

Die approbierte Originalversion dieser Diplom-/Masterarbeit ist an der Hauptbibliothek der Technischen Universität Wien aufgestellt (<http://www.ub.tuwien.ac.at>).

The approved original version of this diploma or master thesis is available at the main library of the Vienna University of Technology (<http://www.ub.tuwien.ac.at/englweb/>).



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
WIEN

VIENNA
UNIVERSITY OF
TECHNOLOGY

DIPLOMARBEIT

Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur Hydroxylierung von Chalconen an der Position 3

Ausgeführt am Institut für

**Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische
Biowissenschaften**

der Technischen Universität Wien

unter der Anleitung von ao. Univ. Prof. Dr. Karl Stich

durch

Marosits Thomas

Straußengasse 2-10/1/39

1050 Wien

Wien, im Oktober 2008

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich ein herzliches Danke an jene Personen aussprechen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Karl Stich für die Unterstützung und für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe arbeiten zu können.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Heidi Halbwirth für die interessante Themenstellung und für die Betreuung. Danke auch für die große Geduld und den Einsatz für diese Arbeit!

Ein weiterer Dank gilt Dr. Karin Schlangen für die Betreuung der Arbeit, für die aufmunternden Worte und für die unerschöpfliche Geduld bei der Beantwortung zahlreicher Fragen.

Weiters danke ich der Gesellschaft zur Förderung der Pflanzenwissenschaften (Wien) für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Diesbezüglich ergeht auch ein herzlicher Dank an Prof. Stachelberger!

Für die Unterstützung bei der praktischen Durchführung einiger Arbeiten möchte ich mich bei Jürgen Greiner und Renate Paltram bedanken, auch für die anregenden Diskussionen und interessanten Gespräche abseits der wissenschaftlichen Thematik.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Werner Wruss für die Anstellung in seiner Firma und die damit verbundene Möglichkeit, mir mein Studium zu finanzieren, danke auch für das Verständnis und die Großzügigkeit während der Dauer der Diplomarbeit!

Ein aufrichtiger Dank gebührt meiner Freundin Karina Forsich für die zahlreichen Tipps beim Umgang mit Word und Excel.

Zuletzt möchte ich meiner Mutter danken, die mich in Zeiten finanzieller Not immer unterstützte und auch in schwierigen Lebenslagen immer an mich geglaubt hat.

ZUSAMMENFASSUNG

Chalcone sind gelbe Blütenpigmente, die häufig in Asteraceen gebildet werden. Sie werden auch als Anthochlorone Pigmente bezeichnet aufgrund ihrer Eigenschaft, die Farbe unter Einwirkung von Ammoniakdampf von Gelb nach Orange-Rot zu ändern. Chalcone sind die biochemischen Precursor der Flavonoide, die als Sekundärmetabolite eine Vielzahl von wichtigen physiologischen Funktionen in der Pflanze ausüben. Flavonoide besitzen eine charakteristische chemische Struktur, die durch 2 aromatische Ringe (A- und B-Ring) und einen heterozyklischen Ring (C-Ring) gekennzeichnet ist. Bei den Chalconen hingegen ist der heterozyklische Ring noch nicht ausgeprägt. In der Natur gibt es eine Vielzahl von unterschiedlichen Flavonoiden und Chalconen, die durch unterschiedliche Hydroxylierung, Glykosylierung, Methylierung und Acylierung der chemischen Grundstruktur entstehen. Die Hydroxylgruppen findet man an verschiedenen Positionen des A- und B-Ringes (Flavonoide und Chalcone) bzw. des C-Ringes (Flavonoide). Während die Entstehung des Hydroxylierungsmusters im B-Ring von Flavonoiden bereits im Detail erforscht ist, gibt es noch wenig Informationen darüber, wie bei Chalconen eine zusätzliche Hydroxylgruppe an der Position 3 (entspricht der Position 3' bei Flavonoiden) eingeführt wird. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H), die die Einführung einer Hydroxylgruppe an der Position 3' im B-Ring von Flavonoiden katalysiert, auch für die Hydroxylierung von Chalconen verantwortlich ist.

Dazu wurden F3'H-cDNA Klone aus 3 verschiedenen Pflanzen isoliert, die Chalcone als gelbe Pigmente in ihren Petalen akkumulieren. Ausgehend von der in den Datenbanken vorhandenen Sequenz aus *Antirrhinum majus* wurden 2 weitere bislang unbekannte cDNA Klone aus *Coreopsis grandiflora* und aus *Cosmos sulphureus* isoliert. Die cDNA Klone wurden in Hefe funktionell exprimiert und die rekombinanten Proteine auf ihre Substratspezifität untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Flavanone, Dihydroflavonole und Flavonole für alle 3 Enzyme gleichermaßen gut geeignete Substrate sind. Flavone wurden dagegen von dem Enzym aus *Cosmos sulphureus* gar nicht und von den beiden anderen Enzymen nur sehr schlecht umgesetzt. Die größten Unterschiede in der Substratspezifität wurden jedoch in Bezug auf die Chalcon-Hydroxylierung beobachtet. Während das Enzym aus *Coreopsis grandiflora* Chalcone zu einem hohen Prozentsatz an der Position 3 hydroxylieren konnte, zeigten die anderen beiden Enzyme keine (*Cosmos sulphureus*) oder nur sehr geringe (*Antirrhinum majus*) Umsatzraten. Damit konnte erstmals eine F3'H mit entsprechender Chalcon 3-Hydroxylase-Aktivität nachgewiesen werden, die für die Bildung von Chalconen mit einem 3,4-Hydroxylierungsmuster in *Coreopsis grandiflora* verantwortlich sein könnte. In *Cosmos sulphureus* und *Antirrhinum majus* müssen hingegen andere Enzyme mit CH3H-Aktivität vorhanden sein als die in dieser Arbeit isolierten F3'HS.

ABSTRACT

Chalcones are yellow flower pigments frequently formed in *Asteracea*. They are commonly called anthochlor pigments due to their feature that ammonia vapour causes a colour change from yellow to orange-red. Chalcones act as biochemical precursors of flavonoids, which are responsible for a wide range of physiological functions in plants. Flavonoids consist of 2 aromatic rings (A and B) and a heterocyclic ring (ring C) whereas in chalcones 2 benzene rings are joined by a linear 3 carbon chain. The large number of different flavonoids and chalcones present in nature are a result of varying modifications in the basic structures such as hydroxylation, glycosylation, methylation and acylation. Hydroxyl groups are present at different positions in ring A and ring B (flavonoids and chalcones) or in ring C (flavonoids). Whereas hydroxylation patterns of flavonoids in ring B have been studied in detail, little is known about the introduction of an additional hydroxyl group at position 3 (corresponding with position 3' in flavonoids) in chalcones.

cDNA clones of the flavonoid 3'-hydroxylase were isolated from 3 different plants which are known to accumulate chalcones in petals. Based on the sequence of *Antirrhinum majus* in the NCBI database 2 novel cDNA clones were isolated from *Coreopsis grandiflora* and *Cosmos sulphureus*. The cDNA clones were heterologously expressed in yeast and the recombinant proteins characterized. It could be demonstrated that flavanones, dihydroflavonols and flavonols were suitable substrates for all 3 enzymes. However, the enzyme from *Cosmos sulphureus* did not accept flavones as substrate and the 2 other enzymes only converted flavones to a low extent. The biggest difference was found with respect to the acceptance of chalcones as substrates. The enzyme from *Coreopsis grandiflora* was able to hydroxylate chalcones at position 3 with high efficiency whereas the enzyme from *Cosmos sulphureus* did not accept the substrate at all. The enzyme from *Antirrhinum majus* only converted a small amount of chalcones. For the first time F3'H activity could be demonstrated presumably responsible for the formation of the 3,4-hydroxylation pattern in *Coreopsis grandiflora*. In *Cosmos sulphureus* and *Antirrhinum majus* enzymes bearing CH3H activity have to be present to the isolated ones presented in this study.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung	- 1 -
1.1 Blütenfärbung	- 1 -
1.1.1 Gelbe Blütenfarben.....	- 2 -
1.2 Honey Guides	- 4 -
1.3 Flavonoide	- 5 -
1.3.1 Einteilung der Flavonoide	- 6 -
1.4 Flavonoidbiosynthese	- 7 -
1.4.1 Der Flavonoidbiosyntheseweg.....	- 7 -
1.4.2 Precursor der Flavonoidbiosynthese	- 8 -
1.4.3 Biosynthese der Chalcone	- 8 -
1.4.4 Biosynthese der Flavanone	- 11 -
1.4.5 Biosynthese der Flavone	- 12 -
1.4.6 Biosynthese der Dihydroflavonole	- 12 -
1.4.7 Biosynthese der Flavonole.....	- 13 -
1.4.8 Biosynthese der Leucoanthocyanidine	- 13 -
1.4.9 Biosynthese der Anthocyanidine.....	- 14 -
1.5 Modifikation von Flavonoiden	- 14 -
1.5.1 Hydroxylierung von Flavonoiden.....	- 15 -
1.5.1.1 Hydroxylierungen im B-Ring	- 15 -
1.5.1.2 Hydroxylierungen im A-Ring	- 18 -
1.5.2 Methylierung von Flavonoiden	- 18 -
1.5.3 Glykosylierung von Flavonoiden	- 18 -
1.5.4 Acylierung von Flavonoiden.....	- 19 -
2 Problemstellung	- 21 -
3 Material und Methoden	- 23 -

3.1 Pflanzenmaterial.....	- 23 -
3.2 Bakterien- und Hefestämme.....	- 23 -
3.3 Geräte	- 23 -
3.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	- 24 -
3.5 Molekularbiologische Kits	- 26 -
3.6 Puffer-, Stamm- und sonstige Lösungen.....	- 26 -
3.6.1 Galaktose (20 %)	- 26 -
3.6.2 Ladepuffer.....	- 26 -
3.6.3 Längenmarker.....	- 26 -
3.6.4 McIlvaine-Puffer	- 26 -
3.6.5 TAE-Puffer	- 27 -
3.6.6 TEK-Puffer	- 27 -
3.6.7 TES-B*-Puffer	- 27 -
3.6.8 Tris/HCl-Puffer	- 27 -
3.6.9 Wasser.....	- 28 -
3.7 Laufmittel.....	- 28 -
3.8 Nährmedien	- 28 -
3.8.1 LB _{AMP} -Medium.....	- 28 -
3.8.2 SGI-Medium.....	- 29 -
3.8.3 SOC-Medium	- 29 -
3.8.4 YPGE-Medium	- 29 -
3.9 Plasmide (Vektoren)	- 29 -
3.9.1 Plasmide für <i>E.coli</i>	- 29 -
3.9.1.1 pCR2.1-TOPO (Invitrogen)	- 29 -
3.9.2 Plasmide für <i>S. cerevisiae</i>	- 30 -
3.9.2.1 pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen).....	- 30 -
3.10 mRNA-Präparation.....	- 31 -
3.11 Reverse Transkription	- 32 -

3.12 PCR	- 32 -
3.12.1 Primerkonstruktion	- 33 -
3.12.1.1 Degenerierte Primer	- 33 -
3.12.1.2 Spezifische Primer	- 33 -
3.12.2 Standard-PCR.....	- 33 -
3.12.2.1 PCR-Bedingungen	- 34 -
3.12.2.2 PCR-Ansatz	- 34 -
3.12.3 Proofreading-PCR.....	- 35 -
3.12.3.1 PCR-Bedingungen	- 36 -
3.12.3.2 PCR-Ansatz	- 36 -
3.12.4 Colony-PCR	- 36 -
3.12.4.1 PCR-Bedingungen	- 37 -
3.12.4.2 PCR-Ansatz	- 37 -
3.12.5 RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends)	- 38 -
3.12.5.1 3'-RACE	- 38 -
3.12.5.2 5'-RACE	- 38 -
3.13 Agarosegel-Elektrophorese	- 38 -
3.14 Aufarbeitung von Agarosegelfragmenten	- 39 -
3.15 Klonierung von DNA-Fragmenten	- 40 -
3.15.1 Ligation	- 40 -
3.15.1.1 pCR2.1-TOPO-Klonierungsreaktion	- 40 -
3.15.1.2 pYES2.1/V5-His-TOPO-Klonierungsreaktion	- 40 -
3.15.2 Transformation.....	- 41 -
3.15.2.1 Transformation von pCR2.1-TOPO und pYES2.1/V5-His-TOPO in <i>E. coli</i>	- 41 -
3.15.2.2 Transformation von pYES2.1/V5-His-TOPO in <i>S. cerevisiae</i>	- 41 -
3.15.3 Plasmidisolierung.....	- 42 -
3.15.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA.....	- 42 -
3.16 Heterologe Expression in <i>S. cerevisiae</i>	- 43 -
3.17 Synthesen der (¹⁴C)-markierten Substrate	- 44 -
3.17.1 Enzymatische Synthese von (¹⁴ C)-Naringenin.....	- 44 -
3.17.2 Enzymatische Synthese von (¹⁴ C)-Dihydrokämpferol	- 45 -
3.17.3 Enzymatische Synthese von (¹⁴ C)-Apigenin	- 46 -
3.17.4 Enzymatische Synthese von (¹⁴ C)-Kämpferol.....	- 46 -

3.17.5 Enzymatische Synthese von (¹⁴ C)-Isoliquiritigenin	- 47 -
3.18 Enzymtests	- 48 -
3.18.1 <i>Antirrhinum majus</i>	- 49 -
3.18.2 <i>Cosmos sulphureus</i>	- 49 -
3.18.3 <i>Coreopsis grandiflora</i>	- 50 -
3.19 Enzymcharakterisierung (F3'H)	- 51 -
3.19.1 pH-Optimum	- 51 -
3.19.1.1 <i>Antirrhinum majus</i>	- 51 -
3.19.1.2 <i>Cosmos sulphureus</i>	- 51 -
3.19.1.3 <i>Coreopsis grandiflora</i>	- 52 -
4 ERGEBNISSE	- 53 -
4.1 Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H) aus <i>Antirrhinum majus</i>	- 53 -
4.1.1 Klonierung	- 53 -
4.1.2 Verifizierung der Enzymaktivität	- 53 -
4.1.3 Charakterisierung	- 56 -
4.2 Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H) aus <i>Cosmos sulphureus</i>	- 62 -
4.2.1 Klonierung	- 62 -
4.2.2 Verifizierung der Enzymaktivität	- 63 -
4.2.3 Charakterisierung	- 65 -
4.3 Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H) aus <i>Coreopsis grandiflora</i>	- 69 -
4.3.1 Klonierung	- 69 -
4.3.2 Verifizierung der Enzymaktivität	- 69 -
4.3.3 Charakterisierung	- 72 -
5 Diskussion	- 78 -
6 Literaturverzeichnis	- 83 -

Abkürzungsverzeichnis

4CL	4-Cumarat-Coenzym A-Ligase
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ANS	Anthocyanidinsynthase
AUS	Auronsynthase
Bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
c	Konzentration
¹⁴ C	Radiokohlenstoffisotop 14
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase
CAW	Chloroform-Eisessig-Wasser
cDNA	copy DNA
CHI	Chalconisomerase
CHS	Chalconsynthase
CoA	Coenzym A
cv.	cultivar
dA	Desoxyadenosin
DC	Dünnschichtchromatographie
DFR	Dihydroflavonol 4-Reduktase
DHK	Dihydrokämpferol
DNA	desoxynucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpm	disintegrations per minute
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F3GT	Flavonoid 3-O-Glykosyltransferase
F5GT	Flavonoid 5-O-Glykosyltransferase
F7GT	Flavonoid 7-O-Glykosyltransferase
F3'H	Flavonoid 3'-Hydroxylase
F3',5'H	Flavonoid 3',5'-Hydroxylase
F6H I	Flavonol 6-Hydroxylase I
F6H II	Flavonol 6-Hydroxylase II
F8H	Flavonol 8-Hydroxylase
FHT	Flavanon 3-Hydroxylase
FLS	Flavonolsynthase
FNS I	Flavonsynthase I
FNS II	Flavonsynthase II
h	Stunde
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
krist.	kristallin

L	Liter
M	Molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mPa	Millipascal
mRNA	messenger ribonucleic acid
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NADP ⁺	Nikotinsäureamidadenindinukleotidphosphat (oxidiert)
NADPH	Nikotinsäureamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
n.b.	nicht bestimmt
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nmol	Nanomol
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei der Wellenlänge von 260 Nanometer
PAL	Phenylalaninammoniumlyase
PCR	polymerase chain reaction
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PKR	Polyketidreduktase
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TLC	Thin Layer Chromatography
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Units
UDPG	Uridin 5'-diphospho-Glukose
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anthocyanidine mit verschiedenen Hydroxylierungsstufen	- 2 -
Abbildung 2: Nomenklatur der Chalcone, Aurone und Flavonoide.....	- 2 -
Abbildung 3: Chemische Struktur von Quercetin und zwei gelben Flavonolen.....	- 3 -
Abbildung 4: Flavone und Flavonole in weißen Petalen.....	- 4 -
Abbildung 5: Einteilung der Flavonoide nach dem Oxidationszustand des Pyranrings	- 6 -
Abbildung 6: Übersicht über die Flavonoidbiosynthese.....	- 7 -
Abbildung 7: Precursor der Flavonoidbiosynthese	- 8 -
Abbildung 8: Nomenklatur der Chalcone und Aurone	- 9 -
Abbildung 9: Biosynthese von Naringenin-chalcon	- 9 -
Abbildung 10: Beispiele für Chalkone	- 10 -
Abbildung 11: Beispiele für Aurone	- 11 -
Abbildung 12: Bioynthese von Naringenin	- 11 -
Abbildung 13: Biosynthese von Apigenin	- 12 -
Abbildung 14: Biosynthese von Dihydrokämpferol	- 12 -
Abbildung 15: Biosynthese von Kämpferol.....	- 13 -
Abbildung 16: Biosynthese von Leucopelargonidin	- 13 -
Abbildung 17: Biosynthese von Pelargonidin	- 14 -
Abbildung 18: Hydroxylierung durch F3'H und F3',5'H.....	- 16 -
Abbildung 19: pCR 2.1-Topo-Vektor	- 30 -
Abbildung 20: pYES2.1-Topo-Vektor	- 31 -
Abbildung 21: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Eriodictyol aus Naringenin in Gegenwart von NADPH durch die rekombinante F3'H aus <i>Antirrhinum majus</i> nach Chromatographie in CAW	- 54 -

Abbildung 22: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Dihydroquercetin aus Dihydrokämpferol in Gegenwart von NADPH durch die rekombinante F3'H aus <i>Antirrhinum majus</i> nach Chromatographie in CAW	- 54 -
Abbildung 23: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Luteolin aus Apigenin in Gegenwart von NADPH durch die rekombinante F3'H aus <i>Antirrhinum majus</i> nach Chromatographie in CAW	- 55 -
Abbildung 24: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Quercetin aus Kämpferol in Gegenwart von NADPH durch die rekombinante F3'H aus <i>Antirrhinum majus</i> nach Chromatographie in CAW	- 55 -
Abbildung 25: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Butein aus Isoliquiritigenin in Gegenwart von NADPH durch die rekombinante F3'H aus <i>Antirrhinum majus</i> nach Chromatographie in CAW	- 56 -
Abbildung 26: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Naringenin als Substrat.....	- 57 -
Abbildung 27: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Dihydrokämpferol als Substrat	- 58 -
Abbildung 28: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Apigenin als Substrat.....	- 59 -
Abbildung 29: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Kämpferol als Substrat.....	- 60 -
Abbildung 30: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Isoliquiritigenin als Substrat	- 61 -
Abbildung 31: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Eriodictyol aus Naringenin in Anwesenheit von NADPH durch die rekombinante F3'H aus <i>Cosmos sulphureus</i> nach Chromatographie in CAW.....	- 63 -
Abbildung 32: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Dihydroquercetin aus Dihydrokämpferol in Anwesenheit von NADPH durch die rekombinante F3'H aus <i>Cosmos sulphureus</i> nach Chromatographie in CAW	- 63 -
Abbildung 33: Radiochromatogramm von Apigenin in Anwesenheit von NADPH und rekombinanter F3'H aus <i>Cosmos sulphureus</i> nach Chromatographie in CAW.....	- 64 -

Abbildung 34: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Quercetin aus Kämpferol in Anwesenheit von NADPH durch die rekombinante F3'H aus <i>Cosmos sulphureus</i> nach Chromatographie in CAW	- 64 -
Abbildung 35: Radiochromatogramm von Isoliquiritigenin in Anwesenheit von NADPH und rekombinanter F3'H aus <i>Cosmos sulphureus</i> nach Chromatographie in CAW	- 65 -
Abbildung 36: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Naringenin als Substrat.....	- 66 -
Abbildung 37: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Dihydrokämpferol als Substrat	- 67 -
Abbildung 38: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Kämpferol als Substrat.....	- 68 -
Abbildung 39: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Eriodictyol aus Naringenin in Anwesenheit von NADPH durch die rekombinante F3'H aus <i>Coreopsis grandiflora</i> nach Chromatographie in CAW	- 70 -
Abbildung 40: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Dihydroquercetin aus Dihydrokämpferol in Anwesenheit von NADPH durch die rekombinante F3'H aus <i>Coreopsis grandiflora</i> nach Chromatographie in CAW	- 70 -
Abbildung 41: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Luteolin aus Apigenin in Anwesenheit von NADPH durch die rekombinante F3'H aus <i>Coreopsis grandiflora</i> nach Chromatographie in CAW	- 71 -
Abbildung 42: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Quercetin aus Kämpferol in Anwesenheit von NADPH durch die rekombinante F3'H aus <i>Coreopsis grandiflora</i> nach Chromatographie in CAW	- 71 -
Abbildung 43: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Butein aus Isoliquiritigenin in Anwesenheit von NADPH durch die rekombinante F3'H aus <i>Coreopsis grandiflora</i> nach Chromatographie in CAW	- 72 -
Abbildung 44: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Naringenin als Substrat.....	- 73 -
Abbildung 45: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Dihydrokämpferol als Substrat	- 74 -

Abbildung 46: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Apigenin als Substrat.....	- 75 -
Abbildung 47: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Kämpferol als Substrat.....	- 76 -
Abbildung 48: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Isoliquiritigenin als Substrat	- 77 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PCR-Standardprogramm.....	- 34 -
Tabelle 2: Proofreading-PCR-Programm	- 36 -
Tabelle 3: Primer für die Colony-PCR.....	- 37 -
Tabelle 4: Colony-PCR-Programm.....	- 37 -
Tabelle 5: Zugabe an SGI-Medium in Abhängigkeit der OD ₆₀₀	- 43 -
Tabelle 6: Primer.....	- 53 -
Tabelle 7: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Naringenin als Substrat ...	- 57 -
Tabelle 8: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Dihydrokämpferol als Substrat.....	- 58 -
Tabelle 9: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Apigenin als Substrat	- 59 -
Tabelle 10: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Kämpferol als Substrat ..	- 60 -
Tabelle 11: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Isoliquiritigenin als Substrat.....	- 61 -
Tabelle 12: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Naringenin als Substrat. -	66 -
Tabelle 13: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Dihydrokämpferol als Substrat.....	- 67 -
Tabelle 14: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Naringenin als Substrat .-	73 -
Tabelle 15: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Dihydrokämpferol als Substrat.....	- 74 -
Tabelle 16: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Apigenin als Substrat	- 75 -
Tabelle 17: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Kämpferol als Substrat ..	- 76 -
Tabelle 18: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Isoliquiritigenin als Substrat.....	- 77 -

1 Einleitung

Die Bestäubung von Samenpflanzen ist die Voraussetzung für die Befruchtung und Samenbildung. Besuchen Insekten oder Vögel Blüten, um sich von Nektar oder Pollen zu ernähren, kommt es in der Regel zu einer Bestäubung der Blüten. Dabei sind die Wechselbeziehungen zwischen Pflanzen und Tieren äußerst komplex, da jede Pflanzengruppe über eigene Methoden der Anlockung von tierischen Bestäubern verfügt.

Bei der Wechselwirkung zwischen Blütenpflanzen und Bestäubern gibt es drei wichtige biochemische Faktoren [Harborne, 1995].

- Blütenduft
- Blütenfarbe
- Nährwert von Nektar und Pollen

Tierische Bestäuber sind in der Lage, flüchtige Stoffe und Bestandteile des Blütenduftes aus einiger Entfernung wahrzunehmen. Bei Annäherung des Bestäubers an den Standort der Pflanze dient die Kontrastfarbe der Blüte gegenüber dem Grün der Blätter und Wiese als visuelles Signal. Hat der Bestäuber nun die Blüte erreicht, so kann er durch spezielle Blütenmuster (Honey guides) auf den Blütenblättern zum Nektar geleitet werden [Harborne, 1995].

Farben von Blüten entstehen in der Regel aus Kombinationen verschiedenster Pigmente, die von Blüten akkumuliert werden. Die wichtigsten Gruppen sind die Flavonoide, die Carotinoide, die Chalcone und Aurone.

1.1 Blütenfärbung

Die Färbung von Blüten beruht auf dem Vorhandensein von Pigmenten in Chromoplasten oder in Zellvakuolen des Blütengewebes [Harborne, 1995]. Durch Wechselwirkung von Elektronen mit dem Sonnenlicht wird ein Teil des Spektrums durch Pigmente in den Blütenpflanzen absorbiert, der andere Teil der Strahlung wird reflektiert und als Farbe wahrgenommen [Schmidt, 1999]. Blätter erscheinen in grüner Farbe, da die in den Chloroplasten enthaltenen Pigmente Chlorophyll a und Chlorophyll b den größten Teil des einfallenden Sonnenlichts absorbieren, dabei wird nur der Bereich zwischen 500 und 600 nm reflektiert, dies entspricht der Wellenlänge von grünem Licht [Stryer, 1994].

Zu den bedeutendsten Gruppen der Blütenfarbstoffe gehören die Flavonoide, insbesondere die Anthocyane, welche eine Farbausprägung von Orange über

Rot bis hin zu Blau hervorrufen. Zu den wichtigsten Vertretern der Anthocyanpigmente zählen Perlagonidin (ziegelrot), Cyanidin (rot) und Delphinidin (blauviolett). Strukturell unterscheiden sich diese genannten Verbindungen nur durch die Anzahl der Hydroxylgruppen im B-Ring.

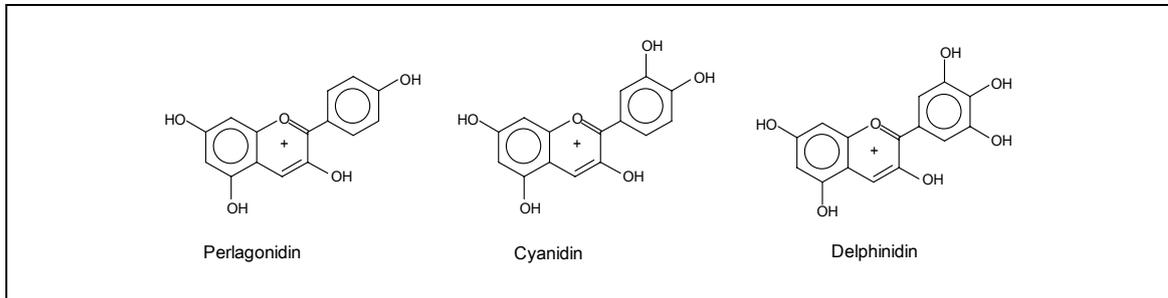


Abbildung 1: Anthocyanidine mit verschiedenen Hydroxylierungsstufen

Für die Bildung von Lila- und Blautönen sind also primär Anthocyane verantwortlich, die gelbe Blütenfarbe hingegen kann auf vielfältige Weise entstehen.

Weißer Färbung dagegen beruht nicht auf Anwesenheit von Pigmenten, sie entsteht, wenn die Gesamtheit des auftreffenden Lichts durch die Luftpolster in den Zellzwischenräumen reflektiert wird, ohne dass ein Teil des Spektrums durch Pigmente herausgefiltert wird.

1.1.1 Gelbe Blütenfarben

Die Ausprägung der gelben Blütenfarbe entsteht durch drei Klassen von Pigmenten oder durch ihre Mischungen:

- Carotinoide
- gelbe Flavonole
- Chalcone und Aurone (anthochlore Pigmente)

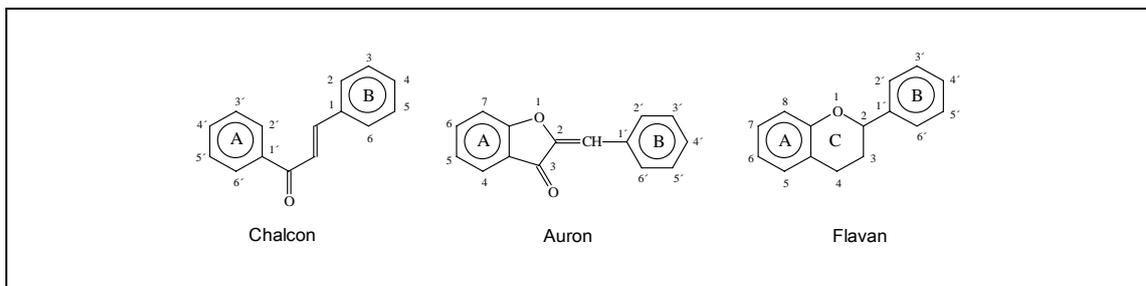


Abbildung 2: Nomenklatur der Chalcone, Aurone und Flavonoide

Die wichtigste Gruppe gelber Blütenpigmente sind die Carotinoide, diese können an Fettsäuren oder Proteine gebunden werden, die Einlagerung erfolgt in den Chromoplasten. Fast alle gelben und zitronengelben, carotinoidhaltigen Blüten enthalten hauptsächlich Xanthophylle wie Zeaxanthin und seine 5,8-Epoxide Auroxanthin und Flavoxanthin.

Gelbe Flavonole wie Gossypetin oder Quercetagetin verdanken ihre Farbe einer zusätzlichen Hydroxylgruppe in Position 6 oder Position 8 am aromatischen A-Ring. Gossypetin und seine Derivate sind für die Blütenfarbe der Baumwolle (*Gossypium hirsutum*) verantwortlich, Quercetagetin findet man in Pflanzengattungen wie *Rudbeckia* und *Tagetes*. Bei der Ausbildung der gelben Farbe kommt es oft zu Mischungen von gelben Farbpigmenten aus zweier nicht miteinander verwandten Pigmentklassen, vor allem von Carotinoiden und Flavonoiden. Die Bedeutung solcher Mischungen ist vor allem im Zusammenhang mit speziellen Blütenmustern (Honey guides) zu sehen, wobei in dem entsprechenden Kapitel (1.2) näher darauf eingegangen werden soll.

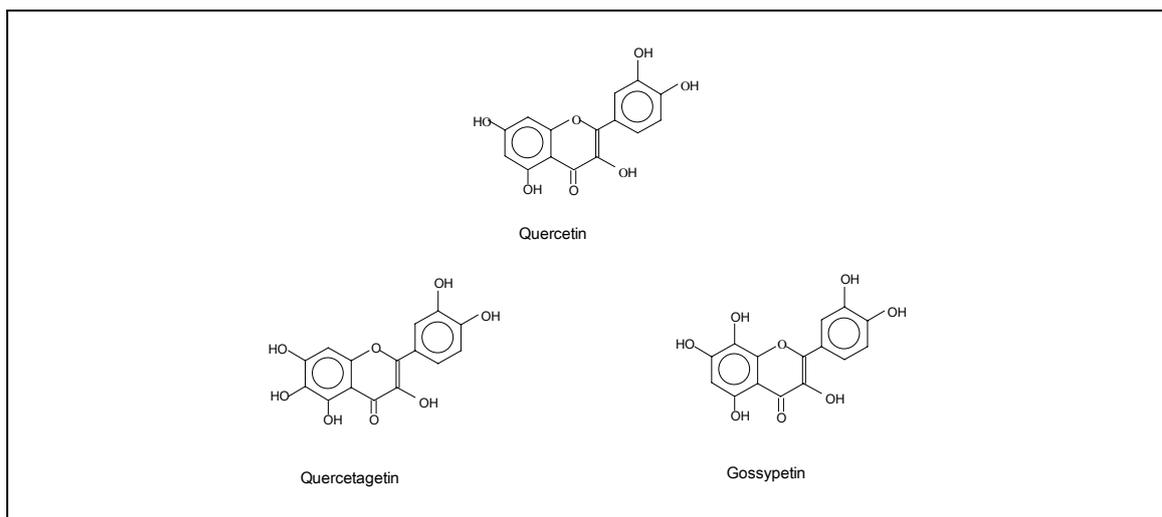


Abbildung 3: Chemische Struktur von Quercetin und zwei gelben Flavonolen

Chalcone und Aurone sind von anderen gelben Farbstoffen leicht durch ihren typischen Farbwechsel von Gelb zu Rot bei Bedampfung mit Ammoniak zu unterscheiden. Anthochlore Pigmente haben in der Natur eine beschränkte Verbreitung und wurden als Blütenfarbstoffe bisher in neun Pflanzenfamilien nachgewiesen [Harborne, 1967]. Sie dienen einer Anzahl von Pflanzen, die zur Familie der Asteraceae gehören, als gelbe Pigmente. Chalcone werden beispielsweise in den Petalen von Gattungen wie *Cosmos*, *Coreopsis*, *Bidens* und *Helichrysum* akkumuliert, weiters findet man sie in der Pflanzengattung *Antirrhinum*, die zur Familie der Wegerichgewächse zählt.

1.2 Honey Guides

Die Aufgabe der Blütenmale (Honey guides) besteht darin, bestäubende Insekten zum Blütenzentrum zu leiten, wo sich die Fortpflanzungsorgane und der Nektar befinden. Sie sind besonders auffällig bei Blüten, die von Bienen bestäubt werden [Harborne, 1995]. Honey guides können oft auch für das menschliche Auge in Form von farbigen Tupfen oder Linien am Blütenblatt sichtbar sein, weiters entstehen sichtbare Blütenmale oftmals auch durch lokale Konzentrationen von Anthocyanpigmenten in bestimmten Bereichen der Blütenkrone. Bei gelben Blüten kommt es häufig zur Ausprägung von Honey guides, die für das menschliche Auge unsichtbar sind, von Insekten jedoch sehr gut wahrgenommen werden aufgrund der intensiven Absorption im UV-Bereich. In diesem Zusammenhang wurden ausführliche Untersuchungen an *Rudbeckia hirta* (Rauher Sonnenhut) durchgeführt [Thompson *et al.*, 1972], diese enthält 2 Typen gelber Pigmente, das Carotinoid für die gelbe Blütenfarbe zur Anlockung von Bestäubern (Bienen), gelbe Flavonole in der inneren Zone der Blüte, welche als Honey guides im UV-Bereich fungieren [Harborne und Smith, 1978].

Neben den bereits vorher erläuterten chemisch unterschiedlich aufgebauten Farbpigmenten gibt es auch noch Verbindungen, die in weißen Blüten vorkommen. Für das menschliche Auge werden diese kaum als Farbe wahrgenommen und führen zu einer Elfenbeinfärbung, jedoch können Insekten diese Pigmente unterscheiden, da sie Absorptionsunterschiede im nahen UV-Bereich wahrnehmen können. Zu diesen Flavonoiden zählen Flavone (Luteolin und Apigenin) als auch Flavonole (Kämpferol und Quercetin) [Harborne, 1995].

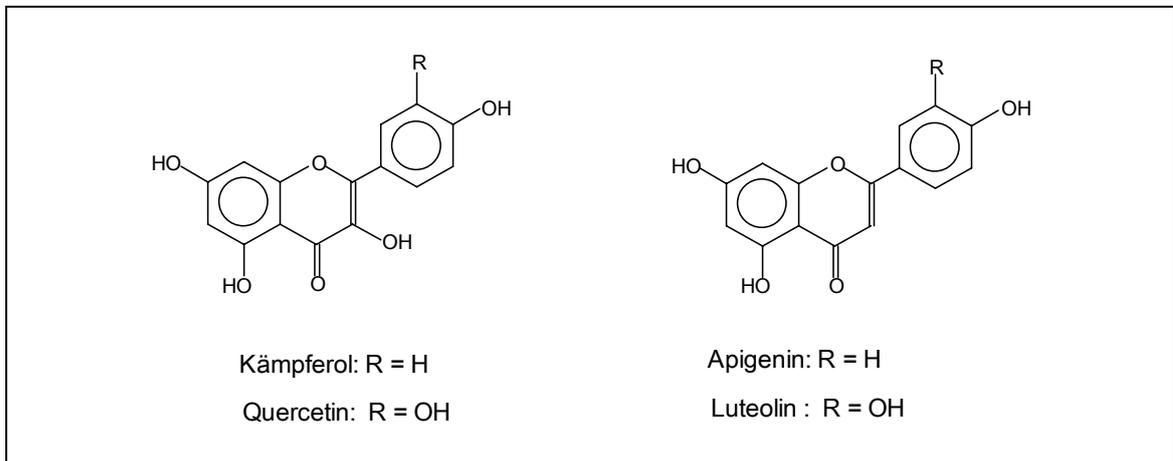


Abbildung 4: Flavone und Flavonole in weißen Petalen

Die Wahrnehmung von Blütenfärbung ist abhängig von der Art des Betrachters und von dessen physiologischen Möglichkeiten. In der Regel verfügt der Mensch über eine trichromale Wahrnehmung im Bereich von 400 – 700 nm,

wobei die Gesamtheit des sichtbaren Spektrums als weiße Farbe empfunden wird. Einzelne Wellenlängenbereiche werden als Farbe wahrgenommen, das für den Mensch sichtbare Spektrum reicht von der Farbe Rot im langwelligen Bereich über die Farben Orange, Gelb, Grün und Blau bis zu Violett im kurzwelligen Bereich [Schmidt, 1999]. Bei Bienen beruht die Farbwahrnehmung ebenfalls auf einem trichromalen System [McCrea und Levy, 1983], jedoch gegenüber dem Mensch ist das für Honigbienen erkennbare Farbspektrum in Richtung kürzerer Wellenlänge verschoben. Sie sind daher unempfindlich gegenüber Rot, nehmen jedoch den nahen Ultraviolett-Bereich (300-400 nm) als Farbe wahr [Rieseberg *et al.*, 1985; Daumer, 1958]. Aufgrund dieser Tatsache fliegen Bienen vor allem gelb- und blau gefärbte Blüten an, wobei diese selektive Bestäubung eine evolutionäre Entwicklung in Richtung dieser Blütenfarben bewirkt hat.

1.3 Flavonoide

Flavonoide, sowie die mit ihnen biochemisch verwandten Chalcone und Aurone, nehmen unter den pflanzlichen Sekundärmetaboliten eine herausragende Stellung ein. Sie sind in höheren Pflanzen generell verbreitet, ihr Vorkommen ist nicht auf bestimmte Pflanzenteile beschränkt. Man findet sie in Blüten, Früchten, Blättern, Wurzeln sowie im Holz und in der Rinde. Sie sind an der Farbgebung in Blüten beteiligt und an der Bildung von UV-aktiven Honey guides. Flavonoide spielen weiters eine wichtige Rolle bei der Regulation des Wachstums, beim Schutz vor Fraßfeinden und beim Schutz vor Strahlenschäden durch UV-Strahlung [Brödenfeldt und Mohr, 1988; Lois, 1994].

Eine wichtige Untergruppe der Flavonoide, die Anthocyane, sind sehr bedeutende Pflanzenpigmente, sie sind verantwortlich für die Bildung von Violett- und Blautönen. Ihre Synthese und Akkumulation findet vor allem in den Blüten statt, aber auch in anderen Organen der Pflanze wie in Früchten, Wurzeln und Stengeln. Die mit den Flavonoiden biochemisch eng verwandten Chalcone und Aurone (anthochlore Pigmente) sind ebenfalls wichtige Pflanzenpigmente, welche, wie bereits erwähnt, für die gelbe Färbung von Blüten verantwortlich sind.

Ein Großteil der allgemeinen Flavonoidbiosynthese ist bis heute genetisch und biochemisch charakterisiert [Forkmann, 1994; Forkmann und Heller, 1999], ebenso sind alle wichtigen Strukturgene auf molekularer Ebene charakterisiert und heterolog exprimiert worden [Winkel-Shirley, 2001]. Im Gegensatz dazu ist die Biosynthese im Bereich der Proanthocyanidinsysteme noch nicht aufgeklärt, so ist beispielsweise der genaue Chemismus der Polymerisation von Lignin-Vorstufen zum dreidimensionalen Makromolekül noch unbekannt.

Die Flavonoide leiten sich vom C₁₅-Gerüst des Flavans (2-Phenylchroman) ab, welches aus zwei aromatischen C₆-Ringen (Notation: A,B) und einem heterozyklischen Pyranring (Notation: C) besteht. Die biochemisch verwandten Chalcone und Aurone werden nicht zu den Flavonoiden gezählt, da ihre chemische Struktur von der des Flavangerüstes abweicht, ebenso ist die Nummerierung ihrer Ringsysteme unterschiedlich aufgrund der entsprechenden Nomenklaturregeln (siehe Abb.2).

1.3.1 Einteilung der Flavonoide

Je nach dem Oxidationszustand des Pyranrings erfolgt eine weitere Unterteilung innerhalb der Flavonoide, die wichtigsten Klassen hierbei sind:

- Flavanone
- Flavone
- Dihydroflavonole
- Flavonole
- Flavan-3,4-diole (Leucoanthocyanidine)
- Anthocyanidine
- Flavan 3-ole

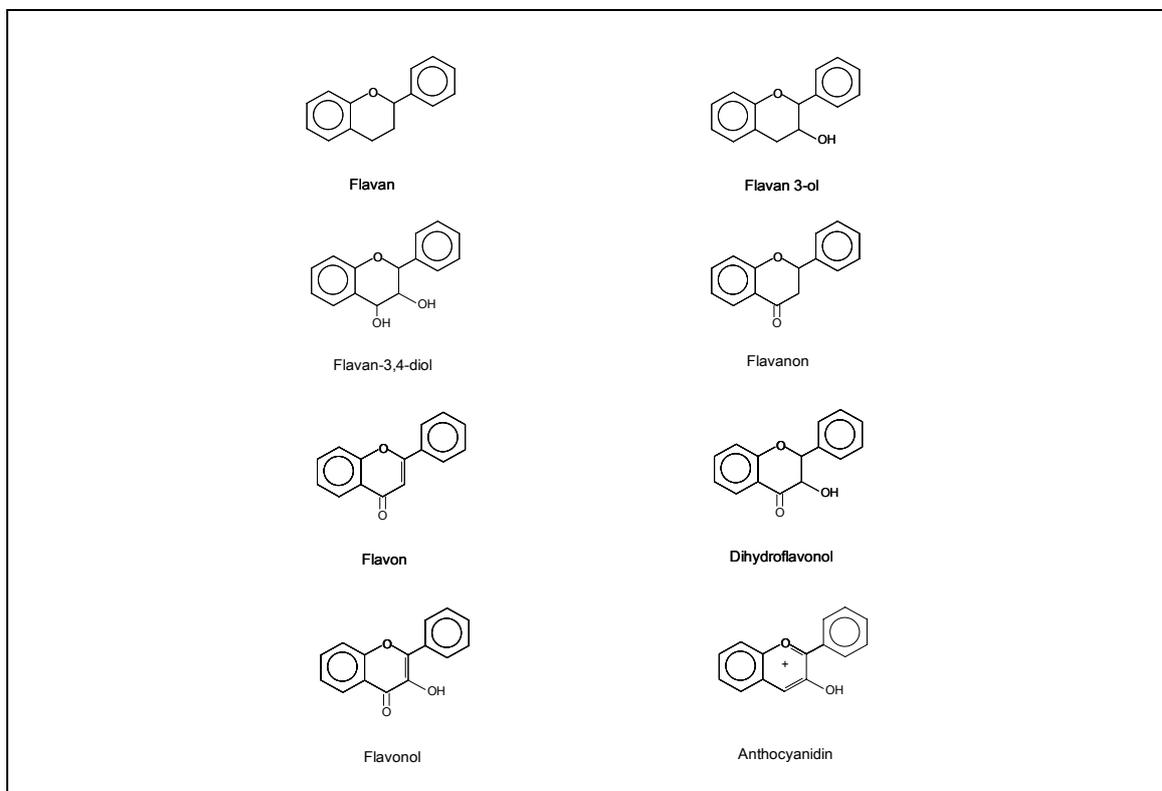


Abbildung 5: Einteilung der Flavonoide nach dem Oxidationszustand des Pyranrings

1.4 Flavonoidbiosynthese

1.4.1 Der Flavonoidbiosyntheseweg

Die unterhalb angeführte Biosynthese gibt einen Überblick über die entstehenden Flavonoidklassen und die verschiedenen Enzyme des Flavonoidbiosyntheseweges:

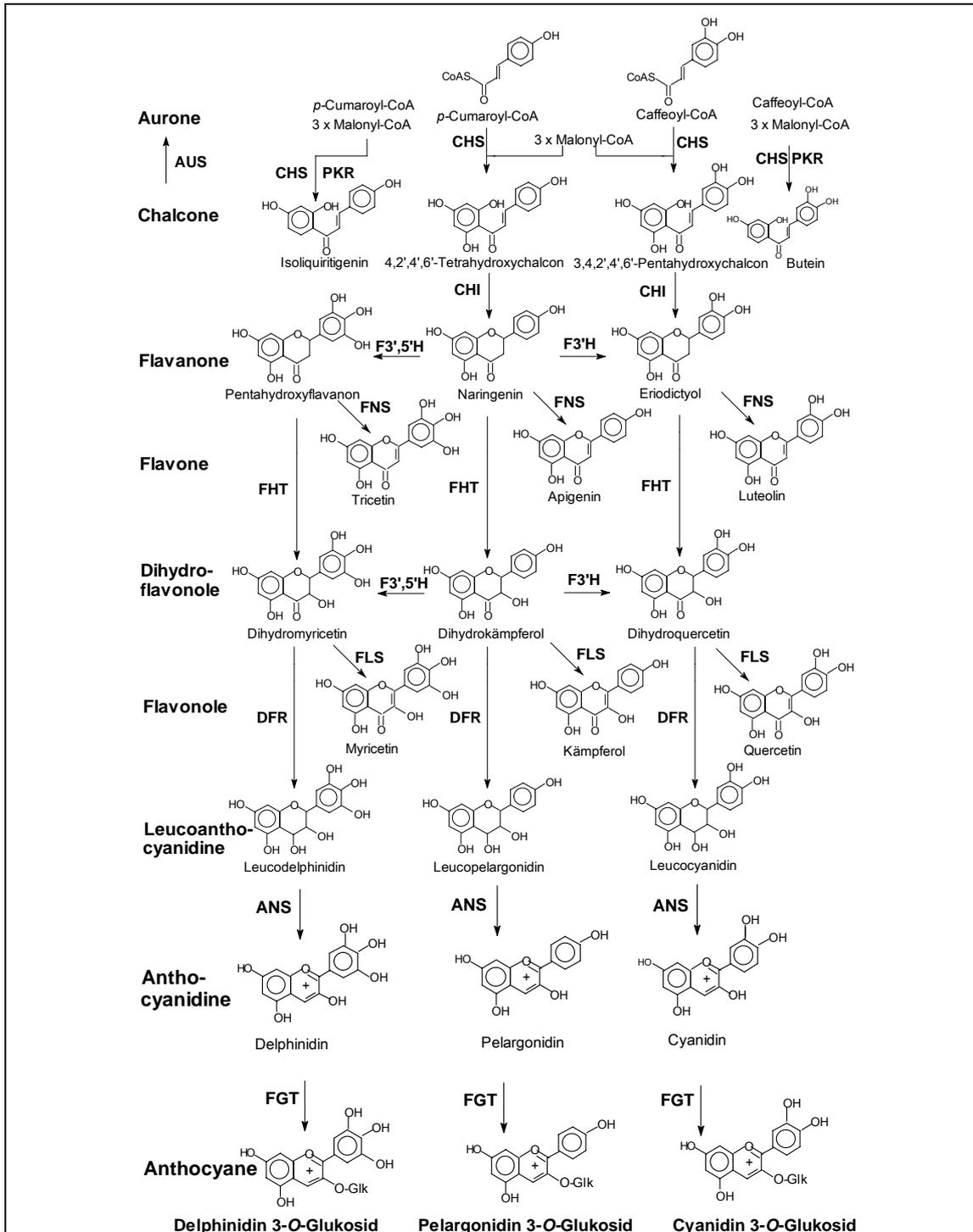


Abbildung 6: Übersicht über die Flavonoidbiosynthese

1.4.2 Precursor der Flavonoidbiosynthese

Durch Kondensation von Malonyl-CoA und eines entsprechenden *p*-Hydroxyzimtsäure-CoA-Esters, meist handelt es sich um *p*-Cumaroyl-CoA, kommt es zur Bildung des entsprechenden C₁₅-Grundkörpers. Die Biosynthese des Malonyl-CoA erfolgt aus Acetyl-CoA und CO₂, die Katalyse dieser Reaktion erfolgt durch das Enzym Acetyl-CoA-Carboxylase.

Ausgehend vom L-Phenylalanin erfolgt die Biosynthese des *p*-Hydroxyzimtsäure-CoA-Esters (*p*-Cumaroyl-CoA oder 4-Cumaroyl-CoA). Phenylalanin wird mit Hilfe des Enzyms Phenylalaninammoniumlyase (PAL) in die *trans*-Zimtsäure umgewandelt. Durch Wirkung der Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) entsteht aus der *trans*-Zimtsäure durch Hydroxylierung die *p*-Cumarsäure, diese wird durch die 4-Cumarat-CoA-Ligase (4CL), auch als *p*-Cumarat-CoA-Ligase bezeichnet, mit Coenzym A verestert, es entsteht das chemisch reaktive *p*-Cumaroyl-CoA (4-Cumaroyl-CoA).

Die entstehenden Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester sind nicht nur Ausgangssubstrate für die Bildung der Chalcone, Aurone und der Flavonoide, sondern auch für viele andere Phenylpropane wie beispielweise Lignin, Stilbene und Cumarine [Richter, 1988].

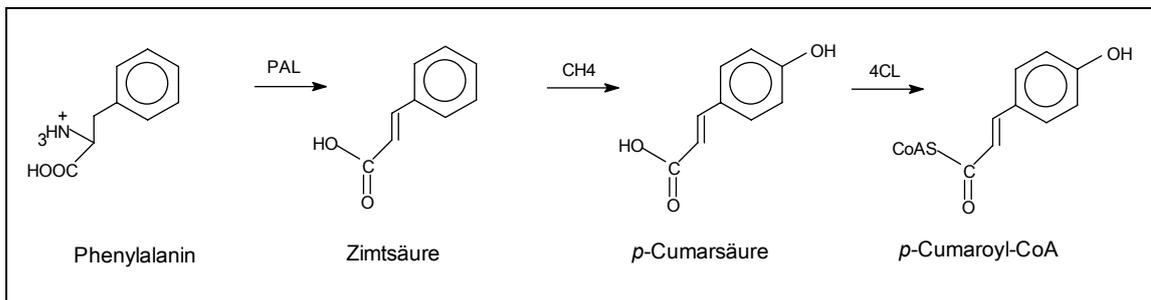


Abbildung 7: Precursor der Flavonoidbiosynthese

PAL	Phenylalaninammoniumlyase
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase
4CL	4-Cumarat-CoA-Ligase (<i>p</i> -Cumarat-CoA-Ligase)

1.4.3 Biosynthese der Chalcone

Chalcone und Aurone haben in der Natur eine beschränkte Verbreitung und wurden als Blütenfarbstoffe bisher in neun Pflanzenfamilien nachgewiesen. Sie

dienen einer Anzahl von Pflanzen, die zur Familie der Asteraceae gehören, als gelbe Pigmente.

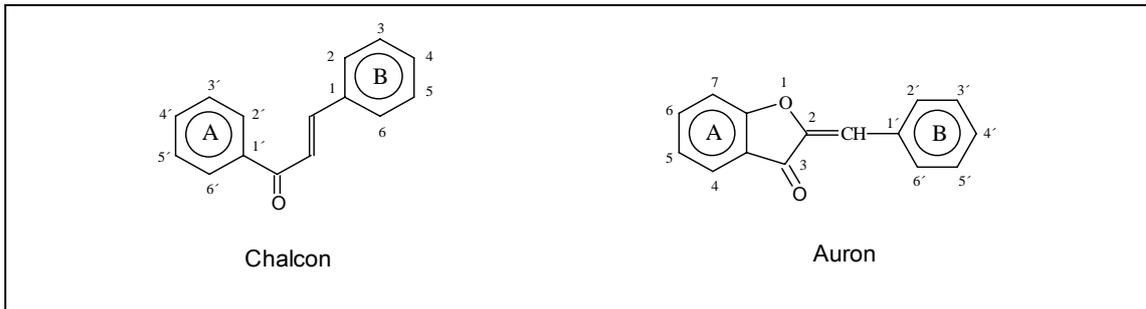


Abbildung 8: Nomenklatur der Chalcone und Aurone

Die Chalcone sind die ersten C₁₅-Körper, die im Flavonoidbiosyntheseweg entstehen, sie sind Substrate für die weitere Flavonoid- und Auronbiosynthese.

In Pflanzen können zwei Arten von Chalconen synthetisiert werden:

- 6'-Hydroxychalcone
- 6'-Deoxychalcone

6'-Hydroxychalcone, welche Intermediate bei der Biosynthese der weit verbreiteten 5-Hydroxyflavonoide sind, entstehen durch Katalyse der Chalconsynthase (CHS) aus drei Molekülen Malonyl-CoA und dem entsprechenden Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester.

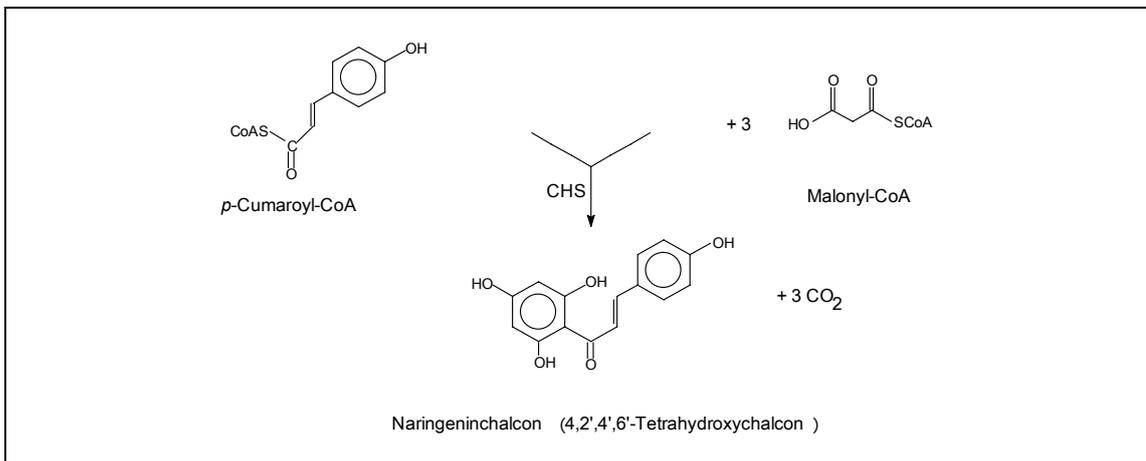


Abbildung 9: Biosynthese von Naringenin chalcon

In vivo ist generell *p*-Cumaroyl-CoA das bevorzugte Substrat für die CHS, *in vitro* werden auch andere *p*-Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester wie Caffeyoyl-CoA oder Cinnamoyl-CoA umgesetzt [Schröder, 1999]. Die Biosynthese mit

p-Cumaroyl-CoA führt zur Bildung des Naringeninchalcons, Caffeoyl-CoA wird mit Malonyl-CoA zum Eriodictyolchalcon umgesetzt.

Bevorzugt wird jedoch *p*-Cumaroyl-CoA. Daraus kann geschlossen werden, dass dieses als natürliches Substrat fungiert. Das entstehende Chalcon besitzt dann an der Position 4 des B-Ringes eine Hydroxylgruppe. In Pflanzengewebe kommt es selten zur Akkumulation von 6'-Hydroxychalconen, da diese in der Regel sofort umgewandelt werden. Chalcone werden von der Chalconisomerase (CHI) stereospezifisch in 2S-Flavanone umgewandelt, nur diese können von den nachfolgenden Enzymen des Biosynthesewegs verwertet werden [Holton und Cornish, 1995].

Die Bildung der 6'-Deoxychalcone war lange unbekannt. Ihre Biosynthese und die der isomeren 5-Deoxyflavanone aus Malonyl-CoA und *p*-Cumaroyl-CoA konnte erstmals mit Rohextrakten aus *Glycyrrhiza echinata* in Gegenwart hoher NADPH-Konzentrationen gezeigt werden [Ayabe *et al.*, 1988]. Detaillierte Studien mit Enzymextrakten aus *Pueraria lobata* ergaben auch eine Abhängigkeit der Biosynthese vom pH-Wert und der Ionenstärke. Welle und Grisebach gelang 1988 die Isolierung einer Polyketidreduktase (PKR) aus Sojabohnenzellkulturen. Mit gereinigter Chalconsynthase aus Sojabohnen und der Reduktase wurde bei Anwesenheit von NADPH, Malonyl-CoA und *p*-Cumaroyl-CoA die Bildung von Isoliquiritigenin beobachtet. Bei Einsatz von Caffeoyl-CoA unter gleichen Bedingungen konnte die Bildung von Butein bestätigt werden.

Die Biosynthese von Chalconglukosiden wurde im Detail von Halbwirth in *Coreopsis grandiflora* untersucht [Halbwirth *et al.*, 1997]. Die orange Blütenfarbe dieser Pflanze ist zurückzuführen auf das entsprechende Vorhandensein von Butein 4'-O-Glukosid und dem strukturanalogen Auron Sulfuretin 6-O-Glukosid. Aufgrund der dabei erhaltenen Daten kann man annehmen, dass die Bildung des Chalcon- und Auronglukosids von der selben Glykosyltransferase katalysiert wird.

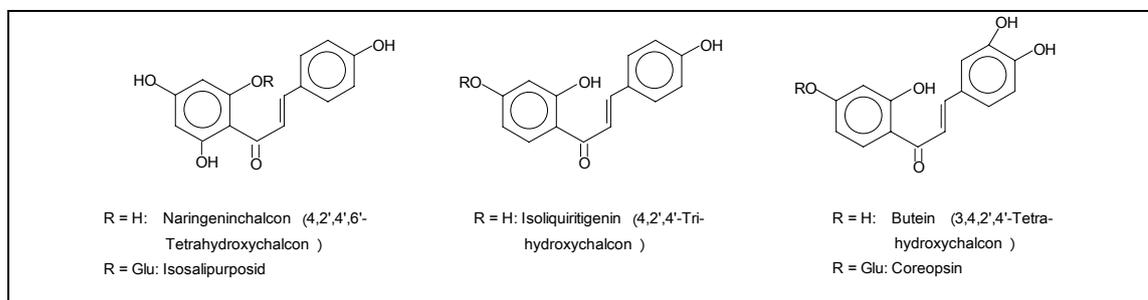


Abbildung 10: Beispiele für Chalkone

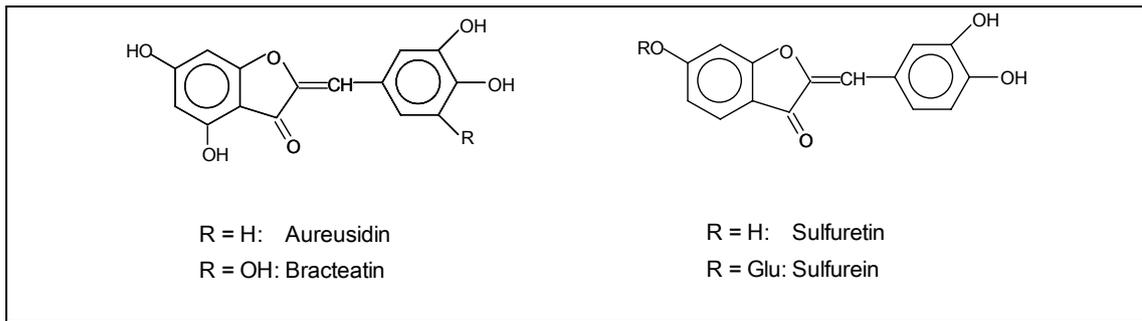


Abbildung 11: Beispiele für Aurone

1.4.4 Biosynthese der Flavanone

Die Chalcone (Biosynthese siehe 1.4.3) werden von der Chalconisomerase (CHI) stereospezifisch in die 2S-Flavanone umgewandelt. 6'-Hydroxychalcone (z.B. Naringenchalcon) können sowohl enzymatisch als auch chemisch cyclisieren. Bei der enzymatischen Cyclisierung durch die CHI wird das Naringenchalcon in stereospezifischer Weise zum entsprechenden Flavanon, dem Naringenin (4'-Hydroxylierungsmuster des B-Rings) cyclisiert [Holton und Cornish, 1995]. Dient Caffeoyl-CoA der CHS als Substrat, entsteht bei gleichzeitiger Anwesenheit der CHI das Flavanon Eriodictyol (3',4'-Hydroxylierungsmuster des B-Rings).

Die Cyclisierung der 6'-Hydroxychalcone kann aber *in vitro* und *in vivo* auch spontan erfolgen, dies führt zu einem racemisierten Gemisch der Flavanone. Für die weitere Reaktion wird jedoch nur das 2S-Isomer als Substrat genutzt. 6'-Deoxychalcone hingegen sind chemisch stabil und eine Cyclisierung kann nur enzymatisch erfolgen.

Die Flavanone Naringenin und Eriodictyol stellen die ersten echten Flavonoidstrukturen dar. Sie können als zentrale Intermediate der Flavonoidbiosynthese angesehen werden, da sie die Vorstufen aller Flavonoidklassen darstellen.

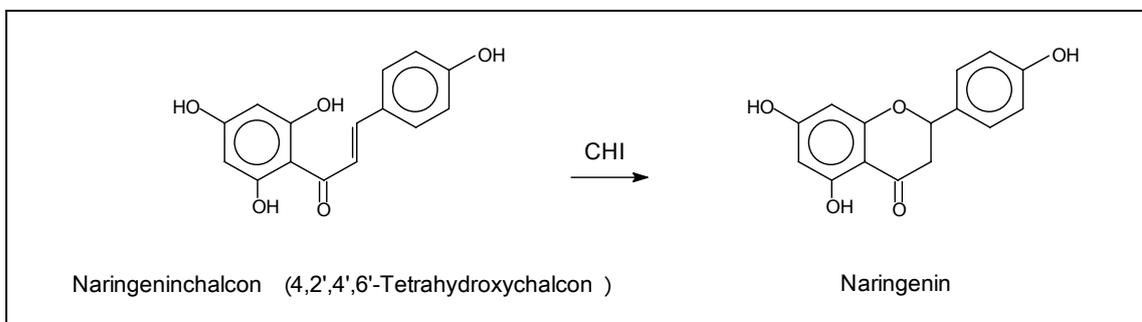


Abbildung 12: Bioynthese von Naringenin

1.4.5 Biosynthese der Flavone

Flavanone wie Naringenin werden durch Einführen einer Doppelbindung zwischen dem C2-Atom und dem C3-Atom des Pyranrings mit Hilfe der Flavonsynthase (FNS) in die entsprechenden Flavone übergeführt. Bei der FNS I handelt es sich um eine 2-Oxoglutarat-, Fe^{2+} -abhängige Dioxygenase [Sutter *et al.*, 1975; Britsch *et al.*, 1981], im Gegensatz dazu benötigt die FNS II, eine mikrosomal gebundene Monooxygenase, als Cofaktor NADPH [Heller und Forkmann, 1993].

Die FNS II konnte in den meisten Pflanzen nachgewiesen werden, die FNS I bis jetzt nur in der Pflanzenfamilie der Apiaceae (Doldenblütler).

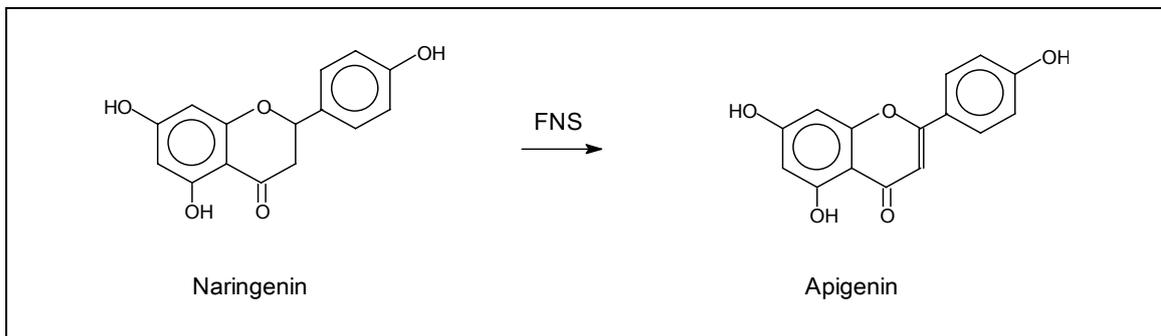


Abbildung 13: Biosynthese von Apigenin

1.4.6 Biosynthese der Dihydroflavonole

Die Synthese von Dihydroflavonolen wird durch das Enzym Flavanon 3-Hydroxylase (FHT) katalysiert, im Zuge dieser Reaktion kommt es zu einer Hydroxylierung der entsprechenden Flavanone am C3-Atom des heterozyklischen Ringes. Als Cofaktoren benötigt die FHT 2-Oxoglutarat, Fe^{2+} und Ascorbat, das Enzym wird daher als eine 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase klassifiziert.

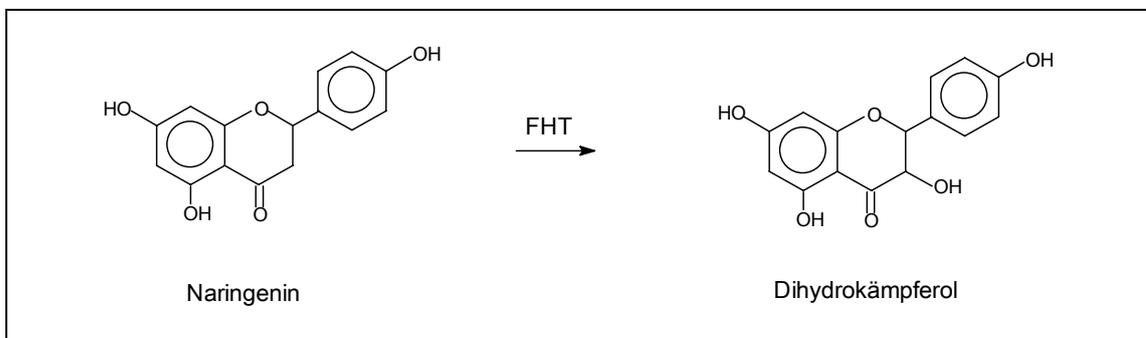


Abbildung 14: Biosynthese von Dihydrokämpferol

1.4.7 Biosynthese der Flavonole

Die Flavonolsynthase (FLS) katalysiert die Umwandlung der Dihydroflavonole zu den Flavonolen, beispielsweise die Synthese von Kämpferol aus Dihydrokämpferol. Mit Hilfe der FLS kommt es bei dieser Reaktion zur Einführung einer Doppelbindung in den Pyranring zwischen dem C2- und C3-Atom des entsprechenden Dihydroflavonols. Aufgrund der benötigten Cofaktoren wird die Flavonolsynthase als 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase klassifiziert [Forkmann und Heller, 1999].

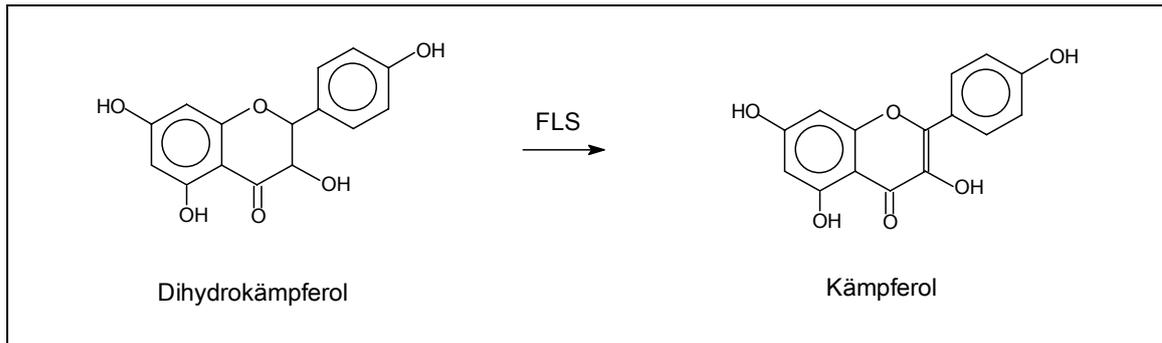


Abbildung 15: Biosynthese von Kämpferol

1.4.8 Biosynthese der Leucoanthocyanidine

Die Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR) katalysiert die Reduktion der Dihydroflavonole zu den entsprechenden Leucoanthocyanidinen (Flavan-3,4-cis-diole) durch Reduktion der Ketogruppe des heterozyklischen Ringes an der Position C4.

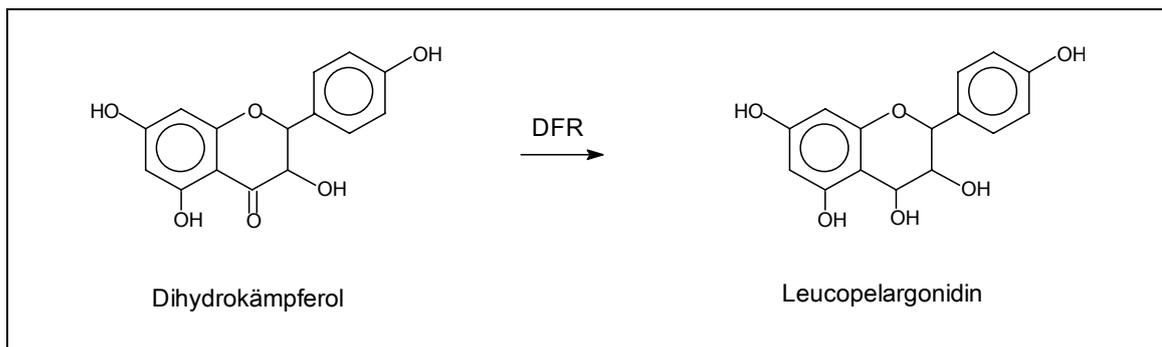


Abbildung 16: Biosynthese von Leucopelargonidin

1.4.9 Biosynthese der Anthocyanidine

Die Anthocyanidinsynthese (ANS) katalysiert die Synthese von Anthocyanidinen aus den entsprechenden Leucoanthocyanidinen. Die ANS wird ebenso wie die FHT und FLS als 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase klassifiziert [Forkmann und Heller, 1999]. Die Glykosylierung trägt zur Stabilisierung der Anthocyanidine bei, die mit einer freien Hydroxylgruppe an der Position 3 unter physiologischen pH-Bedingungen instabil sind. In der Pflanze werden diese Moleküle durch die Flavonoid 3-O-Glykosyltransferase (F3GT) stabilisiert, indem sie die C3-Hydroxylgruppe glykosyliert [Schlangen, 2003].

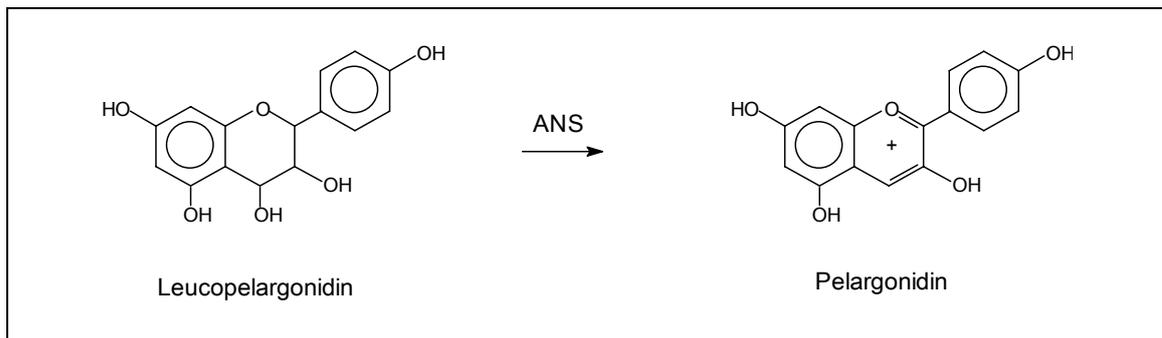


Abbildung 17: Biosynthese von Pelargonidin

1.5 Modifikation von Flavonoiden

Die Vertreter der einzelnen Flavonoidklassen können durch verschiedene Reaktionen modifiziert werden, dabei entsteht eine sehr große Vielfalt an Flavonoiden, bis heute wurden mehr als 6000 zu dieser Gruppe gehörenden Verbindungen isoliert und identifiziert [Harborne und Baxter, 1999].

Innerhalb einer Flavonoidklasse können Modifikationen durch folgende Reaktionen entstehen:

- Hydroxylierung
- Methylierung
- Glykosylierung
- Acylierung

Hydroxylierung und Methylierung finden bevorzugt am B-Ring an der Position 3' oder 5' statt. Glykosylierung und Acylierung erfolgen primär am A-Ring oder am C-Ring. Diese Modifikationen verändern Eigenschaften wie Löslichkeits- und Absorptionsverhalten (Farbe) und können dadurch maßgeblich zur chemischen Stabilisierung einer Substanz beitragen.

1.5.1 Hydroxylierung von Flavonoiden

Hydroxylierungsreaktionen können im Flavonoidbiosyntheseweg durch verschiedene Klassen von Hydroxylasen durchgeführt werden [Fischer *et al.*, 2006]. Zum einen durch im Cytosol lokalisierte Dioxygenasen, diese benötigen als Cofaktoren 2-Oxoglutarat, Fe^{2+} und Ascorbat, dazu zählen die FHT und die Flavonol 6-Hydroxylase I (F6H I). Die FHT katalysiert die Umwandlung von Flavanonen zu den entsprechenden Dihydroflavonolen, die F6H I hingegen akzeptiert ausschließlich methylierte Flavonole als Substrate [Anzellotti und Ibrahim, 2000].

Eine weitere Klasse von Hydroxylasen bilden die Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen. Dabei handelt es sich um membrangebundene Oxidoreduktasen, die als Cofaktor NADPH und molekularen Sauerstoff benötigen. Entsprechende Enzyme dieser Klasse stellen die Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H) und die Flavonoid 3',5'-Hydroxylase (F3',5'H) dar. Sie gehören zur Gruppe der Cytochrom P450-abhängigen Proteine, die in Bakterien, Insekten, Säugern, Pflanzen und Pilzen nachgewiesen werden konnten [Chapple, 1998]. Pflanzliche Cytochrom P450-abhängige Proteine sind an vielen biochemischen Stoffwechselwegen beteiligt und spielen auch eine wichtige Rolle bei der Synthese von Pflanzenprodukten.

1.5.1.1 Hydroxylierungen im B-Ring

Fast alle bekannten Flavonoide besitzen im B-Ring mindestens eine Hydroxylgruppe und zwar an der Position 4'. Diese Hydroxylgruppe wird schon vor der eigentlichen Flavonoidbiosynthese durch die Precursor von Malonyl-CoA mit einem entsprechenden Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester determiniert. Meistens wird *p*-Cumaroyl-CoA verwendet. Die CHS akzeptiert jedoch *in vitro* auch andere Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester. Wird Caffeoyl-CoA anstatt *p*-Cumaroyl-CoA verwendet, entstehen Chalcone und in weiterer Folge Flavonoide, die ein 3,4- bzw. 3',4'-Hydroxylierungsmuster aufweisen. Allerdings bevorzugen CHS *p*-Cumaroyl-CoA als Substrat. Bislang konnte die physiologische Relevanz von Caffeoyl-CoA als Precursor der Flavonoidbiosynthese lediglich in Verbenen [Forkmann und Heller, 1999] nachgewiesen werden. Im Regelfall werden zusätzliche Hydroxylgruppen im B-Ring erst später auf der Ebene der Flavonoide eingeführt.

Am häufigsten werden Hydroxylierungen im B-Ring an der Position 3' und 5' durchgeführt. Dieser Schritt wird durch die beiden Cytochrom P450-abhängigen Enzyme F3'H und F3',5'H katalysiert (Abb.18). Diese Monooxygenasen akzeptieren eine Reihe von Flavonoidklassen als Substrate, und zwar

Flavanone, Flavone, Flavonole und Dihydroflavonole. Leucoanthocyanidine, Anthocyanidine und Anthocyane werden hingegen nicht mehr in die entsprechenden 3',4'-hydroxylierten Verbindungen überführt [Holton *et al.*, 1993; Kaltenbach *et al.*, 1999; Shimada *et al.*, 1999]. Die Einführung einer zusätzlichen Hydroxylgruppe an der Position 3' muß im Flavonoidbiosyntheseweg also vor der Bildung der Leucoanthocyanidine erfolgen.

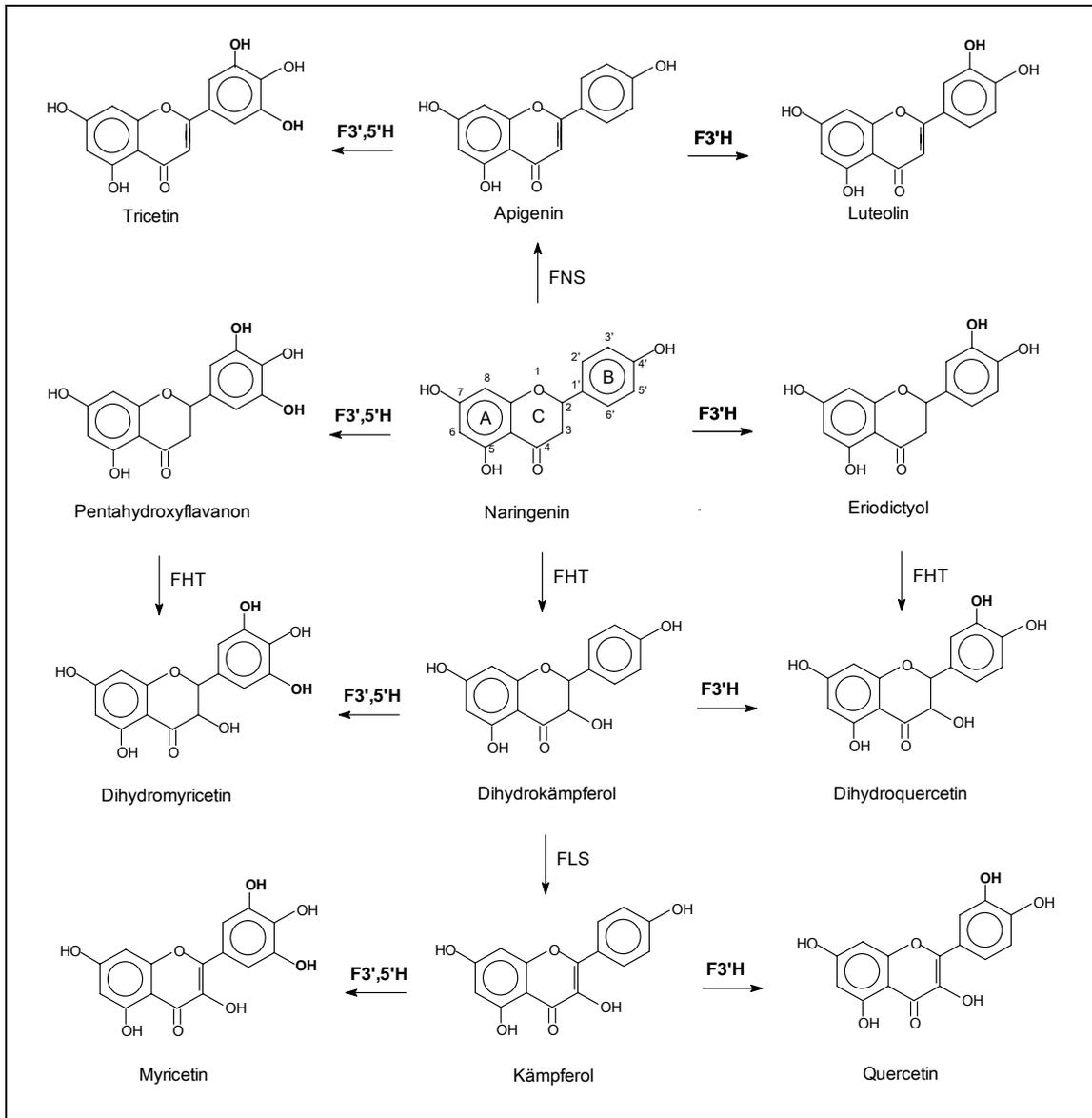


Abbildung 18: Hydroxylierung durch F3'H und F3',5'H

Der Hydroxylierungsgrad des B-Ringes, der durch die F3'H und F3',5'H determiniert wird, ist maßgeblich für die Farbgebung der Anthocyane. Durch steigende Anzahl der Hydroxylgruppen wird der Absorptionsbereich des entsprechenden Anthocyanins in Richtung größere Wellenlängen, also in den Blaubereich, verschoben. Weitere Verschiebungen des Absorptionsbereiches

werden durch diverse Modifikationen wie Methylierung von Hydroxylgruppen oder aromatische Acylierungen ermöglicht.

Die F3'H akzeptiert 4'-hydroxylierte Substrate wie Naringenin oder Dihydrokämpferol und wandelt diese in die entsprechenden 3',4'-Hydroxyverbindungen Eriodictyol und Dihydroquercetin um. Im Gegensatz dazu akzeptiert die F3',5'H *in vitro* sowohl 4'- als auch 3',4'-hydroxylierte Substrate und wandelt diese in die entsprechenden 3',4'- oder 3',4',5'-Hydroxyverbindungen (Dihydrokämpferol ist dabei das Substrat für die Bildung von Dihydromyricetin) um [Menting *et al.*, 1994].

Durch phylogenetische Analysen von Seitz konnte bewiesen werden, dass die F3'H evolutionär vor der F3',5'H existierte [Seitz *et al.*, 2006; 2007]. Weiters konnte auch die unabhängige Evolution von F3',5'H-Sequenzen in der Unterfamilie der Asteroideae (*Osteospermum hybrida*) innerhalb der Asteraceae-F3'Hs bestätigt werden. Offensichtlich war zu Beginn der Diversifikation der Asteraceae noch kein entsprechendes Gen für die Expression der F3',5'H vorhanden, die Begründung stützt sich dabei auf die Abwesenheit von 3',4',5'-hydroxylierten Flavonoiden, beispielweise Delphininderivate, in den primitiven Stämmen der Asteraceae [Bohm und Stuessy, 2001].

Chalcone sind die biochemischen Precursor der Flavonoide. Sie haben einen ähnlichen Aufbau, besitzen aber im Gegensatz zu den Flavonoiden keinen heterozyklischen C-Ring. Die Ausbildung des Hydroxylierungsmusters des B-Ringes ist auch hier auf zwei Wegen möglich. Die Reaktion mit 3 Molekülen Malonyl-CoA und Caffeoil-CoA anstelle von *p*-Cumaroyl-CoA unter der Katalyse von CHS führt zur Ausbildung eines 3,4-Hydroxylierungsmusters am B-Ring. Die Hydroxylgruppe an der Position 3 kann aber auch nach Ausbildung des C₁₅-Gerüsts der Chalcone durch ein spezifisches Enzym eingeführt werden. Die Einführung einer Hydroxylgruppe im B-Ring von Chalconen an der Position 3 entspricht dabei jener der Position 3' in Flavonoiden.

Mit Hilfe von Enzympräparationen aus *Dahlia variabilis* konnte erstmals eine entsprechende Hydroxylierung des B-Rings von Chalconen an Position 3 des 6'-Deoxychalcones Isoliquiritigenin nachgewiesen werden [Wimmer *et al.*, 1998]. Das dafür verantwortliche Enzym ist in der mikrosomalen Fraktion lokalisiert und zeigt eine strikte Abhängigkeit von NADPH und molekularem Sauerstoff. Es wurde als Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase identifiziert. Die Frage, ob es sich dabei um ein eigenständiges Enzym handelt oder ob die F3'H auch die Hydroxylierung von Chalconen katalysiert, ist bislang nicht schlüssig geklärt.

1.5.1.2 Hydroxylierungen im A-Ring

Hydroxylierungen im A-Ring können von verschiedenen Enzymklassen durchgeführt werden. Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen sind die Flavonoid 6-Hydroxylase [Latunde-Dada *et al.*, 2001] und die Flavonol 6-Hydroxylase II (F6H II) aus *Tagetes patula*. Letztere wurde in der mikrosomalen Fraktion lokalisiert und benötigt molekularen Sauerstoff und NADPH als Cofaktor [Halbwirth *et al.*, 2004]. Das Enzym bevorzugt Quercetin als Substrat und setzt dieses zu Quercetagetin um, wobei Cytochrom P450-spezifische Inhibitoren die Aktivität stark herabsetzen.

Die Flavonol 8-Hydroxylase (F8H) aus *Chrysanthemum segetum* katalysiert die Einführung einer zusätzlichen Hydroxylgruppe an der Position 8 von Flavonen und Flavonolen, gehört jedoch weder zu den 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen noch zu den Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen [Halbwirth und Stich, 2006].

Aus *Chrysosplenium americanum* konnte eine 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase isoliert werden, welche Flavonole an der Position 6 hydroxyliert (F6H I). Im Gegensatz zu den Monooxygenasen akzeptiert die Dioxygenase jedoch ausschließlich methylierte Flavonole als Substrate [Anzellotti und Ibrahim, 2000].

1.5.2 Methylierung von Flavonoiden

Die Methylierung phenolischer Hydroxylgruppen führt zu einer Verringerung ihrer Reaktivität und stabilisiert dadurch das entsprechende Molekül. Der Transfer einer Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf die Hydroxylgruppen der Flavonoide wird durch O-Methyltransferasen katalysiert, S-Adenosylhomocystein hingegen wirkt meist inhibierend. Die meisten O-Methyltransferasen akzeptieren nur C₁₅-Körper als Substrate [Heller und Forkmann, 1988; 1994].

1.5.3 Glykosylierung von Flavonoiden

Ein wichtiger Modifizierungsschritt, der ebenfalls zu der großen Vielzahl an Flavonoidderivaten beiträgt, ist die Glykosylierung zur Stabilisierung der Moleküle. Er trägt zur Erhöhung der Löslichkeit des Moleküls in Wasser bei und ist auch die Voraussetzung für eine nachfolgende Acylierung des Zuckerrestes mit organischen Säuren.

Bei der Glykosylierung kommt es zur Übertragung eines Glukoserests von Uridin 5'-diphospho-Glukose auf die Hydroxylgruppen phenolischer Substrate. Die Katalyse erfolgt durch die O-Glykosyltransferasen. Da Anthocyanidine unter physiologischen pH-Bedingungen instabil sind, ist die Glykosylierung ein essentieller Bestandteil der Biosynthese. Glykosylierte Anthocyanidine werden Anthocyane genannt. Sie werden durch die Flavonoid 3-O-Glykosyltransferase (F3GT) gebildet, die die Übertragung eines aktivierten Zuckers auf die Hydroxylgruppe von Anthocyanidinen in Position 3 katalysiert [Forkmann und Heller, 1999]. Dabei stellt die Glykosylierung den letzten Schritt für die Herstellung stabiler Pigmente dar.

Bisherige Untersuchungen weisen darauf hin, dass Glykosylierungen eher positionsspezifisch erfolgen. Es wird auch ein breites Spektrum an Substraten akzeptiert [Forkmann und Heller, 1999]. Neben den 3-O-Glykosyltransferasen und den 7-O-Glykosyltransferasen sind noch weitere bekannt, welche Zuckerreste auf die Position 5 bzw. 3' von Flavonoiden übertragen können [Heller und Forkmann, 1988; 1994]. 3-O-Glukoside sind bei Flavonolen am weitesten verbreitet, an zweiter Stelle stehen 7-O-Glukoside [Sutter und Grisebach, 1975; Ebel und Hahlbrock, 1982; Bohm und Stuessy, 2001].

1.5.4 Acylierung von Flavonoiden

Allgemein ist die Einführung von Acylgruppen einer der letzten Schritte des Flavonoidbiosynthesewegs, dieser führt dazu, dass die Wasserlöslichkeit der Metabolite erhöht wird. Außerdem werden dadurch Glukoside vor einem Angriff von Glukosidasen geschützt. Die Acylierung trägt zur Stabilisierung der Anthocyanstruktur bei und spielt auch höchstwahrscheinlich eine wichtige Rolle beim Transport der Flavonoide durch die Vakuolenmembranen [Hopp und Seitz, 1987].

Die Einteilung acylierter Flavonoide erfolgt hinsichtlich des Acylrestes in zwei Gruppen, bei der ersten handelt es sich um Verbindungen, bei denen die Hydroxylgruppe des Zuckerrestes entweder mit Monocarbonsäuren oder Dicarbonsäuren aliphatischer oder aromatischer Struktur verestert ist. Bei Verbindungen der zweiten Gruppe ist ein Sulfatrest direkt mit der Hydroxylgruppe des Flavonoids verbunden.

Bezüglich aliphatischer und aromatischer Carbonsäuren weisen Acetyltransferasen eine hohe Substratspezifität auf, zudem müssen diese in Form ihrer CoA-Ester vorliegen [Heller und Forkmann, 1988; 1994].

Sulfotransferasen sind verantwortlich für die Übertragung der Sulfatgruppen auf Hydroxylgruppen. Sie benötigen 3'-Phosphoadenosin 5'-phosphosulfat als Substrat [Varin *et al.*, 1987; Varin und Ibrahim, 1989].

2 Problemstellung

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Aufklärung eines Schrittes der Biosynthese von Chalconen. Dabei soll die Hydroxylierung der Position 3, welche mit der Position 3' in Flavonoiden korreliert, durch eine Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase am B-Ring, untersucht werden.

Mit Hilfe von Enzympräparationen aus *Dahlia variabilis* [Wimmer *et al.*, 1998] konnte eine Hydroxylierung des 6'-Deoxychalcones Isoliquiritigenin zum entsprechenden 3-hydroxylierten Produkt, Butein, nachgewiesen werden. Bei dem entsprechenden Enzym handelt es sich um eine mikrosomal gebundene, Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase, wobei diese aber kein Isoliquiritigenin 4'-Glukosid als Substrat akzeptiert. Daraus kann gefolgert werden, dass die Einführung einer zusätzlichen Hydroxylgruppe am B-Ring eines Chalcones im Chalcon-Biosyntheseweg vor der Glykosylierung stattfindet. Bisher konnte noch nicht geklärt werden, ob die Hydroxylierung im B-Ring der Chalcone durch das gleiche Enzym katalysiert wird, das auch für die Einführung einer Hydroxylgruppe im B-Ring von verschiedenen Flavonoidklassen verantwortlich ist. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass auch andere- jedoch nicht alle- Pflanzen in der Lage sind, Chalcone zu hydroxylieren. Diese Fähigkeit findet man auch in Pflanzen, die keine Chalcone in ihren Blüten akkumulieren und sie korreliert nicht immer mit der F3'H-Aktivität der entsprechenden Pflanzen.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit soll geklärt werden, ob die Hydroxylierung von Chalconen an der Position 3 durch eine spezifische CH3H oder durch eine bekannte F3'H katalysiert wird. Da die weitverbreiteten 6'-Hydroxychalcone chemisch nicht stabil sind und leicht zu den entsprechenden 5-Hydroxyflavanonen isomerisieren, sollen die stabileren 6'-Deoxychalcone für die Untersuchungen eingesetzt werden.

Dazu sollen cDNA Klone von F3'Hs bzw. CH3Hs aus 3 verschiedenen Pflanzen isoliert werden, die in ihren Petalen Chalcone als gelbe Pflanzenpigmente akkumulieren. Ausgehend von der in der NCBI-Datenbank bereits vorhandenen Sequenz eines F3'H-cDNA Klons aus dem Löwenmäulchen (*Antirrhinum majus*) soll versucht werden, weitere cDNA Klone aus *Coreopsis grandiflora* und *Cosmos sulphureus* zu isolieren. Im Gegensatz zu *Antirrhinum majus*, deren gelbe Blütenfarbe auf die Akkumulation von 6'-Hydroxychalconen und davon abgeleiteten 4-Deoxyauronen beruht, werden in *Coreopsis grandiflora* und in *Cosmos sulphureus* die selteneren 6'-Deoxychalcone gebildet. Daher sollten die 6'-Deoxychalcone auch die natürlichen Substrate für ein Enzym mit CH3H-Aktivität in diesen Pflanzen darstellen.

Durch heterologe Expression der cDNA Klone in Hefe sollen rekombinante Enzyme für die Untersuchung der Substratspezifität gewonnen werden. Die Enzyme sollen auf ihre Akzeptanz von verschiedenen Flavonoidklassen und von Chalconen als Substrate getestet werden. Damit soll geklärt werden, ob die F3'Hs dieser Pflanzen in der Lage sind, Chalcone als Seitenaktivität zu hydroxylieren oder ob ein Enzym identifiziert werden kann, das eine ausgeprägte Substratspezifität für Chalcone aufweist.

3 Material und Methoden

3.1 Pflanzenmaterial

Für die Untersuchungen wurden junge Petalen aus Knospen von *Antirrhinum majus* cv. „Sonnett“, *Coreopsis grandiflora* cv. „Early Sunrise“ und *Cosmos sulphureus* cv. „Sunny Goldgelb“ verwendet. Die Samen wurden von der Firma Austrosaat bezogen. Die Pflanzen wurden von der Gärtnerei Karl Wagner angezogen und auf der Verkehrsinsel Getreidemarkt kultiviert. Die jungen Petalen wurden in den Sommermonaten 2006 und 2007 regelmäßig geerntet, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.2 Bakterien- und Hefestämme

Folgende Bakterien- und Hefestämme wurden für diese Arbeit verwendet:

TOP 10 One Shot	Bakterienstamm	Invitrogen
TOP 10F'	Bakterienstamm	Invitrogen
INVSc1	Hefestamm	Invitrogen

3.3 Geräte

Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden folgende Geräte verwendet:

Autoklav	pbi
Biofuge 22R	HERAEUS Instruments GmbH
Biofuge A	HERAEUS Instruments GmbH
Electrophoresis Power Supply EPS 600	Pharmacia
Elektrophorese-Kammer	C.B.S. Scientific CO.
Exsikkator	Glaswerk Wertheim
Feinwaage R200D	Sartorius GmbH
Gefrierschrank (-80°C) Ultima II	Revco
Gefrierschrank (-80°C)	GFL
Heizblock QBT 2	Grant Instruments
Kühlschrank	Bosch
Kühlzentrifuge Allegra™ 21 R	BECKMAN Instruments Inc.
Kühlzentrifuge Avanti™ J-26 XP	BECKMAN Coulter®
Magnetrührer	IKA-Werke
Magnetrührer	Janka & Kunkel GmbH
Microfuge Lite	BECKMAN Instruments Inc.
Mikrowelle	Philips
Thermoschrank B 6060	HERAEUS Instruments GmbH
pH-Meter pMX 3000	Technische Werkstätten

PCR Mastercycler ep-gradient	Eppendorf
Rotavapor Laborota 4000	Heidolph
Rüttler VWR 1719	VWR International
Schüttelinkubator Certomat® BS-1	B. Braun Biotech International
Spectrophotometer DU 800	BECKMAN Coulter®
Sterilbank Holten LaminAir TL2448	Heto-Holten
Szintillationszähler WinSpectral 1414	Wallac
Thermomixer Comfort	Eppendorf
TLC-Linear Analyzer LB 2842	Berthold
Typhoon 8600 Scanner	Amersham
Vakuumcontroller	KNF-Neuberger
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH

3.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Folgende Chemikalien wurden für diese Arbeit benötigt:

Agar Agar	Merck
Ampicillin	Sigma
Bromphenolblau	Merck
(¹⁴ C)-Apigenin	Synthese
CaCl ₂	Merck
Casaminosäuren	Becton Dickinson
Chloroform	Merck
CuSO ₄	Merck
DC-Celluloseplatten (20 x 20 cm)	Merck
(¹⁴ C)-Dihydrokämpferol	Synthese
2,4-Dihydroxyacetophenon	Sigma
Dithiothreitol	Sigma
DOWEX 1X2 200-400 mesh	Sigma
EDTA	Sigma
Eisessig	Merck
Eriodictyol (purum)	Roth
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Fluka
Ethylacetat	Merck
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck
Ficoll 400	Sigma
D(+)-Galaktose	Merck
Glasperlen (acid washed)	Sigma
D(+)-Glukose	Merck
Glukose 6-Phosphat	Merck
Glukose 6-Phosphat Dehydrogenase	Roche
Glycerin (87 %)	Merck
HCl (37 %)	Merck

Hefeextrakt granuliert	Merck
(¹⁴ C)-Isoliquiritigenin	Synthese
(¹⁴ C)-Kämpferol	Synthese
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
KOH	Merck
Küvette (halbmikro; 1,5 ml)	Brand
Küvette (UV; mikro; 70 µl)	Brand
λDNA/Eco471 (Avall) Marker	MBI Fermentas
L-Tryptophan	Sigma
Lysozym	Roche
(¹⁴ C)-Malonyl-CoA	Amersham
Malonyl-CoA	Sigma
MgCl ₂ -Hexahydrat	Merck
MgSO ₄ -Heptahydrat	Merck
Na-Ascorbat	Sigma
NaCl krist.	Merck
NADP ⁺	Sigma
NADPH	Boehringer Mannheim
Naringenin	Sigma
(¹⁴ C)-Naringenin	Synthese
Natriumacetat-Trihydrat	Merck
dNTPs (10 mM)	Promega
Methanol	Merck
NaOH	Merck
Na ₂ CO ₃	Merck
Oligo-(dT)-Anker Primer (25 µM)	MWG Biotech
2-Oxoglutarat	Sigma
p-Cumaroyl-CoA	Sammlung des Instituts
Pepton aus Casein	Merck
Polyclar AT	Serva
Polyethylenglykol 4.000	Sigma
Quarzsand (feinkörnig)	Merck
Sephadex G-25 (medium)	Pharmacia
Sorbitol	Sigma
Szintillationscocktail Sigma Lumagel [®]	J.T.Baker Chemicals B.V.
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan	Merck
Universal Agarose peqGold	peqLab Biotechnologie GmbH
Yeast nitrogen base without aminoacids	Sigma
Zitronensäure-Monohydrat	Sigma

Alle weiteren Chemikalien, welche nicht aufgelistet sind, waren von p.a. Qualität.

3.5 Molekularbiologische Kits

Für die Untersuchungen wurden folgende molekularbiologische Kits verwendet:

µMACS mRNA Isolation Kit	Miltenyi Biotec
Super Script™ II RNaseH- Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen
PCR <i>Taq</i> Polymerase Kit	Promega
Wizard® SV Gel und PCR Clean-Up System	Promega
Wizard® <i>Plus</i> SV Minipreps DNA Purification System	Promega
pYES2.1-TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
pCR2.1-TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
Expand High Fidelity PCR-System	Roche
SMART RACE cDNA Amplification Kit	Clontech
S.c. EasyComp Transformation Kit	Invitrogen

3.6 Puffer-, Stamm- und sonstige Lösungen

3.6.1 Galaktose (20 %)

200 g Galaktose wurden in einem Liter Wasser gelöst und anschließend sterilfiltriert.

3.6.2 Ladepuffer

15 g Ficoll 400 und 0,25 g Bromphenolblau wurden in 100 ml TE-Puffer (50 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0) gelöst.

3.6.3 Längenmarker

Bei der Agarosegel-Elektrophorese wurde neben den Proben ein DNA-Längenmarker zur Größenbestimmung der PCR-Fragmente aufgetragen:

100 µl λDNA/*Eco471* (Avall) Marker
200 µl Ladepuffer
700 µl Wasser

3.6.4 McIlvaine-Puffer

Zur Herstellung der 0,2 M McIlvaine-Pufferlösung für die Enzymtests wurden

35,58 g Na₂HPO₄
0,40 g Na-Ascorbat

in einem Liter destillierten Wasser gelöst und mit Zitronensäure der entsprechende pH-Wert eingestellt.

3.6.5 TAE-Puffer

Für die Elektrophorese (3.13) wurde eine 50 x konzentrierte Stammlösung eines TAE-Puffers hergestellt. Dazu wurden 242,0 g Tris und 18,61 g EDTA in einem Liter Wasser gelöst und mit Eisessig ein pH-Wert von 8,0 eingestellt. Durch Verdünnen der Stammlösung mit destilliertem Wasser wurde eine 1 x konzentrierte Lösung hergestellt.

3.6.6 TEK-Puffer

Zur Herstellung der TEK-Pufferlösung für den Aufschluss der Hefezellen (3.16) wurden

6,10 g Tris
0,40 g EDTA
7,46 g KCl

in einem Liter destillierten Wasser gelöst und mit HCl ein pH-Wert von 7,4 eingestellt.

3.6.7 TES-B* -Puffer

Zur Herstellung der TES-B*-Pufferlösung für den Waschschrift nach dem Zellaufschluss bei der Hefeexpression wurden

109,3 g Sorbitol
6,1 g Tris
0,4 g EDTA
0,3 g DTT

in einem Liter destillierten Wasser gelöst und mit HCl ein pH-Wert von 7,4 eingestellt.

3.6.8 Tris/HCl-Puffer

Zur Herstellung der Tris/HCl-Pufferlösung für die Enzymtests wurden

24,22 g Tris
0,40 g Na-Ascorbat

in einem Liter destillierten Wasser gelöst und mit konzentrierter HCl der entsprechende pH-Wert eingestellt.

3.6.9 Wasser

Für sämtliche molekularbiologische Zwecke wurde ultrafiltriertes und UV-behandeltes Wasser verwendet. Für die enzymatischen Untersuchungen wurde einfach destilliertes Wasser verwendet.

3.7 Laufmittel

Für die Dünnschichtchromatographie wurde CAW als Laufmittel verwendet.

Volumensanteile CAW:

Chloroform: 50
Essigsäure: 45
Wasser : 5

3.8 Nährmedien

Sämtliche für diese Arbeit benötigten Nährmedien wurden mit einfach destilliertem Wasser angesetzt und bei 120 °C für 30 Minuten autoklaviert.

3.8.1 LB_{AMP}-Medium

Zur Herstellung des LB-Mediums wurden

10 g Pepton
10 g NaCl
5 g Hefeextrakt

in einem Liter destillierten Wasser gelöst, mit 1 M NaOH ein pH-Wert von 7,0 eingestellt und bei 120 °C für 30 min autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde 1 ml Ampicillin-Lösung (100 mg/ml) zugesetzt.

Für LB_{Amp}-Agarplatten wurde das LB-Medium mit 15 g Agar versetzt und bei 120°C für 30 min autoklaviert. Anschließend wurde das Medium auf ca. 60°C abgekühlt, 1 ml Ampicillin-Lösung (100 mg/ml) hinzugefügt und in Petrischalen gegossen.

3.8.2 SGI-Medium

Zur Herstellung des SGI-Mediums wurden

20,0 mg L-Tryptophan
6,7 g Yeast nitrogen base (without aminoacids)
1,0 g Pepton

in 900 ml destilliertem Wasser gelöst. Nach dem Autoklavieren wurde mit 100 ml sterilfiltrierter 20%iger Glukoselösung auf ein Volumen von 1 Liter aufgefüllt.

Für die Herstellung von SGI-Agarplatten wurde das SGI-Medium vor dem Autoklavieren mit 15 g Agar versetzt.

3.8.3 SOC-Medium

Das SOC-Medium war Bestandteil der entsprechenden Kits (3.5).

3.8.4 YPGE-Medium

Zur Herstellung des YPGE-Mediums wurden 10 g Pepton und 10 g Hefeextrakt in 970 ml destilliertem Wasser gelöst, bei 120 °C für 30 min autoklaviert und nach dem Abkühlen mit 30 ml absolutem Ethanol versetzt.

3.9 Plasmide (Vektoren)

Plasmide sind kleine, ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die neben den Chromosomen in Bakterien vorkommen. Sie ermöglichen eine von den Chromosomen unabhängige Duplikation der DNA und liegen in unterschiedlicher Kopienzahl vor. Plasmide mit einer Größe von bis zu 5 kb werden biotechnologisch als Vektoren benutzt.

3.9.1 Plasmide für *E.coli*

3.9.1.1 pCR2.1-TOPO (Invitrogen)

pCR2.1-TOPO ist ein 3931 Bp langes, linearisiertes high-copy Plasmid mit singulären dT-Überhängen, die zur Klonierung von *Taq* DNA Polymerase amplifizierten PCR-Produkten mit singulären dA-Überhängen dienen (Abb. 19).

Die Energie zur kovalenten Bindung zwischen dem DNA-Insert und Plasmid wird durch die Abspaltung der Topoisomerase I bereitgestellt, die Zugabe einer DNA-Ligase ist deshalb nicht notwendig.

Der Vektor verfügt über eine Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz zur Selektion von transformierten Bakterienzellen. Weiters enthält der Vektor ein *lacZα*-Genfragment mit Multipler Cloning Site (MCS). Wird ein Insert in die MCS ligiert, kann die β -Galaktosidase (Genprodukt des *lacZα*-Genfragments) nicht mehr exprimiert werden. Die Bakterien erscheinen dann weiß, im Gegensatz zu den Plasmidträgern mit dem intakten *lacZα*-Genfragment, welche aufgrund der β -Galaktosidase-Aktivität das farblose Substrat X-Gal zum blauen Abbauprodukt spalten können (Blau/Weiß-Selektion).

Die Multiple Cloning Site enthält mehrere Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme (Restriktionsschnittstellen). Diese ermöglichen das Herausschneiden des Inserts aus dem Vektor.

pCR2.1-TOPO wurde ausschließlich als Klonierungsvektor verwendet.

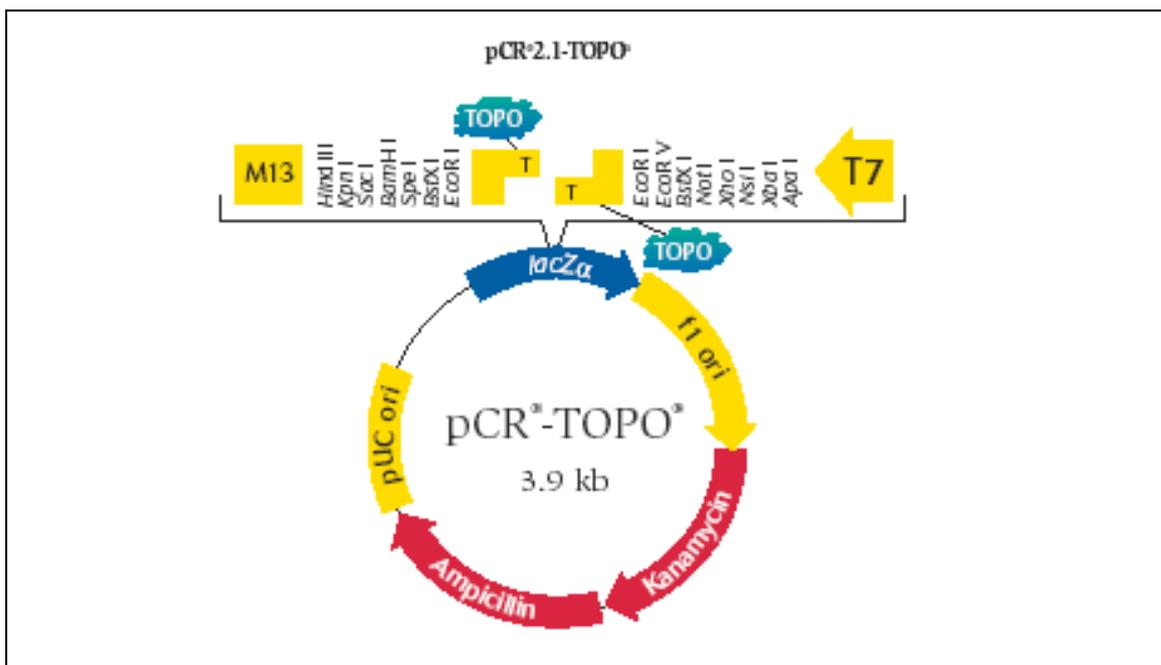


Abbildung 19: pCR 2.1-Topo-Vektor

3.9.2 Plasmide für *S. cerevisiae*

3.9.2.1 pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen)

pYES2.1/V5-His-TOPO ist ein 5886 Bp langes, linearisiertes high-copy Plasmid

mit singulären dT-Überhängen, die zur Klonierung von *Taq* DNA Polymerase amplifizierten PCR-Produkten mit singulären dA-Überhängen dienen (Abb. 20).

Mithilfe von pYES2.1/V5-His-TOPO können Gene in *S. cerevisiae* heterolog exprimiert werden, die Ligationsreaktion verläuft wie bei pCR2.1-TOPO beschrieben (3.9.1.1), eine Blau/Weiß-Selektion ist nicht möglich. Der Vektor trägt eine Ampicillinresistenz zur Selektion transformierter *E.coli* sowie das URA3-Gen zur Selektion transformierter Hefezellen. Zuerst wird das PCR-Produkt mit dA-Überhang in den pYES2.1-Vektor ligiert und zur Subklonierung in *E. coli* transformiert. Mittels Colony-PCR (3.12.4) wurden Plasmide positiver Klone mit dem Insert in Sense-Richtung selektiert, anschließend mit dem Wizard® *Plus* SV Minipreps DNA Purification System isoliert und in Hefezellen transformiert.

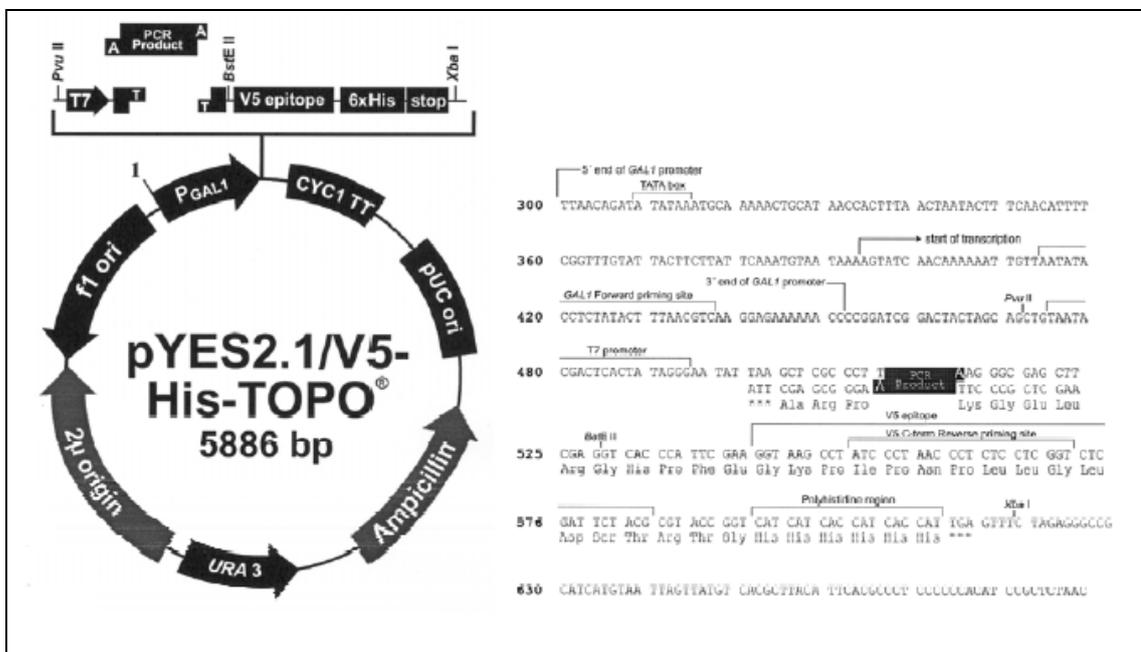


Abbildung 20: pYES2.1-Topo-Vektor

3.10 mRNA-Präparation

Die mRNA-Präparation erfolgte mit dem μ MACS mRNA Isolation Kit.

Die Methode beruht auf der magnetischen Separation von poly(A)⁺ mRNA mithilfe von Oligo-(dT), die an Magnetpartikel gebunden sind. Die gebundene poly(A)⁺ mRNA wird in einem starken Magnetfeld in einer Säule festgehalten, während andere Nukleinsäuren und Proteine durch Waschschriffe abgetrennt werden können. Anschließend wird die poly(A)⁺ mRNA von den Magnetpartikeln mit heißem Wasser eluiert.

Die Präparation wurde folgendermaßen durchgeführt:

RNAse freies Wasser wurde in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und im Heizblock auf 65 °C erwärmt. In der Zwischenzeit wurden 200 mg des vorher mit flüssigem Stickstoff zerriebenen Pflanzenmaterials in ein steriles 15 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen eingewogen, 1 ml Lysis/Binding Buffer zugegeben und 3 min mit dem Vortex-Genie gemischt. Die Suspension wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die LysateClear Column aufgetragen und nochmals 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Pro Probe wurde eine µMACS Säule im Magnetfeldständer mit je 100 µl Lysis/Binding Buffer equilibriert. Pro ml Durchfluß wurden 50 µl Oligo-(dT) MicroBeads zugemischt und das gesamte Volumen auf die µMACS Column aufgebracht.

Die Säulchen wurden mit je 2 x 200 µl Lysis/Binding Buffer und mit 4 x 100 µl Wash Buffer gewaschen. Anschließend wurde die mRNA mit 120 µl 65 °C heißem Wasser eluiert, wobei der 1. Tropfen verworfen wurde und jeweils der 2. und 3. sowie der 4. und 5. Tropfen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen und auf Eis gestellt wurden.

3.11 Reverse Transkription

Die mRNA wurde mit dem Super Script™II RNaseH- Reverse Transkriptase Kit mithilfe eines Oligo-(dT)-Anker Primers in cDNA transkribiert.

Je ein Heizblock wurde auf 70 °C bzw. 42 °C vorgeheizt. 15 µl mRNA wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 µl Oligo-(dT)-Anker Primer versetzt, gemischt, kurz zentrifugiert, 10 min im Heizblock auf 70 °C gehalten und danach auf Eis gestellt. Anschließend wurden 4 µl 5 x Puffer (Natriumacetat, pH 5,0), 2 µl 0,1 M DTT-Lösung und 1 µl dNTP Mix zugegeben, vorsichtig gemischt und 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Gemisch wurde 2 min bei 42 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl Reverse Transkriptase wurde vorsichtig gemischt und 60 min bei 42 °C und anschließend 15 min bei 70 °C inkubiert. Die Probe wurde kurz zentrifugiert und danach die cDNA direkt für die PCR verwendet bzw. bei -20 °C gelagert.

3.12 PCR

Die PCR ist ein Verfahren zur raschen enzymatischen Vervielfältigung einer DNA-Sequenz. Als Matrize (Template) dient die zu vervielfältigende DNA-Sequenz, an welche Primer in der Länge von 15 - 30 Nucleotiden anlagern. Die Sequenzen der Primer sind zu den Anfangs- bzw. Endsequenzen (5'- bzw. 3'-Sequenzen) der zu amplifizierenden DNA komplementär.

3.12.1 Primerkonstruktion

Bei der Primerkonstruktion wurden, wenn möglich, folgende Regeln eingehalten:

- Die Primer sollen eine Länge von 18-30 Basen haben.
- Der G/C-Gehalt soll zwischen 40 und 60 % liegen.
- Vier gleiche Basen in Folge sollen vermieden werden.
- Die Differenz der Schmelztemperatur der beiden Primer soll möglichst gering sein.
- Die Primer dürfen nicht miteinander hybridisieren.
- Die Primer dürfen keine Sekundärstrukturen ausbilden.

3.12.1.1 Degenerierte Primer

Zur Amplifizierung von Genabschnitten, von denen keinerlei spezifische Sequenzinformation vorlagen, wurden degenerierte Primer verwendet. Das Design der degenerierten Primer erfolgte mithilfe von Sequenzinformationen aus der NCBI-Gendatenbank, wobei hochkonservierte Aminosäureregionen als Vorlage für die Primerkonstruktion dienten. Die Konzentration der eingesetzten degenerierten Primer war 25 μ M.

3.12.1.2 Spezifische Primer

Bei vorhandener Sequenzinformation wurden spezifische Primer aus der Zielsequenz abgeleitet, um das jeweilige Gen bzw. fehlende Genabschnitte zu amplifizieren. Die Konzentration der eingesetzten spezifischen Primer war 10 μ M.

3.12.2 Standard-PCR

Bei der Standard-PCR sollen mithilfe von spezifischen bzw. degenerierten Primern Gene bzw. Genabschnitte amplifiziert werden. Die Verwendung von *Taq* DNA Polymerase, die einen 3'-dA-Überhang an den PCR-Produkten produziert, ermöglicht die direkte Ligation in pCR2.1-TOPO für die anschließende Sequenzierung (3.9.1.1). Ein wichtiger Faktor bei der PCR ist die optimale MgCl₂-Konzentration, da Mg-Ionen verschiedene Parameter wie die Polymeraseaktivität, Primerannealing, Denaturierung der DNA und Bildung

von Primerdimeren beeinflussen. Bei den PCR-Ansätzen wurden deshalb variierende $MgCl_2$ -Konzentrationen eingesetzt.

Falls die Schmelztemperaturen beider bei der PCR eingesetzten Primer zu weit auseinander lagen, wurde ausgehend von der höheren Schmelztemperatur des einen Primers während der PCR schrittweise die Annealingtemperatur hin zur niedrigeren Schmelztemperatur des zweiten Primers erniedrigt. Alternativ dazu kann eine Zwei-Schritt-PCR durchgeführt werden, bei der im ersten Schritt nur ein Primer vorhanden ist, um bei dessen optimaler Annealingtemperatur den ersten Strang zu synthetisieren. Im zweiten Schritt wird dann der komplementäre Strang durch Zugabe des zweiten Primers mit der entsprechenden Annealingtemperatur synthetisiert.

3.12.2.1 PCR-Bedingungen

Funktion	Start	Erste Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	finale Elongation	Ende
T [°C]	94	94	94	ΔT Primer	72	72	4
t [min]	halten	3	0,5	2	1	10	halten
Zyklen	1	1	40	40	40	1	1
Step	1	2	3	4	5	6	7

Tabelle 1: PCR-Standardprogramm

3.12.2.2 PCR-Ansatz

Für sämtliche PCR-Ansätze wurden 200 μl PCR-Reaktionsgefäße verwendet. Das Gesamtvolumen des Ansatzes der Standard-PCR betrug 20 μl , bei höheren Zusätzen an $MgCl_2$ -Lösung wurde die zugesetzte H_2O -Menge im Ansatz entsprechend verringert:

1,0 µl	cDNA
4,0 µl	5 x PCR-Puffer mit MgCl ₂
x µl	MgCl ₂
0,4 µl	dNTP-Mix
1,0 µl	Forward Primer
1,0 µl	Reverse Primer
0,2 µl	<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)
y µl	H ₂ O
20 µl	

Nach Beendigung der PCR wurden die Ansätze in einem ethidiumbromidhaltigen 1%igen Agarosegel mittels Elektrophorese aufgetrennt (3.13).

3.12.3 Proofreading-PCR

Konnte mittels Standard-PCR das gewünschte Fragment gefunden und mit Sequenzierung die Sequenz bestätigt werden, wurde unter den gleichen Bedingungen gearbeitet, unter denen das gewünschte PCR-Produkt bei der Standard-PCR erhalten wurde (Annealingtemperatur, MgCl₂-Konzentration, Primerkonzentration).

Bei einer Proofreading-PCR kommen *Pwo*- und *Pfu* DNA Polymerase zum Einsatz, weil sie neben ihrer 5'-3'-Polymeraseaktivität auch über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität verfügen, welche falsch eingebaute Nukleotide erkennt, diese entfernt und den Fehler durch erneute Polymerisation behebt.

Die Proofreading-PCR wurde mit dem Expand High Fidelity PCR-System (*Taq/Pfu*-System) durchgeführt. Dieser Polymerasemix gewährleistet zum einen den für die TA-Klonierung nötigen dA-Überhang durch die *Taq* DNA Polymerase und die Proofreading-Funktion durch die *Pfu* DNA Polymerase. Um Artefakte durch falsche Primeranlagerung und den Abbau der Primer durch die 3'-5'-Exonucleaseaktivität der *Pfu* DNA Polymerase zu vermeiden, wurde ein sogenannter Pseudo-Hot-Start durchgeführt, bei dem die Reaktionsgefäße in den zuvor auf 94°C aufgeheizten Block gestellt wurden. Erst danach wurde der Polymerase-Mix einzeln in die Probengefäße pipettiert. Weiters wurde eine niedrigere Zyklenanzahl gewählt, sowie die finale Elongation auf 7 min reduziert, um die Fehlerwahrscheinlichkeit während der PCR niedrig zu halten.

3.12.3.1 PCR-Bedingungen

Funktion	Start	Erste Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	finale Elongation	Ende
T [°C]	94	94	94	ΔT Primer	72	72	4
t [min]	halten	3	0,5	2	1	7	halten
Zyklen	1	1	30	30	30	1	1
Step	1	2	3	4	5	6	7

Tabelle 2: Proofreading PCR-Programm

3.12.3.2 PCR-Ansatz

Der Ansatz für die Proofreading-PCR enthielt ein Gesamtvolumen von 25 μ l:

- 2,00 μ l cDNA
- 2,50 μ l Puffer mit MgCl₂
- 0,50 μ l dNTP-Mix
- 1,25 μ l Forward Primer
- 1,25 μ l Reverse Primer
- 0,40 μ l Polymerase-Mix
- 17,10 μ l H₂O

Nach Beendigung der PCR wurden 15 μ l des Ansatzes mit 4 μ l 6 x Ladepuffer versetzt und in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (3.13).

3.12.4 Colony-PCR

Bei der Colony-PCR wurden *E. coli*-Kolonien nach der Transformation auf Insertion des gewünschten Templates im Vektor überprüft. Mittels Selektionsmethoden (3.9.1.1) konnte zwischen Kolonien ohne Vektor (Antibiotikaresistenz) sowie mit oder ohne Insert (Weiß/Blau-Selektion: *lacZ α*) unterschieden werden. Als PCR-Template wurden positive, weiße Klone verwendet. Es wurden folgende vektorspezifische Primer verwendet, die das Insert flankieren und von der Vektorsequenz abgeleitet wurden:

Vektor	Sequenz 5' - 3'
pCR2.1 forward	AGC TCG GAT CCA CTA GTA ACG
pCR2.1 reverse	CCT CTA GAT GCA TGC TCG AG
pYES2.1 forward	ATC GGA CTA CTA GCA GCT G
pYES2.1 reverse	ACC GGT ACG CGT AGA ATC

Tabelle 3: Primer für die Colony- PCR

Anhand der erhaltenen PCR-Produkte konnte überprüft werden, ob die Länge mit der des gewünschten Inserts übereinstimmte. Um die richtige Orientierung des Inserts im Vektor (sense-Richtung) im Falle einer Expression zu garantieren, wurde jeweils ein genspezifischer Primer und ein vektorspezifischer Primer für die PCR eingesetzt.

3.12.4.1 PCR-Bedingungen

Funktion	Start	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Ende
T [°C]	95	95	94	ΔT Primer	72	72	4
t [min]	halten	2	0,5	1	2	10	halten
Zyklen	1	1	35	35	35	1	1
Step	1	2	3	4	5	6	7

Tabelle 4: Colony- PCR-Programm

3.12.4.2 PCR-Ansatz

Die entsprechende *E.coli*-Kolonie wurde mit einem sterilen Zahnstocher vom Nährboden der Petrischale abgenommen und damit der Boden des PCR-

Reaktionsgefäßes bestrichen. Der Ansatz für die Colony-PCR enthielt ein Gesamtvolumen von 20 µl:

4,0 µl 5 x PCR-Puffer mit MgCl₂
0,4 µl dNTP-Mix
1,0 µl Forward Primer
1,0 µl Reverse Primer
0,2 µl *Taq* DNA Polymerase
13,4 µl H₂O

Nach Beendigung der PCR wurde der Ansatz in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (3.13).

3.12.5 RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Die RACE-Technik dient dazu, unbekannte 5'- und/oder 3'-Bereiche eines bekannten cDNA-Fragments zu klonieren, um Full Size Klone der gewünschten Gene zu erhalten.

3.12.5.1 3'-RACE

Mithilfe eines Reverse Primers, dessen Sequenz zum Anker des bei der cDNA-Synthese verwendeten Oligo-(dT)-Anker Primers komplementär ist, sowie eines spezifischen, vom cDNA-Fragment abgeleiteten Forward Primers, wurde der 3'-Bereich von cDNAs kloniert.

3.12.5.2 5'-RACE

Die 5'-RACE wurde mit dem SMART™ RACE cDNA Amplification Kit durchgeführt.

Mithilfe einer terminalen Transferase wird ein Homo-Oligomer einer beliebigen Base an das 5'-Ende der cDNA angehängt, ein dazu komplementärer Homo-Oligomer Primer kann dann an dieser Stelle hybridisieren, welcher in der 5'-RACE-PCR als Forward Primer verwendet wurde. Mithilfe eines genspezifischen Reverse Primers wurde das 5'-Ende des Gens amplifiziert.

3.13 Agarosegel-Elektrophorese

Bei der Agarosegel-Elektrophorese werden DNA-Fragmente aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld nach

ihrer Größe aufgetrennt. Da die DNA durch ihre Phosphatgruppen negativ geladen ist, wandert sie zum positiv geladenen Pol. Die Wanderung im elektrischen Feld wird durch Zusatz eines Laufpuffers bewerkstelligt.

Sämtliche Agarosegele wurden mit TAE-Puffer hergestellt. Im Allgemeinen wurde ein 1%iges Agarosegel eingesetzt, bei kleinen Fragmenten wurde ein 1,5%iges Gel verwendet. Für ein 1%iges Gel wurden 1 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer im Mikrowellenofen gelöst, nach Abkühlen auf ca. 60 °C mit 10 µl Ethidiumbromid¹ versetzt und in einen Gelschlitten mit eingelegten Kämmen gegossen. Ethidiumbromid interkaliert mit DNA und wird als Fluoreszenzmarker verwendet.

Nach dem Aushärten wurde das Gel in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt und bei einer Einstellung von maximal 120 V, 60 mA und 15 W mindestens 60 min aufgetrennt.

Zur Abschätzung der Menge und Fragmentgröße wurden auf jedem Gel 20 µl λDNA/Eco471 Längenmarker mitaufgetragen.

3.14 Aufarbeitung von Agarosegelfragmenten

Nach der Elektrophorese wurde das Agarosegel unter UV-Licht auf DNA-Fragmente gesuchter Größe überprüft, die entsprechenden Stellen aus dem Gel geschnitten und die DNA mit dem Wizard[®] SV Gel und PCR Clean-Up System eluiert.

Die Aufarbeitung wurde folgendermaßen durchgeführt:

Pro 10 µg Gel wurden 10 µl Membrane Binding Solution in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und das Gel bei 55 °C im Heizblock vollständig gelöst. Die Lösung wurde auf die SV Minicolumn aufgetragen und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Säulchen wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Durchfluß wurde verworfen. Anschließend erfolgte ein Zusatz von 700 µl Membrane Wash Solution, danach wurde wieder 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Der gleiche Schritt erfolgte nochmals mit 500 µl Membrane Wash Solution und mit einer Zentrifugationsdauer von 5 min bei 13.000 rpm.

Nach Ende der Zentrifugation wurde das Säulchen in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und die DNA mit 50 µl nukleasefreiem Wasser eluiert, nach Inkubation bei Raumtemperatur 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert

¹ Ethidiumbromid: (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridiniumbromid)

und das Säulchen anschließend verworfen. Die erhaltene DNA wurde bei -20 °C gelagert oder direkt für die Ligation verwendet (3.15.1.1; 3.15.1.2).

3.15 Klonierung von DNA-Fragmenten

3.15.1 Ligation

Bei der Ligation werden DNA-Fragmente miteinander verknüpft, z.B. ein PCR-Produkt mit einem Plasmidvektor. Plasmidvektoren besitzen eine sog. „Multiple Cloning Site“ (MCS) mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen. Wird ein Plasmid und die gewünschte Zielsequenz mit demselben Restriktionsenzym geschnitten, können diese DNA-Stücke durch Ligation mittels Ligase miteinander verbunden werden. Bei der TA-Klonierung mithilfe des TOPO TA Cloning Kits ist kein Schneiden der zu verknüpfenden DNA notwendig. Bei dieser Technik wird ein *Taq*-amplifiziertes PCR-Produkt mit dA-Überhang in einen kommerziell erhältlichen Vektor mit dT-Überhang direkt ligiert. Der dA-Überhang wird durch die terminale Transferase-Aktivität der *Taq* DNA Polymerase erzeugt. Er ermöglicht die Ligation mit den dT-überhängen des Plasmids.

3.15.1.1 pCR2.1-TOPO-Klonierungsreaktion

Für die Ligation wurde die amplifizierte DNA aus dem PCR-Ansatz verwendet, der Gesamtansatz betrug 5 µl:

2,0 µl PCR-Produkt
0,5 µl pCR2.1-TOPO
2,5 µl Wasser

Der Ansatz wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend auf Eis gestellt und direkt für die Transformation in *E. coli* verwendet.

3.15.1.2 pYES2.1/V5-His-TOPO-Klonierungsreaktion

Für die Ligation wurde die amplifizierte DNA aus dem PCR-Ansatz verwendet, der Gesamtansatz betrug 5 µl:

2,0 µl PCR-Produkt
1,0 µl salt solution (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl₂)
0,5 µl pYES2.1/V5-His-TOPO
1,5 µl Wasser

Der Ansatz wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend auf Eis gestellt und direkt für die Transformation in *S. cerevisiae* verwendet.

3.15.2 Transformation

Unter Transformation versteht man das Einbringen von Fremd-DNA mittels eines Vektors in einen Wirtsorganismus.

3.15.2.1 Transformation von pCR2.1-TOPO und pYES2.1/V5-His-TOPO in *E. coli*

Für die Transformation in *E. coli* wurden 50 µl Top10 One Shot-Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 2 µl des Ligationsansatzes (3.15.1.1) vorsichtig vermischt, anschließend wurde 5 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock für 30 sec bei 42 °C im Wasserbad, der Ansatz wurde dann für 15 min auf Eis gestellt. Es erfolgte die Zugabe von 250 µl SOC-Medium unter sterilen Bedingungen, dann wurde für 60 min bei 37 °C und 200 rpm horizontal geschüttelt. Jeweils 30 µl und 270 µl wurden auf LB_{Amp}-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Bei der Transformation von *E. coli* mit pCR2.1-TOPO wurden vor dem Ausstreichen des Transformationsansatzes 60 µl X-Gal (30 mg/ml DMSO) auf LB_{Amp}-Platten verstrichen.

Zur Selektion erfolgreicher Transformanten diente die Antibiotikaresistenz der Vektoren. Bei dem Vektor pCR2.1-TOPO konnte zusätzlich durch Blau/Weiß-Selektion auf die erfolgreiche Insertion eines cDNA-Fragmentes selektiert werden. Bei Transformationen in Expressionsvektoren wurde mittels Colony-PCR die Orientierung des Inserts im Plasmid geprüft (3.12.4).

3.15.2.2 Transformation von pYES2.1/V5-His-TOPO in *S. cerevisiae*

Für die Transformation von *S. cerevisiae* und die anschließende heterologe Expression der klonierten cDNAs wurden pYES2.1-Plasmide mit den gewünschten Inserts in richtiger Orientierung (sense-Richtung) verwendet. Die Transformation wurde mit dem S.c. EasyComp Transformation Kit durchgeführt.

Solution III und SGI-Platten wurden auf Raumtemperatur gebracht und 25 µl kompetente Hefezellen aufgetaut. Je 0,5 µg Plasmid-DNA der positiven Klone wurden den Hefezellen zugegeben, mit 250 µl Solution III unter

Sterilbedingungen versetzt und für 1 min mit dem Vortex-Genie gemischt. Anschließend wurde für 1 Stunde bei 30 °C inkubiert, wobei der Ansatz alle 15 min heftig geschüttelt wurde.

Der gesamte Ansatz wurde auf einer SGI-Platte ausgestrichen und anschließend 2-4 Tage bei 30 °C inkubiert. Zur Selektion der erfolgreichen Transformation wurde die Uracil-Auxotrophie des verwendeten Hefestammes genutzt.

3.15.3 Plasmidisolierung

Plasmid-DNA wurde mit dem Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System aus *E. coli* präpariert und folgendermaßen durchgeführt:

5 ml LB_{Amp}-Medium wurden mit einem positiven *E.coli*-Klon angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert (max. 16 h). Die Kultur wurde am nächsten Tag für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und die dabei entstehenden Pellets mit 250 µl Cell Resuspension Solution resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 250 µl Cell Lysis Solution versetzt und 4 x invertiert.

Es erfolgte der Zusatz von 10 µl Alkaline Protease Solution, danach wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurden 350 µl Neutralization Solution zugegeben und 4 x invertiert, dann für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein Minisäulchen pipettiert, dieses in ein Collection Tube übergeführt und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, das Zentrifugat wurde anschließend verworfen.

Es erfolgte der Zusatz von 750 µl Wash Solution, danach wurde 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, dieser Schritt wurde nochmals mit 250 µl Wash Solution wiederholt. Das Minisäulchen wurde in ein steriles Eppendorf-Gefäß transferiert und mit 100 µl nukleasefreiem Wasser eluiert. Zuletzt wurde 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, das erhaltene Plasmid bei -20 °C gelagert.

3.15.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA

Die gewonnene Plasmid-Konzentration errechnete sich aus der Messung der Absorption bei 260 nm am Photometer (Optische Dichte, OD₂₆₀) nach folgender Formel:

$c \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right] = OD_{260} \times V \times F$	<p>V = Verdünnungsfaktor;</p> <p>F = Multiplikationsfaktor für DNA = 50</p>
---	---

(50 ng/μl Doppelstrang-DNA entspricht einer optischen Dichte von 1 bei 260 nm)

3.16 Heterologe Expression in *S. cerevisiae*

Zunächst erfolgte die Anzucht und Vermehrung des Hefestammes. Am 1. Tag wurden 5 ml SGI-Medium in einer Eprovette mit einer Kolonie transformierter Hefezellen angeimpft und für 24 h bei 28 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Am 2. Tag wurden 2 x 5 ml SGI-Medium mit je 500 μl der inkubierten Hefekultur überimpft und erneut für 24 h bei 28 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

Von der so erhaltenen Hefekultur wurden am 3. Tag 5 ml in einen 250 ml Erlenmeyerkolben, welcher 50 ml SGI-Medium enthielt, überführt und erneut für 24 h bei 28 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

Am 4. Tag wurde die optische Dichte der Hefekultur mittels Absorption bei 600 nm am Photometer gemessen (OD₆₀₀), die Kultur diente als Starterkultur für die Expression.

250 ml YPGE-Medium wurden in einem 1L Erlenmeyerkolben mit der entsprechenden Menge an Starter-Hefekultur angeimpft (Tab. 5) und so lange bei 28 °C und 200 rpm inkubiert, bis die Lösung eine OD₆₀₀ zwischen 0,8 und 1,2 erreicht hatte.

OD ₆₀₀ der Hefekultur	Zugabe zum YPGE-Medium in ml
2	25
1,7	30
1,4	35
1,25	40
1,1	45
≤ 1	50

Tabelle 5: Zugabe an SGI-Medium in Abhängigkeit der OD₆₀₀

Dann wurden zur Induktion der Proteinbildung 27 ml einer sterilfiltrierten 20%igen D(+)-Galaktoselösung zugegeben und für weitere 12-15 h bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Die OD₆₀₀ der 1:10 verdünnten Hauptkultur sollte dann zwischen 0,8 und 1,2 liegen. Anschließend wurde die Lösung auf 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und für 10 min bei 5.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen.

Die dabei entstandenen Pellets wurden in 27 ml TEK-Puffer resuspendiert, die Suspensionen in einem Falcon-Röhrchen vereinigt und anschließend für 5 min bei 4 °C und bei 4.000 rpm zentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets in 2,5 ml eisgekühltem TES-B*-Puffer resuspendiert und 7,5 g Glasperlen zugegeben.

Dann wurden die Zellwände für 20 min durch heftiges Schütteln mechanisch aufgebrochen, wobei die Probe immer abwechselnd 30 sec geschüttelt und 30 sec auf Eis inkubiert wurde. Anschließend wurden 5 ml eisgekühlter TES-B*-Puffer zugegeben, gemischt und die Probe für 10 min bei 4 °C und bei 16.000 rpm zentrifugiert.

Der klare Überstand wurde in 100 µl Portionen aufgeteilt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.17 Synthesen der (¹⁴C)-markierten Substrate

3.17.1 Enzymatische Synthese von (¹⁴C)-Naringenin

Die Synthese von (¹⁴C)-Naringenin erfolgte mit Hilfe rekombinanter CHS und CHI-hältigen Präparationen aus *Dahlia variabilis* cv. Eurostar.

Herstellung des CHS-Extrakts: Jeweils 1 OD₆₀₀-Pellet der induzierten *E.coli*-Bakterien wurde in 80 µl 0,2 M Tris-Puffer (+ 1 mM EDTA, pH 6,5) resuspendiert, mit 10 µl Lysozym-Lösung (1 mg Lysozym/ml Puffer) versetzt, aufgeschüttelt und 30 min auf Eis gestellt, wobei alle 5 min erneut aufgeschüttelt wurde. Anschließend wurde 10 min bei 4 °C und 10.000 rpm zentrifugiert, die Überstände wurden für die Synthese eingesetzt.

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1.000 µl:

- 50 µl (¹⁴C)-Malonyl-CoA (15 nmol, 13.000 Bq)
- 50 µl *p*-Cumaroyl-CoA (10 nmol)
- 50 µl CHI-Präparation
- 400 µl rekombinante CHS
- 450 µl 0,05 M Tris/HCl-Puffer

Nach Inkubation der Enzymsätze für 30 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Eisessig und 400 µl Ethylacetat gestoppt, die Lösungen wurden aufgeschüttelt und 3 min bei 13.000 rpm zur Phasentrennung zentrifugiert.

Nach viermaliger Extraktion mit je 400 µl Ethylacetat wurden die gesammelten organischen Phasen im Rotationsverdampfer (bei 55 mPa, Wasserbad 30 °C) bis zur Trockene eingedampft. Das (¹⁴C)-Naringenin wurde mit Methanol aufgenommen und ein Aliquot am Szintillationszähler gemessen. Darüber hinaus wurden 6.500 dpm auf eine DC-Celluloseplatte aufgetragen, in CAW chromatographiert und die Reinheit des synthetisierten Naringenins am TLC-Linear Analyzer überprüft.

3.17.2 Enzymatische Synthese von (¹⁴C)-Dihydrokämpferol

Die Synthese von (¹⁴C)-Dihydrokämpferol erfolgte mit Hilfe von rekombinanter FHT.

Herstellung des FHT-Extrakts: Jeweils 1 OD₆₀₀-Pellet der induzierten *E.coli*-Bakterien wurde in 80 µl 0,2 M Tris-Puffer (pH 7,0) resuspendiert, mit 10 µl Lysozym-Lösung (1 mg Lysozym/ml Puffer) versetzt, aufgeschüttelt und 30 min auf Eis gestellt, wobei alle 5 min erneut aufgeschüttelt wurde. Anschließend wurde 10 min bei 4 °C und 10.000 rpm zentrifugiert, die Überstände wurden für die Synthese eingesetzt.

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1.000 µl:

2,19 nmol	(¹⁴ C)-Naringenin (5.030 Bq)
200 µl	rekombinante FHT
50 µl	2-Oxoglutarat (1,46 mg/ml H ₂ O)
50 µl	FeSO ₄ x 7 H ₂ O (0,56 mg/ml H ₂ O dest.)
700 µl	0,1 M Tris/HCl-Puffer (+ 0,4 % Ascorbat, pH 7,5)

Das in Methanol gelöste (¹⁴C)-Naringenin wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und das Lösungsmittel im Vakuumexsikkator entfernt. Das (¹⁴C)-Naringenin wurde mit dem Tris-Puffer aufgenommen, die rekombinante FHT, die 2-Oxoglutarat- und die FeSO₄-Lösung wurden zugegeben und die Enzymsätze 30 min bei 30 °C mit geöffneten Gefäßdeckeln inkubiert.

Durch Zugabe von 50 µl Essigsäure und 400 µl Ethylacetat wurde die Reaktion gestoppt, die Lösungen wurden gut gemischt und 3 min bei 13.000 rpm zur Phasentrennung zentrifugiert. Nach viermaliger Extraktion mit je 400 µl wurden die gesammelten organischen Phasen im Rotationsverdampfer (bei 55 mPa, Wasserbad 30 °C) bis zur Trockene eingedampft, der Umsatz zu DHK per

Chromatographie auf einer DC-Celluloseplatte in CAW überprüft und die Ausbeute durch Messung am Szintillationszähler bestimmt. Das Substrat wurde anschließend durch Chromatographie in 30%iger Essigsäure gereinigt.

3.17.3 Enzymatische Synthese von (¹⁴C)-Apigenin

Die Synthese von (¹⁴C)-Apigenin erfolgte mit Hilfe von mikrosomalen Präparationen aus *Dahlia variabilis* cv. Katzelsdorf als FNS II-Quelle.

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1.000 µl:

0,73 nmol	(¹⁴ C)-Naringenin (1.667 Bq)
200 µl	Mikrosomen aus <i>Dahlia variabilis</i> cv. Katzelsdorf
50 µl	NADP ⁺ (0,83mg/100 µl H ₂ O) (0,48 mM)
50 µl	Glukose 6-Phosphat (0,61 mg/100 µl H ₂ O) (0,96 mM)
10 µl	Glukose 6-Phosphat-Dehydrogenase (1,75 U)
690 µl	0,1 M KP _i -Puffer (+ 0,4 % Ascorbat, pH 7,5)

Das in Ethylacetat gelöste (¹⁴C)-Naringenin wurde in ein Eppendorfgefäß pipettiert und in einem Vakuumexsikkator bis zur Trockene eingedampft. Danach wurde das Substrat mit dem Puffer aufgenommen, NADP⁺-, Glukose 6-Phosphat-Lösung sowie Glukose 6-Phosphat-Dehydrogenase-Lösung zugegeben und die Reaktion durch Zugabe der Mikrosomen gestartet. Der Enzymansatz wurde 60 min bei 30 °C bei geöffnetem Gefäßdeckel inkubiert, alle 15 min wurde geschüttelt.

Durch Zugabe von 50 µl Essigsäure und 400 µl Ethylacetat wurde die Reaktion gestoppt und der Ansatz 4 x mit je 400 µl Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im Vakuum eingengt. Mittels Chromatographie in CAW wurde das gebildete Produkt vom Ausgangssubstrat abgetrennt und seine Lage auf der DC-Platte mit Hilfe des TLC-Linear Analyzers ermittelt. Dieser Bereich wurde von der Celluloseplatte abgekratzt und das (¹⁴C)-Apigenin mit Methanol von der Cellulose eluiert. Die Ausbeute wurde am Szintillationszähler gemessen und die Reinheit durch Chromatographie auf einer DC-Celluloseplatte überprüft.

3.17.4 Enzymatische Synthese von (¹⁴C)-Kämpferol

Die Synthese von (¹⁴C)-Kämpferol erfolgte mit Hilfe von Flavonolsynthaseextrakten, die durch Expression eines Flavonolsynthaseklons in *E.coli* und anschließendem Zellaufschluß gewonnen wurden.

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1.000 µl:

0,73 nmol (¹⁴ C)-Dihydrokämpferol (1.667 Bq)	
200 µl	rekombinante FLS
50 µl	2-Oxoglutarat (1,46 mg/ml H ₂ O)
50 µl	FeSO ₄ x 7 H ₂ O (0,56 mg/ml H ₂ O)
700 µl	0,05 M KP _i -Puffer (+ 0,4 % Ascorbat, pH 7,6)

Das in Methanol gelöste (¹⁴C)-Dihydrokämpferol wurde in ein Eppendorfgesäß pipettiert und die Lösung in einem Vakuumexsikkator bis zur Trockene eingedampft. Anschließend wurde das Substrat mit dem Puffer aufgenommen, die rekombinante FLS zugegeben und die Reaktion durch Zugabe der 2-Oxoglutarat- und der FeSO₄-Lösung gestartet. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei 30 °C mit geöffnetem Gefäßdeckel inkubiert.

Anschließend wurden dem Ansatz 50 µl Essigsäure zugegeben, das gebildete Produkt 4 x mit je 400 µl Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im Vakuum eingengt. Die Reinigung erfolgte durch Chromatographie auf Celluloseplatten in 30%iger Essigsäure. Die Lage des enzymatisch gebildeten Produkts auf der DC-Platte wurde mit Hilfe des TLC-Linear Analyzers ermittelt. Dieser Bereich wurde von der Celluloseplatte abgekratzt und das (¹⁴C)-Kämpferol mit Methanol von der Cellulose extrahiert. Die Ausbeute wurde am Szintillationszähler gemessen und die Reinheit durch Chromatographie auf einer DC-Celluloseplatte in verschiedenen Laufmitteln überprüft.

3.17.5 Enzymatische Synthese von (¹⁴C)-Isoliquiritigenin

Radioaktiv markiertes Isoliquiritigenin wurde nach der Vorschrift von Nabaei-Bidhendi und Bannerjee [Nabaei-Bidhendi und Bannerjee, 1990] hergestellt.

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Volumen von 82 µl:

4,1 µmol (¹⁴ C)- <i>p</i> -Hydroxybenzaldehyd (2.870 kBq)	
4,1 µmol	2,4-Dihydroacetophenon
12 µl	Ethanol
70 µl	KOH (60 %)

(¹⁴C)-*p*-Hydroxybenzaldehyd und 2,4-Dihydroacetophenon wurden in Methanol gelöst und in ein Eppendorfgesäß überführt. Die Lösung wurde in einem Vakuumexsikkator bis zur Trockene eingedampft und der Rückstand in 12 µl Ethanol gelöst. Anschließend wurde er mit 70 µl eisgekühlter 60%iger KOH aufgenommen und 3 Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Danach wurde das Reaktionsgemisch mit 100 µl 4N HCl angesäuert und mehrmals mit je 200 µl Ethylacetat extrahiert. Mittels Chromatographie in 30%iger Essigsäure wurde Isoliquiritigenin vom Ausgangsprodukt abgetrennt und seine Lage auf der DC-Celluloseplatte mit dem TLC-Linear Analyzer ermittelt. Dieser Bereich wurde von der Celluloseplatte abgekratzt und Isoliquiritigenin mit Methanol von der Cellulose eluiert. Die methanolischen Phasen wurden im Vakuum eingeeengt, die gebildete Menge an Isoliquiritigenin wurde am Szintillationszähler gemessen und die Reinheit durch Chromatographie auf einer DC-Celluloseplatte überprüft.

3.18 Enzymtests

Für alle Tests wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, das Volumen der Ansätze betrug 100 µl. Als Substrate wurden eingesetzt:

(¹⁴ C)-Naringenin	: 108 Bq	(0,048 nmol)*
(¹⁴ C)-Dihydrokämpferol	: 108 Bq	(0,048 nmol)
(¹⁴ C)-Apigenin	: 108 Bq	(0,048 nmol)
(¹⁴ C)-Kämpferol	: 108 Bq	(0,048 nmol)
(¹⁴ C)-Isoliquiritigenin	: 108 Bq	(0,500 nmol)

*0,0485 nmol bei *Antirrhinum majus* (3.18.1)

Das in Methanol gelöste Substrat wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß einpipettiert und die Lösung im Vakuumexsikkator bis zur Trockene eingedampft. Anschließend wurde das Substrat mit dem Puffer aufgenommen, die rekombinante F3'H zugegeben und die Reaktion durch Zugabe der NADPH-Lösung gestartet. Das Reaktionsgemisch wurde entsprechend den angegebenen Zeiten (3.18.1, 3.18.2, 3.18.3) bei 30 °C im Wasserbad inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Eisessig und 70 µl Ethylacetat gestoppt.

Die organische Phase wurde durch Zentrifugation bei 13.000 rpm und 3 min abgetrennt und auf eine DC-Celluloseplatte aufgetragen, anschließend in CAW chromatographiert und am TLC-Linear Analyzer gemessen. Zur Kontrolle wurden jeweils 108 Bq des entsprechenden (¹⁴C)-markierten Substrats mitaufgetragen.

3.18.1 *Antirrhinum majus*

0,0485 nmol	(¹⁴ C)- Naringenin
5 µl	rekombinante F3'H
85 µl	0,2 M Puffer
5 µl	NADPH (0,83 mg/100 µl)
Inkubation: 15 min	

0,048 nmol	(¹⁴ C)-Dihydrokämpferol
5 µl	rekombinante F3'H
90 µl	0,2 M Puffer
5 µl	NADPH (0,83 mg/100 µl)
Inkubation: 15 min	

0,048 nmol	(¹⁴ C)-Kämpferol
5 µl	rekombinante F3'H
90 µl	0,2 M Puffer
5 µl	NADPH (0,83 mg/100 µl)
Inkubation: 15 min	

0,5 nmol	(¹⁴ C)-Isoliquiritigenin
30 µl	rekombinante F3'H
65 µl	0,2 M Puffer
5 µl	NADPH (0,83 mg/100 µl)
Inkubation: 30 min	

3.18.2 *Cosmos sulphureus*

0,048 nmol	(¹⁴ C)-Naringenin
10 µl	rekombinante F3'H
85 µl	0,2 M Puffer
5 µl	NADPH (0,83 mg/100 µl)
Inkubation: 15 min	

0,048 nmol	(¹⁴ C)-Dihydrokämpferol
10 µl	rekombinante F3'H
85 µl	0,2 M Puffer
5 µl	NADPH (0,83 mg/100 µl)
Inkubation: 15 min	

0,048 nmol (¹⁴C)-Kämpferol
20 µl rekombinante F3'H
75 µl 0,2 M Puffer
5 µl NADPH (0,83 mg/100 µl)

Inkubation : 30 min

3.18.3 *Coreopsis grandiflora*

0,048 nmol (¹⁴C)-Naringenin
1 µl rekombinante F3'H
94 µl 0,2 M Puffer
5 µl NADPH (0,83 mg/100 µl)

Inkubation: 15 min

0,048 nmol (¹⁴C)-Dihydrokämpferol
10 µl rekombinante F3'H
85 µl 0,2 M Puffer
5 µl NADPH (0,83 mg/100 µl)

Inkubation: 15 min

0,048 nmol (¹⁴C)-Apigenin
20 µl rekombinante F3'H
75 µl 0,2 M Puffer
5 µl NADPH (0,83 mg/100 µl)

Inkubation: 30 min

0,048 nmol (¹⁴C)-Kämpferol
5 µl rekombinante F3'H
90 µl 0,2 M Puffer
5 µl NADPH (0,83 mg/100 µl)

Inkubation: 15 min

0,5 nmol (¹⁴C)-Isoliquiritigenin
10 µl rekombinante F3'H
85 µl 0,2 M Puffer
5 µl NADPH (0,83 mg/100 µl)

Inkubation: 15 min

3.19 Enzymcharakterisierung (F3'H)

3.19.1 pH-Optimum

Zur Abdeckung des pH-Bereichs von pH 5,5 bis pH 8,5 wurde ein 0,2 M Mcllvaine-Puffer (Na_2HPO_4 /Citronensäure) und ein 0,2 M Tris/HCl-Puffer verwendet. In einer ersten groben Bestimmung wurde der pH-Wert in 0,5er-Schritten variiert, die Feinabstimmung erfolgte in 0,25er-Schritten.

3.19.1.1 *Antirrhinum majus*

(^{14}C)-Naringenin:

pH 5,5-6,5: 0,2 M Mcllvaine + 0,4 % Ascorbat
pH 7,0-8,5: 0,2 M Tris/HCl + 0,4 % Ascorbat

(^{14}C)-Dihydrokämpferol:

pH 5,5-6,5: 0,2 M Mcllvaine + 0,4 % Ascorbat
pH 7,0-8,5: 0,2 M Tris/HCl + 0,4 % Ascorbat

(^{14}C)-Apigenin:

pH 5,5-8,5: 0,2 M Mcllvaine + 0,4 % Ascorbat

(^{14}C)-Kämpferol:

pH 5,5-8,5: 0,2 M Mcllvaine + 0,4 % Ascorbat

(^{14}C)-Isoliquiritigenin:

pH 5,5-7,0: 0,2 M Mcllvaine + 0,4 % Ascorbat
pH 7,0-8,5: 0,2 M Tris/HCl + 0,4 % Ascorbat

3.19.1.2 *Cosmos sulphureus*

(^{14}C)-Naringenin:

pH 5,5-6,5: 0,2 M Mcllvaine + 0,4 % Ascorbat
pH 7,0-8,5: 0,2 M Tris/HCl + 0,4 % Ascorbat

(¹⁴C)-Dihydrokämpferol:

pH 5,5-7,0: 0,2 M Mcllvaine + 0,4 % Ascorbat
pH 7,0-8,5: 0,2 M Tris/HCl + 0,4 % Ascorbat

(¹⁴C)-Kämpferol:

pH 5,5-8,50: 0,2 M Mcllvaine + 0,4 % Ascorbat
pH 8,0-8,75: 0,2 M Tris/HCl + 0,4 % Ascorbat

3.19.1.3 *Coreopsis grandiflora*

(¹⁴C)-Naringenin:

pH 5,5-8,5: 0,2 M Mcllvaine + 0,4 % Ascorbat

(¹⁴C)-Dihydrokämpferol:

pH 5,5-8,5: 0,2 M Mcllvaine + 0,4 % Ascorbat

(¹⁴C)-Apigenin:

pH 5,5-8,5: 0,2 M Mcllvaine + 0,4 % Ascorbat

(¹⁴C)-Kämpferol:

pH 5,5-8,5: 0,2 M Mcllvaine + 0,4 % Ascorbat

(¹⁴C)-Isoliquiritigenin:

pH 5,5-8,5: 0,2 M Mcllvaine + 0,4 % Ascorbat

4 ERGEBNISSE

4.1 Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H) aus *Antirrhinum majus*

4.1.1 Klonierung

In der NCBI-Datenbank war eine entsprechende F3'H-Sequenz aus *Antirrhinum majus* vorhanden (Accession Number: DQ272592). Daraus wurden Primer abgeleitet, um die codierende Sequenz mittels Proofreading-PCR zu amplifizieren. Mit Hilfe des Primerpaares Antirr.F3'H (Tab. 6) konnte ein Stück der Länge von 1814 Bp erhalten werden. Die anschließende Sequenzierung ergab, dass es sich um die gleiche Sequenz wie die in der Datenbank handelte. Das PCR-Produkt wurde in den Expressionsvektor pYES2.1 ligiert, dieser in Hefe transformiert und anschließend exprimiert.

Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die verwendeten Primer:

Primer	Sequenz 5'-3'	Verwendung als:
Antirr.F3'H.for	CTC TTT CCG ACC ATC TAT ACA TG	Forward Primer
Antirr.F3'H.rev	ATT GAG TTG GGA ATT GGG AGC AA	Reverse Primer

Tabelle 6: Verwendete Primer für F3'H (*Antirrhinum majus*)

4.1.2 Verifizierung der Enzymaktivität

Inkubation von (¹⁴C)-Naringenin in Gegenwart von NADPH mit rekombinanter F3'H führte zur Bildung eines Produktes, das mit Hilfe von Standardsubstanzen als Eriodictyol identifiziert werden konnte (Abb. 21).

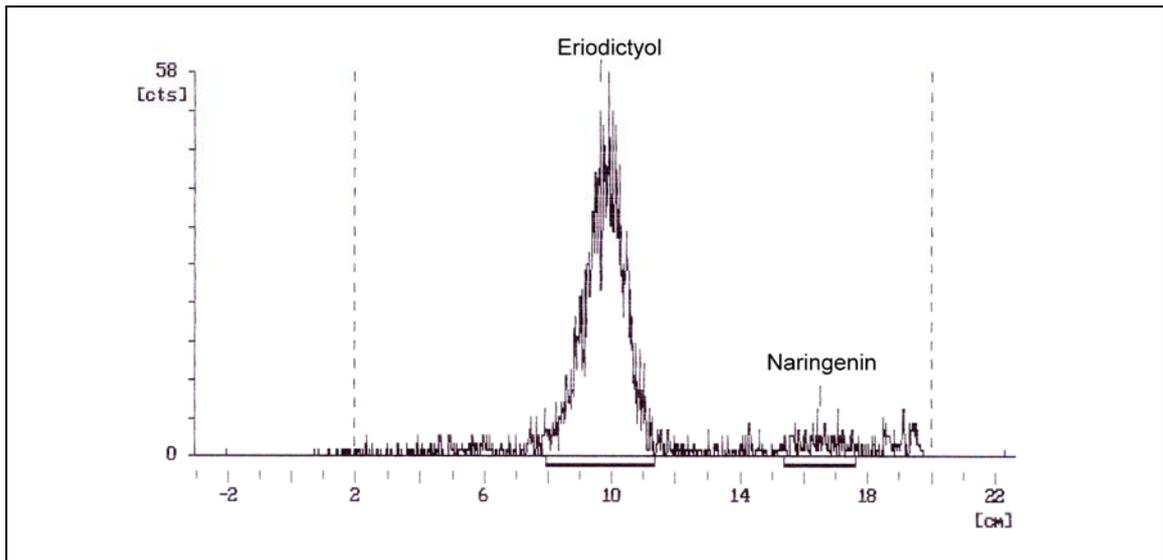


Abbildung 21: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Eriodictyol aus Naringenin in Gegenwart von NADPH durch die rekombinante F3'H aus *Antirrhinum majus* nach Chromatographie in CAW

Inkubation von (^{14}C)-Dihydrokämpferol in Gegenwart von NADPH mit rekombinanter F3'H führte zur Bildung eines Produkts, das mit Hilfe von Standardsubstanzen als Dihydroquercetin identifiziert werden konnte (Abb. 22).

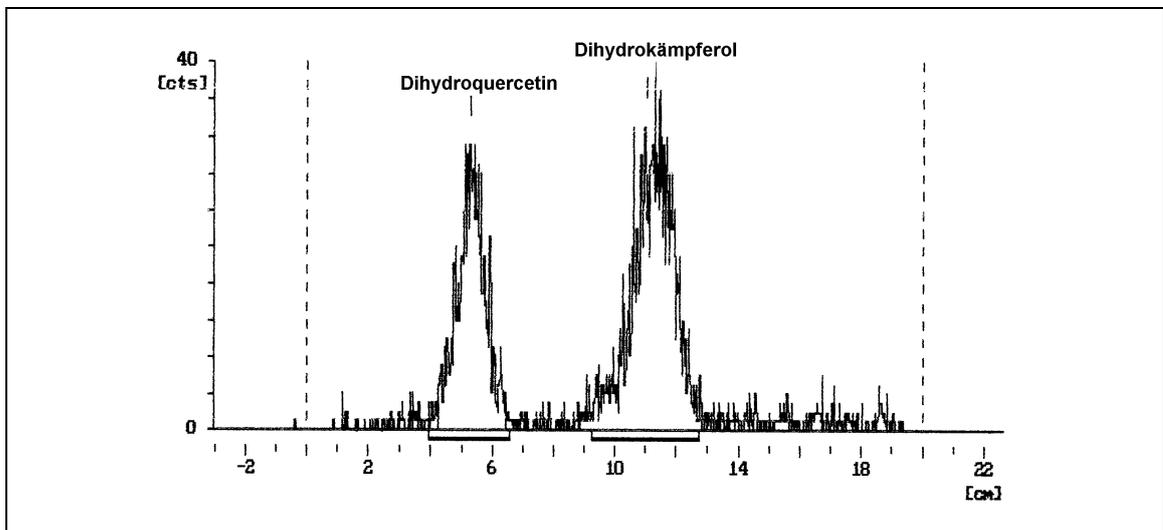


Abbildung 22: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Dihydroquercetin aus Dihydrokämpferol in Gegenwart von NADPH durch die rekombinante F3'H aus *Antirrhinum majus* nach Chromatographie in CAW

Inkubation von (^{14}C)-Apigenin in Gegenwart von NADPH mit rekombinanter F3'H führte zur Bildung eines Produkts, das mit Hilfe von Standardsubstanzen als Luteolin identifiziert werden konnte (Abb. 23).

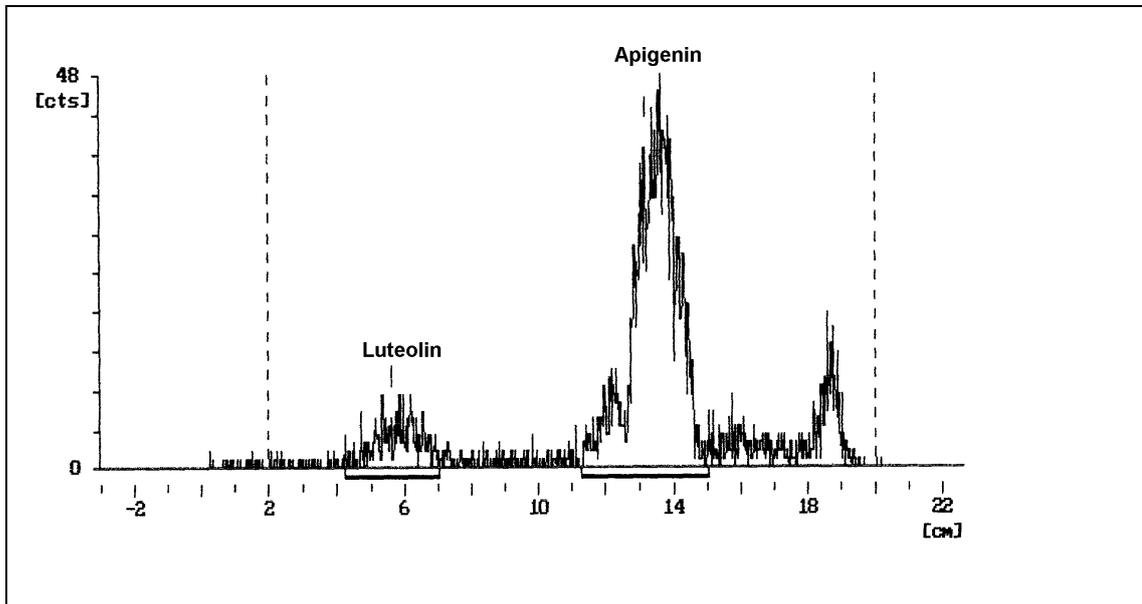


Abbildung 23: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Luteolin aus Apigenin in Gegenwart von NADPH durch die rekombinante F3'H aus *Antirrhinum majus* nach Chromatographie in CAW

Inkubation von (^{14}C)-Kämpferol in Gegenwart von NADPH mit rekombinanter F3'H führte zur Bildung eines Produkts, das mit Hilfe von Standardsubstanzen als Quercetin identifiziert werden konnte (Abb. 24).

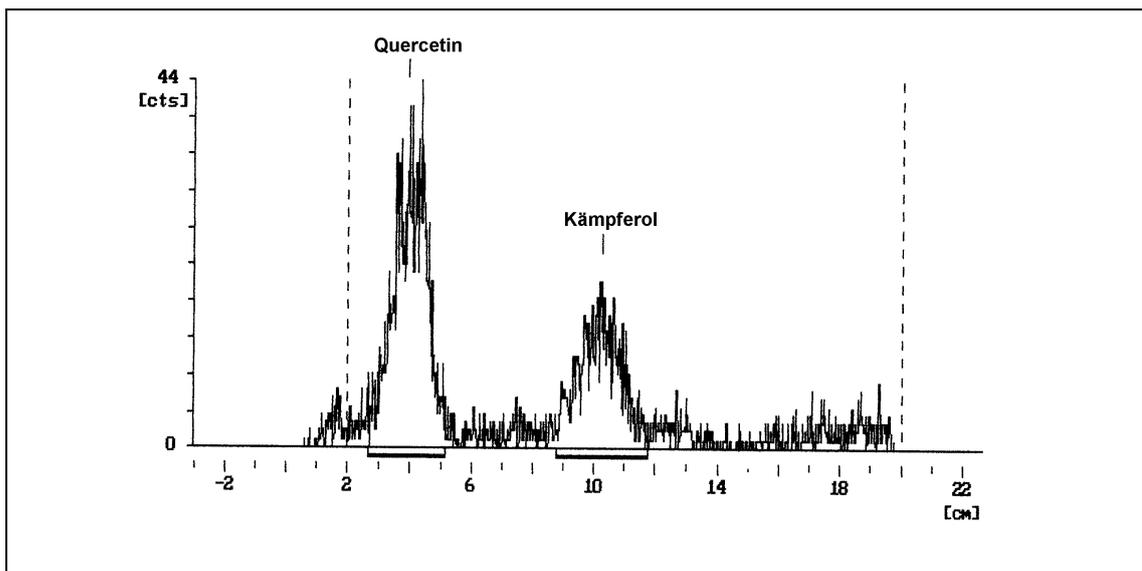


Abbildung 24: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Quercetin aus Kämpferol in Gegenwart von NADPH durch die rekombinante F3'H aus *Antirrhinum majus* nach Chromatographie in CAW

Inkubation von (^{14}C)-Isoliquiritigenin in Gegenwart von NADPH mit rekombinanter F3'H führte zur Bildung geringer Mengen eines Produktes, das mit Hilfe von Standardsubstanzen als Butein identifiziert werden konnte (Abb. 25).

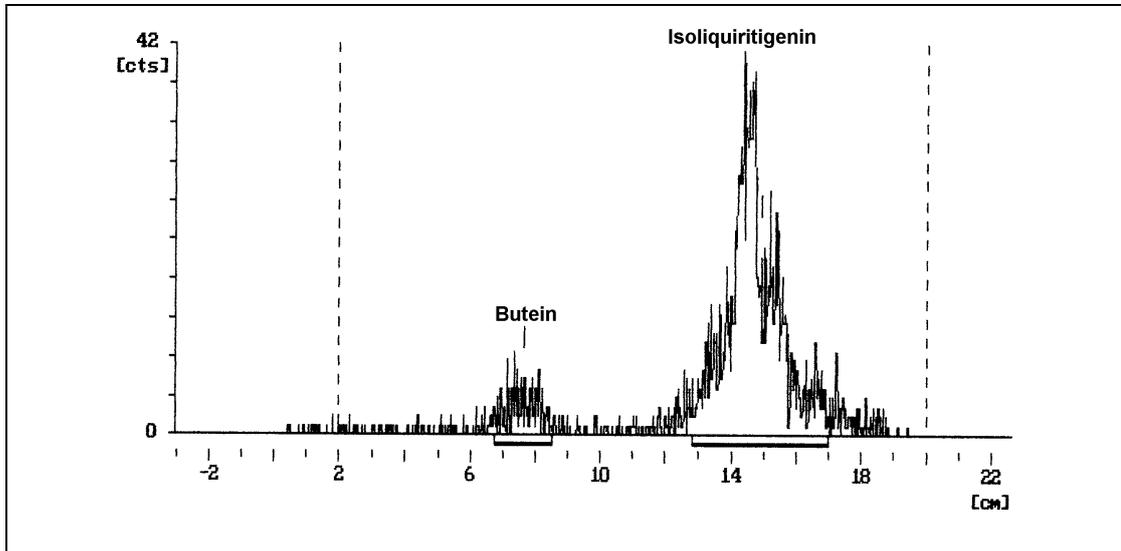


Abbildung 25: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Butein aus Isoliquiritigenin in Gegenwart von NADPH durch die rekombinante F3'H aus *Antirrhinum majus* nach Chromatographie in CAW

4.1.3 Charakterisierung

Um den für die Untersuchung benötigten pH-Bereich von pH 5,5-8,5 abzudecken, wurde für den alkalischen Bereich ein Tris/HCl-Puffer eingesetzt und für den sauren Bereich ein McIlvaine-Puffer. Die pH-Optimierung der Aktivität der F3'H wurde mit Naringenin, Dihydrokämpferol, Apigenin, Kämpferol und Isoliquiritigenin als Substrate durchgeführt, wobei bei Apigenin und Kämpferol für den pH-Bereich von pH 5,5-8,5 ein McIlvaine-Puffer eingesetzt wurde. Da sich die Aktivitäten der F3'H in Abhängigkeit des Puffersystems bei pH 7,0 nur marginal voneinander unterscheiden, wurden diese in den entsprechenden Tabellen nur bei grösserer Abweichung voneinander angegeben. Ansonsten bezieht sich der tabellarische Wert von pH 7,0 auf das Tris/HCl-Puffersystem.

Mit Naringenin als Substrat wurde bei pH 7,75 ein Maximum beobachtet. Auffällig ist, dass im pH-Bereich von pH 5,5-6,0 kein Umsatz zu verzeichnen ist, generell liegen die höheren Umsätze im alkalischen Bereich, der Umsatz bei pH 7,0 wurde in Tris/HCl-Puffer gemessen (Tab.7, Abb. 26).

pH	gebildetes Eriodictyol [pmol]
5,50	0
6,00	0
6,50	2,88
7,00	3,98
7,25	4,97
7,50	5,61
7,75	6,71
8,00	6,23
8,50	4,52

Tabelle 7: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Naringenin als Substrat

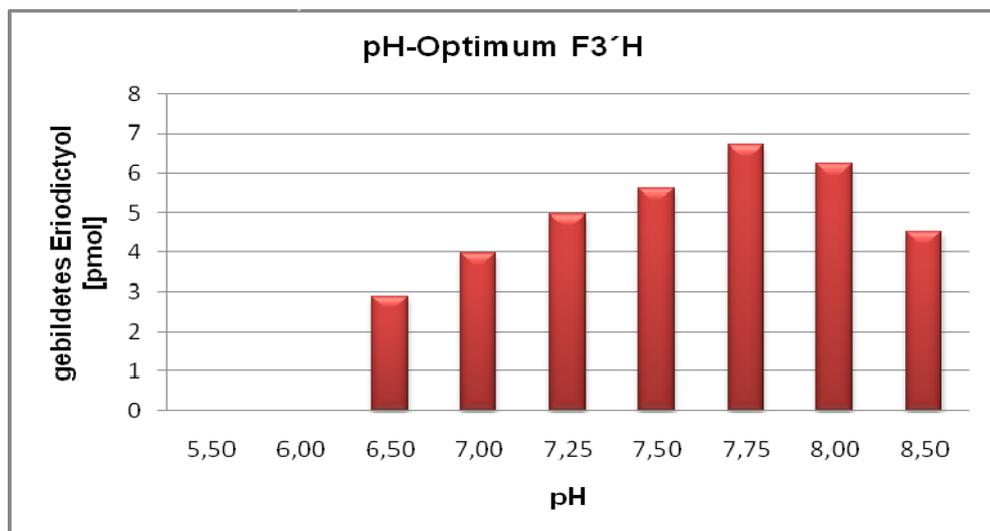


Abbildung 26: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Naringenin als Substrat

Mit Dihydrokämpferol ist ein stärker ausgeprägtes Maximum bei einem pH-Wert von pH 7,5 zu beobachten, auch hier liegen die höheren Umsätze des Enzyms im alkalischen pH-Bereich, wobei sich die Aktivität des Enzyms bei pH 8,5 um circa 50 % gegenüber pH 8,0 verringert. Der Umsatz bei pH 7,0 wurde in Tris/HCl-Puffer gemessen (Tab.8, Abb. 27).

pH	gebildetes Dihydroquercetin [pmol]
5,50	nicht bestimmt
6,00	nicht bestimmt
6,50	13,65
7,00	23,16
7,25	24,53
7,50	25,15
7,75	22,84
8,00	20,92
8,50	11,56

Tabelle 8: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Dihydrokämpferol als Substrat

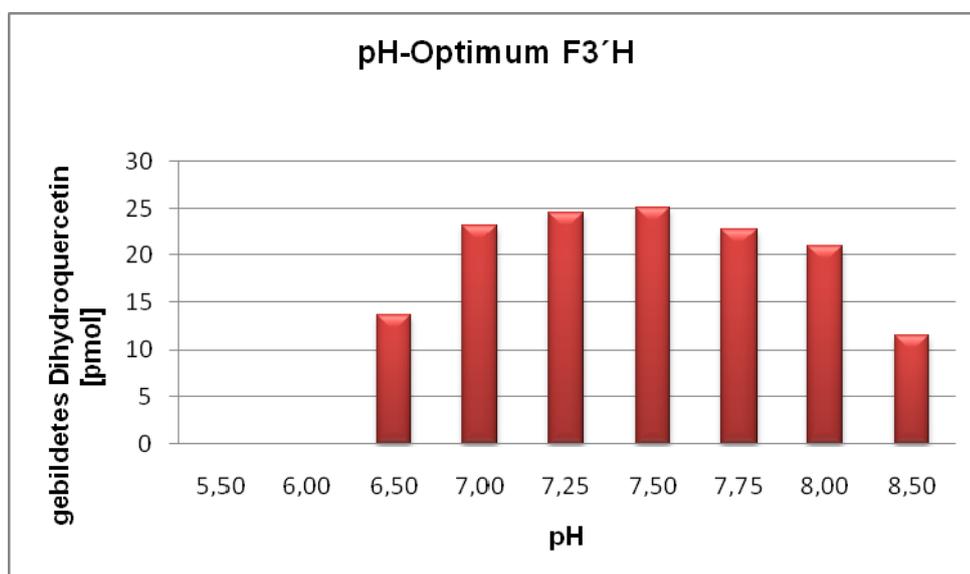


Abbildung 27: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Dihydrokämpferol als Substrat

Mit Apigenin als Substrat wird bei pH 7,25 der höchste Umsatz des Enzyms gemessen, wobei bei pH 7,75 nochmals ein Anstieg erfolgt und danach der Umsatz wieder abnimmt. Wie schon bei den vorherigen Substraten liegen auch hier die höchsten Aktivitäten wieder im alkalischen Bereich (Tab. 9, Abb. 28).

pH	gebildetes Luteolin [pmol]
5,50	0
6,00	1,56
6,50	3,00
7,00	4,83
7,25	5,83
7,50	5,41
7,75	5,57
8,00	4,43
8,25	4,47
8,50	3,08

Tabelle 9: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Apigenin als Substrat

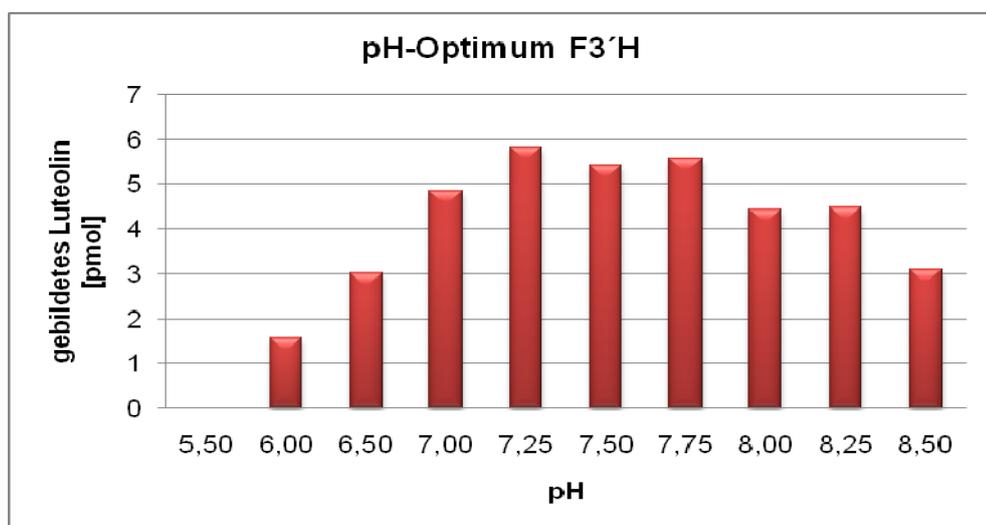


Abbildung 28: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Apigenin als Substrat

Mit Kämpferol ist wie bei Apigenin die höchste Aktivität bei pH 7,25 zu verzeichnen, auch hier liegen die höchsten Umsätze des Enzyms wiederum im alkalischen Bereich (Tab. 10, Abb. 29).

pH	gebildetes Quercetin [pmol]
5,50	0,13
6,00	8,34
6,50	24,18
6,75	27,52
7,00	29,72
7,25	31,54
7,50	27,16
7,75	24,13
8,00	20,02
8,50	12,33

Tabelle 10: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Kämpferol als Substrat

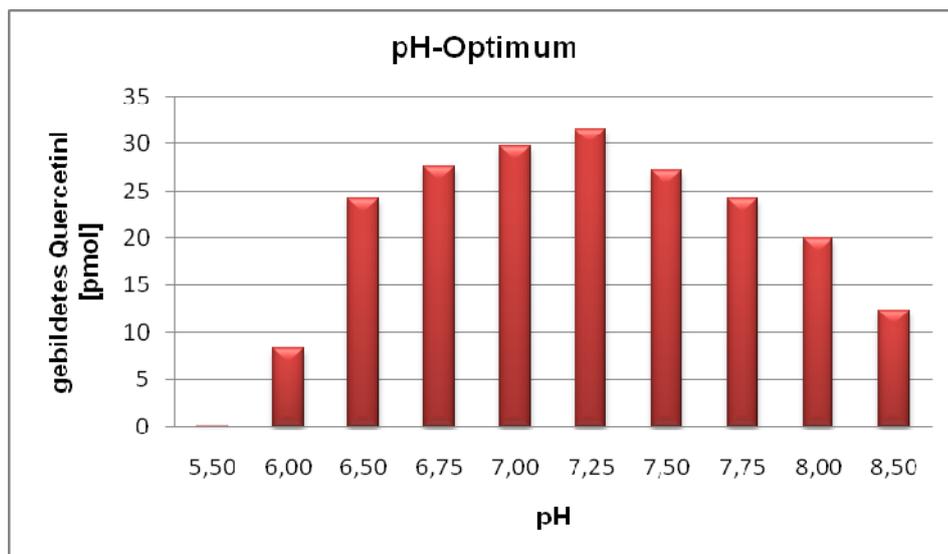


Abbildung 29: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Kämpferol als Substrat

Mit Isoliquiritigenin als Substrat ist im pH-Bereich von pH 5,5-6,0 kein Umsatz messbar, ein ausgeprägtes Maximum liegt bei pH 7,75. Generell sind wieder im alkalischen Bereich höhere Aktivitäten zu verzeichnen als im sauren Bereich. Der enzymatische Umsatz bei pH 7,0 wurde für beide Puffersysteme angegeben, da die Messwerte in Abhängigkeit des Puffers stärker voneinander abweichen (Tab. 11, Abb. 30).

pH	gebildetes Butein [pmol]
5,50	0
6,00	0
6,50	5,10
7,00	14,00
7,00*	15,70
7,25	26,35
7,50	28,80
7,75	30,20
8,00	24,85
8,25	23,25
8,50	17,25

*Mc Ilvaine-Puffer

Tabelle 11: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Isoliquiritigenin als Substrat

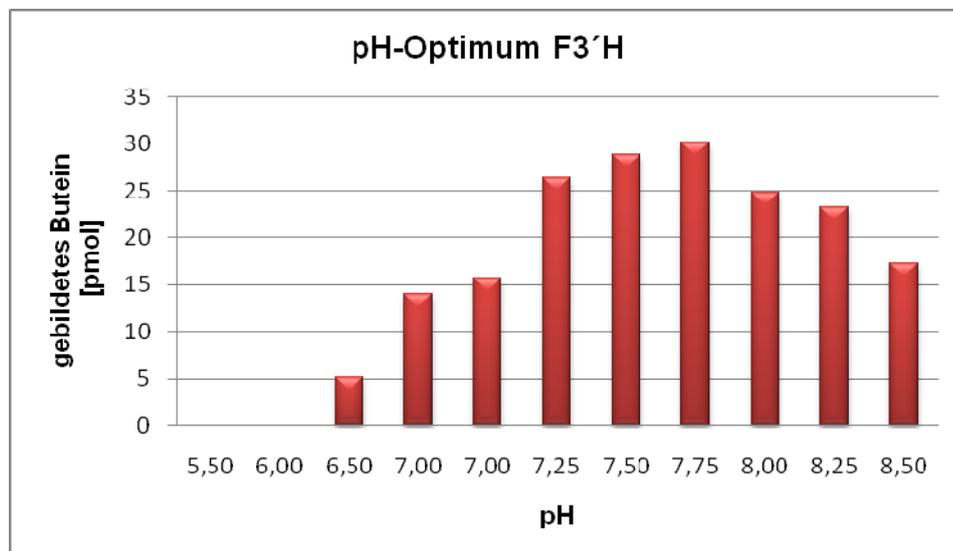


Abbildung 30: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Isoliquiritigenin als Substrat

4.2 Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H) aus *Cosmos sulphureus*

4.2.1 Klonierung

Aus konservierten Regionen verschiedener F3'H-Sequenzen aus der Familie der Asteraceae (NCBI-Datenbank) wurden degenerierte Primer abgeleitet. Mithilfe der Primer AstF3'H.for und AstF3'H.rev konnte ein Fragment der Länge von 578 Bp mit der PCR amplifiziert werden. Aus der Sequenzinformation des Fragments wurden spezifische Primer für die 5'- und 3'-RACE abgeleitet, mit denen die komplette Sequenz der F3'H erhalten wurde. Aus der Sequenz wurden dann Primer für die Expression abgeleitet, mit denen die codierende Region mittels Proofreading-PCR amplifiziert wurde.

Die Länge des mit den Expressionsprimern erhaltenen Fragments betrug 1602 Bp (codierende Region: 1-1527). Die Sequenz wurde in die NCBI-Datenbank eingetragen (Accession number: 1133747).

Tabelle 12 gibt eine Übersicht über die verwendeten Primer:

Primer	Sequenz 5' - 3'	Verwendung als:
AstF3'H.for	TGG MGD ATG CTK MGG AAR ATY TG	degenerierter Primer
AstF3'H.rev	GCC CAT TCM AYN GTR CTA GAT GA	degenerierter Primer
3'RACE.Cos_Cor	ATG GTG TTG GCC GGA GAA TTC A	3'-RACE
Cos_Cor_5'RACE	TGC ACG GAG CAA ATC TTC CTA AGC ATC CGC CA	5'-RACE
Cos_5'RACE	GGC GTC TGC TTC AGT CGC TGC ACA GTT	5'-RACE
CosCor.exp.for	ATG ACT ATT CTA CCC CTA CTA CTC	Full Length Forward Primer
Cos.exp.rev	AGG ATG TCT CAA CTT ACA ACA ATA AAC C	Full Length Reverse Primer

Tabelle 12: Verwendete Primer für F3'H (*Cosmos sulphureus*)

4.2.2 Verifizierung der Enzymaktivität

Inkubation von (^{14}C)-Naringenin in Gegenwart von NADPH mit rekombinanter F3'H führte zur Bildung eines Produkts, das mit Hilfe von Standardsubstanzen als Eriodictyol identifiziert werden konnte (Abb. 31).

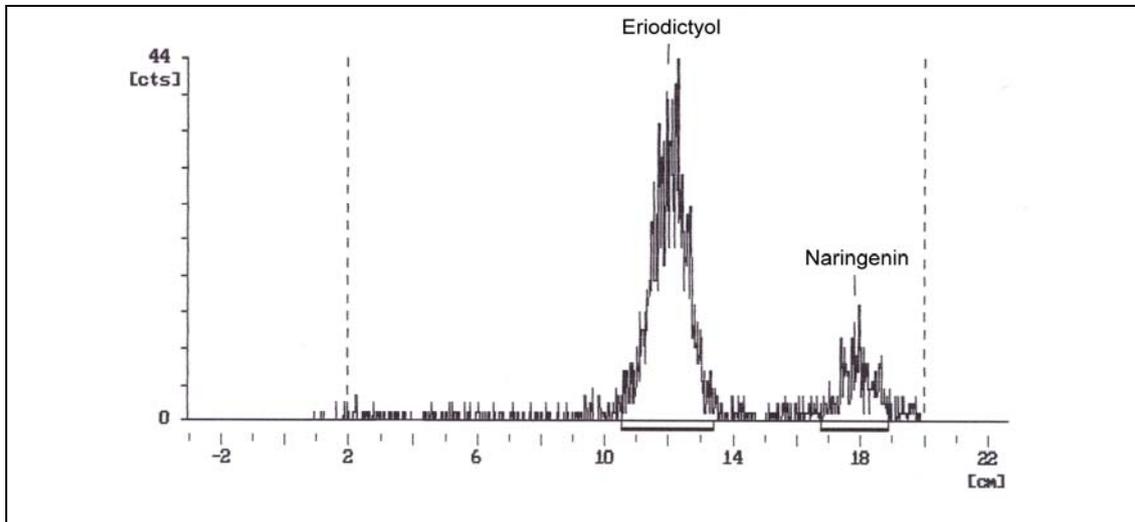


Abbildung 31: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Eriodictyol aus Naringenin in Anwesenheit von NADPH durch die rekombinante F3'H aus *Cosmos sulphureus* nach Chromatographie in CAW

Inkubation von (^{14}C)-Dihydrokämpferol in Gegenwart von NADPH mit rekombinanter F3'H führte zur Bildung eines Produkts, das mit Hilfe von Standardsubstanzen als Dihydroquercetin identifiziert werden konnte (Abb. 32).

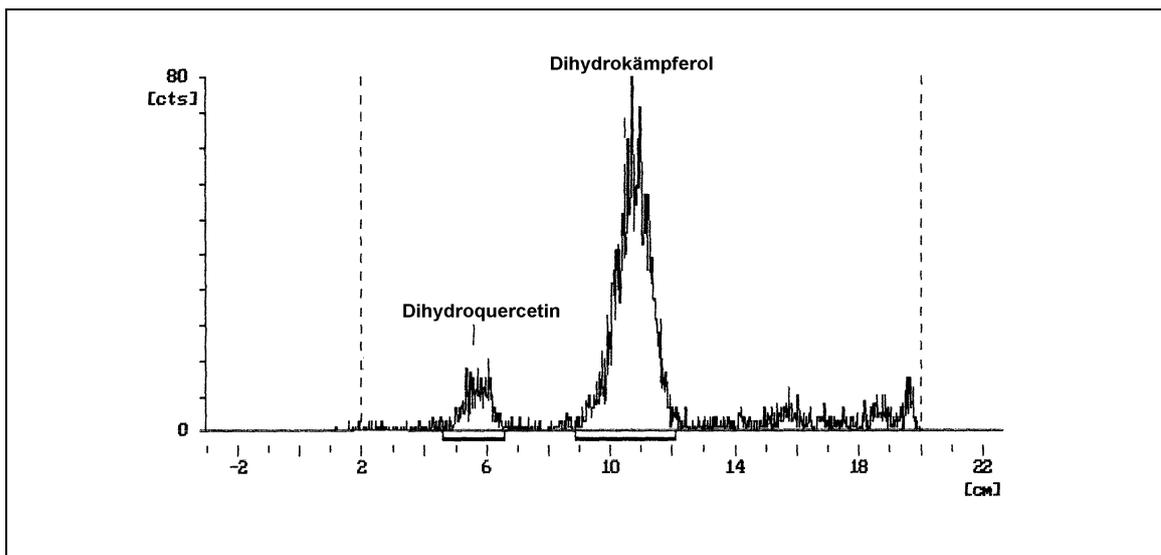


Abbildung 32: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Dihydroquercetin aus Dihydrokämpferol in Anwesenheit von NADPH durch die rekombinante F3'H aus *Cosmos sulphureus* nach Chromatographie in CAW

Inkubation von (^{14}C)-Apigenin in Gegenwart von NADPH und rekombinanter F3'H führte zu keiner entsprechenden Produktbildung (Abb. 33).

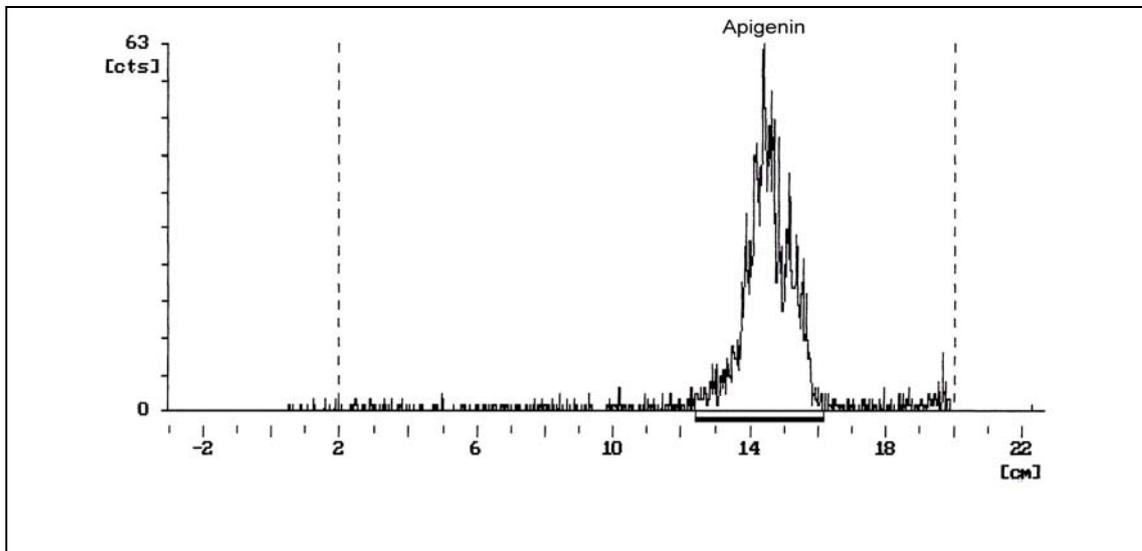


Abbildung 33: Radiochromatogramm von Apigenin in Anwesenheit von NADPH und rekombinanter F3'H aus *Cosmos sulphureus* nach Chromatographie in CAW

Inkubation von (^{14}C)-Kämpferol in Gegenwart von NADPH mit rekombinanter F3'H führte zur Bildung eines Produkts, das mit Hilfe von Standardsubstanzen als Quercetin identifiziert werden konnte (Abb. 34).

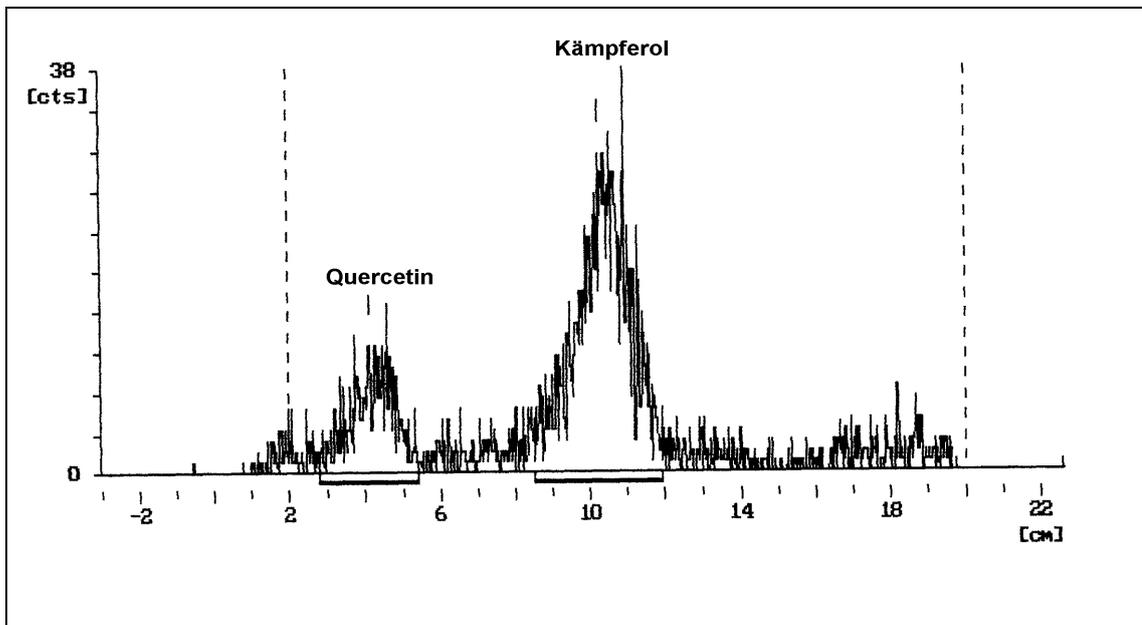


Abbildung 34: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Quercetin aus Kämpferol in Anwesenheit von NADPH durch die rekombinante F3'H aus *Cosmos sulphureus* nach Chromatographie in CAW

Inkubation von (^{14}C)-Isoliquiritigenin in Gegenwart von NADPH und rekombinanter F3'H führte zu keiner entsprechenden Produktbildung (Abb. 35).

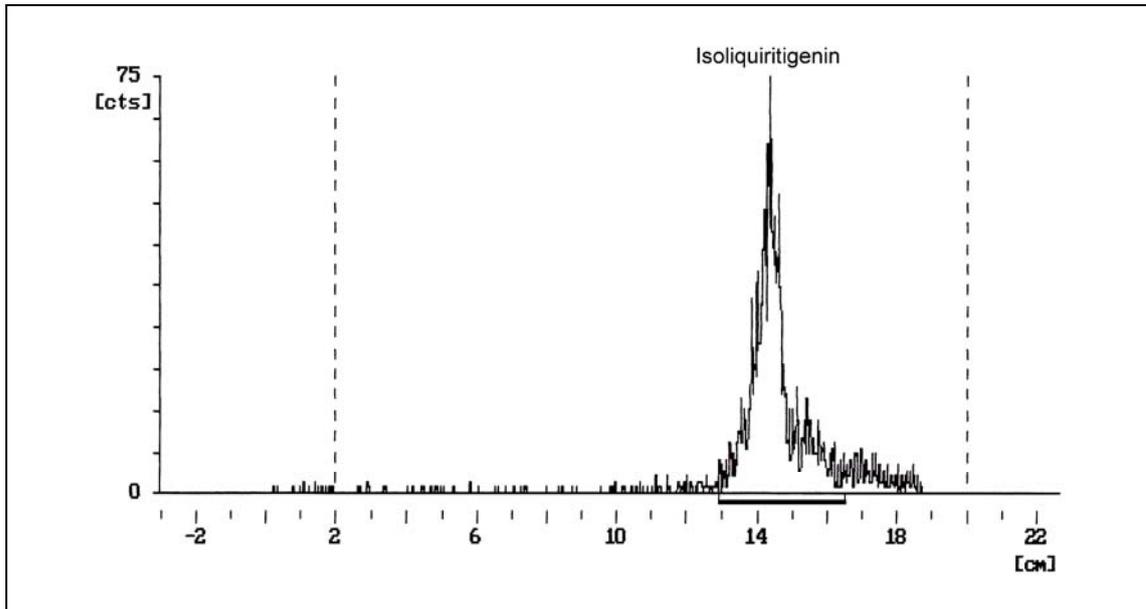


Abbildung 35: Radiochromatogramm von Isoliquiritigenin in Anwesenheit von NADPH und rekombinanter F3'H aus *Cosmos sulphureus* nach Chromatographie in CAW

4.2.3 Charakterisierung

Um den für die Untersuchung benötigten pH-Bereich von pH 5,5-8,5 abzudecken, wurde für den alkalischen Bereich ein Tris/HCl-Puffer eingesetzt und für den sauren Bereich ein McIlvaine-Puffer. Die pH-Optimierung der Aktivität der F3'H wurde mit den Substraten Naringenin, Dihydrokämpferol und Kämpferol durchgeführt, bei Kämpferol wurde der gesamte pH-Bereich von pH 5,5-8,75 durch einen McIlvaine-Puffer abgedeckt.

Der Einsatz von Naringenin als Substrat zur Optimierung der Aktivität der F3'H liefert ein Umsatzmaximum bei pH 8,25, wobei dieses bei pH 8,5 wieder stark abnimmt. Im Gegensatz dazu ist ein relativ kontinuierlicher Anstieg des Umsatzes im pH-Bereich von pH 6,50-8,25 zu beobachten. Die höchsten Umsätze des Enzyms wurden im alkalischen Bereich gemessen (Tab. 13, Abb. 36).

pH	gebildetes Eriodictyol [pmol]
5,50	1,33
6,00	3,35
6,50	7,41
7,00	8,43
7,25	9,35
7,50	9,52
7,75	9,39
8,00	10,14
8,25	10,40
8,50	7,17

Tabelle 13: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Naringenin als Substrat

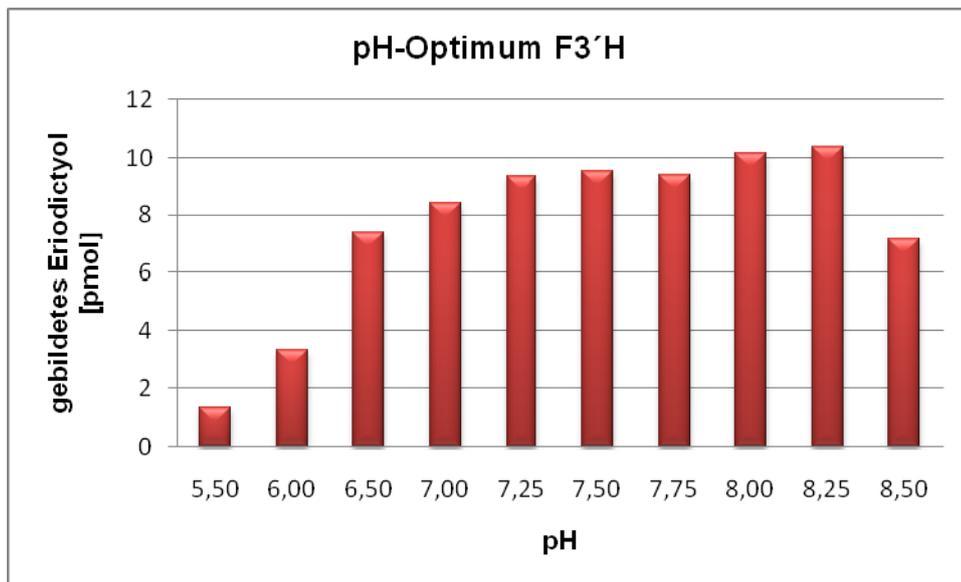


Abbildung 36: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Naringenin als Substrat

Dihydrokämpferol als Substrat zeigt ein pH-Optimum bei pH 7,25, wobei bei pH 7,75 nochmals ein erhöhter Umsatz gemessen werden kann. Auch hier liegen die höchsten Aktivitäten des Enzyms im alkalischen Bereich, weiters ist die erstmals deutliche Abweichung der Enzymumsätze bei pH 7,0 in beiden Puffersystemen um fast 40 Prozent erwähnenswert (Tab. 14, Abb. 37).

pH	gebildetes Dihydroquercetin [pmol]
5,50	0,51
6,00	1,90
6,50	2,82
7,00	3,07
7,00*	4,97
7,25	5,68
7,50	5,36
7,75	5,58
8,00	5,08
8,50	2,32

**Mc Ilvaine-Puffer*

Tabelle 14: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Dihydrokämpferol als Substrat

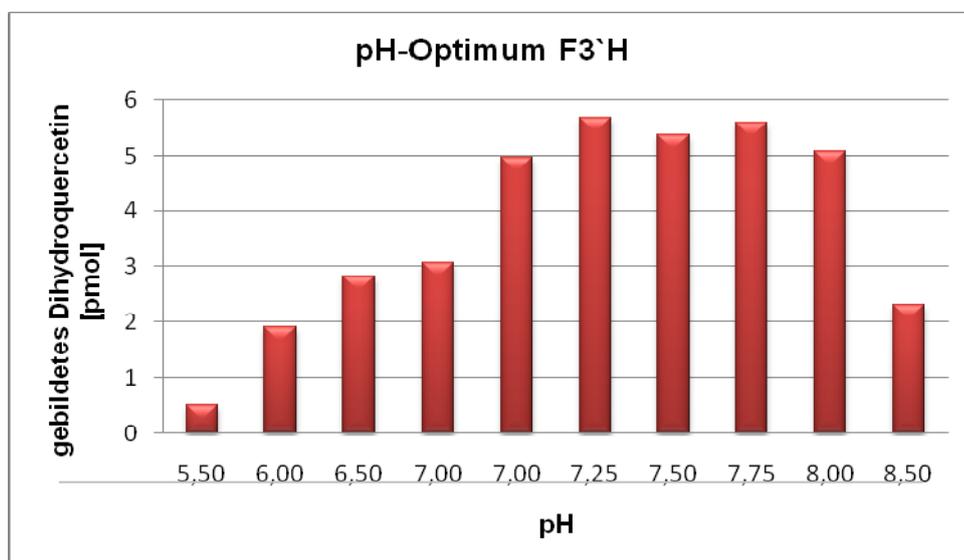


Abbildung 37: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Dihydrokämpferol als Substrat

Der Einsatz von Kämpferol als Substrat liefert ein pH-Optimum bei pH 8,5, wogegen im pH-Bereich von pH 5,5-6,0 überhaupt kein Umsatz von Kämpferol zu Quercetin stattfindet (Tab. 15, Abb. 38).

pH	gebildetes Quercetin [pmol]
5,50	0
6,00	0
6,50	0
7,00	0,17
7,50	6,15
8,00	11,89
8,25	16,94
8,50	23,73
8,75	14,97

Tabelle 15: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Kämpferol als Substrat

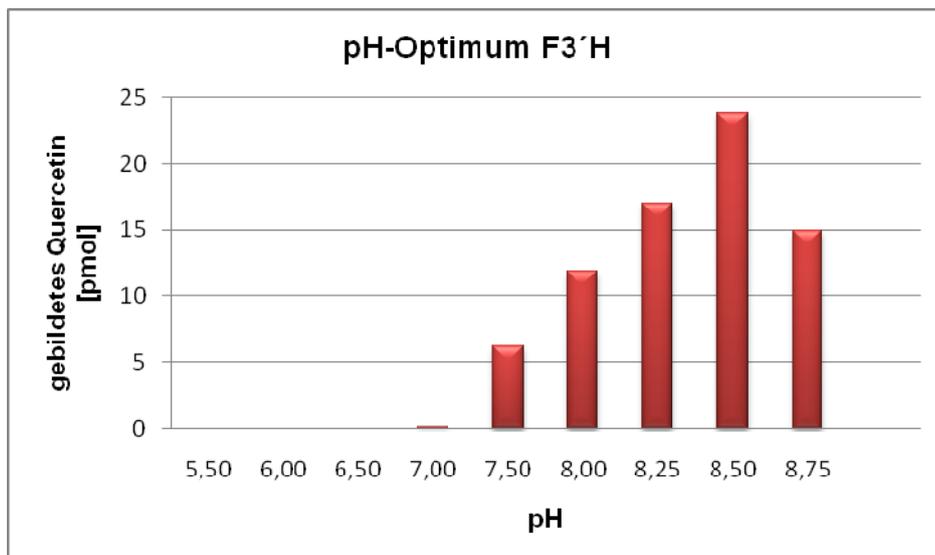


Abbildung 38: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Kämpferol als Substrat

4.3 Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H) aus *Coreopsis grandiflora*

4.3.1 Klonierung

Aus konservierten Regionen verschiedener F3'H-Sequenzen aus der Familie der Asteraceen (NCBI-Datenbank) wurden degenerierte Primer abgeleitet. Mithilfe der Primer AstF3'H.for und AstF3'H.rev konnte ein Fragment der Länge von 578 Bp mit der PCR amplifiziert werden. Aus der Sequenzinformation des Fragments wurden spezifische Primer für die 5'- und 3'-RACE abgeleitet, mit denen die komplette Sequenz der F3'H erhalten wurde. Aus dieser Sequenz wurden dann Primer für die Expression abgeleitet, mit denen die codierende Region mittels Proofreading-PCR amplifiziert wurde.

Die Länge des mit den Expressionsprimern erhaltenen Fragments betrug 1651 Bp (codierende Region: 1-1539). Die Sequenz wurde in die NCBI-Datenbank eingetragen (Accession number: 1133806).

Tabelle 16 gibt eine Übersicht über die verwendeten Primer:

Primer	Sequenz 5' – 3'	Verwendung als:
AstF3'H.for	TGG MGD ATG CTK MGG AAR ATY TG	degenerierter Primer
AstF3'H.rev	GCC CAT TCM AYN GTR CTA GAT GA	degenerierter Primer
3'RACE.Cos_Cor	ATG GTG TTG GCC GGA GAA TTC A	3'-RACE
Cos_Cor_5'RACE	TGC ACG GAG CAA ATC TTC CTA AGC ATC CGC CA	5'-RACE
CosCor.exp.for	ATG ACT ATT CTA CCC CTA CTA CTC	Full Length Forward Primer
PCR-Anker	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C	Full Length Reverse Primer

Tabelle 16: Verwendete Primer für F3'H (*Coreopsis grandiflora*)

4.3.2 Verifizierung der Enzymaktivität

Inkubation von (¹⁴C)-Naringenin in Gegenwart von NADPH mit rekombinanter F3'H führte zur Bildung eines Produkts, das mit Hilfe von Standardsubstanzen als Eriodictyol identifiziert werden konnte (Abb. 39).

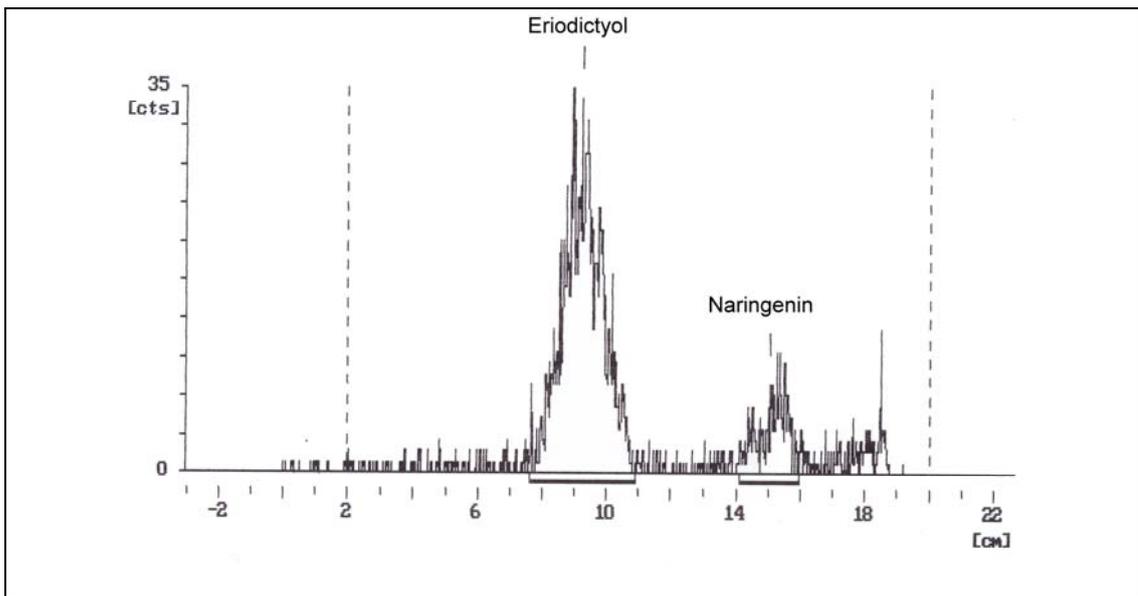


Abbildung 39: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Eriodictyol aus Naringenin in Anwesenheit von NADPH durch die rekombinante F3'H aus *Coreopsis grandiflora* nach Chromatographie in CAW

Inkubation von (^{14}C)-Dihydrokämpferol in Gegenwart von NADPH mit rekombinanter F3'H führte zur Bildung eines Produkts, welches mit Hilfe von Standardsubstanzen als Dihydroquercetin identifiziert werden konnte (Abb. 40).

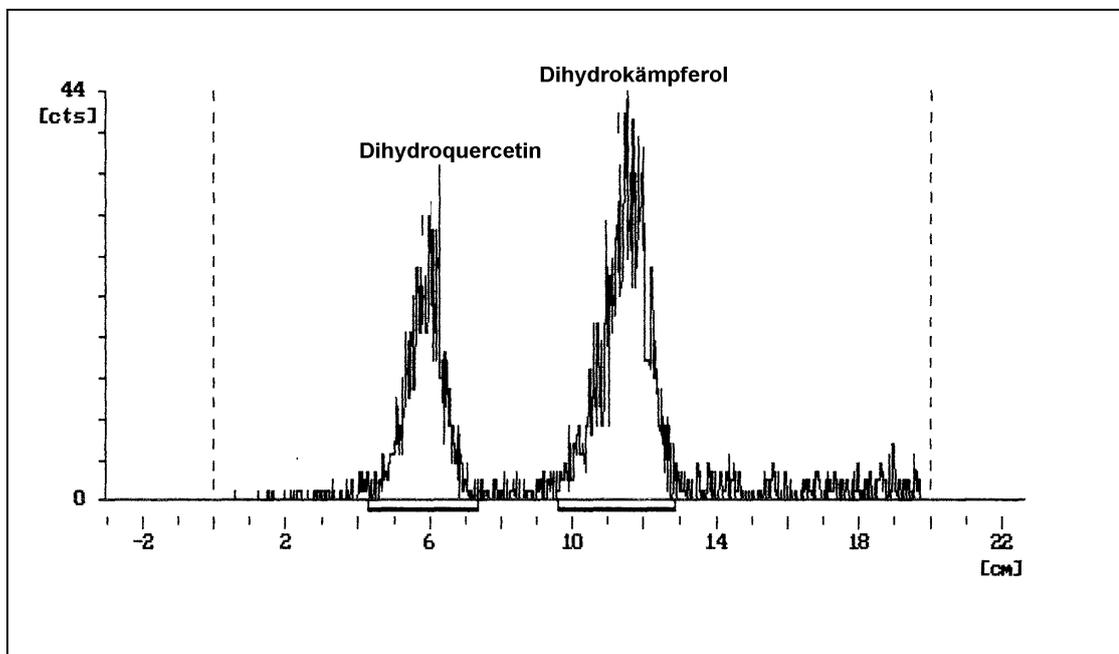


Abbildung 40: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Dihydroquercetin aus Dihydrokämpferol in Anwesenheit von NADPH durch die rekombinante F3'H aus *Coreopsis grandiflora* nach Chromatographie in CAW

Inkubation von (^{14}C)-Apigenin in Gegenwart von NADPH mit rekombinanter F3'H führte zur Bildung eines Produkts, welches mit Hilfe von Standardsubstanzen als Luteolin identifiziert werden konnte (Abb. 41).

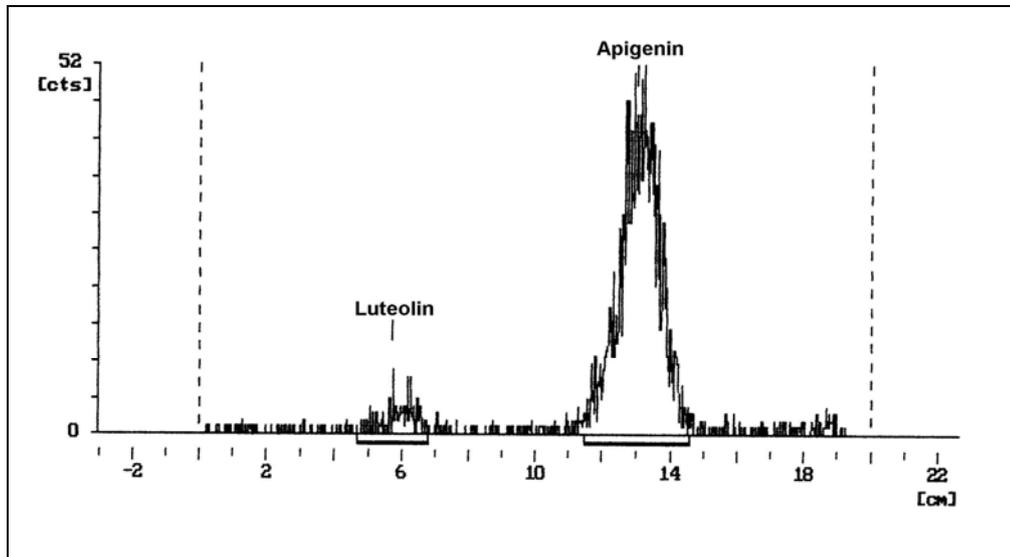


Abbildung 41: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Luteolin aus Apigenin in Anwesenheit von NADPH durch die rekombinante F3'H aus *Coreopsis grandiflora* nach Chromatographie in CAW

Inkubation von (^{14}C)-Kämpferol in Gegenwart von NADPH mit rekombinanter F3'H führte zur Bildung eines Produkts, welches mit Hilfe von Standardsubstanzen als Quercetin identifiziert werden konnte (Abb. 42).

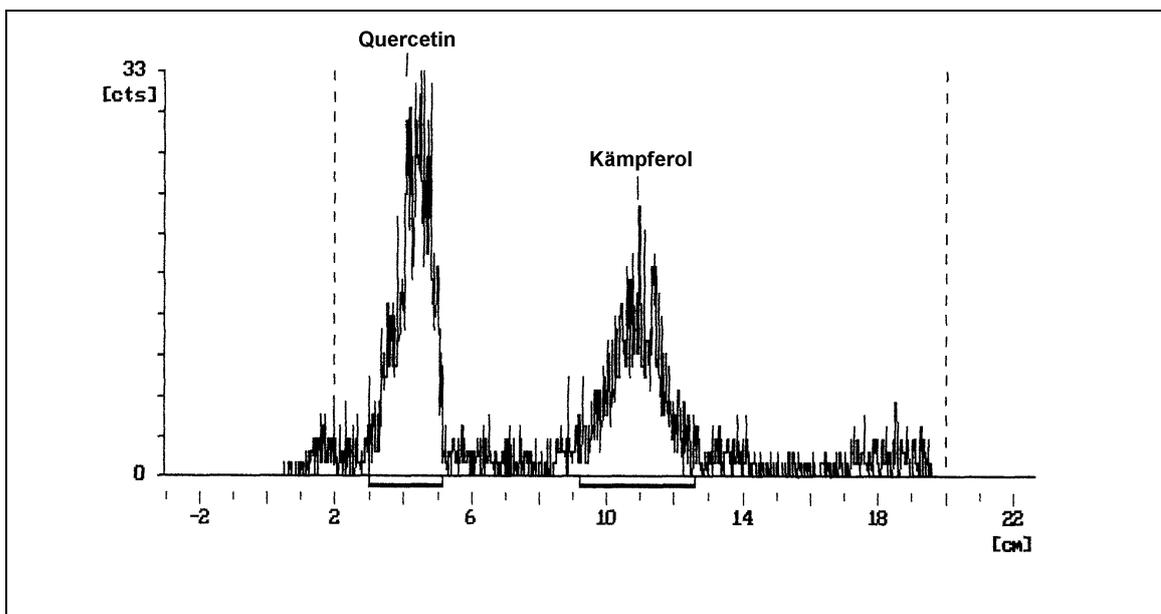


Abbildung 42: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Quercetin aus Kämpferol in Anwesenheit von NADPH durch die rekombinante F3'H aus *Coreopsis grandiflora* nach Chromatographie in CAW

Inkubation von (^{14}C)-Isoliquiritigenin in Gegenwart von NADPH mit rekombinanter F3'H führte zur Bildung eines Produkts, das mit Hilfe von Standardsubstanzen als Butein identifiziert werden konnte (Abb. 43).

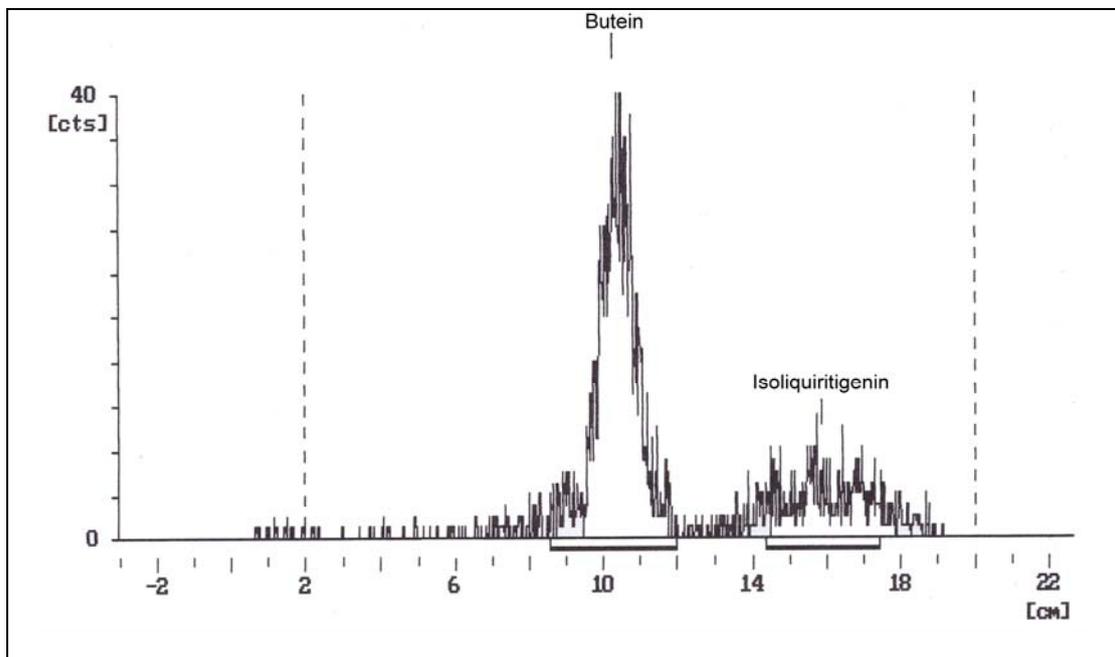


Abbildung 43: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Butein aus Isoliquiritigenin in Anwesenheit von NADPH durch die rekombinante F3'H aus *Coreopsis grandiflora* nach Chromatographie in CAW

4.3.3 Charakterisierung

Um den für die Untersuchung benötigten pH-Bereich von pH 5,5-8,5 abzudecken, wurde sowohl für den alkalischen Bereich als auch für den sauren Bereich ein McIlvaine-Puffer eingesetzt. Die pH-Optimierung wurde mit den Substraten Naringenin, Dihydrokämpferol, Apigenin, Kämpferol und Isoliquiritigenin durchgeführt.

Bei Verwendung von Naringenin als Substrat wurde ein Umsatzmaximum bei einem pH-Wert von pH 7,25 beobachtet, wobei die Aktivität des Enzyms bereits bei einer pH-Differenz von 0,25 oberhalb sowie unterhalb des Maximums stark verringert wurde (Tab. 17, Abb. 44).

pH	gebildetes Eriodictyol [pmol]
5,50	0,5
6,00	2,78
6,50	5,16
7,00	5,06
7,25	6,24
7,50	5,15
7,75	3,80
8,00	2,64
8,50	3,18

Tabelle 17: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Naringenin als Substrat

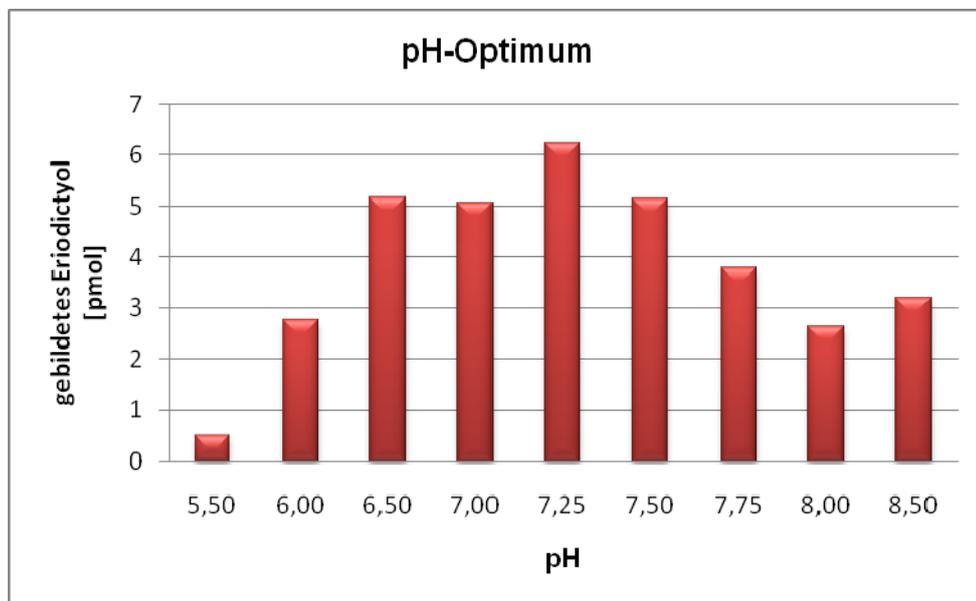


Abbildung 44: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Naringenin als Substrat

Bei Verwendung von Dihydrokämpferol als Substrat liegt das Umsatzmaximum der F3`H bei pH 7,5, generell sind im alkalischen Bereich höhere Umsätze messbar als im sauren Bereich (Tab. 18, Abb. 45).

pH	gebildetes Dihydroquercetin [pmol]
5,50	1,73
6,00	4,25
6,50	11,72
6,75	14,62
7,00	16,60
7,25	17,87
7,50	18,08
7,75	15,96
8,00	12,97
8,50	7,36

Tabelle 18: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Dihydrokämpferol als Substrat

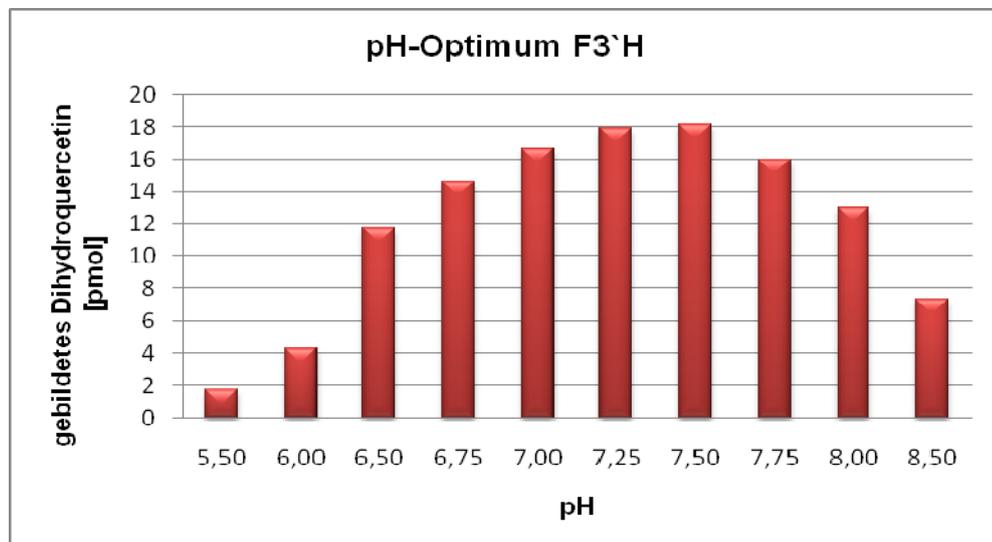


Abbildung 45: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Dihydrokämpferol als Substrat

Im pH-Bereich von pH 5,5-6,0 findet kein Umsatz von Apigenin durch die rekombinante F3'H statt. Das pH-Optimum liegt bei pH 7,75, wiederum sind etwas höhere Umsätze im alkalischen Bereich messbar (Tab. 19, Abb. 46).

pH	gebildetes Luteolin [pmol]
5,50	0
6,00	0
6,50	1,34
7,00	2,31
7,25	2,46
7,50	3,48
7,75	3,63
8,00	3,07
8,25	2,94
8,50	2,63

Tabelle 19: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Apigenin als Substrat

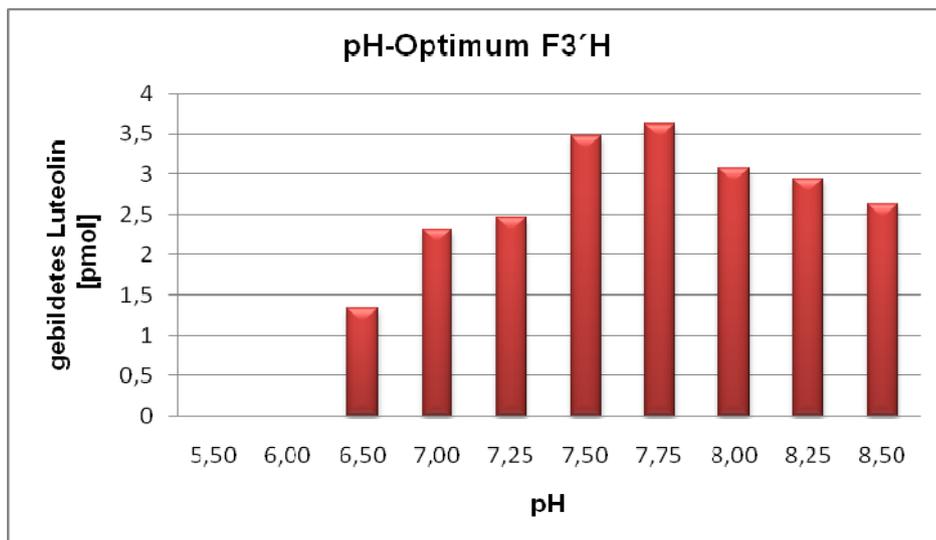


Abbildung 46: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Apigenin als Substrat

Mit Kämpferol als Substrat wird bei pH 8,0 der höchste Umsatz gemessen, wobei ein geringfügig niedrigerer Substratumsatz bei pH 7,75 zu beobachten ist. Deutlich ausgeprägt sind die generell höheren Umsätze des Enzyms im alkalischen Bereich (Tab. 20, Abb. 47).

pH	gebildetes Quercetin [pmol]
5,50	1,19
6,00	2,50
6,50	9,87
7,00	19,45
7,25	23,90
7,50	24,58
7,75	26,72
8,00	26,96
8,25	24,58
8,50	22,93

Tabelle 20: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Kämpferol als Substrat

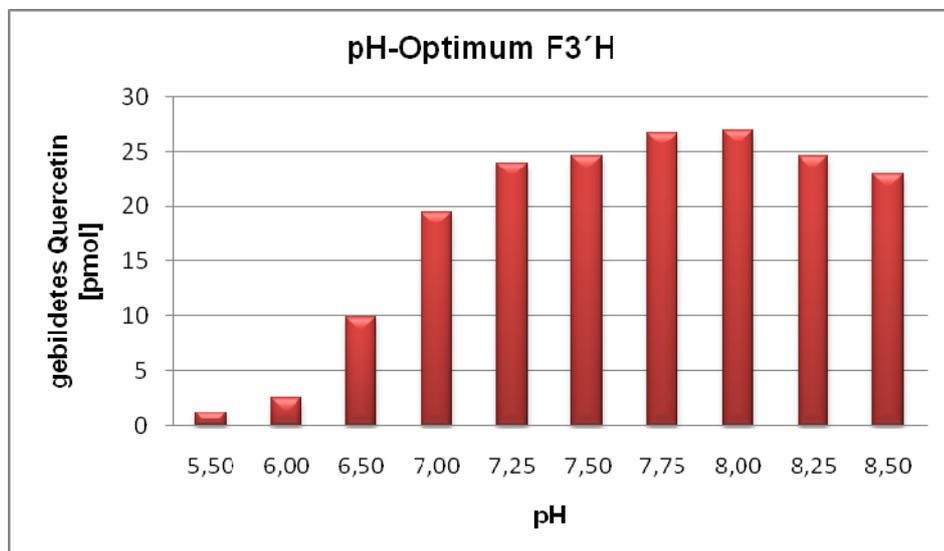


Abbildung 47: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Kämpferol als Substrat

Bei Verwendung von Isoliquiritigenin als Substrat kann bei pH 7,5 ein ausgeprägtes Umsatzmaximum beobachtet werden, wiederum werden wie bei den anderen Substraten im alkalischen Bereich höhere Aktivitäten gemessen (Tab. 21, Abb. 48).

pH	gebildetes Butein [pmol]
5,50	2,45
6,00	12,00
6,50	29,45
7,00	37,90
7,25	42,20
7,50	47,90
7,75	41,15
8,00	34,60
8,50	20,70

Tabelle 21: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Isoliquiritigenin als Substrat

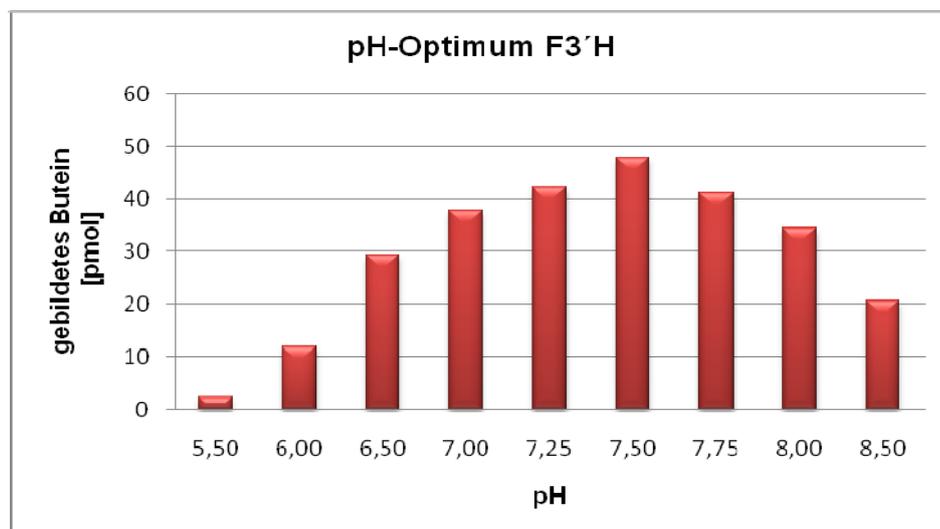


Abbildung 48: Abhängigkeit der Aktivität vom pH-Wert mit Isoliquiritigenin als Substrat

5 Diskussion

Chalcone und Aurone unterscheiden sich von anderen Farbstoffen durch ihren Farbwechsel von Gelb zu Rot bei Bedampfung mit Ammoniak oder mit anderen alkalischen Dämpfen. Während es sich bei den Carotinoiden um die wichtigsten und am weitesten verbreiteten gelben Blütenpigmente handelt, sind in einigen Pflanzen die anthochloren Pigmente für die Ausprägung der gelben Blütenfarbe von entscheidender Bedeutung. Im Gegensatz zu anderen Korbblütlern akkumuliert die Dahlie keine Carotinoide. Ihre Gelbfärbung beruht ausschließlich auf dem Vorhandensein von 6'-Deoxychalconen. In vielen anderen Korbblütlern findet man jedoch sowohl Carotinoide als auch 6'-Deoxychalcone. Bei Nelken beruht die gelbe Blütenfarbe hingegen ausschließlich auf Akkumulation von Chalconen in den Blüten, im Gegensatz zur Dahlie handelt es sich dabei um 6'-Hydroxychalcone [Yoshida *et al.*, 2004]. Diese dienen auch *Antirrhinum majus* als gelbe Blütenpigmente.

Chalcone sind die ersten C₁₅-Körper, die im Flavonoidbiosyntheseweg entstehen. Sie sind Intermediate für die weitere Auron- und Flavonoidbiosynthese. Das Hydroxylierungsmuster von Chalconen bzw. Flavonoiden wird teilweise durch die Bildung des Grundkörpers aus einem Hydroxyzimtsäureester und 3 Molekülen Malonyl-CoA determiniert (Positionen 5, 7 und 4'), während weitere Hydroxylgruppen später im Verlauf der Flavonoidbiosynthese eingeführt werden können, wodurch auch die große Vielzahl der unterschiedlichen Flavonoidverbindungen in der Natur entsteht. Im Flavonoidbiosyntheseweg werden Hydroxylierungsreaktionen häufig durch im Cytosol lokalisierte 2-Oxoglutarat-, Fe²⁺-abhängige Dioxygenasen oder durch Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen (mikrosomal gebundene Oxidoreduktasen) durchgeführt. Im C-Ring wird die Einführung einer Hydroxylgruppe an der Position 3 durch die 2-Oxoglutarat-, Fe²⁺-abhängige Dioxygenase FHT katalysiert, die für die Umwandlung der Flavanone zu den entsprechenden Dihydroflavonolen verantwortlich ist. Im B-Ring werden zusätzliche Hydroxylgruppen durch Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen wie beispielsweise die F3'H und die F3',5'H eingeführt. Sie hydroxylieren an den Positionen 3' bzw. 5' in einer Reihe von Flavonoidklassen wie Flavanone, Dihydroflavonole, Flavonole und Flavone. In den späten Stadien der Flavonoidbiosynthese auf der Ebene der Leucoanthocyanidine und Anthocyanidine kann die Hydroxylgruppe jedoch nicht mehr eingeführt werden. Chalcone können ebenfalls zusätzliche Hydroxylgruppen im B-Ring aufweisen. Aufgrund der unterschiedlichen Nomenklatur von Chalconen und Flavonoiden entsprechen die Positionen 3' und 4' der Flavonoide den Positionen 3 und 4 bei den Chalconen.

Die Einführung einer Hydroxylgruppe im B-Ring der 6'-Deoxychalcone an der Position 3 (entspricht der Position 3' bei Flavonoiden) wurde erstmals während der Charakterisierung der Glykosyltransferase in *Coreopsis grandiflora* nachgewiesen [Halbwirth *et al.*, 1997]. Das entsprechende Enzym wurde in *Dahlia variabilis* im Detail studiert [Wimmer *et al.*, 1998], es wurde in der mikrosomalen Fraktion lokalisiert und benötigt molekularen Sauerstoff und NADPH als Cofaktor und wurde somit als Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase identifiziert. Diese ist in der Lage, Isoliquiritigenin sehr effizient in Butein umzusetzen und wurde vorerst als Chalcon 3-Hydroxylase (CH3H) benannt. Es stellt sich die Frage, ob es sich bei diesem Enzym um eine spezifische CH3H oder um die bereits bekannte F3'H handelt, welche ebenfalls im Rohextrakt von *Dahlia variabilis* vorhanden ist [Stich *et al.*, 1988]. Da von der Dahlie bislang keine F3'H-Mutante entdeckt wurde, konnte die Bestimmung der Substratspezifität der CH3H nicht in einer Dahlie, welche keine F3'H-Aktivität aufweist, erfolgen.

Mithilfe dieser Arbeit soll geklärt werden, ob die Einführung einer Hydroxylgruppe an der Position 3 bei Chalconen durch die bereits bekannte F3'H durchgeführt wird oder ob eine spezifische Hydroxylase dafür verantwortlich ist. Für die Untersuchungen wurden 3 Pflanzen ausgewählt, die in ihren Petalen Chalcone, die im B-Ring ein 3,4-Hydroxylierungsmuster aufweisen, als gelbe Pigmente akkumulieren und somit CH3H-Aktivität besitzen müssen. Das Löwenmäulchen, *Antirrhinum majus*, akkumuliert 6'-Hydroxychalcone und davon abgeleitete 4-Hydroxyaurone, während in *Cosmos sulphureus* und *Coreopsis grandiflora* die selteneren 6'-Deoxychalcone gebildet werden. In der NCBI-Datenbank waren lediglich Sequenzinformationen für die F3'H aus *Antirrhinum majus* verfügbar, für die anderen beiden Pflanzen lagen keine Informationen vor.

Aus der in der Datenbank vorhandenen Sequenz wurden entsprechende Primer abgeleitet, die codierende Sequenz anschließend mittels Proofreading-PCR aus *Antirrhinum majus* Petalen amplifiziert und das Gen in Hefe funktionell exprimiert. Die Verifizierung der Enzymaktivität erfolgte mit einer Reihe von Substraten entsprechend verschiedener Flavonoidklassen im Flavonoidbiosyntheseweg. Das rekombinante Enzym wies eine hohe Aktivität auf und setzte Naringenin, DHK und Kämpferol zu einem hohen Prozentsatz in die entsprechenden 3',4'-hydroxylierten Produkte um. Das Flavon Apigenin hingegen stellte ein wesentlich schlechteres Substrat dar. Das 6'-Deoxychalcon Isoliquiritigenin wurde nur in geringem Maße zu Butein umgesetzt. Man kann davon ausgehen, dass die Hydroxylierung von Apigenin und Isoliquiritigenin lediglich unter den gewählten Testbedingungen, d.h. in *in vitro*-Ansätzen in Anwesenheit von sehr großen Mengen des entsprechenden Proteins stattfindet, jedoch in der Pflanze keine Rolle spielt. Aufgrund des

geringen Umsatzes von Isoliquiritigenin zu Butein durch die F3'H dürfte daher dieses Enzym *in vivo* nicht für die entsprechende Hydroxylierung an der Position 3 der entsprechenden Chalcone verantwortlich sein. Daher muß in dieser Pflanze ein weiteres Enzym vorhanden sein, welches die Hydroxylierung an der entsprechenden Stelle im B-Ring von 6'-Deoxychalconen durchführt.

Bei der Charakterisierung der rekombinanten F3'H konnten die höchsten Aktivitäten generell im alkalischen Bereich gemessen werden. Die pH-Optima für die verschiedenen Substrate lagen zwischen pH 7,25 und pH 7,75 und befinden sich damit durchaus im physiologisch relevanten Bereich.

Für die Klonierung des entsprechenden F3'H-Gens aus *Cosmos sulphureus* wurden verschiedene Sequenzen aus der Familie der Asteraceae aus der NCBI-Datenbank auf konservierte Regionen miteinander verglichen, anschließend wurden daraus degenerierte Primer abgeleitet, wobei zunächst ein Teilstück der F3'H mithilfe der PCR aus *Cosmos sulphureus* isoliert werden konnte. Durch den Einsatz von 5'- und 3'-RACE konnte in der Folge die cDNA dieses Gens in voller Länge isoliert und anschließend in Hefe funktionell exprimiert werden. Die Verifizierung der katalytischen Funktion des rekombinanten Proteins zeigte eine Umsetzung der Substrate Naringenin, DHK und Kämpferol, wobei die F3'H aber nicht in der Lage war, das Flavon Apigenin zu hydroxylieren. Das Chalcon Isoliquiritigenin wurde ebenfalls nicht als Substrat akzeptiert. Damit besitzt der aus *Cosmos sulphureus* isolierte cDNA Klon keine CH3H-Aktivität.

Im Gegensatz zu dem Enzym aus *Antirrhinum majus* wies die F3'H aus *Cosmos sulphureus* höhere pH-Optima auf. Sie lagen zwischen pH 7,25 und pH 8,5.

Bei der Isolierung eines F3'H-cDNA Klons aus *Coreopsis grandiflora* wurde nach der gleichen Methode wie bei *Cosmos sulphureus* vorgegangen. Es konnte ein Full Size Klon isoliert und anschließend in Hefe exprimiert werden. Zur Verifizierung der Enzymaktivität wurden wieder Naringenin, DHK, Kämpferol und Apigenin als Substrate eingesetzt. Die rekombinante F3'H aus *Coreopsis grandiflora* setzte Naringenin, DHK und Kämpferol zu einem großen Prozentsatz um, zeigte aber nur geringe Umsatzraten mit Apigenin. Isoliquiritigenin wurde ebenfalls zu einem hohen Prozentsatz umgesetzt. Damit ist das in dieser Arbeit isolierte Enzym aus *Coreopsis grandiflora* die erste F3'H, die eine hohe CH3H-Aktivität aufweist. Aufgrund der starken *in vitro* beobachteten Umsatzraten mit Isoliquiritigenin kann davon ausgegangen werden, dass die Reaktion auch *in vivo* erfolgt und daher von physiologischer Relevanz ist.

Für die verschiedenen Substrate wurden die pH-Werte bestimmt. Sie lagen im Bereich zwischen pH 7,25 und pH 8,0. Für Isoliquiritigenin wurde ein pH-Optimum von pH 7,5 ermittelt. Dies stimmt mit dem von Wimmer *et al.* beschriebenen Wert überein [1998].

Mithilfe des aus *Coreopsis grandiflora* isolierten F3'H-cDNA Klons konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass es F3'HS gibt, die Isoliquiritigenin in so hohem Ausmaß umsetzen können, dass es wahrscheinlich ist, dass sie auch *in vivo* für die Hydroxylierung von Chalconen verantwortlich sind. Damit unterscheidet sich die Substratspezifität dieser F3'H deutlich von den bislang bekannten Enzymen. Da diese fast ausschließlich aus Pflanzen isoliert wurden, die Chalcone nicht als gelbe Pigmente akkumulieren, bestand die Möglichkeit, dass sich CH3H-Aktivität bei F3'HS als Spezialisierung in solchen Pflanzen entwickelt hat, bei denen dies von physiologischer Relevanz ist, weil 3,4-hydroxylierte Chalcone als gelbe Blütenpigmente genutzt werden. Daher wurden in diesen Untersuchungen nur Pflanzen ausgewählt, die Chalcone akkumulieren. Die Tatsache, dass die aus *Antirrhinum majus* und *Cosmos sulphureus* isolierten F3'H-cDNA Klone wenig bzw. gar keine CH3H-Aktivität aufweisen, zeigt jedoch eindeutig, dass dies keine generelle Eigenschaft von Chalcon-akkumulierenden Pflanzen ist. Die Hydroxylierung von Chalconen in diesen Pflanzen muß daher durch ein anderes Enzym erfolgen. Dabei könnte es sich entweder um ein spezifisches Chalcon-hydroxylierendes Enzym handeln oder aber um eine weitere F3'H, die sich in ihrer Substratspezifität von der in dieser Arbeit isolierten unterscheidet. Da die Gene des Flavonoidstoffwechsels häufig in Multigenfamilien vorliegen [Fischer *et al.*, 2006] und sich verschiedene Substratspezifitäten oder Enzymfunktionen im Lauf der Evolution häufig aus unterschiedlichen Genkopien entwickelt haben [Des Marais und Rausher, 2008], ist zu erwarten, dass es sich eher um eine F3'H handelt, die eine erweiterte Substratspezifität aufweist. Auch die F3',5'H hat sich im Lauf der Evolution aus der F3'H entwickelt und damit die Bildung von blauen Blütenfarbstoffen ermöglicht [Seitz *et al.*, 2006; 2007]. Zur Isolierung weiterer F3'HS aus *Antirrhinum majus* und *Cosmos sulphureus* müssen weitere Techniken angewendet werden, wie z.B. das Screening einer entsprechenden cDNA-Bibliothek oder der Vergleich entsprechender konservierter Cytochrom P450-Regionen aus der NCBI-Datenbank zur Ableitung degenerierter Primer, um mittels PCR-Techniken entsprechende Teilstücke weiterer Hydroxylasen zu amplifizieren.

Zur Identifizierung der für die Fähigkeit, Chalcone zu hydroxylieren, relevanten Sequenzbereiche wurden Sequenzvergleiche durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass besonders die beiden Enzyme aus *Cosmos sulphureus* und *Coreopsis grandiflora* eine hohe Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz aufweisen. Es konnten 3 unterschiedliche Bereiche identifiziert werden, die für die

unterschiedliche Substratazeptanz verantwortlich sein könnten. Ihr tatsächlicher Einfluß auf die Substratspezifität der F3'Hs muß in weiteren Studien untersucht werden, dies könnte beispielsweise durch gezielte Mutationen in den fraglichen Bereichen oder durch die Konstruktion von chimären Genen erfolgen.

6 Literaturverzeichnis

Anzellotti D., Ibrahim R. K.

Novel flavonol 2-oxoglutarate dependent dioxygenase: affinity purification, characterization, and kinetic properties

Archives of Biochemistry and Biophysics, 382(2), 161-172 (2000)

Ayabe S. I., Udagawa A., Furuya T.

NAD(P)H-dependent 6'-deoxychalcone synthase activity in *Glycyrrhiza echinata* cells induced by yeast extract

Arch. Biochem. Biophys. 261: 458-462 (1988)

Bohm B., Stuessy T.

Flavonoids of the sunflower family (Asteraceae)

Springer Verlag, Wien (2001)

Britsch L., Heller W., Grisebach H.

Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley

Zeitschrift für Naturforschung 36c, 742-750 (1981)

Brödenfeldt R., Mohr H.

Time courses for phytochrome-induced enzyme levels in phenylpropanoid metabolism (phenylalanine ammonia-lyase, naringenin-chalcone synthase) compared with time courses for phytochrome-mediated end-product accumulation (anthocyanin, quercetin)

Planta 176(3): 383-390 (1988)

Chapple C.

Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent mono-oxygenases

Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 311-343 (1998)

Daumer K.

Blumenfarben, wie sie die Bienen sehen

Z. Vergl. Physiol. 38, 413-478 (1958)

Des Marais D. L., Rausher M. D.

Escape from adaptive conflict after duplication in an anthocyanin pathway gene

Nature 454, 762-765 (2008)

Ebel J., Hahlbrock K.

Biosynthesis of flavonoids

In: Harborne J. B. and Mabry T. J. (Eds.): The Flavonoids: Advances in Research

Chapman and Hall, London, 641-679 (1982)

Fischer T. C., Halbwirth H., Römmelt S., Sabatini E., Schlangen K., Andreotti C., Spinelli F., Costa G., Forkmann G., Treutter D., Stich K.

Induction of flavonoid gene expression in apple (*Malus x domestica*) after the application of a dioxygenase enzyme inhibitor

Physiologia Plantarum 128, 604-617 (2006)

Forkmann G.

Genetics of flavonoids

In: HARBORNE J. B. (Hrsg): The flavonoids: advances in research since 1986.

Chapmann and Hall, London, 537-564 (1994)

Forkmann G., Heller W.

Biosynthesis of flavonoids

In: SANKAWA U. (Hrsg): Comprehensive Natural Products Chemistry. Elsevier Science Ltd., Oxford, 713-748 (1999)

Halbwirth H., Wimmer G., Wurst F., Forkmann G., Stich K.

Enzymatic glucosylation of 4-deoxyaurones and 6'-deoxychalcones with enzyme extracts of *Coreopsis grandiflora*, Nutt. I.

Plant Science 122: 125-131 (1997)

Halbwirth H., Forkmann G., Stich K.

The A-ring specific hydroxylation of flavonols in position 6 in *Tagetes sp.* is catalyzed by a cytochrome P450 dependent monooxygenase

Plant Science 167(1): 129-135 (2004)

Halbwirth H., Stich K.

An NADPH and FAD dependent enzyme catalyzes hydroxylation of flavonoids in position 8

Phytochemistry, Elsevier, Amsterdam, 67(11): 1080-1087 (2006)

Harborne J. B.
Comparative Biochemistry of the Flavonoids
Academic Press, London (1967)

Harborne J. B., Smith D. M.
Anthochlors and other flavonoids as honey guides in the Compositae
Biochemical Systematics and Ecology 6: 287-291 (1978)

Harborne J. B., Greenham J., Eagles J.
Malonylated chalcone glycosides in *Dahlia*
Phytochemistry 29(9), 2899-2900 (1990)

Harborne J. B.
Ökologische Biochemie
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1995)

Harborne J. B., Baxter H.
The handbook of natural flavonoids
Wiley, Chichester (1999)

Heller W., Forkmann G.
Biosynthesis of flavonoids
In: Harborne J. B. (Ed.), The Flavonoids: Advances in Research since 1980
Chapman & Hall, London, 399-425 (1988)

Heller W., Forkmann G.
Biosynthesis of flavonoids
In: Harborne J. B. (Ed.), The Flavonoids: Advances in Research since 1986.
Chapman & Hall, London, 499-535 (1993)

Heller W., Forkmann G.
Biosynthesis of flavonoids
In: Harborne J. B. (Ed.), The Flavonoids: Advances in Research since 1986
Chapman & Hall, London, 499-535 (1994)

Holton T. A., Brugliera F., Lester D. R., Tanaka Y., Hyland C. D., Menting J. G.,
Lu C. Y., Farcy E., Stevenson T. W., Cornish E. C.
**Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower
colour**
Nature 366, 276-279 (1993)

Holton T. A., Cornish E. C.
Genetics and biochemistry of anthocyan biosynthesis
Plant Cell, 7(7), 1071-1083 (1995)

Hopp W., Seitz H. U.
The uptake of acylated anthocyanin into isolated vacuoles from a cell suspension culture of *Daucus carota*
Planta 170(1), 74-85 (1987)

Kaltenbach M., Schröder G., Schmelzer E., Lutz V., Schröder J.,
Flavonoid hydroxylase from *Catharanthus roseus*: cDNA, heterologous expression, enzyme properties and cell-type specific expression in plants
The Plant Journal 19(2), 183-193 (1999)

Latunde-Dada A. O., Cabello-Hurtado F., Czittrich N., Didierjean L., Schopfer C., Hertkorn N., Werck-Reichhart D., Ebel J.
Flavonoid 6-hydroxylase from soybean (*Glycine max L.*), a novel plant P-450 monooxygenase
Journal of Biological Chemistry, 276(3), 1688-1695 (2001)

Lois R.
Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana L.*
Planta 194(4): 498-503 (1994)

McCrea K. D., Levy M.
Photographic visualization of floral colors as perceived by honeybee pollinators
Amer. J. Bot. 70(3): 369-375 (1983)

Menting J., Scopes R., Stevenson T.
Characterization of Flavonoid 3',5'-Hydroxylase in Microsomal Membrane Fraction of *Petunia hybrida* Flowers
Plant Physiol. 106: 633-642 (1994)

Nabaei-Bidhendi G., Bannerjee N. R.
Convenient synthesis of polyhydroxy flavonoids
Journal of the Indian Chemical Society 67(1), 43-45

Richter G.

Stoffwechselphysiologie der Pflanzen

5. überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1988)

Rieseberg L. H., Schilling E. E.

Floral flavonoids and ultraviolet patterns in *Viguiera* (Compositae)

American Journal of Botany 72(7), 999-1004 (1985)

Schlangen K.

Biochemische Untersuchungen zur induzierten Resistenz gegenüber dem Erreger des Feuerbrandes bei Apfel und Birne durch Prohexadion-Calcium Behandlung

Dissertation

Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften TU Wien (2003)

Schmidt W.

Die Biophysik des Farbensehens

Edition 5, Farbe, Color, Couleur, Regenbogenverlag Klaus Stromeer (1999)

Schröder J.

The chalcone/stilbene synthase family of condensing enzymes

In: SANKAWA U. (Hrsg): Polyketids and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives. Elsevier, Amsterdam, 749-771 (1999)

Sharma S. B., Dixon R. A.

Metabolic engineering of proanthocyanidins by ectopic expression of transcription factors in *Arabidopsis thaliana*

Plant Journal 44(1), 62-75 (2005)

Shimada Y., Nakano-Shimada R., Ohbayashi M., Okinaka Y., Kiyokawa S., Kikuchi Y.

Expression of chimeric P450 genes encoding flavonoid-3',5'-hydroxylase in transgenic tobacco and petunia plants

FEBS Letters, 461(3), 241-245 (1999)

Seitz C., Eder C., Deiml B., Kellner S., Martens S., Forkmann G.

Cloning, functional identification and sequence analysis of flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase cDNAs reveals independent evolution of flavonoid 3',5'-hydroxylase in the Asteraceae family

Plant Mol Biol., 61(3), 365-381 (2006)

Seitz C., Ameres S., Forkmann G.

Identification of the molecular basis for the functional difference between flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase

FEBS Lett., 581(18), 3429-3434 (2007)

Stich K., Ebermann R., Forkmann G.

Einfluß Cytochrom P-450 - spezifischer Inhibitoren auf die Aktivität von Flavonoid -3'-hydroxylase and Flavonsynthase II bei verschiedenen Pflanzen

Python 28, 237-247 (1988)

Stryer L.

Biochemie

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1994)

Sutter A., Grisebach H.

Free reversibility of the UDP-glucose:flavonol 3-O-glucosyltransferase reaction

Archives of Biochemistry and Biophysics, 167(2), 444-447 (1975)

Sutter A., Poulton J., Grisebach H.,

Oxidation of flavanone to flavone with cell-free extracts from young parsley leaves

Archives of Biochemistry and Biophysics 170, 547-556 (1975)

Thompson W. R., Meinwald J., Aneshansley D., Eisner T.

Flavonols: pigments responsible for ultraviolet absorption in nectar guide of flower

Science 177(48), 528-530 (1972)

Varin L., Barron D., Ibrahim R. K.

Enzymatic Synthesis of Sulphated Flavonols in *Flaveria*

Phytochemistry 26, 135-138 (1987)

Varin L., Ibrahim R. K.

Partial purification and characterization of three flavonol-specific sulfotransferases from *Flaveria chloreaefolia*

Plant Physiol. 90, 977-981 (1989)

Welle R., Grisebach H.

Isolation of a novel NADPH-dependent reductase which coacts with chalcon synthase in the biosynthesis of 6'-deoxychalcone

FEBS Letters 236(1), 221-225 (1988)

Wimmer G., Halbwirth H., Wurst F., Forkmann G., Stich K.

Enzymatic hydroxylation of 6'-deoxychalcones with protein preparations from petals of *Dahlia variabilis*

Phytochemistry 47(6), 1013-1016 (1998)

Winkel-Shirley B.

Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology

Plant physiology 126: 485-493 (2001)

Yoshida H., Itoh Y., Ozeki Y., Iwashina T., Yamaguchi M.

Variation in chalcononaringenin 2'-O-glucoside content in the petals of carnations (*Dianthus caryophyllus*) bearing yellow flowers

Scientia Horticulturae (Amsterdam, Netherlands) 99(2), 175-186 (2004)