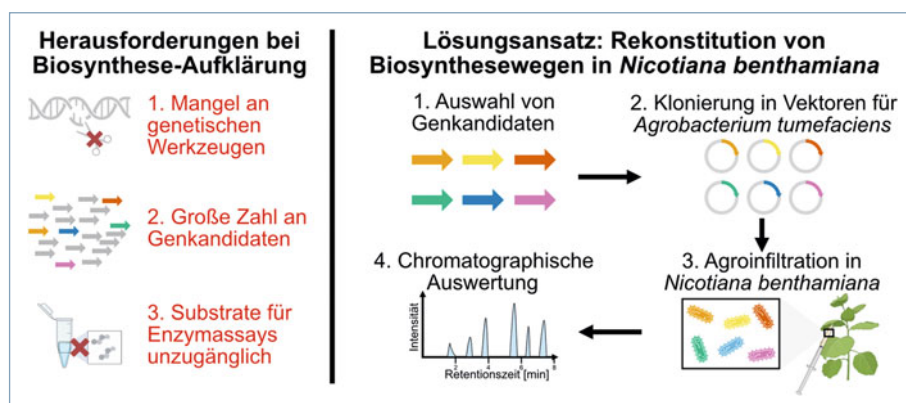
Quassinoide: pflanzliche Abwehrstoffe mit biotechnologischem Potenzial

Quassinoide sind also in der Lage, das Wachstum von konkurrierenden Pflanzen zu hemmen, ohne dass der Götterbaum selbst davon betroffen ist – und sind damit für den Pflanzenschutz von großem Interesse. Insgesamt sind in der Natur über 200 Quassinoide bekannt, wovon einige zudem pharmakologisch relevante Eigenschaften besitzen [2]. Ein besonders bekanntes Beispiel ist Bruceantin, das in den 1980er-Jahren in klinischen Studien der Phase II zur Behandlung von Brustkrebs getestet wurde. Aktuelle Studien unterstreichen das medizinische Potenzial dieser pflanzlichen Wirkstoffklasse [3].

Wie lassen sich die potenten biologischen Eigenschaften der Quassinoide nun biotechnologisch nutzen? Eine zentrale Herausforderung ist, dass Quassinoide strukturell sehr komplex sind, weshalb ein chemisch-synthetischer Zugang nicht praktikabel ist. Einfacher wäre es, Quassinoide aus natürlichen Quellen zu isolieren. Während der Götterbaum in Deutschland weit verbreitet ist und dadurch der Zugang zu Biomasse zur Isolierung von Quassinoiden im industriellen Maßstab grundlegend denkbar wäre, ist das bei vielen anderen Quassinoid-produzierenden Pflanzen nicht der Fall. Das zuvor erwähnte Bruceantin etwa stammt aus *Brucea antidysenterica*, einem Baum, der nur im tropischen Afrika zu finden ist. Problematisch ist zudem, dass in Pflanzen komplexe Quassinoid-Cocktails gebildet werden, die sich nur schwer auftrennen lassen. Doch gerade hier liegt eine große Chance für die Biotechnologie. Mit unseren Forschungsarbeiten möchten wir aufklären, wie Quassinoide in Pflanzen gebildet werden. Kennt man die zugrunde liegenden Stoffwechselwege, die Biosynthese, kann man beispielsweise gezielt die Produktion dieser Verbindungen verbessern sowie die Zusammensetzung des Quassinoid-Cocktails maßgeschneidert einstellen. Denk-



▲ **Abb. 1:** Der invasive Götterbaum (*Ailanthus altissima*) produziert als Abwehrstoffe Quassinoide, z. B. Ailanthon, die Konkurrenzpflanzen hemmen und dadurch für den Pflanzenschutz interessant sind. Teile der Abbildung wurden mit BioRender.com erstellt.



▲ Abb. 2: Zentrale Herausforderungen bei der Aufklärung von pflanzlichen Biosynthesewegen und deren Umgehung durch die Rekonstitution von Stoffwechselwegen in *Nicotiana benthamiana*. Bei der Agroinfiltration werden Stämme von *Agrobacterium tumefaciens*, die unterschiedliche Genkandidaten enthalten, gemischt und in Blätter von *N. benthamiana* infiltriert zur transienten Ko-Expression. Teile der Abbildung wurden erstellt mit BioRender.com.

denden Vorteile sind dabei: 1) Anders als bei stabilen genetischen Transformationen werden bei der transienten Expression nur erwachsene Tabakpflanzen eingesetzt. Das zeitaufwändige Abwarten eines kompletten pflanzlichen Lebenszyklus entfällt damit. 2) Besonders einfach ist die Ko-Expression mehrerer Gene in diesem System. Bei klassischen Expressionssystemen müsste man aufwändige Multigenkonstrukte erzeugen oder mehrere Selektionsmarker verwenden. Bei *N. benthamiana* lässt sich Ko-Expression dagegen durch simples Mischen der *Agrobacterium*-Kulturen vor der Infiltration erreichen. So lassen sich 10–15 Gene mit minimalem Aufwand ko-exprimieren. 3) Diese effiziente Ko-Expression erlaubt es, Stoffwechselwege Schritt für Schritt zu rekonstituieren. Die mühsame Gewinnung von Substraten für Enzymassays entfällt damit, weil Stoffwechselzwischenstufen direkt in den Pflanzen gebildet werden.

Ungewöhnliche Umlagerungen des Kohlenstoffgrundgerüsts im Quassinoid-Stoffwechsel

Mithilfe von Transkriptomdaten haben wir aus Tausenden pflanzlicher Gene einen Satz von etwa 80 Genkandidaten ausgewählt. Durch Ko-Expression in *N. benthamiana* gelang uns damit die Aufklärung der ersten fünf Schritte der Quassinoid-Biosynthese (**Abb. 3**, [5, 6]). Bei der Naturstoffklasse der Triterpenoide, zu denen die Quassinoiden gehören, wird zu Beginn eines Stoffwechselwegs aus dem allgemeinen Vorläufer Oxidosqualen mithilfe einer Oxidosqualenzylase ein komplexes Ringsystem gebildet. Ein derartiges Enzym konnten wir auch in der Quassinoid-Biosynthese finden; dort erzeugt sie das Grundgerüst Tirucalla-7,24-dien-3 β -ol. Erstaunlicherweise konnten wir danach allerdings Enzyme finden, die dieses Kohlenstoffskelett wieder verändern. Eine derartige nachträgliche Modifikation des Kohlenstoffgrundgerüsts von Triterpenoiden war zuvor unbekannt. Dieser ungewöhnliche enzymatische Schritt wird von einer Sterolisomerase katalysiert. Diese Enzyme kennt man aus dem Primärstoffwechsel – auch bei der Cholesterin-Biosynthese im Menschen kommt eine derartige Isomerase vor, das Emopamilbindende Protein, – nicht aber aus dem Sekundärstoffwechsel. Hier hat also durch Genduplikation und Neofunktionalisierung ein Enzym aus dem Primärstoffwechsel eine neue Funktion im Sekundärstoffwechsel entwickelt. Langfristig lässt sich das biochemi-

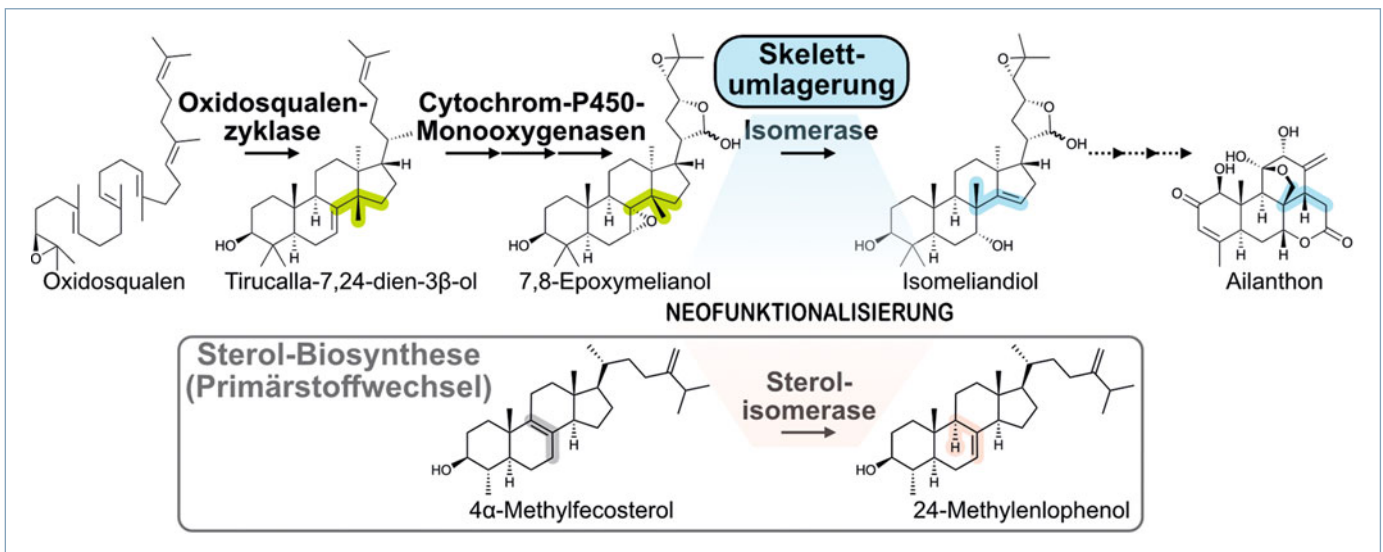
bar wäre es in ferner Zukunft vielleicht sogar, die Produktion von allelopathischen Quassinoiden auf Nutzpflanzen zu übertragen und dadurch Pflanzenschutzmittel zu ersetzen. Die Grundvoraussetzung für alle solchen Anwendungen ist jedoch ein detailliertes Verständnis der Quassinoid-Biosynthese.

Die Aufklärung pflanzlicher Biosynthesewege

In unserer Forschungsgruppe identifizieren wir daher die Gene, die für die Bildung der Quassinoiden erforderlich sind, und untersuchen biochemisch, welche enzymatische Funktion die zugehörigen Proteine besitzen. Dabei stellen sich drei große Probleme (**Abb. 2**): Erstens ist der Götterbaum trotz seiner großen Verbreitung als invasive Art kein gängiger Modellorganismus, weshalb viele molekulare Werkzeuge nicht zur Verfügung stehen. Eine zweite große Herausforderung ist es, überhaupt vielversprechende Genkandidaten zu identifizieren. Anders als in Mikroorganismen sind Stoffwechselgene im pflanzlichen Genom nur selten direkt aufeinanderfolgend – also in Form von Genclustern – angeordnet. In Pflanzen gleicht die Entdeckung von Biosynthesegenen daher der Suche nach der Nadel im Heuhaufen. Um eine experimentell handhabbare Zahl an Genkandidaten zu erhalten, nutzen wir und viele andere Gruppen vor allem Genexpressionsdaten. Dahinter liegt die Grundannahme, dass spezialisierte Metabolite oft nur in bestimmten Pflanzenteilen gebildet werden – man denke nur an den alkaloidhaltigen Milchsaft der Mohngewächse. Im Fall des Götterbaums finden die ersten Biosynthese-

schritte nahezu ausschließlich in den Wurzeln statt. Dadurch können wir uns auf Genkandidaten beschränken, die nur in Wurzeln exprimiert sind. Mithilfe solcher Strategien können wir typischerweise etwa 20 bis 100 Genkandidaten für eine tiefere experimentelle Untersuchung auswählen. Dies führt allerdings unmittelbar zum dritten zentralen Problem der pflanzlichen Biosyntheseforschung, der Untersuchung der biochemischen Aktivität. Klassisch produziert man dazu die zu untersuchenden Enzyme heterolog und prüft *in vitro*, ob das Enzym Stoffwechselzwischenstufen in die darauffolgende Stufe umwandeln kann. Die Verfügbarkeit von Substraten für solche Assays ist allerdings ein enormes Problem. In sehr vielen Fällen sind Stoffwechselintermediate kaum zugänglich – sie lassen sich meistens nicht in ausreichenden Mengen aus Pflanzen isolieren und sind strukturell oftmals zu komplex, um sie synthetisch herzustellen.

Diese drei Probleme – der begrenzte genetische Zugang, die große Zahl an Genkandidaten sowie der Mangel an Substraten für biochemische Untersuchungen – erfordern spezielle experimentelle Strategien zur Aufklärung pflanzlicher Biosynthesewege. Glücklicherweise lassen sich diese mit einer mächtigen Methode umgehen – der transienten Expression in der Modellpflanze *Nicotiana benthamiana* (**Abb. 2**). Diese australische Tabakart hat sich als besonders geeignet zur Expression von Fremdgenen erwiesen [4]. Dabei werden Fremdgene über das Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* in pflanzliche Zellen eingeschleust, indem Bakteriensuspensionen direkt in die Blätter infiltriert werden (Agroinfiltration). Die entschei-



▲ **Abb. 3:** Die ersten fünf Schritte der Quassinoid-Biosynthese beinhalten eine ungewöhnliche Umlagerung des Kohlenstoffskeletts durch eine Isomerase, die durch Neofunktionalisierung aus der Sterol-Biosynthese im Primärstoffwechsel hervorgegangen ist. Die neu entdeckten Enzyme bieten Potenzial für biotechnologische Anwendungen.

sche Prinzip dieser Enzyme vielleicht dazu nutzen, Triterpenoide maßgeschneidert enzymatisch zu modifizieren, um deren pharmakologische Eigenschaften zu verändern.

Fazit: erste Schritte zu biotechnologischen Anwendungen

Quassinoide bieten biotechnologisches Potenzial etwa im Bereich Pflanzenschutz oder Krebstherapie, aber erst ein vollständiges Verständnis der Biosynthese erlaubt dessen Nutzung. Mithilfe von *Nicotiana benthamiana* als Modellsystem konnten wir in den letzten Jahren die ersten fünf Schritte des Quassinoid-Stoffwechsels aufklären. Bemerkenswert dabei war vor allem die Entdeckung von Isomerasen, die das ursprüngliche Kohlenstoffgrundgerüst nachträglich modifizieren. Damit ist ein wichtiger Schritt zur biotechnologischen Nutzung der Quassinoide geschafft.

Danksagung

Ich danke Ling Chuang, Shenyu Liu und Kseniia Zaikova für die Arbeiten an diesem

Projekt sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die großzügige Förderung im Rahmen des Emmy-Noether-Programms (FR 3720/3-1).

Literatur

- [1] Heisey RM (1996) Identification of an Allelopathic Compound from *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae) and Characterization of its Herbicidal Activity. *Am J Bot* 83: 192–200
- [2] Curcino Vieira JJ, Braz-Filho R (2006) Quassinoids: Structural Diversity, Biological Activity and Synthetic Studies. In: Atta-ur-Rahman (Hrsg.) *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, 433–492
- [3] Pazur EJ, Wipf P (2022) Recent syntheses and biological profiling of quassinoids. *Org Biomol Chem* 20: 3870–3889
- [4] Bally J, Jung H, Mortimer C et al. (2018) The Rise and Rise of *Nicotiana benthamiana*: A Plant for All Reasons. *Annu Rev Phytopathol* 56: 405–426
- [5] Chuang L, Liu S, Biedermann D, Franke J (2022) Identification of early quassinoid biosynthesis in the invasive tree of heaven (*Ailanthus altissima*) confirms evolutionary origin from protolimonoids. *Front Plant Sci* 13: 958138
- [6] Chuang L, Liu S, Franke J (2023) Post-Cyclization Skeletal Rearrangements in Plant Triterpenoid Biosynthesis by a Pair of Branchpoint Isomerases. *J Am Chem Soc* 145: 5083–5091

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende

nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Jakob Franke
 Leibniz Universität Hannover
 Institut für Botanik
 Herrenhäuser Straße 2
 D-30419 Hannover
 jakob.franke@botanik.uni-hannover.de