



Nicola Schneegans (Autor)

Mutationsanalysen und funktionelle Untersuchungen zur Rolle spezifizierender Proteine bei der Bildung von Allylthiocyanat, 3,4-Epithiobutannitril und But-3-ennitril nach Myrosinase-katalysierter Hydrolyse von Allylglucosinolat



Institut für Pharmazeutische Biologie
pharmazie in braunschweig



Mutationsanalysen und funktionelle Untersuchungen zur Rolle spezifizierender Proteine bei der Bildung von Allylthiocyanat, 3,4-Epithiobutannitril und But-3-ennitril nach Myrosinase-katalysierter Hydrolyse von Allylglucosinolat

Nicola Schneegans



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/8308>

Copyright:

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

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

1 Einleitung

1.1 Das Glucosinolat-Myrosinase-System der Brassicales

Protektive Wirkung gegen Insekten, Herbivoren und Pathogene bietet den Pflanzen der Ordnung Brassicales das Glucosinolat-Myrosinase-System. Im intakten Pflanzengewebe sind Enzym und Substrat in verschiedenen Kompartimenten lokalisiert. Bei Gewebeverletzung, beispielsweise ausgelöst durch einen Insektenangriff, wird die Kompartimentierung der Zellen aufgehoben. Die Myrosinasen hydrolysieren die Glucosinolate zu instabilen Glucosinolat-Aglyka, welche sich spontan zu den Isothiocyanaten, den sogenannten Senfölen, umlagern (Abb. 1) (Ettlinger et al. 1961). Senföle wirken toxisch auf viele Insekten, Bakterien, Pilze und Nematoden (Wittstock et al. 2003; Brader et al. 2006). Somit stellt das Glucosinolat-Myrosinase-System einen Verteidigungsmechanismus der Brassicales dar. Aufgrund der Toxizität und explosionsartigen Freisetzung der Senföle wurde diese Reaktion als „Senfölbombe“ bezeichnet (Matile 1980). Gesundheitsfördernde Wirkungen der Isothiocyanate, insbesondere antimikrobielle und chemoprotektive Effekte für den Menschen wurden beschrieben und teilweise in epidemiologischen Studien bestätigt (Halkier und Gershenzon 2006; Juge et al. 2007; Romeo et al. 2018). Statt der Isothiocyanate können unter bestimmten Bedingungen, insbesondere in Anwesenheit spezifizierender Proteine, weitere Hydrolyseprodukte entstehen (siehe Kap. 1.2). Über ihre Bioaktivität und ökologische Funktion ist nur wenig bekannt.

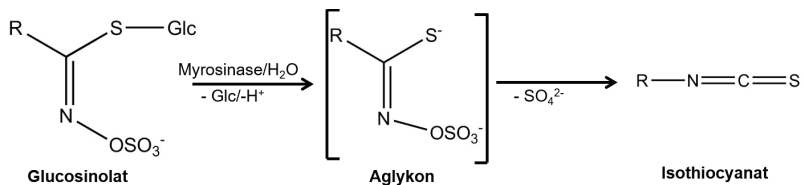


Abb. 1: Myrosinase-katalysierte Glucosinolathydrolyse

Dekompartimentierung des intakten Pflanzengewebes löst eine Reaktion des Zweikomponenten-Systems aus. Die Myrosinase hydrolysiert die thioglykosidische Bindung des Glucosinolats. Das instabile Glucosinolat-Aglykon (hier: Aglykon) wird durch eine spontane Losson-Umlagerung zum Isothiocyanat desulfatisiert. Glc: Glucose; R: variable aliphatische, benzyliche oder indolische Seitenkette

Bislang wurden mehr als 120 Glucosinolate identifiziert (Fahey et al. 2001). Die Struktur der anionischen 1-Thio-β-D-Glykoside gliedert sich in eine Z-konfigurierte sulfatierte Aldoximeinheit, eine Schwefel-verknüpfte β-D-Glucopyranose und eine variable

Seitenkette (Abb. 1) (Ettliger und Lundeen 1956; Fahey et al. 2001; Halkier und Gershenzon 2006; Mithen et al. 2010). Abhängig von der Seitenkette, die aus einer von acht proteinogenen Aminosäuren hervorgeht, werden sie als aliphatische, benzyliche und indolische Glucosinolate klassifiziert (Halkier und Gershenzon 2006). Die untoxischen Glucosinolate sind in Phloem-assoziierten schwefelreichen Zellen (S-Zellen) sowie in den Epidermiszellen aller vegetativen und generativen Organe gespeichert (Bones et al. 1991; Koroleva et al. 2000; Andreasson et al. 2001; Husebye et al. 2002; Halkier und Gershenzon 2006; Koroleva et al. 2010). S-Zellen besitzen dünne Zellwände und lange Vakuolen, aber keine Plastide (Koroleva et al. 2000; Andreasson et al. 2001; Husebye et al. 2002). Durch die Bestimmung der *in vitro* gebildeten Isothiocyanate aus extrahierten Vakuolen (Grob und Matile 1979) und die Quantifizierung radioaktiv markierter [¹⁴C]-Indolglucosinolate nach Zufüttern von [¹⁴C]-L-Tryptophan (Helmlinger et al. 1983) wurde nachgewiesen, dass Glucosinolate in den Vakuolen der Wurzelzellen von *Amoracia rusticana* gespeichert werden. Der immunhistochemische Nachweis mittels eines gegen Sinigrin gerichteten polyklonalen Antikörpers bestätigte die vakuoläre Lokalisation in den Embryos von *Brassica juncea* (Kelly et al. 1998). Auch in den S-Zellen der Blütenstiele von *Arabidopsis thaliana* werden Glucosinolate in der Vakuole gespeichert, wie durch Quantifizierung der Glucose nach Inkubation des Zellsaftes mit Myrosinase gezeigt wurde (Koroleva et al. 2000). Glucosinolate werden nicht in S-Zellen sondern im Leitgewebe synthetisiert (Nintemann et al. 2018). Über das Phloem soll der Transport zu den Speicherorten erfolgen, die Aufnahme in die S-Zellen soll mittels GTR1/2-Transportern stattfinden (Grubb und Abel 2006; Halkier und Gershenzon 2006; Nur-Eldin et al. 2012; Andersen und Halkier 2014). Die Glucosinolatprofile differieren abhängig von Organ und Entwicklungszustand der Pflanze sowie externen Faktoren wie Umgebungsbedingungen oder biotischem und abiotischem Stress (Brader et al. 2001; Petersen et al. 2002; Brown et al. 2003; Witzel et al. 2013). Zudem wird das Glucosinolatprofil durch Herbivoren und Infektionen mit Pathogenen beeinflusst (Burow et al. 2007a; Burow et al. 2007b; Wentzell und Kliebenstein 2008; Burow und Wittstock 2009; Witzel et al. 2015). Bei Aufhebung der Kompartimentierung werden die Glucosinolate von den Myrosinasen zu instabilen Glucosinolat-Aglyka hydrolysiert, diese werden durch eine spontane Losson-Umlagerung zu den Isothiocyanaten umgelagert (Abb. 1) (Ettliger et al. 1957).

Bei Myrosinasen handelt es sich um β -Thioglucosidasen (Thioglykosid-Glukohydrolasen (TGG)). Sie werden in Myrosinzellen gespeichert, die in allen Pflanzenorganen und -geweben vorkommen (Bones und Iversen 1985; Andréasson und Jørgensen 2003). Der Begriff Myrosinase leitete sich von den ersten Untersuchungen des Senföls ab, bei der eine Substanz als „Myrosyne“ (*myron* (griech.) = flüchtiges Öl; *syn* (griech.) = mit) bezeichnet wurde (Bussy 1840). Daraus resultierte auch die Namensgebung der proteinreichen Idioblasten als Myrosinzellen (Heinricher 1884; Guignard 1890). In diesen isodiametrischen

oder prosenchymatischen Zellen (Bones und Rossiter 1996) befinden sich sogenannte Myrosinkörner (Spatzier 1893). Cytochemische Untersuchungen lokalisierten die Myrosinasen 1913 erstmals in Myrosinzellen (Peche 1913). Spätere Promotor-Reporter-Analysen bestätigten dies (Husebye et al. 2002; Thangstad et al. 2004). Weitere Untersuchungen wie beispielsweise Immunogold-Markierung lokalisierten die Myrosinasen innerhalb der Myrosinkörner (Höglund et al. 1992; Bones et al. 1991; Thangstad et al. 1991; Andreasson et al. 2001; Carter et al. 2004; Ueda et al. 2006) und fanden einen Zusammenschluss von Myrosinkörnern zu Myrosinkörperchen (Andreasson et al. 2001). Folglich werden Myrosinasen in Myrosinzellen synthetisiert und gespeichert. Myrosinasen wurden auch in anderen Zellen gefunden, beispielsweise in Schließzellen der Spaltöffnungen und in S-Zellen (Iversen et al. 1979; Kelly et al. 1998; Husebye et al. 2002; Barth und Jander 2006; Zhao et al. 2008; Koroleva et al. 2010). Die Co-Lokalisation von Glucosinolaten und Myrosinasen in S-Zellen erfordert eine subzelluläre Kompartimentierung beider Reaktanden.

Die Kristallstruktur der Myrosinase aus *Sinapis alba* wurde 1997 aufgeklärt (Burmeister et al. 1997). Das Protein ist stark glykosyliert und tritt als Homodimer auf (Burmeister et al. 1997). Es besitzt eine $(\beta/\alpha)_8$ -Fass-Struktur (Burmeister et al. 1997). Der Cofaktor Zn^{2+} ist tetrahedral koordiniert und interagiert mit den Resten H56 und D70, die in Myrosinasen konserviert sind (Burmeister et al. 1997). Myrosinasen zählen zu den S-Glykosidasen. Im Gegensatz zu O-Glykosidasen, die zwei Glutamatreste im aktiven Zentrum aufweisen, besitzen klassische Myrosinasen wie die aus *S. alba* oder TGG1 aus *A. thaliana* im katalytischen Zentrum einen Glutamin-(Q187) und einen Glutamatrest (E409) (Burmeister et al. 1997). Die Aufklärung der Kristallstruktur der Myrosinase aus *S. alba* zeigte, dass E409 nukleophil am anomeren Kohlenstoffatom der Glucose angreift, sodass der Glucoserest auf E409 übergeht und das Glykosylenzym entsteht (Burmeister et al. 1997). Gln187 positioniert und aktiviert ein Wassermolekül, das dieses Glykosylenzym hydrolysiert (Burmeister et al. 1997; Burmeister et al. 2000). Ascorbinsäure steigert die Aktivität der Myrosinasen, da es das Wassermolekül aktiviert (Burmeister et al. 2000). Die atypischen Myrosinasen PEN2 und PYK10 besitzen wie O-Glykosidasen zwei Glutamatreste im aktiven Zentrum (Xu et al. 2004; Bednarek et al. 2009; Nakano et al. 2017). Ihre Hydrolyseaktivität ist auf bestimmte Glucosinolate beschränkt und sie akzeptieren auch O-Glycoside als Substrate (Bednarek et al. 2009). PEN2 wurde zudem als erste Myrosinase identifiziert, welche Glucosinolate in intakten Zellen hydrolysiert (Fuchs et al. 2016). Ihr wurde eine Funktion bei der präinvasiven Pathogenabwehr zugesprochen (Fuchs et al. 2016). Glucosinolatabbau im intakten Pflanzenzellgewebe ist auch in anderem Zusammenhang postuliert worden. So könnte der Abbau, sogenannter „turnover“, (Petersen et al. 2002; Brown et al. 2003) die Pflanze bei Nährstoffmangel mit Schwefel versorgen (Falk et al. 2007). Zurzeit werden interne Abbauwege von Glucosinolaten über

Myrosinasen, Nitril-spezifisierende Proteine (NSPs) und Nitrilasen zu einfachen Nitrilen postuliert (Janowitz et al. 2009; Meier et al. 2019).

Obwohl bei der Glucosinolyse toxische Isothiocyanate entstehen, spezialisierten sich einige Insekten auf diese Pflanzen und entwickelten Mechanismen, die die Bildung der Isothiocyanate verhindern. Der kleine Kohlweißling (*Pieris rapae*, Lepidoptera) besitzt beispielsweise ein Nitril-spezifisierendes Protein (NSP) im Darm, das die Glucosinolat-Aglyka zu weniger toxischen einfachen Nitrilen umlagert (Wittstock et al. 2004). Die Kohlschabe (*Plutella xylostella*, Lepidoptera) metabolisiert die Glucosinolate durch eigene Sulfatasen zu Desulfoglucosinolaten, die von Myrosinasen nicht hydrolysiert werden (Ratzka et al. 2002). Die mehlig Blattlaus (*Brevicoryne brassicae*, Hemiptera) besitzt eine eigene atypische Myrosinase und nimmt intakte Glucosinolate aus der Pflanze auf, sie aktiviert ihr Glucosinolat-Myrosinase-System zur Verteidigung gegen Parasiten (Kazana et al. 2007; Winder und Wittstock 2011)

Isothiocyanate sind leicht flüchtig und dienen den spezialisierten Insekten zur Identifikation ihrer Wirtspflanzen (Wittstock et al. 2003). Manche Glucosinolat-haltige Pflanzen bilden statt Isothiocyanaten einfache Nitrile, die für Generalisten weniger toxisch sind (Wittstock et al. 2004). Der Spezialist *P. rapae* legt weniger Eier auf Nitril-bildende Pflanzen als auf solche, die vornehmlich Isothiocyanat produzieren (Mumm et al. 2008; Vos et al. 2008). Also schützt die Bildung einfacher Nitrile statt der Isothiocyanate die Glucosinolat-haltigen Pflanzen vor ihren Spezialisten. Gleichzeitig können einfache Nitrile tritrophe Interaktionen vermitteln, da sie beispielsweise den Parasiten von *P. rapae*, *Cotesia rubecula* (Hymenoptera), anlocken (Mumm et al. 2008). Damit stellt die einfache Nitrilbildung einen indirekten Verteidigungsmechanismus gegen den Spezialisten *P. rapae* dar. Vermutlich haben Nitrile aber weitere Funktionen für die Pflanzen, denn sie werden auch in Wurzeln und Samen bei Gewebeverletzung gebildet.

1.2 Spezifizierende Proteine

1.2.1 Produkte spezifizierender Proteine

Spezifizierende Proteine erweitern das Produktprofil der Myrosinase-katalysierten Glucosinolathydrolyse, sodass alternative Hydrolyseprodukte wie Epithionitrile, organische Thiocyanate und einfache Nitrile auf Kosten der Isothiocyanate entstehen. Die Bildung der alternativen Produkte ist neben der Art des spezifizierenden Proteins von der Glucosinolatseitenkette abhängig. Die Epithionitrilbildung erfordert eine terminale Doppelbindung in der Glucosinolatseitenkette, wie sie beispielsweise Allylglucosinolat (Abb. 2) aufweist (Daxenbichler et al. 1968; Tookey 1973; Kirk und MacDonald 1974; Cole 1976; MacLeod und Rossiter 1985; Lambrix et al. 2001; Burow et al. 2006b; Matusheski et al. 2006; Burow et al. 2007b).

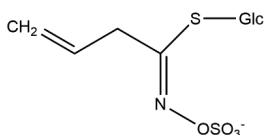


Abb. 2: Molekülstruktur von Allylglucosinolat

Allylglucosinolat zeigt den charakteristischen Aufbau eines Glucosinolats bestehend aus einer sulfatierten Aldoximeinheit, einer Schwefel-verknüpften Glucose (Glc), und einer Seitenkette. Diese weist bei Allylglucosinolat eine terminale Doppelbindung auf.

Folglich entsteht bei der Myrosinase-katalysierten Hydrolyse von Allylglucosinolat mit bestimmten spezifizierenden Proteinen 3,4-Epithiobutanitril (Abb. 3). Der Mechanismus der Epithionitrilbildung wurde mittels Isotopenlabelling untersucht (Brocker und Benn 1983). Während der Reaktion wird der thioglykosidische Schwefel vom Glucosinolat-Aglykon abstrahiert (Benn 1977; Brocker und Benn 1983; Wittstock und Burow 2007). Dieser Schwefel interagiert anschließend intramolekular mit der terminalen Doppelbindung der Seitenkette, sodass ein Thiiranring entsteht (Brocker und Benn 1983).

Zudem wurden Ähnlichkeiten zwischen dem Mechanismus der Thiiranringbildung und der Epoxidringbildung durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen postuliert (Foo et al. 2000). Demnach würde mittels Elektron-Transfer von einem Fe(II) ein Schwefelradikal gebildet werden, das über radikalische Addition mit der terminalen Doppelbindung der Seitenkette reagiert und zur Ausbildung des Thiiranrings führt (Foo et al. 2000). Untersuchungen am rekombinanten Epithionitril-spezifizierenden Protein (ESP) aus *Arabidopsis thaliana* (AtESP) stellten jedoch keinen Einfluss von Radikalfängern oder Sauerstoffausschluss auf die Epithionitrilbildung fest (Burow et al. 2006a).

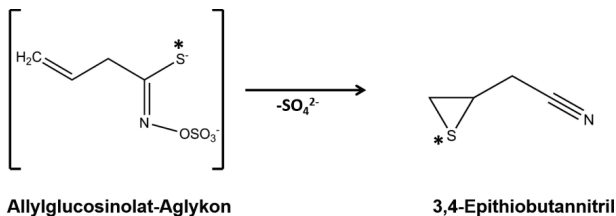


Abb. 3: Bildung von 3,4-Epithiobutannitril aus dem Allylglucosinolat-Aglykon

3,4-Epithiobutannitril entsteht bei der Myrosinase-katalysierten Hydrolyse von Allylglucosinolat in Anwesenheit bestimmter spezifizierender Proteine, *: Isotopenmarkierung (Brocker und Benn 1983)

Die Thiocyanatbildung ist in Brassicales selten und wurde nur mit Allyl-, Benzyl- und 4-Methylthiobutylglucosinolat nachgewiesen (Wittstock und Burow 2007). Voraussetzung soll die Entstehung eines stabilen Carbokations in der Seitenkette des Aglykons sein (Gmelin und Virtanen 1959; Walker und Gray 1970; Schlüter und Gmelin 1972; Lüthy und Benn 1977). Der Mechanismus der Thiocyanatbildung bei der Hydrolyse von Allylglucosinolat wurde mittels ^{14}C - und Deuterium-Label-Experimenten charakterisiert (Lüthy und Benn 1977; Rossiter et al. 2007). Dabei soll das Sulfidion der Thiolatgruppe nucleophil am C3-Atom der Seitenkette angreifen, sodass Allylthiocyanat gebildet wird (Abb. 4) (Lüthy und Benn 1977; Rossiter et al. 2007).

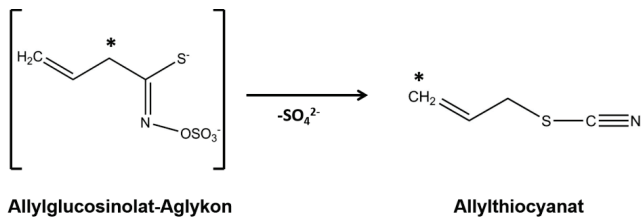


Abb. 4: Bildung von Allylthiocyanat aus dem Allylglucosinolat-Aglykon

Bestimmte spezifizierende Proteine bilden bei der Myrosinase-katalysierten Hydrolyse von Allylglucosinolat Allylthiocyanat, *: Isotopenmarkierung (Lüthy und Benn 1977)

Einfache Nitrile enthalten keinen Schwefel im Molekül. Bei ihrer Bildung abstrahiert elementarer Schwefel vom Glucosinolat-Aglykon (Benn 1977). Einfache Nitrile können bei der Myrosinase-katalysierten Hydrolyse in Anwesenheit spezifizierender Proteine aus allen Glucosinolaten, also unabhängig von der Glucosinolatseitenkette, gebildet werden. Aus Allylglucosinolat entsteht dann beispielsweise mit spezifizierenden Proteinen But-3-enitril (Allylcyanid) (Abb. 5).

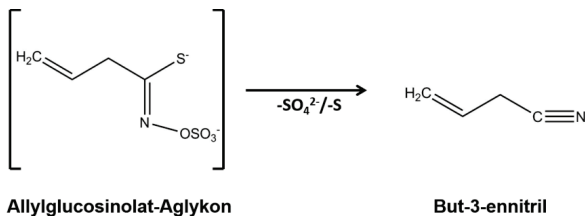


Abb. 5: Bildung von But-3-ennitril aus dem Allylglucosinolat-Aglykon

But-3-ennitril (Allylcyanid) entsteht bei der Myrosinase-katalysierten Hydrolyse von Allylglucosinolat in Anwesenheit bestimmter spezifizierender Proteine.

1.2.2 Klassifizierung spezifizierender Proteine

Das erste spezifizierende Protein entdeckte Tookey 1973 in *Crambe abyssinica* und nannte es nach dem bei der Glucosinolathydrolyse entstandenen Produkt Epithionitril-spezifisierendes Protein (ESP) (Tookey 1973). Bisher wurden 21 spezifizierende Proteine aus Pflanzen kloniert und charakterisiert (Tookey 1973; Burow et al. 2009; Kissen und Bones 2009; Kuchernig et al. 2011; Kuchernig et al. 2012; Witzel et al. 2019). Außerhalb der Brassicaceae wurde die Bildung alternativer Glucosinolat-Hydrolyseprodukte nur in *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) festgestellt, ein spezifizierendes Protein wurde jedoch nicht gefunden (Kuchernig et al. 2012). Nach ihrem Produktspektrum werden spezifizierende Proteine in Nitril-spezifisierende Proteine (NSPs), Epithionitril-spezifisierende Proteine (ESPs) und Thiocyanat-formende Proteine (TFPs) unterteilt. NSPs bilden bei der Myrosinase-katalysierten Hydrolyse mit allen Glucosinolaten einfache Nitrile (Abb. 6) (Burow et al. 2009; Kissen und Bones 2009). Sie stellen evolutionär die älteste Gruppe spezifizierender Proteine dar, aus denen sich zunächst die ESPs und später die TFPs entwickelten (Kuchernig et al. 2012). Mit ESPs entstehen einfache Nitrile oder, sofern die Glucosinolatseitenkette eine terminale Doppelbindung aufweist, Epithionitrile (Abb. 6) (Lambrix et al. 2001; Burow et al. 2006b, Matusheski et al. 2006, Burow et al. 2007b). TFPs können bei der Hydrolyse neben einfachen Nitrilen und Epithionitrilen aus bestimmten Glucosinolaten organische Thiocyanate bilden (Abb. 6) (Gmelin und Virtanen 1959; Burow et al. 2007a; Kuchernig et al. 2011). Phylogenetische Untersuchungen deuten auf eine divergente, voneinander unabhängige Entwicklung von TFPs verschiedener Arten der Brassicaceae hin (Franzke et al. 2011; Kuchernig et al. 2012).

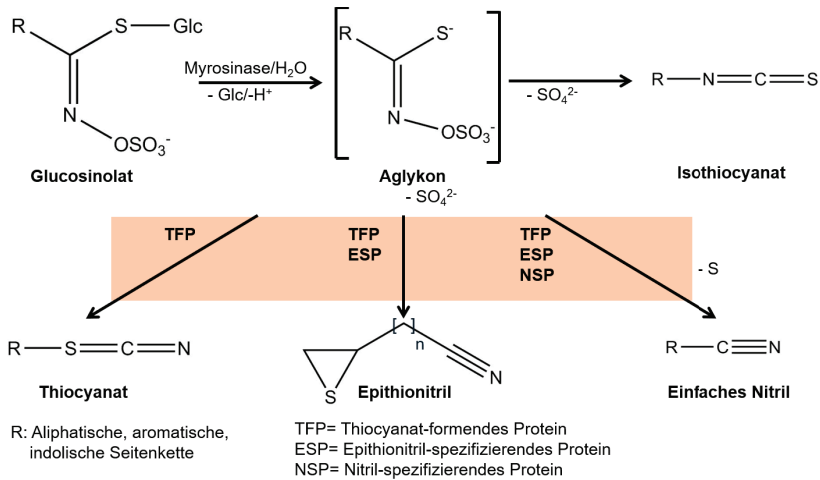


Abb. 6: Spezifizierende Proteine verändern das Produktprofil der Myrosinase-katalysierten Glucosinolat-Hydrolyse

Bei der Myrosinase-katalysierten Glucosinolat-Hydrolyse entstehen mit spezifizierenden Proteinen Thiocyanate, Epithionitrile oder einfache Nitrile auf Kosten der Isothiocyanate. Die Art der Produkte ist abhängig vom spezifizierenden Protein und von der Glucosinolatseitenkette. Als Substrat spezifizierender Proteine wird das intermediär gebildete Glucosinolat-Aglykon postuliert.

Nach der Definition beeinflussen spezifizierende Proteine enzymatische Reaktionen ohne eine katalytische Aktivität für die Umwandlung des Substrats zu besitzen (Brew et al. 1968). Das heißt, sie hydrolysieren nicht die Glucosinolate, sondern beeinflussen die Produktbildung bei der Myrosinase-katalysierten Hydrolyse (Gmelin und Virtanen 1959; Virtanen 1965; Tookey 1973; Wittstock und Burow 2007) (Abb. 6). Zunächst wurde vermutet, dass es sich bei spezifizierenden Proteinen um allosterische Cofaktoren der Myrosinase handelt (Tookey 1973; Petroski und Kwolek 1985). Inkubationen von Allylglucosinolat mit Myrosinase und gereinigtem ESP aus *Arabidopsis thaliana* (AtESP) unter Zusatz von Ascorbinsäure widerlegten diese Annahme (Burow et al. 2006a). Denn der Myrosinase-Cofaktor Ascorbinsäure steigerte nur die Isothiocyanatbildung, aber nicht den durch AtESP gebildeten Epithionitrilanteil (Burow et al. 2006a). Das heißt, unter Einfluss von Ascorbinsäure wurde die Myrosinase aktiviert. Daher wird angenommen, dass spezifizierende Proteine Enzyme sind, die bei der Myrosinase-katalysierten Glucosinolat-Hydrolyse intermediär gebildete Glucosinolat-Aglyka abfangen und in alternative Produkte umwandeln (Abb. 6) (Foo et al. 2000; Lambrix et al. 2001; Burow et al. 2006a; Wittstock und Burow 2007; Gumz et al. 2015). Da Glucosinolat-Aglyka instabil und nicht isolierbar sind, können keine enzymkinetischen Untersuchungen mit ihnen durchgeführt werden. Daher steht ein experimenteller Beweis der Enzymaktivität spezifizierender Proteine mit den Aglyka als Substrat noch aus.

1.2.3 Aktivität und Spezifität spezifizierender Proteine aus Pflanzen

Nach der Klassifizierung spezifizierender Proteine können ausschließlich TFPs organische Thiocyanate bilden, sie besitzen dabei jedoch eine hohe Substratspezifität (Burow et al. 2007a; Kuchernig et al. 2011). Das erste TFP wurde in *Lepidium sativum* (LsTFP) identifiziert (Burow et al. 2007a). Untersuchungen von rekombinantem LsTFP im *Escherichia coli*-Rohextrakt zeigten, dass bei der Hydrolyse von Benzylglucosinolat in Anwesenheit von Myrosinase und LsTFP Benzylthiocyanat entsteht, während aus Allylglucosinolat Epithionitril gebildet wird (Burow et al. 2007a). Neben LsTFP wurden bislang noch TFPs aus *Thlaspi arvense* (TaTFP) und aus *Alliaria petiolata* (ApTFP1) identifiziert, die bei der Hydrolyse von Allylglucosinolat Allylthiocyanat und 3,4-Epithiobutannitril bilden (Abb. 7), bei der Hydrolyse von Benzylglucosinolat bilden sie jedoch nur Benzylcyanid (Kuchernig et al. 2011; Kuchernig et al. 2012). Jedes TFP bildet also Thiocyanat aus einem bestimmten Glucosinolat-Aglykon (Burow et al. 2007a; Kuchernig et al. 2011). Das heißt, TFPs verschiedener Pflanzen besitzen unterschiedliche Substrat- und Produktspezifitäten.

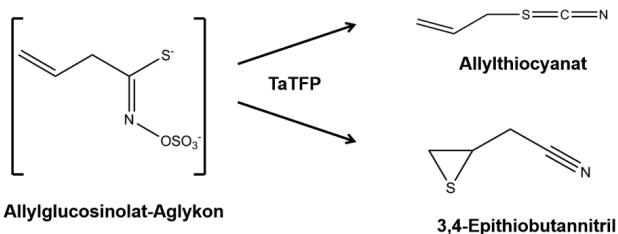


Abb. 7: TaTFP bildet Allylthiocyanat und 3,4-Epithiobutannitril bei der Myrosinase-katalysierten Allylglucosinolathydrolyse

ESPs können, wenn die strukturelle Voraussetzung gegeben ist, Epithionitril aber kein Thiocyanat bilden. Als erstes gereinigtes spezifizierendes Protein wurde ESP aus *Brassica napus* untersucht (Bernardi et al. 2000; Foo et al. 2000). Das erste *ESP*-Gen wurde aus *A. thaliana* des Ökotyps Landsberg *erecta* (*Ler*) (AtESP) isoliert (Lambrix et al. 2001). ESPs bilden bei der Myrosinase-katalysierten Glucosinolathydrolyse Epithionitrile, sofern die Glucosinolate eine terminale Doppelbindung aufweisen. So bildet beispielsweise AtESP bei der Allylglucosinolathydrolyse 3,4-Epithiobutannitril (Abb. 8). Neben AtESP sind ESPs aus *Brassica oleracea* (BoESP), *Cardamine hirsuta* (ChESP1), *Cardamine impatiens* (CiESP1), *Draba aurea* (DaESP1), *Draba lanceolata* (DIESP1), *Isatis tinctora* (ItESP1) und *Schouwia purpurea* (SpESP1) kloniert und charakterisiert worden (Matusheski et al. 2006; Kuchernig et al. 2012). Zudem wurden kürzlich drei ESPs aus *Brassica oleracea* (BoESP1, BoESP2, BoESP3) publiziert (Witzel et al. 2019). Dabei ist die Gensequenz von BoESP1 aus *B. oleracea* var. *oleracea* (Witzel et al. 2019) identisch zu der Sequenz von BoESP aus *B. oleracea* var. *italica* (Matusheski et al. 2006). Glucosinolate anderer Struktur werden in Anwesenheit von ESPs zu

einfachen Nitrilen abgebaut. AtESP wurde in *A. thaliana Ler* mittels Immunlokalisationen in den Epidermiszellen aller Organe mit Ausnahme der Wurzeln und Antheren identifiziert (Burow et al. 2007b). Es kommt jedoch nicht im vakuolären Proteom vor (Carter et al. 2004), sondern ist im Cytoplasma und im Nukleus lokalisiert (Burow et al. 2007b; Miao und Zentgraf 2007). Eine Rolle spezifizierender Proteine in der Regulation der Transkription wurde postuliert (Miao und Zentgraf 2007). Untersuchungen mit Hilfe von qRT-PCR, Western Blot und Enzymassays zeigten, dass die Aktivität von AtESP in *A. thaliana Ler* auf transkriptionaler und posttranslationaler Ebene kontrolliert wird (Burow et al. 2007b).

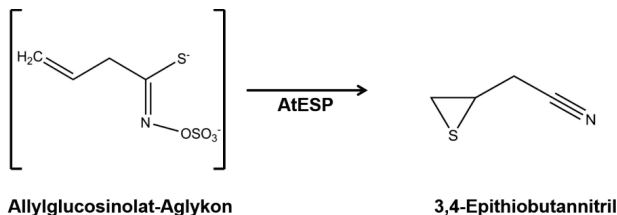


Abb. 8: Bildung von 3,4-Epithiobutannitril durch AtESP bei der Myrosinase-katalysierten Allylglucosinolatthydrolyse

NSPs bilden mit allen Glucosinolaten einfache Nitrile, beispielsweise entsteht bei der Myrosinase-katalysierten Hydrolyse von Allylglucosinolat mit NSPs als Produkt But-3-enitril (Abb. 9). *A. thaliana* besitzt fünf NSPs (AtNSP1-AtNSP5) (Burow et al. 2009; Kissen und Bones 2009). In Kombination zeigten Untersuchungen mittels q-PCR und T-DNA-Mutanten, dass AtNSP2 im Homogenat von Samen, AtNSP1 im Homogenaten von Keimlingen und AtNSP1, AtNSP3 und AtNSP4 für die Nitrilbildung im Homogenat der Wurzel verantwortlich sind (Wittstock et al. 2016). Demnach wird die Expression der AtNSPs organspezifisch reguliert (Wittstock et al. 2016). Neben AtNSP1-AtNSP5 aus *A. thaliana* wurden NSPs aus *Cardamine hirsuta* (ChNSP1), *Isatis tinctora* (ItNSP1) und *Schouwia purpurea* (SpNSP1) kloniert und charakterisiert (Kuchernig et al. 2012).

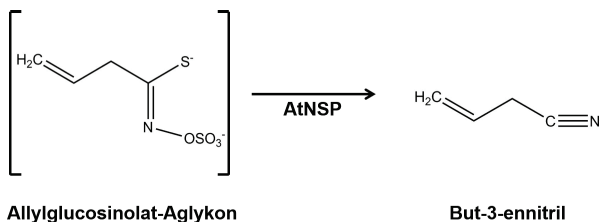


Abb. 9: Bildung des einfachen Nitrils But-3-enitril (Allylcyanid) durch AtNSP bei der Myrosinase-katalysierten Allylglucosinolatthydrolyse