



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Phytochemical background matters for bioactivity of plant metabolites : a case study with pyrrolizidine alkaloids

Liu, X.

Citation

Liu, X. (2016, December 22). *Phytochemical background matters for bioactivity of plant metabolites : a case study with pyrrolizidine alkaloids*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/45055>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/45055>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/45055> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Liu, X.

Title: Phytochemical background matters for bioactivity of plant metabolites : a case study with pyrrolizidine alkaloids

Issue Date: 2016-12-22

Samenvatting en discussie

Planten hebben verschillende afweer mechanismen ontwikkeld om te reageren op prikkels uit hun natuurlijke omgeving. Dit heeft geresulteerd in een groot scala van chemische inhoudsstoffen (Fraenkel 1959; Hartmann 1996; Kliebenstein 2004; Mithofer and Boland 2012). De gevolgen van het voorkomen van veel verschillende metabolieten in een plant is dat er een grote kans op interacties bestaat tussen deze metabolieten. Het samen voorkomen van plant metabolieten creëert een natuurlijke chemische achtergrond waar deze metabolieten in functioneren. Dit laatste wordt vaak over het hoofd gezien in ecologische studies.

Het hoofddoel van dit proefschrift is om het belang van de interacties tussen plant metabolieten in de context van plant-insect herbivoor interacties te begrijpen. Hiervoor heb ik *Jacobaea spp.*, en het daarin voorkomende chlorogeen zuur (CGA) en pyrrolizidine alkaloiden (PA's) als studie object gebruikt. In deze samenvatting van mijn proefschrift bespreek ik als eerste de bioactiviteit van individuele PA's. Als tweede zal ik de interacties tussen plant metabolieten bespreken in relatie tot herbivoor resistentie. Als derde zal ik kort de aanpak waarmee en het kader waarin ik dit onderzocht heb bespreken. Als laatste zal ik de hoofdconclusies van dit proefschrift samenvatten, en bespreken welke vooruitzichten zij bieden voor verder onderzoek.

1 Bioactiviteit en individuele metabolieten

In hoofdstuk 2 vind ik duidelijke negatieve effecten van PA's van *J. vulgaris* op trips overleving. Dit laat de beschermende functie van PA's tegen insect herbivoren zien. Het negatieve effect op trips ondersteunt eerdere bevindingen in een correlatieve studie met hele planten die liet zien dat de totale PA concentratie negatief gecorreleerd was met resistentie tegen verschillende herbivoren (Cheng et al. 2011), en meer specifiek dat met name de jacobine-achtige PA's negatief gecorreleerd waren met trips schade (Leiss et al. 2009; Cheng et al. 2011).

In hoofdstuk 2 laat ik ook zien dat metabolieten met een vergelijkbare chemische structuur verschillen in de sterkte van hun effect op trips. Als eerste blijken de PA's met een vrije base meer toxisch in vergelijking met hun corresponderende N-oxides. Dit is consistent met eerdere studies in erwtenbladluis (*Acyrtosiphon pisum*) (Dreyer et al. 1985), de slak *Arianta arbustorum* (Helicidae) (Speiser et al. 1992), de rups *Spodoptera exigua* (van Dam et al. 1995), de sprinkhaan *Locusta migratoria* (Macel et al. 2005), en met resultaten met *S. exigua* cel lijnen en rupsen (Nuringtyas et al. 2014). Het verschil tussen de twee vormen van PA's en hun effect op insect herbivoren is mogelijk gerelateerd aan cel permeabiliteit. In het algemeen passeren hydrofobe of lipofiele componenten de cel membraan makkelijker omdat het membraan uit fosfolipiden bestaat. De meeste vrije base PA's zijn lipofiel en

kunnen daardoor makkelijk een bio-membraan passeren, terwijl N-oxides polair en hydrofiel zijn (Lindigkeit et al. 1997). Daarnaast hebben ik gevonden dat de vrije base PA's jacobine en erucifoline de meest actieve PA's tegen trips waren, terwijl seneciphylline en senecionine het minst actief waren. Eerdere studies met individuele PA's lieten zien dat deze verschilden in hun effecten op *Spodoptera littoralis* (Gonzalez-Coloma et al. 2002), trips (Macel et al. 2005) en *S. exigua* cel lijnen (Nuringtyas et al. 2014). Daarentegen vonden Dominiguez et al. (2008) geen significante verschillen tussen de effecten van de geteste PA's op *Myzus persicae* en *Leptinotarsa decemlineata*. Fysiologische processen in de herbivoren kunnen de verschillende PA's anders beïnvloeden. De larven van *S. littoralis* kunnen bijvoorbeeld de toxiciteit van senecionine omzeilen door deze stof snel en efficiënt uit te scheiden (Lindigkeit et al. 1997). Er is echter nog weinig kennis over de toxiciteit van PAs in herbivoren. De metabolieten senecionine en seneciphylline staan aan de basis van de biosynthetische route van PA's. Retrorsine, jacobine en erucifoline worden verderop in de route gesynthetiseerd. Senecionine N-oxide is het eerste PA in de biosynthese waarvan de andere PA's zijn afgeleid (Hartmann en Dierich 1998; Pelser et al. 2005). Senecionine N-oxide en seneciphylline N-oxide komen beide voor in alle *Senecio* soorten. Van deze PA's worden in een of twee enzymatische stappen de andere PA's gesynthetiseerd, waaronder retrorsine N-oxide, jacobine N-oxide en erucifoline N-oxide (Figuur 1 in hoofdstuk 2 en 3). In hoofdstuk 2 vergelijk ik de effecten op trips van de vrije base PA's verderop in de biosynthese route met die van de vrije base PA's aan het begin van de biosynthese route. Hoewel er een trend was te zien dat de afgeleide PA's meer actief waren tegen trips dan senecionine en seneciphylline, vond ik geen echt significant verschil. Resultaten van experimenten met pure PA's kwamen niet altijd overeen met de resultaten van correlatieve studies met hele planten. Voor metabolieten die effectief zijn bij lage concentraties zijn correlatieve studies niet altijd gevoelig genoeg om bio-activiteit aan te tonen. Ik heb bijvoorbeeld gevonden dat retrorsine effect heeft op trips overleving in bioassays, terwijl er geen significante correlatie gevonden werd met trips schade op *Jacobaea* planten (Cheng et al. 2011). Jacobine N-oxide is positief gecorreleerd met trips schade in bioassays met hele planten (Cheng et al. 2011), terwijl er geen sterke effecten op trips waren in experimenten met zuivere metabolieten die werden toegevoegd aan een artificieel dieet (hoofdstuk 2). Een nadeel van correlatieve studies is dat een correlatie niet altijd een oorzakelijk verband aangeeft. De correlatie tussen trips schade en de concentratie van jacobine N-oxide die gevonden is door Cheng et al. (2011) kan het gevolg zijn van een correlatie tussen jacobine N-oxide en een of meer andere PA's. Een andere mogelijke verklaring is dat jacobine N-oxide geactiveerd wordt in aanwezigheid van andere metabolieten. Dit benadrukt het belang van onderzoek naar de interacties tussen plant metabolieten.

2 Interactie tussen plant metabolieten

Het metabooloom van de plant vormt de natuurlijke chemische achtergrond voor individuele metabolieten. Doordat er zeer veel verschillende metabolieten in een plant voorkomen bestaat er een grote kans op interactie tussen de metabolieten. Planten kunnen die interacties beïnvloeden door opslag van metabolieten in verschillende organen, weefsels, cellen en cel compartimenten. Compartimentering kan gebruikt worden om metabolieten die antagonistisch interacteren van elkaar te scheiden. Planten kunnen profiteren van synergistische interacties doordat deze de bioactiviteit doen toenemen tegen lagere kosten (Berenbaum en Zangerl 1998; Nelson en Kursar 1999). Individuele metabolieten kunnen een andere activiteit vertonen dan wanneer zij interacteren met andere metabolieten. Daarom geven potentiële interacties mogelijk nieuwe inzichten in de bio-activiteit van individuele metabolieten die tot nu toe over het hoofd gezien zijn tijdens het testen van de zuivere stoffen. Het is bekend dat de concentratie van metabolieten sterk kan verschillen tussen plant organen (Kuhlisch en Pohnert 2015) en zelfs tussen verschillende cel lagen (Nuringtyas et al. 2014; Moussaieff et al. 2013). Het belang van de interacties tussen plant metabolieten in de context van plant-insect herbivoor interacties en de invloed van die interacties op bio-activiteit van individuele metabolieten zal hieronder beschreven worden. Ondanks dat interacties tussen plant metabolieten belangrijk zijn, is er nog weinig onderzoek gedaan naar deze interacties en de effecten die ze hebben in een ecologische context (zie enkele referenties hieronder). Dit kan mogelijk verklaard worden door de complexiteit van de interacties, en de moeilijkheid deze te detecteren en analyseren op een juiste manier (Nelson en Kursar 1999).

De studie van interacties tussen plant metabolieten vormt een grote uitdaging door het schier oneindige aantal mogelijke combinaties. Het onderzoek naar de interacties wordt nog complexer doordat een groot aantal metabolieten nog niet bekend of geïdentificeerd is (Trethewey 2004). In dit proefschrift, met inachtneming van de mate van complexiteit van de chemische diversiteit, heb ik de effecten van de interacties tussen plant metabolieten op insect herbivoren bestudeerd op drie niveaus, namelijk 1) interacties tussen metabolieten uit een zelfde chemische klasse, 2) interacties tussen metabolieten uit verschillende chemische klassen en 3) interacties die plaatsvinden in combinatie met de natuurlijke chemische achtergrond van primaire metabolieten (PM's) en verschillende klassen van secundaire metabolieten (SM's).

2.1 Onderbouwing voor onderzoek aan interactie tussen metabolieten

Een mogelijke aanpak is om te starten met combinaties van metabolieten waarvan bekend is dat ze potentieel interacteren. Een voorbeeld hiervan wordt gevormd door saponinen in combinatie met metabolieten die moeilijk membranen passeren (Gee et al. 1996; Herrmann en Wink 2011). Ik heb de interacties in bioactiviteit onderzocht van PA's en CGA. We hebben deze combinatie gekozen op basis van kennis over deze twee metabolieten. Nuringtyas et al. (2014) beschrijven dat het mesofyl van *J. vulgaris* grote hoeveelheden

PA's bevat, terwijl CGA ophoopt in de epidermis. CGA vormt een π -moleculair complex met cafeïne (een purine alkaloid) (Mösli, Waldhauser en Baumann 1995). Een eerdere studie in *S. exigua* cel lijnen liet een antagonistische interactie zien tussen jacobine en CGA (Nuringtyas, PhD thesis, 2014). Dit verklaart mogelijk waarom PA's en CGA verdeeld zijn over verschillende cel lagen. Dit is van belang voor insecten die specifieke cellen eten. Voor knagende insecten zoals *S. exigua* zal verspreiding van PA's en CGA over verschillende cel lagen een antagonistisch effect niet voorkomen. Daarom heb ik de interactie tussen PA's en CGA bestudeerd in relatie met trips, een herbivoor die individuele cellen leeg zuigt. Ook bestuurdde ik de effecten van de meest voorkomende PA N-oxides in *J. vulgaris* op Californische trips (*Frankliniella occidentalis*), een generalistische herbivoor. Ik wilde onderzoeken of het veel voorkomen van PA N-oxides in planten, ondanks de relatief lage activiteit tegen herbivoren, verklaard kan worden door interacties tussen deze PA's.

In de gevallen waar geen voorkennis over metabolieten beschikbaar is, kan een 'top-down' benadering worden gebruikt: van metabooloom analyse naar component-interactie analyse. In hoofdstukken 5 en 6 heb ik de eerste stappen gezet voor een 'top-down' benadering om de interacties tussen metabolieten te bestuderen met twee soorten bioactiviteit, namelijk de effecten op trips zoals gemeten met een *in vitro* bio-assay (hoofdstuk 5) en mutageniteit zoals bepaald met de Ames test (hoofdstuk 6). Ik heb de bio-activiteit van individuele PA's bestudeerd wanneer deze waren toegevoegd aan hun natuurlijke chemische achtergrond (fracties van plant extracten). Deze eerste stap heeft een algemene indruk gegeven van het belang van interacties tussen metabolieten vanuit het perspectief van het metabooloom. Wanneer de bio-activiteit van een metaboliet vergroot wordt als het wordt toegevoegd aan een planten extract of een fractie daarvan, geeft dit een indicatie van het belang van interacties tussen de verschillende plant metabolieten voor die activiteit. Verdere sub-fractionering en recombineren van sub-fracties kan het aantal mogelijke kandidaten betrokken bij deze interacties reduceren.

Ik beschrijf in mijn proefschrift een methode om de sterkte van interacties tussen twee of meer componenten te berekenen. De ontwikkelde methode maakt het mogelijk om het patroon en de grootte van de interacties statistisch te toetsen. Voor de trips overleving heb ik een multiplicatief nulmodel geformuleerd. Dit kan gebruikt worden om de verwachte overleving te berekenen onder de aanname dat er geen interacties plaatsvinden. De gevonden overleving kan dan getoetst worden tegen de verwachting waarbij een hogere overleving dan verwacht duidt op antagonistische interacties en een lagere overleving op synergistische interacties (hoofdstuk 5). Voor de mutageniteit zoals gemeten met de Ames test is een additioneel model toegepast, omdat de kans op een terug mutatie erg klein is in vergelijking met het initiële aantal cellen (hoofdstuk 6). Een dergelijk kader staat niet alleen het testen van het bestaan van interactie effecten toe, maar ook van de verschillen in grootte.

2.2 Het effect van interacties tussen plant metabolieten en hun ecologisch belang

Interactie effecten van metabolieten binnen klassen van planten stoffen

Voorbeelden van interacties tussen metabolieten binnen een chemische klasse in plant-insect herbivoor associaties zijn de synergistische effecten van twee aardappel glycoalkaloïden op de slak *Helix aspersa* (Smith et al. 2001) en op de Khapra kever *Trogoderma granarium* (Nenaah 2011), het antagonistische effect van twee furanocoumarinen op *S. littoralis* (Diawara et al. 1993; Calcagno et al. 2002), het synergistische effect van piper amides op de mug *Aedes atropalpus* (Scott et al. 2002) en op *S. frugiperda* rupsen (Dyer et al. 2003; Richards et al. 2010) en het synergistische effect van twee iridoïde glycosiden op een specialistische rups *Junonia coenia* (Richards et al. 2012). Er zijn slechts enkele studies uitgevoerd naar interacties tussen PA's. Macel (2005) heeft een zwak synergistisch effect gevonden van een combinatie van vrije basen van senecionine, seneciphylline en senkirkine op *S. exigua* en van een mix van vrije basen van senecionine en seneciphylline op *L. migratoria*. Daarentegen heeft Siciliano et al. (2005) geen synergistisch effect gevonden van twee PA's van *Anchusa strigosa* op *S. exigua*. Beide studies hebben alleen interacties tussen vrije basen bestudeerd. Echter PA's komen in de plant voornamelijk voor als PA N-oxides en daarom is het ecologische relevanter om deze interacties te bestuderen. In hoofdstuk 2 zijn de meest voorkomende PA N-oxides van *J. vulgaris* gecombineerd, namelijk senecionine N-oxide, jacobine N-oxide en erucifoline N-oxide (Joosten et al. 2011). Tussen deze N-oxiden vonden we geen synergistisch (of antagonistisch) effect op trips overleving. Deze resultaten geven daarom geen verklaring waarom PA N-oxides de meest voorkomende vorm van PA's zijn in de plant. Ook geeft deze studie geen verklaring voor waarom er zo veel verschillende PA N-oxides aanwezig zijn in een enkele plant.

Interacties tussen metabolieten van verschillende chemische klassen

Antagonistische interacties tussen vrije base PA's en CGA.

In hoofdstuk 3 beschrijf ik antagonistische interacties tussen vrije base PA's en CGA van alle vijf geteste PA's in de effecten op trips. Vanuit de plant gezien vormen antagonistische interacties geen fitness voordeel. Daarom zijn deze interacties vanuit een ecologisch perspectief moeilijk te verklaren. Dit, en de eerdere bevinding dat PA's en CGA verdeeld zijn over verschillende cel lagen van *Jacobaea* bladeren (Nuringtyas et al. 2014) zou kunnen betekenen dat antagonistische effecten van vrije base PA's en CGA op trips een negatief gevolg zijn van de accumulatie van verschillende metabolieten in de plant (Nelson en Kursar 1999). Voor cafeïne en CGA is *in situ* beschreven dat ze een complex vormen met een ratio van 1:1 (Sondheimer et al. 1961; Horman en Viani, 1972; Chapman en Miller 1974). Als soortgelijke complexen gevormd worden tussen vrije base PA's en CGA dan is

te verwachten dat antagonistische interacties afhangen van de ratio van twee componenten. Ik heb inderdaad gevonden dat het effect van antagonistische interacties tussen vrije base PA's en CGA afhangt van de ratio. Er was echter te veel variatie in de metingen om de ratio die het sterkste antagonistische effect liet zien nauwkeurig genoeg te kunnen bepalen.

Het feit dat alle geteste vrije base PA's interacteerden met CGA duidt erop dat het necine deel van het PA molecuul betrokken is bij de interactie. Alle geteste vrije base PA's hebben een overeenkomende retronecine base, in tegenstelling tot de macrocyclische ring die verschillend van structuur is. Het kinazuur (quinic acid) deel van het CGA molecuul interacteerde antagonistisch met retrorsine, terwijl het caffeoyl deel dit niet doet. In hoofdstuk 3 heb ik de eerste stappen gezet tot modificatie van de functionele groepen van het PA molecuul, door additie of eliminatie van specifieke groepen of door wijzigingen van het substitutiepatroon, die gebruikt kunnen worden om de bindingsmechanismen verder te onderzoeken vanuit een chemisch perspectief.

Synergistische interacties tussen PA N-oxides en CGA op trips

Zoals eerder vermeld komen PA's in planten voornamelijk voor als N-oxides (Hartmann et al. 1989). PA N-oxides waren minder actief dan de corresponderende vrije basen wanneer deze individueel werden getest op trips overleving (hoofdstuk 2). Daarom is het van ecologisch belang om interacties tussen PA N-oxides en andere SM's zoals CGA op trips overleving te bestuderen. In hoofdstuk 4 vond ik synergistische interacties tussen PA N-oxides en CGA op trips overleving. Hoewel de sterkte van de interacties varieerde, was het patroon voor alle geteste PA N-oxides hetzelfde. Vervolgens heb ik de interactie effecten van de combinaties van vrije base PA's en CGA vergeleken met de combinaties van overeenkomende PA N-oxides en CGA op trips overleving. Verrassend genoeg vond ik dat welke vorm van de PAs het meest effectief was tegen trips afhangt van de concentratie van CGA. Het CGA molecuul verminderde de bio-activiteit van de vrije base PA's en vergrootte de bio-activiteit van PA N-oxides tegen trips. Deze bevindingen geven een alternatieve verklaring voor waarom PA N-oxides in grotere hoeveelheden voorkomen in planten dan vrije base PA's. Deze verklaring wordt echter niet ondersteund door de resultaten van hoofdstuk 5 waarin ik synergistische interacties op trips overleving heb gevonden tussen zowel retrorsine als retrorsine N-oxide en twee fracties van een methanol extract van *Jacobaea* planten. In het geval van PA N-oxides geeft het vinden van synergistische effecten een nieuw inzicht in de afweer functies van PA N-oxides. Ook hier geven de resultaten een ecologisch gedreven alternatief voor het in grote hoeveelheden opslaan van PA N-oxides in planten, als aanvulling op de fysisch-chemische verklaring dat N-oxides beter oplosbaar zijn in water en daarom makkelijker opgeslagen kunnen worden in de vacuole of getransporteerd kunnen worden door de plant (von Borstel et al. 1986).

Er wordt verondersteld dat synergistische interacties van ecologisch en evolutionair belang zijn in de relatie tussen planten en hun omgeving. Resultaten van hoofdstuk 4 en andere studies suggereren dat de bioactiviteit van individuele SM's versterkt kan worden in samenwerking met andere SM's. Rutine bijvoorbeeld heeft op zichzelf geen negatief effect op de groei van de rups *S. exigua*, terwijl CGA een licht negatief effect heeft, maar samen hebben ze een sterk negatief effect (Stamp en Yang 1996). Synergistische interacties kunnen voordelig zijn voor de verdediging van de plant doordat ze tot een hogere toxiciteit leiden tegen lagere kosten (Nelson en Kursar 1999; Ryabushkina 2005). Op basis daarvan is het te verwachten dat natuurlijke selectie er toe leidt dat synergistische interacties tussen metabolieten in plant-herbivoor interacties vaker voorkomen dan antagonistische.

Interacties tussen plant metabolieten met hun natuurlijke chemische achtergrond

In de eerste hoofdstukken bestudeerde ik de interacties tussen bekende plant metabolieten door ze te combineren, volgens een 'bottom-up' benadering. In de overige hoofdstukken heb ik een 'top-down' benadering gebruikt om interacties tussen plant metabolieten in hun natuurlijke chemische achtergrond te onderzoeken. In hoofdstuk 5 heb ik de effecten op trips overleving bestudeerd. In hoofdstuk 6 heb ik de mate van mutageniteit gebruikt. De laatste heb ik bepaald in de Ames test. Fracties van een methanol extract van *J. vulgaris* blad verschilden in bio-activiteit in de Ames test. Vooral de chloroform fractie vertoonde een hogere mutageniteit. Na (sub-) fractionering konden we geen bio-activiteit meer meten. Door de fracties opnieuw samen te voegen werd de activiteit weer hersteld. Dit wijst er op dat door (sub-) fractionering de synergistische interacties tussen de metabolieten werden verloren. Ook in de experimenten met trips gaf fractionering een verlies van bio-activiteit. De fracties van *J. vulgaris* planten verschilden in hun mutageniteit en hun anti-herbivoor effect. We vonden geen correlatie tussen de bio-activiteit van de fracties en hun alkaloïde gehalten. Dit duidt er op dat naast alkaloiden andere metabolieten een grote rol spelen in de bio-activiteit van de geteste fracties. Hoewel het buiten de scope van dit proefschrift valt, zou verdere sub-fractionering en identificatie het mogelijke aantal metabolieten betrokken bij deze bio-activiteit verder kunnen reduceren.

In hoofdstuk 5 en 6 heb ik de eerste stappen gezet van een 'top-down' benadering door individuele PA's toe te voegen aan verschillende fracties om zo de interacties tussen plant metabolieten op metabool niveau te bestuderen, en tegelijkertijd te bepalen hoe de natuurlijke chemische achtergrond de bio-activiteit van de individuele metabolieten beïnvloedt. In hoofdstuk 5 interacteren zowel retrorsine als retrorsine N-oxide synergistisch met de chloroform en *n*-butanol fracties in hun effect op trips overleving. In hoofdstuk 6 beschrijf ik hoe de chloroform en ethyl acetaat fracties van *J. vulgaris* spruiten de mutageniteit van retrorsine liet toenemen, terwijl hexaan, *n*-butanol en water fracties de mutageniteit van retrorsine lieten afnemen. Gezien de PA hoeveelheid in deze fracties lijkt het er op dat de interacties tussen PA's en andere SM's het uiteindelijke effect van de

interacties tussen PA's en de fracties domineren. Samengenomen wijzen de resultaten van hoofdstuk 5 en 6 erop dat de natuurlijke chemische achtergrond een sterke invloed heeft op de bio-activiteit van individuele SM's in zowel positieve als negatieve zin.

Het belang van de natuurlijke achtergrond

Plant extracten en fracties kunnen effectief gebruikt worden om interacties tussen plant metabolieten te meten in een natuurlijke achtergrond, zonder dat er voorkennis over de betrokken metabolieten nodig is. Het kan helpen de bio-activiteit van individuele plant metabolieten in een natuurlijke achtergrond te bestuderen om plant-insect herbivoor interacties beter te begrijpen. Tot nu toe er is nog slechts anekdotisch bewijs voor het belang van de natuurlijke achtergrond in een ecologische context. Dit proefschrift heeft hiervoor een belangrijke eerste stap gezet.

Dit proefschrift ondersteunt de algemene opvatting dat chemische afweer van een plant afhangt van de variatie in aanwezige metabolieten, die samen vorm geven aan de effectiviteit van de afweer. Interacties tussen plant metabolieten kunnen nieuwe of aanvullende informatie geven over de bioactiviteit van individuele SM's. Interactie effecten van plant metabolieten kunnen ook verklaren waarom sommige SM's activiteit vertonen in bepaalde plant soorten terwijl ze dit niet doen in andere. Bijvoorbeeld CGA in *chrysanthemum* is negatief gecorreleerd met voedingsschade door trips *Frankliniella occidentalis* (Leiss et al. 2009), terwijl geen effect van CGA op deze trips is gemeten in tomaat *Solanum lycopersicum* (Mirnezhad 2011). Kennis over interacties van metabolieten kan ook toegepast worden op multi-component materialen. Bijvoorbeeld de anti-proliferatieve activiteit van quercetin 3- β -D-glucoside tegen borstkankercellen in mensen wordt verviervoudigd in combinatie met appel extracten (Yang en Liu 2009).

3 Hoofdconclusies en toekomst perspectieven

Verder onderzoek naar de interacties tussen plant metabolieten moet met een aantal punten rekening houden. Ten eerste is er een tekort aan kennis over de mechanismen die tot interacties leiden. Verder onderzoek naar fysisch-chemische en fysiologische processen zal waardevolle informatie opleveren. Vanuit een fysisch-chemisch perspectief kunnen metabolieten de oplosbaarheid en/of de resorptiegraad van andere metabolieten en daarmee de biologische beschikbaarheid er van beïnvloeden (Amin et al. 2015). Ook fysiologische processen, zoals de afbraakstofwisseling of de activiteit van enzymen die betrokken zijn bij de detoxificatie in het insect kunnen bepalend zijn voor interactieve effecten, (Stermitz et al. 2000; Scott et al. 2002). Ten tweede moet het belang van antagonistische effecten in acht genomen worden. Als derde kan compartimentering van plant metabolieten tussen verschillende cel organellen, cellen, cel lagen en andere organen bijdragen aan plant afweer door het stimuleren van synergistische of het voorkomen van antagonistische interacties.

Daarom is het belangrijk om in eerste instantie chemische analyses van SM's in deze compartimenten uit te voeren, om te identificeren welke metabolieten tegelijk voorkomen en welke niet. Ten slotte zijn er weinig voorbeelden van interactieve effecten van plant metabolieten in de context van plant-herbivoor associaties. Dit is waarschijnlijk ook het geval voor andere ecologische relaties. Om plant-omgeving interacties mechanistisch en ecologisch te kunnen begrijpen is een gezamenlijke inspanning nodig van verschillende onderzoeksvelden. In dit proefschrift zijn de eerste stappen gezet voor zowel een 'bottom-up' als een 'top-down' benadering. Gezien het enorme aantal plant metabolieten is het een uitdaging om het grote aantal mogelijke combinaties die van belang zijn te onderzoeken. Deze taak is onmogelijk met de bio-assay's die ontwikkeld zijn voor dit proefschrift. Ontwikkeling van high-throughput screening methoden, zoals veel toegepast in farmacologische studies, is daarvoor van essentieel belang. Bijvoorbeeld receptorgerichte benaderingen zijn op grote schaal toegepast in geneesmiddel ontwikkeling. Vanuit een mechanistisch perspectief kunnen de effecten van interacties tussen metabolieten veroorzaakt worden door blokkeren of verstoren van een membraan gebonden receptor functie. Ramipril bijvoorbeeld remt de angiotensine receptor waardoor de anti hoge bloeddruk werking van candesartan-cilexetil wordt gefaciliteerd (Raasch et al. 2004). Benaderingen gebaseerd op receptor activiteit zouden kunnen worden gebruikt als screening strategie. Een andere benadering is het gebruik van cel lijnen voor bio-activiteit screening. Hoewel cel lijnen voor trips momenteel nog niet beschikbaar zijn, is het wel mogelijk cel lijnen te gebruiken van andere herbivoren, zoals die voor de floridamot *S. exigua*. Dergelijke cel lijnen zijn eerder gebruikt in de onderzoeksgroep (Nuringtyas et al. 2014). De effecten van de interacties tussen vrije base PA's en CGA in *S. exigua* cel lijnen (Nuringtyas et al. 2014) kwamen overeen met die in trips larven (hoofdstuk 3). Bioassay's in cel lijnen zijn echter niet representatief voor metaboolom veranderingen die kunnen plaatsvinden door afbraak stofwisseling of opname (zie review van Yoon et al. 2012). Ondanks dit nadeel kunnen cel lijnen wel goed toegepast worden bij initiële screening en selectie van kandidaat metabolieten of combinaties van metabolieten, die vervolgens verder onderzocht kunnen worden in levende organismen.

Dit proefschrift maakt duidelijk dat de interacties tussen plant metabolieten belangrijk zijn bij plant-insect herbivoor relaties. Verschillende conclusies komen naar voren. Ten eerste dat PA's de trips overleving verlagen, hetgeen wijst op een rol van PA's bij de afweer tegen insecten. Sommige PA's zijn actiever dan andere. Ten tweede beïnvloeden combinaties van plant metabolieten trips overleving meer of minder dan op basis van de activiteit van de afzonderlijke metabolieten verwacht kan worden. Dit geeft aan dat interacties tussen plant metabolieten in acht genomen moeten worden als we het afweer systeem van planten bestuderen. Als derde spelen interacties van plant metabolieten in plant extracten en fracties daarvan een rol bij trips overleving en mutageniteit. Ik laat zien dat de bio-activiteit van individuele metabolieten sterk beïnvloedt wordt door hun natuurlijke biochemische

Samenvatting en discussie

achtergrond, die de effectiviteit kan versterken of verzwakken. Daarom moet er rekening gehouden worden met de chemische achtergrond bij het ontwerpen van bio-assay's.