

Gesunde Früchtchen

KBBE – Genetische Genomik zur Verbesserung der ernährungsphysiologischen Qualität der Erdbeerfrucht (Fragenomics). Der Verzehr von Lebensmitteln, welche reich an sekundären Pflanzenstoffen sind, kann das Risiko an bestimmten chronischen Leiden zu erkranken reduzieren. Erdbeerfrüchte (*Fragaria x ananassa* Duch.) stellen eine reiche Quelle an Phytochemikalien dar, die starke anti-oxidative, anti-kanzerogene, anti-atherosklerotische und anti-neurodegenerative Eigenschaften sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aufweisen. Ein besseres Verständnis der genetischen Kontrolle von Merkmalen, die die Bildung der wertvollen pflanzlichen Nahrungsmittelbestandteilen beeinflussen, soll zur Entwicklung von molekularen Markern genutzt werden. Diese ermöglichen die Entwicklung von neuen Sorten mit hohen Gehalten an gesundheitsfördernden Inhaltsstoffen in optimierten Züchtungsprogrammen.

Wilfried Schwab, Anja Preuß und Ludwig Ring

Die Erdbeere und ihre Sekundärstoffe

Die attraktive und wohlschmeckende Erdbeere (*Fragaria x ananassa* Duch) zählt zu den wichtigsten Früchten der gemäßigten Klimazonen der Erde. Sie weist einen hohen Nährwert auf und wird entweder direkt an die Verbraucher oder als Ausgangsmaterial für die verarbeitende Lebensmittelindustrie verkauft. Die Zeitspanne zwischen Blüte und Ernte ist bei der Erdbeere sehr kurz. Umso stärker wirken sich Witterung und Kulturmaßnahmen auf die Streubreite der Inhaltsstoffe bei derselben Sorte von Frucht zu Frucht, von Pflanze zu Pflanze und von Standort zu Standort aus. Auch im Verlauf der Saison schwanken die Gehalte der wertgebenden Inhaltsstoffe wie Kohlenhydrate, Mineralstoffe und Vitamine stark. Daneben enthalten die roten Früchtchen Phytochemikalien, die der Pflanze als Schutz- und Abwehrstoffe gegen Schädlinge, als Farb-, Duft- oder Lockstoffe und als pflanzeigene Hormone dienen. Früher wurde angenommen, dass diese sekundären Pflanzenstoffe, im Gegensatz zu den Primärstoffen wie Kohlenhydrate, Fette und Proteinen für die menschliche Ernährung unbedeutend sind. Sie kommen in Pflanzen nur in geringen Mengen vor, weshalb man ihnen lange Zeit keine große Beachtung schenkte. Erst in letzter Zeit wurde der Wert dieser Verbindungen erkannt. Sekundäre Pflanzenstoffe üben im menschlichen Körper eine Vielzahl von Schutzfunktionen aus. So können sekundäre Pflanzenstoffe u.a. das Immunsystem stärken (immunmodulierend), den Körper vor freien Radikalen schützen (anti-oxidativ), Krankheitserreger abtöten (anti-mikrobiell) und das Krebsrisiko senken (anti-kanzerogen). Viele Wirkungen sind allerdings noch unbekannt. Auch der exakte Bedarf der einzelnen Stoffe ist bisher nicht geklärt. Sie werden aber inzwischen, was ihre Bedeutung für die Gesundheit angeht, auf eine Stufe mit Vitaminen, Mineralstoffen und Ballaststoffen gestellt

und als wichtiger Schutzfaktor gegen das Auftreten vieler Erkrankungen angesehen.

In der Erdbeere sind vor allem die Polyphenole (Phenolsäuren, Flavonoide, Anthocyane, Ellagitannine und Gallotannine) reich vertreten. Als Hauptfarbstoffe wurden Pelargonidin- und Cyanidin-3-O- β -D-glucopyranosid identifiziert. Weiterhin konnten u.a. verschiedene Quercetin- und Kaempferol-glucoside sowie Cinnamoyl-, Feruloyl- und Caffeoylester nachgewiesen werden. Polyphenole sollen die Pflanze vor Schädlingen und UV-Licht schützen oder durch ihre Farbe Insekten zur Bestäubung und Tiere zur Verbreitung der Samen anlocken. Weiterhin sind sie Grundbausteine wichtiger Zellwand-Biopolymere wie Lignin und Suberin und damit für die Festigkeit pflanzlicher Gewebe verantwortlich. Die verschiedenen Mitglieder dieser Naturstoffgruppe entstammen den Shikimisäure- und nachfolgenden Phenylpropanoid-Stoffwechsel, deren grundlegenden Gene und Enzyme in den letzten Jahren isoliert und identifiziert wurden. Die Initiation und Regulation der komplexen Biosynthesewege ist Gegenstand laufender Forschungsaktivitäten. So konnte kürzlich das dem Birkenpollenallergen homologe Erdbeerprotein Fra a erstmals als ein den Anthocyan-Biosyntheseweg regulierendes Protein charakterisiert werden (Munoz *et al.*, 2010). Die transiente Herabregulation des Fra a kodierenden Gens mittels RNA-Interferenz (RNAi) erwies sich hierbei als nützliche Methode zum Nachweis der Genfunktion und die Erdbeerfrucht als geeignetes Model zur Untersuchung des Polyphenol-Stoffwechsels (Abb.1; Hoffmann *et al.*, 2006). Diese



Foto: Michelle Robek – Fotolia.com



Abb. 1: Funktionsnachweis des Chalkon-Synthase-(CHS)-Gens in Erdbeeren (*F. x ananassa* cv. Elsanta). Nach transienter Stilllegung der CHS mittels RNAi bilden die Früchte (rechts) signifikant weniger Farbstoffe.

Arbeitsmaterial

Modul 3 Lebenssystem Pflanze



Abb.2: Genfunktionsanalyse in stabil transformierten Erdbeerpflanzen (*F. x ananassa* cv. Calypso). Die stabile Herabregulation des *CHS*-Gens mittels Antisense-Technologie beweist die Beteiligung der Chalkon-Synthase an der Bildung der Erdbeerfarbstoffe (unten). Kontrollfrüchte (oben)

Untersuchungen zeigten, dass neben den aus *Arabidopsis thaliana* bekannten Transkriptionsfaktoren in Kulturpflanzen weitere Mechanismen existieren, die in die Regulation des Polyphenol-Stoffwechsels eingreifen.

Das Modell Erdbeere

Die Erdbeere, insbesondere die diploide *F. vesca*, wird aufgrund ihres kleinen Genoms (164 Mb), ihrer kurzen Generationszeiten und einfach durchzuführenden genetischen Transformationssysteme als Modelorganismus der Wahl für funktionelle Genomik-Studien an Rosaceae-Arten betrachtet. Hierbei werden vor allem reverse Genetikstrategien für Genfunktionsanalysen eingesetzt (Abb. 2). FraGenomics fokussiert sich jedoch auf die oktaploide Kulturerdbeere *F. x ananassa* Da für die detaillierte Kopplungskarten verfügbar sind. Die Gartenerdbeere entstand im 18. Jahrhundert in Europa, vermutlich den Niederlanden, aus der Kreuzung der beiden amerikanischen Erdbeerarten *F. chiloensis* (Chile-Erdbeere) und *F. virginiana* (Scharlacherdbeere). Sie ist genau wie ihre Stammarten oktaploid ($8n=56$). Der Chromosomensatz hat vermutlich die Zusammensetzung AAA'A'BBB'B', wobei die A-Chromosomensätze den Chromosomensätzen der Walderdbeere verwandt sind und die B-Chromosomensätze mit denen der diploiden *F. iinumae*. Wann und wo die Oktaploidie der Ausgangsarten entstand, ist unbekannt. Mit Hilfe einer nahezu gesättigten Karte konnte kürzlich das diploide Verhalten der oktaploiden Arten gezeigt werden. Der Vergleich dieser Karte mit der der diploiden *F. vesca* ermöglichte den Nachweis von sieben erwarteten homoeologen Gruppen (jede durch vier Kopplungsgruppen gebildet) in den oktaploiden Arten, wodurch ein hoher Grad an Synteny und Kolinearität mit den diploiden *Fragaria* Chromosomen gezeigt wurde.

Die Expressionsmuster einiger Gene, deren korrespondierende Enzyme am Erdbeerfrucht-Reifungsprozess beteiligt sind und möglicherweise in Beziehung zu agronomischen Merkmalen stehen, wurden bereits untersucht. Dazu zählen Gene, die Enzyme (β -Galaktosidase, Pektin-Methylesterase, Endo- und Exo-Galakturonidase und Pektatlyase) kodieren, welche im Pektinstoffwechsel

der Zellwände eine wichtige Rolle spielen und vermutlich die Fruchtfestigkeit beeinflussen. So wiesen transgene Pflanzen mit reduzierter Pektatlyase-Expression ($< 30\%$ der Kontrollpflanzen) eine höhere Fruchtfestigkeit auf. Früchte von transgenen Pflanzen, die eine reduzierte Endo-1,4- β -glucanase Expression zeigten, unterschieden sich jedoch in ihrer Festigkeit nicht von Kontrollfrüchten. Weiterhin wurde kürzlich das an der Ascorbinsäure-Biosynthese beteiligte D-Galakturonat-Reduktase-Gen in reifenden Erdbeerfrüchten identifiziert. Zwei weitere Gene, SAAT (Alkohol Acyl-CoA Transferase) und FaQR (Chinon-Oxidoreduktase), sind verantwortlich für die Bildung verschiedener Erdbeer-Aromastoffe. Außerdem wurden kürzlich mehrere Glucosyltransferase-Gene beschrieben, deren korrespondierende Proteine verschiedene Intermediate des Flavonoid- und Anthocyanidin-Stoffwechsels in der Erdbeere glukosylieren. Studien, die sich detailliert mit den Expressionsprofilen von Genen beschäftigen, die an der Bildung von ernährungsphysiologisch wichtigen Inhaltsstoffen beteiligt sind, fehlen.

Die genetische Genomik

Die stetig steigende Zahl vollständig sequenzierter Genome von Modell- und Nutzpflanzen sowie die zahlreichen expressed sequence tags (EST) führten in den letzten Jahren zur Entwicklung und Anwendung neuer methodischer Ansätze. Das Ziel der "Funktionellen Genomik" ist die Charakterisierung und Aufklärung der Funktion von Genen in globalen Transkript- und Proteinstudien, in denen u.a. mutagenisierte oder transgene Pflanzen studiert werden. Die Expression von Genen und die Proteinmengen können aber auch als quantitatives Merkmal allelischer Diversität genutzt werden. Ziel der "Genetischen Genomik" ist die Lokalisierung eines bestimmten Gens im Genom, indem Expressionsuntersuchungen einzelner Individuen einer segregierenden Population mit der Analyse der Genomstruktur mittels molekularer Marker verknüpft werden.

Die starke Variation der nutritiven Parameter in verschiedenen Erdbeer-Genotypen weist auf eine genetische Kontrolle hin. Diese Kenntnis könnte bei der Sortenentwicklung in Züchtungsprogrammen genutzt werden, die auf eine ernährungsphysiologische Verbesserung hinzielen. Die Analyse der genetischen Vielfalt von quantitativen Eigenschaften in einer segregierenden Population erfolgt durch die Bestimmung von QTLs (*quantitative trait locus*), die Regionen im Genom aufzeigt, wo die genetische Variation mit der phänotypischen Vielfalt verknüpft ist. Das ultimative Ziel der QTL Analyse ist die Ermittlung derjenigen Gene, die für die Variation eines Merkmals verantwortlich sind. Obwohl die Detektion von QTLs verhältnismäßig einfach ist, sind die Angaben der Positionen auf den Chromosomenkarten äußerst ungenau und die Identifizierung der molekularen Grundlagen der QTLs sehr zeit- und ressourcenaufwändig. Genomik und Genetik können jedoch zur „Genetischen Genomik“ vereint werden, die einen wichtigen Schritt für die Klonierung von QTLs darstellt. Um das Genom-umfassende Expressionsmuster von Individuen einer segregierenden Population zu erhalten, wird die Microarray Technologie angewendet. Diese ermöglicht die Kartierung von QTLs, die die Transkriptgehalt-Variation der Gene (*expression* QTL oder eQTL) bestimmen und damit

Arbeitsmaterial

Modul 3 Lebenssystem Pflanze



Abb. 3: Erdbeerpflanzen im Gewächshaus zur Durchführung transgener Expressionsstudien



Abb. 4: Erdbeerblüte



Abb. 5: Reife Kontrollfrüchte (Foto: Tobias Marx – Fotolia.com)

die Untersuchung der Beziehung von Genom und Transkriptom. Diese eQTLs können anschließend dazu benutzt werden um mittels Suche zwischen Genexpressions-Polymorphismen und phänotypischen QTLs Kandidatengene zu identifizieren, die die phänotypische Variation eines Merkmals, zum Beispiel den Gehalt an wertvollen Metaboliten in der Frucht bestimmen. Bei der eQTL-Analyse können die Genexpressionslevel als quantitative Merkmale aufgefasst werden. Die eQTL Kartierung wird inzwischen als leistungsfähige Alternative beschrieben, um Gene zu analysieren und identifizieren, die die quantitativen Phänotypen bestimmen. Dies wurde bereits für verschiedene Pflanzenarten wie Mais, Arabidopsis, Gerste, Eukalyptus und Weizen gezeigt. Die Kombination von Metabolomics und eQTL Daten aus den gleichen Linien bietet die Möglichkeit Metabolite eines Biosynthese-Netzwerks mit den Netzwerk der eQTLs zu verknüpfen und trägt damit zur Ausweitung des Verständnisses der regulatorischen Interaktionen zwischen Transkriptom und Metabolom bei.

Das Projekt Fragenomics

Bei dem KBBE-Fragenomics Vorhaben handelt es sich um ein trilaterales spanisch-französisch-deutsches Kooperationsprojekt in dem vier akademische Partner UCO-UMA (Universität Cordoba und Malaga; Prof. Juan Munoz-Blanco), INRA (Bordeaux, Dr Béatrice Denoyes-Rothan), IRTA (Dr. Amparo Monfort) sowie TUM (Prof. Wilfried Schwab) und zwei Industriepartner PLANASA (Dr Alexander Pierron-Darbonne), CIREF (Dr. Philippe Chartier) beteiligt sind. Ziele des Projektes sind die Identifizierung von eQTLs von Fruchtqualitätsgenen und QTLs für den Sekundärstoffgehalt, die mittels Transkriptom und Metabolit-Analysen an zwei segregierenden Populationen bestimmt werden sollen. Aus den Resultaten können molekulare Marker abgeleitet werden, die in Züchtungsprogrammen zur Selektion von Nachkommen mit erhöhten Gehalten an gesundheitsfördernden Inhaltsstoffen herangezogen werden können.

Erste Untersuchungen der Polyphenol-Muster einer segregierenden Population zeigten, dass die biologische Variabilität des Gesamtgehaltes der Polyphenolgruppen bedeutend geringer ist als die Variabilität der Konzentrationen der Einzelsubstanzen. Dies deutet darauf hin, dass die Verschiebung der prozentualen Verteilung der Metabolite hin zu einer gewünschten Verbindung vermutlich einfacher zu verwirklichen ist als den absoluten Gehalt der Polyphenole zu erhöhen. So führte die Herabregulation der Genexpression einer Anthocyanidin-Glucosyltransferase in Erd-

beerfrüchten zur gesteigerten Bildung von Epiafzelechin einer bioaktiven Substanz, die in Wildtyp-Formen nur in geringen Konzentrationen zu finden ist (Griesser *et al.*, 2008)

Literatur

- Griesser M., Hoffmann T., Bellido M.L., Rosati C., Fink B., Kurtzer R., Aharoni A., Munoz-Blanco J., Schwab W. Redirection of flavonoid biosynthesis through the downregulation of an anthocyanidin glucosyltransferase in ripening strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit. *Plant Physiol.* (2008), 146: 1528-1539, doi:10.1104/pp.107.114280.
- Hoffmann T., Kalinowski G., Schwab W. RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. *Plant J.* (2006), 48: 818-826, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.02913.x.
- Munoz C., Hoffmann T., Medina Escobar N., Ludemann F., Botella M.A., Valpuesta V., Schwab W. The strawberry fruit *Fragaria* allergen functions in flavonoid biosynthesis. *Molecular Plant* (2010), 3: 113-124, doi:10.1093/mp/ssp087.

Kontakt

Wilfried Schwab, Anja Preuß, Ludwig Ring
Biotechnologie der Naturstoffe, Technische Universität München
E-Mail: schwab@wzw.tum.de

Arbeitsaufträge

1. Klären Sie folgende Begriffe: Genomik, Proteomik, Metaboliten, Polyphenole, Microarray und Segregation.
2. Die Erdbeeren als beliebte Früchte – Notieren Sie Ursachen für die besondere Bedeutung dieser Pflanze. Gehen Sie dabei auch auf die Bedeutung der Inhaltsstoffe für die Pflanze ein.
3. Wiederholen Sie in diesem Zusammenhang die Abläufe bei der Genexpression. Bringen Sie Beispiele für die Veränderungen bei transgenen Erdbeeren.
4. Erläutern Sie Ziele und Vorgehensweisen bei der Ermittlung der Gene, die für spezielle Eigenschaften verantwortlich sind. Verwenden Sie für die Darstellung der Vorgehensweise ein Fließschema.