



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Retrobiosynthetic study of salicylic acid in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures

Mustafa, N.R.

Citation

Mustafa, N. R. (2007, May 23). *Retrobiosynthetic study of salicylic acid in Catharanthus roseus cell suspension cultures*. Department of Pharmacognosy, Section Metabolomics, Institute of Biology, Faculty of Science, Leiden University. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/11972>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/11972>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

Planten produceren een grote verscheidenheid aan secundaire metabolieten, die een rol spelen in de interactie tussen planten en hun omgeving. Zo kunnen deze stoffen bijvoorbeeld fungeren als aantrekkers van bestuivers, als een verdediging tegen pathogenen, insecten, herbivoren of abiotische stress (zoals UV-licht, hoge zout concentraties en droogte), of als signaalstoffen. Salicylzuur (SA) is een signaalstof voor de zogenoemde systemisch verkregen afweer (systemic acquired resistance, SAR). Het behoort tot de C6C1 klasse van stoffen, welke structureel zijn opgebouwd uit een carboxyl-groep (C1) gekoppeld aan een aromatische ring (C6). SA is afgeleid van de shikimaat pathway (biosynthese route), een in planten belangrijke pathway die het metabolisme van koolwaterstoffen verbindt met die van aromatische stoffen. Het bestaat uit zeven stappen, en staat aan het begin van de biosynthese van een breed spectrum van secundaire metabolieten, waaronder fenolische verbindingen en alkaloiden. Het eindproduct van de shikimaat pathway is chorismaat, een belangrijk vertakkingspunt van pathways aangezien chorismaat een substraat is voor 5 verschillende enzymen (overzicht in hoofdstuk 2). De producten van deze biosynthetische aftakkingen zijn onder andere: fenylalanine, anthranilaat, tryptofaan, p-aminobenzoëzuur, para-hydroxy-benzoëzuur, 2,3-dihydroxybenzoëzuur (2,3-DHBA), en SA. Van deze verbindingen is vervolgens een grote verscheidenheid aan secundaire metabolieten afgeleid. Het ontrafelen van pathways die leiden tot de vorming van C6C1 verbindingen in planten, door middel van isolatie en karakterisering van de verantwoordelijke enzymen en cDNA, is belangrijk zowel voor een basaal begrip van het verschijnsel SAR, als ook voor toepassing ervan in 'metabolic engineering'.

Fenolische stoffen zoals simpele fenolen (C6), C6-C1 verbindingen, simpele fenylpropanoiden (C6C3 verbindingen) en flavonoiden (C6C3C6 verbindingen) komen algemeen voor in planten en hun gehalte neemt vaak toe als gevolg van een microbiële infectie. Ook voor *Catharanthus roseus* planten en celcultures is de aanwezigheid van fenolische stoffen beschreven in diverse studies (overzicht in hoofdstuk 3). *Catharanthus roseus* is een bron van enkele belangrijke terpenoid indol alkaloiden (TIAs) waaronder de potente antitumor middelen, vincristine en vinblastine. Om meer inzicht te verkrijgen in het functioneren van de pathways die

leiden tot gewenste metabolieten zoals TIAs, zijn studies nodig naar de biosynthese van andere secundaire metabolieten en naar de regulatie hiervan. De regulering van biosynthesewegen geschiedt door middel van signaalstoffen zoals SA, jasmonaat (JA) en ethyleen (ET). Afhankelijk van de omgeving waarin de plant verkeert of de soort (a)biotische stress die hij ervaart, kunnen verschillende pathways actief zijn of worden geactiveerd. Verschillen in geactiveerde pathways worden niet alleen waargenomen tussen soorten, maar ook tussen verschillende individuele planten, planten organen, celcultures en zaailingen van een enkele soort. Een voorbeeld hiervan is dat elicitatie van *C. roseus* celcultures met behulp van *Pythium* extract resulteert in de toename van het gehalte aan SA, 2,3-DHBA en tryptamine.

In *C. roseus* cel suspensie cultures gaan verhoogde gehalten van SA en 2,3-DHBA (Budi Muljono, 2001) vergezeld met een toename in het enzym isochorismaat synthase (Budi Muljono *et al.*, 2002) na elicitatie met *Pythium* extract. Dat maakt de aanwezigheid van de microbiële SA pathway in deze plant waarschijnlijk, zoals eerder voorgesteld is door Verberne *et al.* (2000). In micro-organismen wordt chorismaat omgezet in SA door isochorismaat synthase (ICS) en isochorismaat pyruvaat-lyase (IPL), terwijl gedacht wordt dat SA in planten afkomstig is van fenylalanine, waarvoor vele stappen nodig zijn. Budi Muljono *et al.* (2002) toonde de betrokkenheid van de microbiële pathway aan voor 2,3-DHBA door middel van een retrobiosynthetische studie. Om deze pathway ook aan te tonen voor SA is een hoog-producerende cellijn nodig, aangezien SA gewoonlijk slechts in zeer kleine hoeveelheden wordt geproduceerd. Met gebruikmaking van een kwantitatieve HPLC methode voor SA bepaling (Verberne *et al.*, 2002) onderzochten we daarom de gehalten aan SA in verschillende *C. roseus* cellijnen na elicitatie met *Pythium* extract, om een hoog-SA producerende cellijn te vinden die nodig is voor het verrichten van labeling-studies (hoofdstuk 4). We ontdekten dat een wildtype *C. roseus* cellijn (A12A2), gecultiveerd in Murashige & Skoog medium zonder groeihormonen, het hoogste gehalte produceerde aan totaal SA (som van vrije SA en SA-glucoside).

Uiteindelijke analyse van SA in de celcultures zal gebeuren met behulp van NMR technieken. Maar hiervoor is het verhogen van het SA gehalte door activeren van de SA pathway met behulp van *Pythium* extract niet voldoende, aangezien zelfs een verhoogd gehalte nog veel te laag is om te analyseren temidden van de andere celcomponenten, die zullen interfereren met de signalen van SA in de NMR-spectra. Daarom ontwikkelden we een methode voor de zuivering van SA met behulp van

anion-wisselings chromatografie, met Dowex 1WX2 (100 mesh) als stationaire fase, 0.25 mM natrium-fosfaat (pH 7.0-7.5) als wasbuffer en 0.3 M HCl in 60% acetonitril als counter-ion oplossing. Dit systeem resulteert in een goede eenstaps zuivering van SA uit plantencel cultures, zoals te zien is in de verkregen (400 MHz) ^1H -NMR-spectra (hoofdstuk 5).

De beschikbaarheid van een efficiënte zuiverings methode voor SA opende de mogelijkheid tot het verrichten van labeling studies met behulp van $[1-^{13}\text{C}]$ -D-glucose (hoofdstuk 6). Deze gelabelde precursor wordt algemeen gebruikt voor retrobiosynthetische studies, zoals in gisten en planten (Werner *et al.*, 1997), waaronder *C. roseus* celcultures (Contin *et al.*, 1998; Budi Muljono *et al.*, 2002). Zuivering van een gelabeld ruw extract van geëliciteerde *C. roseus* cellen met behulp van de ion exchange methode gevolgd door een Sephadex-LH20 kolom, resulteerde in een SA-verrijkt extract, zoals aangetoond in de verkregen HMBC- en ^{13}C -NMR spectra. Een 'inverse-gated' ^{13}C -NMR methode, gebruik makend van een 600 MHz NMR-spectrometer en een relatief hoog aantal scans (36.864), werd gebruikt voor de kwantitatieve analyse van gelabeld SA. De resultaten tonen een duidelijke asymmetrie van incorporatie op posities C-2 en C-6, en een relatief lage incorporatie op C-7 van zowel SA als van 2,3-DHBA, wat aanduidt dat de isochorismaat pathway verantwoordelijk is voor de biosynthese van beide stoffen in *Pythium* geëliciteerde celcultures van *C. roseus*. De verschillen in de patronen van labeling tussen SA en 2,3-DHBA tonen dat beide stoffen geproduceerd zijn op verschillende tijdstippen en/of locaties in de celcultuur. Verdere studies naar stoffen afgeleid van fenylalanine, zoals de fenylpropanoïden aangetroffen in onze geëliciteerde cellen, en naar het metabooloom van deze cellen kan meer inzicht verschaffen in andere van fenylalanine afgeleide biosynthesewegen.

Metabolomics is een techniek die mogelijk informatie kan verschaffen over mogelijke metabolische veranderingen na elicitatie. Door middel van NMR-gebaseerde metabolomics is het mogelijk om een algemeen, holistisch overzicht te verkrijgen van alle hoofdcomponenten, waaronder zowel primaire als secundaire metabolieten afkomstig van een grote variatie aan biosynthetische pathways (Kim *et al.*, 2006). We hebben deze methode toegepast bij het volgen van het effect van SA toediening op *C. roseus* cellen over een periode van 72 uur (hoofdstuk 7). Het bleek dat in deze periode het metabolieten profiel van deze cellen veranderde als gevolg van behandeling met 0.5 M natrium-SA, ten opzichte van niet-behandelde cellen. In de

SA-behandelde cellen werd het hoogste gehalte aan suikers gemeten bij aanvang (0 uur), waarna deze vervolgens afnamen tot ondetecteerbare gehalten na 72 uur. Veranderingen in de gehalten van bepaalde alifatische aminozuren en organische zuren werden ook waargenomen. NMR-signalen van SA verdwenen na 48 uur, maar gelijktijdig namen de signalen van 2,5-dihydroxybenzoaat-glucoside (2,5-DHBAG) significant toe. Dit is mogelijk een katabolisch product van SA, zoals eerder beschreven door Shimoda *et al.* (2002). Echter, signalen voor TIAs of hun precursors loganinezuur en secologanine werden niet waargenomen, wat duidt op zeer lage gehalten dan wel volledige afwezigheid. De detectie van componenten die aanwezig zijn in zeer lage concentraties moeten verder onderzocht worden met behulp van gevoeliger analytische technieken als HPLC-DAD, LC-MS en/of GC-MS die specifiek gericht zijn op de detectie van deze stoffen. Verder is ‘metabolic profiling’ van *C. roseus* suspensie celcultures, geëliciteerd met methyl-jasmonaat, *Pythium* extract of andere elicitoren, nodig voor een beter begrip van de activatie van verschillende pathways door diverse elicitoren.

In dit proefschrift is aangetoond dat ‘metabolic profiling’ met behulp van ¹H-NMR in combinatie met ‘Principal Component Analysis’ (PCA) informatie kan verschaffen over de metabolische veranderingen die plaatsvinden in de bestudeerde cellen in de tijdsperiode na elicitatie. Echter, voor het daadwerkelijk in kaart brengen van een pathway moet de betrokkenheid van bepaalde intermediären bevestigd worden door ¹³C-NMR analyse van gelabelde stoffen na toediening van gelabelde precursors.

Perspectieven:

Het verrichten van efficiënte, rationele ‘metabolic engineering’ in planten is niet mogelijk zonder kennis van de structuur en regulatie van de betrokken metabole netwerken van de plant (Ratcliffe en Shachar-Hill, 2005). De recente successen in ‘metabolic engineering’ bij micro-organismen is dan ook te danken aan de veel eenvoudiger structuur van hun metabolisme. Maar helaas kunnen de meeste secundaire metabolieten niet worden geproduceerd door micro-organismen. Indien we in staat zouden zijn om de structuur van plant metabolisme in al zijn complexiteit te begrijpen, dan zou dat een heuse doorbraak zijn, aangezien een dergelijke complexiteit een rol speelt op alle niveaus van biologische organisatie. De drang om de structuur van metabole structuren te doorgronden is groot niet alleen ter

bevrediging van de menselijke nieuwsgierigheid, maar ook vanwege de enorme potentie voor toepassing van die kennis. De blauwdruk van het fenotype wordt grotendeels bepaald door de genen, maar het uiteindelijke fenotype is het resultaat van de interactie van het organisme met zijn omgeving. Hierdoor zullen genomics en transcriptomics alleen nooit in staat zijn het fenotype volledig te verklaren. Hoewel deze -omics technieken, samen met proteomics en metabolomics, nodig zijn om dit doel uiteindelijk te kunnen bereiken, hebben diverse studies aangetoond dat er geen directe parallele correlatie is tussen transcriptie, enzym activiteit, en corresponderende metabolieten. ‘Metabolic profiling’ en metabole flux analyse (fluxomics) zijn daarom belangrijke technieken voor het, stukje bij beetje, ontrafelen van pathways en het beoordelen van het belang van ieder gedeelte van de enorme netwerken van pathways. Tracer experimenten, waarbij gebruik wordt gemaakt van stabiele isotopen om de flux door pathways te bepalen, zijn veelvuldig uitgevoerd bij onderzoek naar het primaire metabolisme. Hoewel er behoorlijke obstakels zijn te overwinnen, zoals de zeer lage gehalten van de meeste secundaire metabolieten, wordt het nu tijd om de technieken van de fluxomics toe te gaan passen op zowel het primaire als het secundaire metabolisme van planten. Wellicht bereiken we hiermee dan het uiteindelijke doel: het in kaart brengen van het gehele metabole netwerk van de plant, inclusief zijn regulatie.