

## Something to sniff at – die Welt der Düfte

Uta Effmert, Diana Rohrbeck, Diana Buß, Birgit Piechulla

Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Abtlg. Biochemie, Rostock

► Im Dezember 2004 erhielten Linda Buck und Alexander Rich den Nobelpreis für Medizin und Physiologie. Mit ihren Arbeiten konnten sie grundsätzliche Mechanismen der Verwirklichung der Geruchspertzeption des Menschen aufzeigen. Eine Hauptquelle für Duftstoffe (volatile organic compounds, voc) sind Pflanzen. Am natürlichen Standort sind Düfte für das Überleben von Pflanzen essenziell, sie verteidigen und schützen sich damit vor Feinden. Terpene, z.B. in Basilikum und in Nadelbäumen, sind einerseits verantwortlich für das jeweils typische Aroma, sorgen aber auch dafür, dass gierige Pflanzenfresser ferngehalten werden. Andererseits ziehen Düfte, insbesondere die von Blüten abgegebenen, Insekten magisch an, z.B. um die Bestäubungseffizienz und damit die Frucht- und Samenbildung zu gewährleisten. Während die ökologischen Funktionen von Pflanzendüften und auch

die chemische Zusammensetzung der Düfte seit vielen Jahren intensiv untersucht werden, besteht mangelndes Wissen über die Biosynthesewege, die zu der Vielfalt der Duftkomponenten beitragen. Letztendlich wird erst die Aufklärung der an den Synthesen beteiligten Enzyme, ihrer Gene und der zugrunde liegenden Regulationsmechanismen uns Klarheit darüber verschaffen, wie ein bestimmtes Duftbouquet von Pflanzen zur gezielten Abwehr oder Anlockung eingesetzt werden kann.

### Benzenoid-Carboxyl-Methyltransferasen synthetisieren die Duftkomponenten Methylsalicylat und Methylbenzoat

Mindestens 2000 verschiedene flüchtige Substanzen konnten alleine von Blüten mit Hilfe der headspace-Technik und GC-MS-Analyse identifiziert werden. Die meisten

dieser Komponenten lassen sich drei Stoffklassen zuordnen, den Fettsäuren, den Benzenoiden und den Terpenoiden. Um mit nur drei zugrundeliegenden Biosynthesewegen trotzdem eine Vielzahl von verschiedenen Substanzen herstellen zu können, sind Derivatisierungsreaktionen ein exzellentes Mittel zum Zweck, z.B. Hydroxylierungen, Acetylierungen oder Methylierungen. Letztere treten dabei am häufigsten am Sauerstoff auf, dementsprechend konnten auch bereits viele O-Methyltransferasen (O-MT) isoliert, charakterisiert und klassifiziert werden. Eine besondere, unlängst erstmals aus Blüten von *Clarkia breweri* isolierte O-MT<sup>[1]</sup> methyliert unter Verwendung des Methylgruppendonators S-Adenosylmethionin (SAM) spezifisch die Hydroxylgruppe einer Carboxylgruppe und bildet somit Methyl ester, z.B. Methylsalicylat (Methyl-2-Hydroxybenzoat) und Methylbenzoat. Dieser neue Typ von O-MT (Benzenoid-Carboxyl-O-MT) ist weder auf der Ebene des Aminosäure-Sequenzvergleichs noch in seiner 3D-Struktur verwandt mit bisher isolierten O-MT<sup>[2]</sup>.

Ca. 100 Pflanzenspezies emittieren bekanntermaßen entweder Methylbenzoat oder Methylsalicylat oder beides, z.B. enthält der Duft des Löwenmäulchens (*Antirrhinum majus*) Methylbenzoat, aber nicht Methylsalicylat, im Duft der Wachsblume (*Hoya carnosa*) und *Clarkia breweri* ist Methylsalicylat, aber kein Methylbenzoat nachweisbar, während sich im Duft der Kranschnelle (*Stephanotis floribunda*) und dem australischen Dufttabak (*Nicotiana suaveolens*) beide Komponenten befinden. Es ist derzeit unklar, welche katalytischen Eigenschaften diese O-MT in den verschiedenen Pflanzen besitzen müssen, um das eine, das andere oder beide Produkte zu bilden. Eine vergleichende Analyse von Benzenoid-Carboxyl-O-MT wurde möglich nach Klonierung und heterologer Expression der Gene aus verschiedenen Pflanzen. Aufgrund des Aminosäuresequenzvergleichs und der biochemischen Charakterisierung dieser Enzyme konnte ein Salicylat-Typ bzw. ein Benzoat-Typ ermittelt werden (Tab. 1), z.B. wurde aus *H. carnosa* ein Enzym des Salicylat-Typs isoliert und aus *A. majus* ein Enzym des Benzoat-Typs, was mit den Emissionsmustern dieser Pflanzen korreliert. Die aus *N. suaveolens* und *S. floribunda* isolierten Enzyme lassen sich dem Salicylat-Typ zuordnen, jedoch emittieren diese beiden Pflanzen neben Methylsalicylat hauptsächlich Methylbenzoat. Die vermehrte Methylbenzoat-Emission erklärt sich einerseits aus der katalytischen Effizienz und dem Aufbau der Substratbindungsstellen der Enzyme und andererseits aus der ca. tausendfach höheren Substratverfügbarkeit des Benzoats gegen-

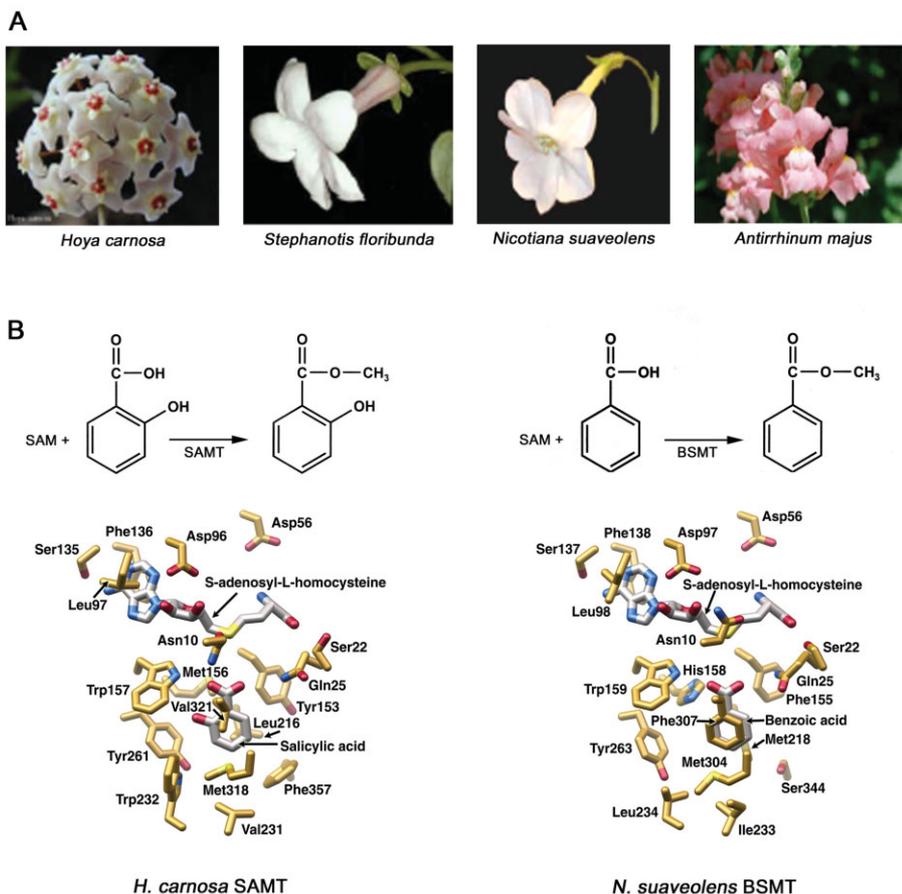


Abb. 1: Methylsalicylat und Methylbenzoat emittierende Blüten (A), katalysierte Reaktionen (B) und Computermodelle der Substratbindungstaschen der Salicylat-spezifischen Carboxyl-O-Methyltransferase von *Hoya carnosa* und der Benzoat favorisierenden Carboxyl-O-Methyltransferase von *Nicotiana suaveolens*.

Tab. 1:

	<i>Hoya carnosa</i>	<i>Stephanotis floribunda</i>	<i>Nicotiana suaveolens</i>	<i>Antirrhinum majus</i>
Aminosäuresequenzvergleich	Salicylat-Typ	Salicylat-Typ	Salicylat-Typ	Benzoat-Typ
Relative Substratnutzung (%) Salicylat/Benzoat	100/1	100/31,9	22,5/100	0/100
Katalytische Effizienz ( $s^{-1}M^{-1}$ )				
Salicylat	230	16,3	160,3	kein Substrat
Benzoat	kein Substrat	14,6	625,8	19–27
Substrat im Gewebe				
Salicylat (nmol/gFG)	n.b.	0,81	0,98	n.b.
Benzoat (nmol/g FG)	n.b.	901	1929	49

n.b. nicht bestimmt

über des Salicylats in den Blütenblättern (Tab. 1, Abb. 1)<sup>[3]</sup>. Weder aufgrund einer Sequenzanalyse noch einer biochemischen Charakterisierung alleine lässt sich die *in planta*-Funktion eines Enzyms vorhersagen, sondern wichtig sind auch die verfügbaren Metabolite in den Zellen für die Ausbildung von Duftstoffbouquets.

### Evolution der Benzenoid-Carboxyl-O-Methyltransferasen

Die bis heute isolierten bekannten Benzenoid-Carboxyl-O-MT haben alle einen deutlich niedrigeren  $K_m$ -Wert für Salicylat als für Benzoat, was darauf hinweist, dass diese Enzyme *in vitro* eine höhere Affinität zu Salicylat haben. Daraus kann abgeleitet werden, dass die blütenspezifischen Benzenoid-Carboxyl-O-MT von Salicylat-spezifischen Enzymen abstammen, die in vegetativem Gewebe (z.B. Blättern) zur Pathogenabwehr vorkommen. Diese evolvierten in Blütenblättern zu Enzymen, die strukturell ähnliche Produkte bilden, diese aber insbesondere attraktiv auf bestäubende Organismen wirken. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der Substratbindestellen der Benzenoid-Carboxyl-O-MT legt nahe (Abb. 1),

dass ein ursprüngliches Enzym den floralen spezialisierten Enzymen aus *H. carnosa* und *C. breweri* ähnlich war und sich daraus Enzyme mit breiterem Substratspektrum entwickelten, ähnlich den Enzymen aus *S. floribunda* oder *N. suaveolens*. Dieser Enzym-Typ könnte wieder Grundlage für die Entwicklung spezialisierter Enzyme des Benzoat-Typs (z.B. *A. majus*) darstellen. Um diese Hypothese zur Evolution von Enzymen mit hoher und breiter Substratspezifität zu festigen, wäre es nun notwendig, diese Klasse der Enzyme in nahe verwandten Pflanzenspezies (z.B. *Nicotiana*) zu charakterisieren.

### Die Duftstoffemittierung

Neben der Aufklärung der Biosynthesewege, die zu flüchtigen Substanzen führen, ist Kenntnis darüber zu gewinnen, wie Duftbouquets entstehen und wie Duftstoffe aus den Zellen gelangen. Der Duft von *S. floribunda* umfasst z.B. über 30 verschiedene Komponenten, während bei *Mirabilis jalapa* (Wunderblume) nur eine Duftkomponente (trans-beta-Ocimen) den Duft beherrscht. Düfte variieren auch in Abhängigkeit vom Alter der Pflanze und Blüte, von der Tages-

zeit und nach erfolgter Befruchtung, sodass damit gezielt Information zur Kommunikation freigesetzt werden können. Viele weiß blühende Pflanzen duften nachts am stärksten, weil während dieser Zeit die korrespondierenden Bestäuber ebenfalls aktiv sind und damit eine optimale Ressourcennutzung (Synthesen der Duftkomponenten sind Energie und Kohlenstoff raubende Prozesse) möglich ist. Aktuelle Erkenntnisse zeigen, dass die tageszeitspezifische Emission gleichzeitig auf der transkriptionalen und der posttranslationalen Ebene reguliert wird und dass die circadiane Uhr involviert ist, sodass fine-tuning und präzise zeitliche Emission möglich ist<sup>[4]</sup>. Obwohl in vielen Fällen nicht geklärt ist, ob die flüchtigen Sekundärmetabolite mit Hilfe spezifischer Transporter oder durch Diffusion aufgrund des niedrigen Dampfdruckes und der relativ geringen Molmasse, die Membran passieren können, zeigen neue Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, dass in der Regel der Duft lokal begrenzt nur von Petalenspreiten der verwachsenen Korollen abgegeben wird und sich die Benzenoid-Carboxyl-O-MT insbesondere in den Epidermiszellen nachweisen lässt (Abb. 2). Diese genaue Lokalisation der Duftstoff synthetisierenden Areale ist neben der innerzellulären Regulation wichtig, um den Mechanismen des Emissionsprozesses und der Duftbouquet-Bildung auf die Spur zu kommen.

### Literatur

- [1] Ross, J.R., Nam, K.H., D'Auria, J.C., Pichersky, E., (1999): S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* 367, 9–16.
- [2] Noel, J.P., Dixon, R. A., Pichersky, E., Zubieta, C., Ferrer, J.L., (2003): Structural, functional, and evolutionary basis for methylation of plant small molecules. In: Romeo J.T., (Ed.), *Recent Advances in Phytochemistry*, Vol. 37. Elsevier Science & Technology, Oxford 37–58.
- [3] Pott, M., Hippauf, F., Saschenbrecker, S., Chen, F., Ross, J., Kiefer, L., Slusarenko, A., Noel, J.P., Pichersky, E., Effmert, U., Piechulla, B. (2004): Biochemical and structural characterization of benzenoid carboxyl methyltransferases involved in floral scent production in *Stephanotis floribunda* and *Nicotiana suaveolens*. *Plant Physiol.* 135, 1946–1955.
- [4] Pott, M., Effmert U., Piechulla B. (2003): Transcriptional and post-translational regulation of S-adenosyl-L-methionine: salicylic acid carboxyl methyltransferase (SAMT) during *Stephanotis floribunda* flower development. *J. Plant Physiol.* 160, 635–643.

### Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Birgit Piechulla  
Universität Rostock  
Institut für Biowissenschaften  
Abt. Biochemie  
Albert-Einstein-Str. 3  
D-18059 Rostock  
Tel.: 0381-498 6130  
Fax: 0381-498 6132  
birgit.piechulla@uni-rostock.de

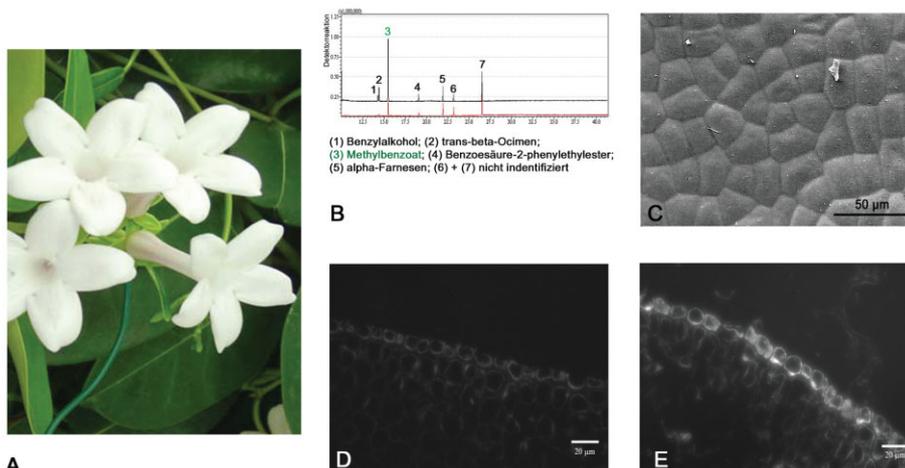


Abb. 2: Blüte (A), Duftprofile aus verschiedenen Blütenregionen (B), rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der adaxialen (inneren) Petalenoberfläche (C), immunhistochemischer Nachweis der Carboxyl-O-Methyltransferase mit spezifischen Antikörpern im Petalquerschnitt (E), Negativkontrolle (D) von *Stephanotis floribunda*.