



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **The evolution of chemical diversity in plants : pyrrolizidine alkaloids and cytochrome P450s in *Jacobaea***

Chen, Y.

### **Citation**

Chen, Y. (2020, January 29). *The evolution of chemical diversity in plants : pyrrolizidine alkaloids and cytochrome P450s in Jacobaea*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/83487>

Version: 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/1887/83487>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/83487> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Chen, Y.

**Title:** The evolution of chemical diversity in plants : pyrrolizidine alkaloids and cytochrome P450s in *Jacobaea*

**Issue Date:** 2020-01-29

---

## Nederlandse samenvatting

Planten produceren een verbazingwekkende verscheidenheid aan secundaire metabolieten (SMs), kleine organische moleculen waarvan wordt gedacht dat ze een vitale rol spelen in de ecologische interacties van een plant met z'n omgeving (Wink, 2003; Moore *et al.*, 2014). SMs zijn van belang voor de relaties van planten met antagonisten zoals herbivoren, pathogenen en naburige planten en met mutualisten zoals bestuivers, predatoren, parasitoïden van herbivoren, mycorrhiza en nuttige bacteriën. Verder zijn SMs betrokken bij de bescherming tegen abiotische factoren zoals UV-licht, droogte en vorst (Kessler and Halitschke, 2007). De meest karakteristieke kenmerken van SMs zijn hun grote chemische diversiteit en de grote variatie binnen en tussen soorten. Momenteel zijn er circa 200.000 SMs geïdentificeerd uit planten (Kessler en Kalske, 2018). SMs komen voor als klassen van chemische verwante stoffen zoals bv. glucosinolaten, alkaloiden, terpenoiden en flavonoiden. Alle chemische klassen van SMs vertonen in vrijwel alle planten zowel kwalitatieve als kwantitatieve variatie. In *Arabidopsis thaliana* zijn bijvoorbeeld 34 verschillende glucosinolaten geïdentificeerd, met een 20-voudig verschil in totale concentratie in de bladeren tussen verschillende ecotypes (Kliebenstein *et al.*, 2001). Vooralsnog is er weinig kennis over hoe SM diversiteit tot stand komt in planten en waarom deze variatie gehandhaafd blijft in de natuur (Moore *et al.*, 2014).

Dit proefschrift beschrijft studies aan SMs die betrokken zijn bij de afweer van planten tegen herbivoren. Om een beter inzicht te krijgen in SM diversiteit, hebben verschillende wetenschappers de verspreidingspatronen van bepaalde SM klassen over de takken van fylogenetische bomen van plantenfamilies bestudeerd (Wink, 2003; Wink, 2008; Pelser *et al.*, 2005; Mint Evolutionary Genomics Consortium, 2018). Op het niveau van een bepaalde klasse van SMs (bv. quinolizidine alkaloiden, pyrrolizidine alkaloiden of glucosinolaten) zijn er nagenoeg altijd sterke fylogenetische signalen aanwezig. Dit suggereert dat wanneer binnen een fylogenetische tak de basisstructuren van een bepaalde klasse van SMs zijn ontstaan, deze worden behouden en dat convergente evolutie zeldzaam is. Daarentegen is het voorkomen van verschillende chemische modificaties van deze basisstructuren binnen een fylogenetische tak vaak willekeurig. Dat wil zeggen dat bepaalde SMs binnen een klasse geen fylogenetische signalen laten zien en dat de fylogenetische afstanden tussen soorten niet gecorreleerd zijn met verschillen in SM samenstellingen tussen die soorten binnen een bepaalde klasse van SMs (Pelser *et al.*, 2005; Mint Evolutionary Genomics Consortium, 2018; Hoofdstuk 2). Dit suggereert dat zulke modificaties binnen een klasse van SMs op een evolutionaire tijdschaal snel kunnen verdwijnen of opnieuw kunnen ontstaan. Een evolutionaire verklaring zou kunnen zijn dat de basisstructuren die helpen planten te beschermen tegen een breed scala van herbivoren op een bepaald moment zijn geëvolueerd en dat verdere evolutionaire afstemming afhankelijk is van de selectieve effecten van de specifieke set van generalistische en gespecialiseerde herbivoren waarmee elke plantensoort wordt geconfronteerd op een bepaald moment op een evolutionaire tijdschaal. Op moleculair niveau suggereert het feit dat nieuwe klassen van SMs in veel plantenfamilies niet snel ontstaan dat de enzymatische aanpassingen

---

die nodig zijn om de basisstructuren te maken relatief complex zijn. De verdere diversificatie van een nieuw geëvolueerde klasse van SMs omvatten relatief eenvoudige chemische reacties zoals oxidaties en methylaties die door meer algemene enzymen die al in de plant aanwezig zijn kunnen worden uitgevoerd. De meerdere functies van een dergelijk enzym kunnen vervolgens gereduceerd worden tot een enkele functie door duplicatie van het onderliggende gen. Eén kopie kan dan voor de oude functie blijven zorgen terwijl de andere kopie geoptimaliseerd kan worden voor de nieuwe functie (Hughes, 1994; DePristo, 2007). Een voorbeeld is de grote gen familie van de cytochroom P450s (CYPs) waarvan de leden grote overeenkomst vertonen en snel dupliceren en evolueren (Bak *et al.*, 2006; Frey *et al.*, 2009; Hoofdstuk 3). Blijkbaar leidt een dergelijke snelle evolutie tot een snelle aanpassing van hun functie maar daardoor ook tot een verlies van een fylogenetisch signaal in de resulterende SMs. Het lijkt zeer waarschijnlijk dat het proces van evolutionair knutselen bovendien wordt versneld door genetische veranderingen in de expressie van CYPs. Het onderzoeken van de diversiteit van zowel SM profielen als van de variatie in de CYP familie in planten kan inzicht verschaffen in de evolutie van SM biosynthese routes.

De pyrrolizidine alkaloiden (PAs) van het geslacht *Jacobaea* zijn in dit proefschrift als modelsysteem gebruikt. PAs zijn een klasse van SMs met een grote diversiteit. PAs worden constitutief gevormd in planten en er wordt verondersteld dat ze een rol spelen in de interacties tussen planten en herbivoren (Hartmann, 1999). De soorten binnen het geslacht *Jacobaea* (26 soorten die voorheen deel uitmaakten van het geslacht *Senecio* in de familie Asteraceae) produceren allemaal PAs (Pelser *et al.*, 2005; Langel *et al.*, 2011) maar de samenstelling en concentratie zijn vaak soort-specifiek (Soldaat *et al.*, 1996; Hartmann en Dierich, 1998; Langel *et al.*, 2011). Niettemin lijken individuele PAs willekeurig verdeeld te zijn over de fylogenetische boom van het *Jacobaea* geslacht (Pelser *et al.*, 2005). Twee hypothesen kunnen het willekeurige voorkomen van de verschillende PAs in *Jacobaea* soorten verklaren. Dit zijn (i) convergente evolutie waarbij het vermogen van plantensoorten om bepaalde PAs te produceren verschillende keren is geëvolueerd, en (ii) differentiële genregulatie van PA biosynthese enzymen, waarbij alle plantensoorten over de enzymen beschikken om alle verschillende PAs te produceren, maar deze niet in alle soorten in gelijke mate tot expressie komen. Om er achter te komen welke hypothese juist is, is het noodzakelijk om de genen die ten grondslag liggen aan de PA biosyntheseroute en hun expressie te onderzoeken.

Tot nu toe zijn er meer dan 400 PAs geïsoleerd (Chou en Fu, 2006), waarvan er meer dan 100 van het senecionine-type zijn (Hartmann en Witte, 1995; Langel *et al.*, 2011). Het merendeel van onze huidige kennis van de diversiteit van PAs is gebaseerd op studies aan senecionine-type PAs met een 12-ledige macrocyclische ring die voorkomen in de onderfamilie *Senecioneae* (Langel *et al.*, 2011). De precursor senecionine *N*-oxide wordt gemaakt in de wortels (Hartmann en Toppel, 1987; Hartmann *et al.*, 1988; Hartmann *et al.*, 1989) waarna het naar de bovengrondse delen van de plant wordt getransporteerd alwaar positie-specifieke en stereoselectieve transformaties plaatsvinden die resulteren in bijvoorbeeld de herschikking van de ringstructuur en/of verschillende oxidatieve modificaties

---

(Hartmann en Dierich, 1998; Pelser *et al.*, 2005). De enzymen die verantwoordelijk zijn voor deze omzettingen zijn nog niet geïdentificeerd. CYPs katalyseren een breed scala van positie-specifieke en stereospecifieke oxidatiestappen in de SM biosynthese in planten (Renault *et al.*, 2014) en spelen daarom een belangrijke rol in de evolutie van chemische diversiteit. Het veelvuldig voorkomen van epoxide-, hydroxyl- en dubbel gebonden zuurstof-groepen in PAs suggereert dat CYPs zeer waarschijnlijk betrokken zijn bij de PA biosynthese.

In dit proefschrift worden de volgende vragen gesteld: Wat zijn de distributiepatronen van PAs in *Jacobaea* soorten en zijn deze patronen gerelateerd aan de fylogenetische afstand tussen deze soorten? Hoe komt de waargenomen PA diversiteit tot stand? Zijn CYPs betrokken bij de PA biosynthese? Naar aanleiding van deze vragen kunnen de experimentele hoofdstukken van dit proefschrift in twee groepen worden verdeeld: (i) de evolutie van de diversiteit in PAs binnen en tussen *Jacobaea* soorten (Hoofdstuk 2), (ii) het gericht onderzoeken of CYPs een rol spelen in de PA diversiteit door middel van een kandidaat-gen benadering (Hoofdstuk 3-5).

### **(i) De evolutie van PA diversiteit binnen en tussen *Jacobaea* soorten**

Studies beschreven in hoofdstuk 2 zijn gericht op een beter begrip van het mechanisme achter de chemische diversiteit van de PAs van *Jacobaea* soorten vanuit een fylogenetische context. De aanwezigheid en concentraties van 80 PAs in acht tot tien weken oude bladeren van 17 *Jacobaea* soorten, met monsters van verschillende individuen en uit verschillende populaties die zijn opgekweekt in een klimaatkamer, zijn geanalyseerd met LC-MS/MS. Een grote diversiteit aan PA profielen is hierbij waargenomen waarbij het aantal PAs varieerde van 21 tot 59 per soort en met totale PA concentraties die varieerden tussen 32,9 tot 3835,7 µg/g drooggewicht. Zowel kwalitatieve als kwantitatieve PA profielen bleken soort-specifiek te zijn en deze bevestigen de resultaten van eerdere onderzoeken (Soldaat *et al.*, 1996; Hartmann and Dierich, 1998; Langel *et al.*, 2011). Jacobine-achtige, senecionine-achtige en otosenine-achtige PAs droegen het meest bij aan de soort-specifieke PA verschillen van de *Jacobaea* soorten. De verschillen tussen de PA samenstellingen van verschillende populaties binnen sommige *Jacobaea* soorten (bijvoorbeeld *J. alpina* en *J. paludosa*) waren groter dan de verschillen tussen de PA samenstellingen van sommige soorten. Om de evolutie van PA diversiteit op soortniveau te begrijpen is de moleculaire fylogenie van de 17 *Jacobaea* soorten gereconstrueerd met behulp van 11 chloroplast en drie nucleaire DNA markers. Door het voorkomen van de individuele PAs op de takken van de gereconstrueerde fylogenetische boom te plaatsen werd duidelijk dat het voorkomen van vrijwel alle PAs meerdere keren is geëvolueerd. Dit is in overeenstemming met eerdere bevindingen van Pelser *et al.* (2005). Twee verschillende maten, Blomberg's K (Blomberg, 2003) en Pagel's  $\lambda$  (Pagel, 1999), zijn gebruikt om de correlaties tussen kwantitatieve PA eigenschappen en fylogenetische relaties te evalueren. Significante fylogenetische signalen zijn alleen onder de  $\lambda$  statistieken gevonden voor negen van de 80 PAs. Gezien de algemene intraspecifieke PA diversiteit gevonden in *Jacobaea* soorten (dit proefschrift; Witte *et al.*, 1992; Macel *et al.*, 2004), kan worden

---

aangenomen dat deze hoge PA diversiteit waarschijnlijk te wijten is aan de regulatie van PA biosynthesegenen in planten als levensstrategie om te voldoen aan hun verschillende biologische behoeften, in plaats van aan de evolutionaire winsten en verliezen van bepaalde PA biosynthesegenen.

**(ii) Een kandidaat-gen benadering gericht op CYPs voor hun betrokkenheid bij het tot stand komen van de PA diversiteit**

Om de hypothese, dat de PA diversiteit in *Jacobaea* soorten het resultaat is van de regulatie van PA biosynthese genen, te testen, is kennis nodig over de genen betrokken bij PA biosynthese. CYPs vormen grote gen families binnen soorten en spelen vaak een rol in de biosyntheseroutes van SMs. De diversificatie van PAs komt vaak tot stand door positie-specifieke oxidaties (Hartmann and Dierich, 1998; Pelsler *et al.*, 2005), wat het waarschijnlijk maakt dat CYPs betrokken zijn bij de PA biosynthese. Er was echter nog geen CYP database van *Jacobaea* soorten beschikbaar aan het begin van deze studie. Daarom is een systematische studie van CYPs uitgevoerd met betrekking tot hun diversiteit en evolutie in *J. vulgaris* en *J. aquatica* zoals beschreven in hoofdstuk 3. In totaal zijn respectievelijk 221 (verdeeld over acht clans en 38 families) en 157 (verdeeld over acht clans en 35 families) CYPs van volledige lengte geïdentificeerd uit *de novo* geassembleerde transcriptomen van respectievelijk *J. vulgaris* en *J. aquatica*. De CYPs die op basis van de KEGG database zijn aangewezen als mogelijk betrokken bij SM biosynthese behoren allemaal tot de CYP71 clan. Geen van de gevonden CYPs werd geannoteerd als mogelijk betrokken bij alkaloid biosynthese. Dit betekent niet noodzakelijk dat CYPs niet betrokken zijn bij de biosynthese van PAs, omdat de huidige KEGG database geen informatie bevat over enzymen die betrokken zijn bij PA biosynthese. Een fylogenetische analyse van de zes grootste CYP families (CYP71, CYP76, CYP706, CYP82, CYP93 en CYP72) van de twee *Jacobaea* soorten, twee andere leden van de familie van de Asteraceae, *Helianthus annuus* en *Lactuca sativa*, en de outgroup *A. thaliana* is uitgevoerd. De fylogenetische bomen vertoonden een sterke soort-specifieke expansie van CYPs, wat suggereert dat de evolutie van CYPs zeer snel is geweest, zelfs binnen de Asteraceae familie. Alleen CYPs van de nauw verwante soorten *J. vulgaris* en *J. aquatica* werden vaak in paren in een terminale clade gevonden, wat een nauwe relatie in de evolutionaire geschiedenis van deze twee soorten bevestigt. De studies beschreven in hoofdstuk 3 hebben geresulteerd in een CYP database voor toekomstige verkenning van hun functies, inclusief mogelijke betrokkenheid bij PA biosynthese en diversiteit.

Hoofdstuk 4 beschrijft een poging tot het identificeren van kandidaat CYPs, welke een rol zouden kunnen spelen in de PA biosynthese, gebaseerd op de associatie tussen PA en CYP transcript profielen van de twee *Jacobaea* soorten, opgegroeid onder gecontroleerde omstandigheden. De contrasten in constitutief aanwezige jacobine-achtige en erucifoline-achtige PAs tussen *J. aquatica* en vier groepen van F<sub>2</sub> hybriden van een kruising tussen *J. vulgaris* en *J. aquatica* zijn gebruikt om kandidaat CYPs te selecteren. Daarnaast zijn de contrasten in profielen gebruikt tussen in weefselkweek opgegroeide *J. vulgaris* planten die

---

behandeld zijn met methyl-jasmonaat (MeJA) om een toename in erucifoline-achtige PAs te induceren en niet-behandelde planten. In totaal zijn 44 PAs gedetecteerd door middel van LC-MS/MS en PA profielen van de verschillende *Jacobaea* monsters zijn onderling vergeleken in de constitutieve en geïnduceerde PA groepen door middel van het optellen van de concentraties van PAs met dezelfde positie-specifieke oxidatieve modificaties, welke aangebracht zouden kunnen worden door een CYP enzym, nl. 15,20-epoxidatie, 12,12-epoxidatie, 19-hydroxylatie, 18-hydroxylatie, 13,19-dehydrogenatie en 8-oxidatie. De sequenties van de transcriptomen zijn voor alle groepen en behandelingen apart bepaald om het expressieniveau van de CYP genen te kunnen vergelijken. In totaal zijn er voor de constitutieve en geïnduceerde PA conversies respectievelijk 33 en 27 CYP kandidaten gevonden. De meeste van deze CYP kandidaten met onbekende functie behoren tot de CYP71 clan. Kandidaten behorende tot 11 CYP subfamilies werden zowel in de constitutieve als in de MeJA-geïnduceerde groep gevonden, waarvan kandidaten uit drie subfamilies (CYP72A, CYP706E, CYP82Q) verantwoordelijk zouden kunnen zijn voor de vorming van erucifoline-achtige PAs die zowel 12,13 epoxidatie als 19-hydroxylatie bevatten.

Hoofdstuk 5 beschrijft het functioneel testen van acht CYP kandidaten voor hun betrokkenheid bij de PA biosynthese door middel van heterologe expressie in gist en een *in vitro* enzymtest met microsomale membraanpreparaten die naar verwachting de tot expressie gebrachte CYPs bevatten. Bij geen van de acht CYP enzympreparaten is met de gebruikte PA substraten (senecionine/integerrimine, seneciphylline, jacobine, erucifoline, en een PA mix of hun respectievelijke *N*-oxiden) conversie vastgesteld. Redenen voor deze negatieve resultaten zouden te lage CYP expressieniveaus of suboptimale reactiecondities kunnen zijn. Waarschijnlijker is echter dat de acht geteste CYP enzymen niet verantwoordelijk zijn voor PA biosynthese.

## Conclusies

*Jacobaea* soorten worden vaak gebruikt voor de bestudering van de diversiteit van PAs (Vrieling *et al.*, 1993; Hartmann and Dierich, 1998; Macel *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2011). Vergeleken met eerdere studies was een andere invalshoek van dit proefschrift onderzoek naar de kwalitatieve en kwantitatieve variatie in PAs tussen soorten, populaties en individuen. De resultaten tonen aan dat de PA samenstellingen van *Jacobaea* soorten inderdaad soort-specifiek zijn, zowel in concentratie als in compositie. Hoewel er voor sommige soorten ook grote verschillen zijn tussen de PA samenstellingen van populaties. Dit is de eerste studie die laat zien dat concentraties en composities van PAs binnen en tussen *Jacobaea* soorten sterk vergelijkbare patronen laten zien, daarmee implicerend dat dezelfde of sterk verwante mechanismen een rol spelen bij het tot stand komen van de variatie in PA concentraties en composities.

De aan- en afwezigheid van individuele PAs is bestudeerd op soortniveau, waarbij slechts voor weinig PAs een fylogenetisch signaal werd gevonden. Het lijkt erop dat alle *Jacobaea* soorten de machinerie voor PA productie bezitten maar dat de verschillen in het voorkomen

---

van PAs het gevolg zijn van differentiële expressie van de biosynthesegenen. Gebaseerd op het feit dat de diversiteit in PAs met name voortkomt uit oxidatiereacties zijn CYPs, een belangrijke klasse van oxidatieve enzymen in planten, gekozen als mogelijke kandidaten voor PA biosynthese genen. De in dit proefschrift beschreven CYP databank is de eerste voor *Jacobaea* soorten. Een gen-tot-metaboliet aanpak is gebruikt om CYP kandidaat genen, welke mogelijk betrokken zouden kunnen zijn bij de PA biosynthese, te identificeren. Vervolgens zijn de functies van acht kandidaat CYP enzymen getest. Hierbij is echter geen indicatie gevonden dat zij een rol zouden spelen bij de biosynthese van PAs. De meerderheid van de in hoofdstuk 4 geïdentificeerde kandidaat genen moeten echter nog functioneel getest worden. Het is verder van belang om in het oog te houden dat de enzymen betrokken bij PA biosynthese niet noodzakelijkerwijs CYPs zijn, maar ook zouden kunnen behoren tot andere klassen van oxidatieve enzymen zoals peroxidases of flavine-afhankelijke mono-oxygenases (Burton, 2003). Omdat deze enzymklassen ook karakteristieke aminozuursequentiemotieven hebben, kunnen de betreffende gen families en kandidaat genen via gen-tot-metaboliet correlaties ook verkregen worden uit de sequentiedata en de metabolietgegevens beschreven in hoofdstuk 4.