

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fachgebiet Biotechnologie der Naturstoffe

# Charakterisierung von Enon-Oxidoreduktasen und 3-Dehydroquinat-Synthasen

Beate D. Arold

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Treutter

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Schwab

2. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Engel

Die Dissertation wurde am 13.07.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 03.12.2010 angenommen.



*Inmitten der Schwierigkeiten liegt die Möglichkeit.*

**Albert Einstein 1879-1955**



## **DANKSAGUNG**

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden vom 1. Februar 2006 bis zum 31. Dezember 2008 am Fachgebiet Biomolekulare Lebensmitteltechnologie (heute Fachgebiet Biotechnologie der Naturstoffe) durchgeführt.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wilfried Schwab danke ich für die Überlassung des Themas, seine wissenschaftliche Unterstützung, das entgegengebrachte Vertrauen und besonders für seinen immerwährenden Optimismus.

Bei den ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Fachgebiets Biomolekulare Lebensmitteltechnologie bedanke ich mich für die Unterstützung und das gute Arbeitsklima. Hierzu hat ganz besonders meine Kollegin und Freundin Christiane Augustin beigetragen, ihr danke ich für die fachliche Hilfe in allen Bereichen der Molekularbiologie und die tolle Atmosphäre in unserem gemeinsamen Büro.

Für die engagierte Mitarbeit im Rahmen von Praktikum, Diplomarbeit und Bachelorarbeit bedanke ich mich ganz herzlich bei Regina Dick, Constanze Raasch und Erika Lackermeier.

Prof. Juan Munoz-Blanco von der Universidad de Córdoba danke ich für die Bereitstellung der transgenen Erdbeerfrüchte.

Prof. Dr. Victoriano Valpuesta danke ich für die Möglichkeit in seinem Arbeitskreis an der Universidad de Málaga zu arbeiten und für seine Unterstützung.

Den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biofunktionalität der Lebensmittel, insbesondere Dr. Anja Osterhues, danke ich für die Hilfe bei der 2-D-Gelelektrophorese.

Für die massenspektrometrischen Arbeiten zur Proteinidentifizierung danke ich Herrn Walter Stelzer vom Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere.

Der Firma Degussa danke ich für die Bereitstellung finanzieller Mittel und die Möglichkeit zur Mitnutzung der Räumlichkeiten und Geräte.

Bei meiner Kollegin und lieben Freundin Dr. Hedwig Strohalp bedanke ich mich für den regen Gedankenaustausch sowohl fachlicher als auch jeglicher anderen Art.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die immer für mich da ist, und Peter, der mir so viel Geduld während des Schreibens entgegengebracht hat und auf dessen Unterstützung ich mich immer verlassen kann.



**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>X</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die Erdbeere .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Botanische Einordnung .....	1
1.1.1.1 Arten und Sorten .....	1
1.1.1.2 Morphologie.....	1
1.1.1.3 Fruchtwachstum und Fruchtreifung.....	2
1.1.2 Aromastoffe.....	3
<b>1.2 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon .....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Vorkommen und Bedeutung von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon.....	5
1.2.2 Eigenschaften .....	7
1.2.3 Biosynthese von HDMF und seinen Derivaten in der Erdbeerfrucht .....	8
<b>1.3 NAD(P)H-abhängige Chinon-Oxidoreduktasen .....</b>	<b>10</b>
1.3.1 Reaktionsmechanismus und Substrate .....	10
1.3.2 Enon-Oxidoreduktasen der Erdbeere und Tomate .....	11
<b>1.4 3-Dehydroquinat-Synthase .....</b>	<b>13</b>
1.4.1 Der Shikimat-Stoffwechsel .....	13
1.4.1.1 Allgemeine Bedeutung des Shikimat-Stoffwechsels .....	13
1.4.1.2 Beschreibung des Shikimatweges .....	15
1.4.2 Reaktionsmechanismus der 3-Dehydroquinat-Synthase .....	16
1.4.3 Mögliche Beteiligung der 3-Dehydroquinat-Synthase an der HDMF-Biosynthese.....	18
<b>1.5 Aufgabenstellung .....</b>	<b>19</b>
<b>2 ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Charakterisierung der <i>Solanum lycopersicum</i> Enon-Oxidoreduktase .....</b>	<b>21</b>
2.1.1 Expression und Aufreinigung von SIEO.....	21
2.1.2 Synthese von ungesättigten 4-Hydroxy-3(2H)-furanonen als Substraten.....	22
2.1.2.1 Synthesebedingungen .....	22
2.1.2.2 Aufreinigung der Syntheseprodukte.....	23
2.1.3 Bestimmung der kinetischen Daten von SIEO .....	25
2.1.4 Diskussion.....	27
<b>2.2 Enon-Oxidoreduktase-herabregulierte Erdbeerfrüchte.....</b>	<b>32</b>
2.2.1 Metabolit-Untersuchung der FaEOi-Früchte .....	32

2.2.2	Effekte der Herabregulation des FaEO-Gens auf das Proteom der Erdbeerfrüchte .....	35
2.2.2.1	Durchführung der Proteomanalyse .....	35
2.2.2.2	Proteomanalyse mittels 2D-PAGE .....	36
2.2.3	Diskussion.....	40
2.2.3.1	Auswahl der transgenen Erdbeerlinien zur weiteren Verwendung .....	40
2.2.3.2	Proteinextraktion und Durchführung der Proteomanalyse .....	40
2.2.3.3	Regulierte Proteine der transgenen Erdbeerlinien .....	42
<b>2.3</b>	<b>Charakterisierung von 3-Dehydroquinat-Synthasen.....</b>	<b>46</b>
2.3.1	Vorversuche mit Proteinrohextrakten aus Erdbeerfrüchten.....	46
2.3.2	3-Dehydroquinat-Synthase-Gensequenzen.....	50
2.3.3	Genexpressionsanalyse der <i>Fragaria x ananassa</i> DHQS-Fragmente .....	50
2.3.4	Klonierung von Vollängensequenzen .....	52
2.3.4.1	Klonierung der <i>Fragaria x ananassa</i> 3-Dehydroquinat-Synthase .....	52
2.3.4.2	Klonierung der <i>Vitis vinifera</i> 3-Dehydroquinat-Synthase .....	54
2.3.5	Heterologe Expression .....	55
2.3.6	Biochemische Charakterisierung .....	57
<b>2.4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>58</b>
2.4.1	Genexpressionsprofile.....	58
2.4.2	Heterologe Expression .....	59
2.4.3	Biochemische Charakterisierung .....	59
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>61</b>
<b>3.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>61</b>
3.1.1	Chemikalien .....	61
3.1.2	Pflanzenmaterial .....	61
3.1.3	Bakterien- und Hefestämme.....	61
3.1.4	Vektoren.....	61
3.1.5	Enzyme .....	62
3.1.6	Primer .....	62
3.1.7	Kommerziell erhältliche Kits für molekularbiologische Arbeiten .....	63
3.1.8	Sonstiges Material.....	63
3.1.9	Medien, Puffer und sonstige Lösungen .....	63
<b>3.2</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>69</b>
3.2.1	Flüssigkeitschromatographie-Elektrospray-Massenspektrometrie .....	69
3.2.2	Präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie .....	69
3.2.3	Massenspektrometer zur Analyse der Peptid-Extrakte .....	70
3.2.4	Geräte zur 2-D-Gelelektrophorese .....	70
3.2.5	Sonstige Geräte .....	71

---

3.2.6	Software und Internetressourcen.....	72
<b>3.3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>72</b>
3.3.1	Allgemeine molekularbiologische Techniken .....	72
3.3.1.1	Isolierung von RNA.....	72
3.3.1.2	Polymerase-Kettenreaktion .....	73
3.3.1.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	74
3.3.1.4	Subklonierung .....	74
3.3.1.5	Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligation klebriger Enden ...	74
3.3.1.6	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen.....	75
3.3.1.7	Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	75
3.3.1.8	Überprüfung der Kolonien nach der Transformation .....	76
3.3.1.9	Isolierung von Plasmid-DNA.....	76
3.3.1.10	Sequenzierung von DNA .....	76
3.3.2	Klonierung von 3-Dehydroquinat-Synthasen .....	76
3.3.2.1	Klonierung der <i>Fragaria x ananassa</i> 3-Dehydroquinat-Synthase .....	76
3.3.2.2	Klonierung der <i>Vitis vinifera</i> 3-Dehydroquinat-Synthase .....	77
3.3.3	Allgemeine biochemische Methoden .....	77
3.3.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	77
3.3.3.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	78
3.3.3.3	Heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i> .....	78
3.3.3.4	Zellaufschluss mittels Ultraschall .....	78
3.3.3.5	His-Tag-Affinitätschromatographie.....	78
3.3.3.6	Aufreinigung mittels Ultrafiltration .....	79
3.3.3.7	S-Tag-Affinitätschromatographie .....	79
3.3.3.8	Heterologe Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	79
3.3.3.9	Zellaufschluss mit gewaschenen Glasperlen .....	80
3.3.4	Enzymassay zur biochemischen Charakterisierung von FaDHQS.....	80
3.3.5	Genexpressionsanalyse .....	80
3.3.5.1	Pflanzenmaterial.....	80
3.3.5.2	DNase-Behandlung und reverse Transkription .....	80
3.3.5.3	Quantitative PCR.....	81
3.3.5.4	Datenauswertung .....	82
3.3.6	Herstellung von Ethylacetat-Extrakten aus Erdbeerfrüchten.....	82
3.3.7	Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	82
3.3.7.1	Protein-Isolierung .....	83
3.3.7.2	Erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung) .....	83
3.3.7.3	Herstellung von SDS-Gelen für die zweite Dimension .....	84
3.3.7.4	Zweite Dimension .....	84

---

3.3.7.5	Kolloidale Coomassie-Färbung .....	84
3.3.7.6	Softwaregestützte Auswertung der Gele.....	85
3.3.8	Protein-Identifizierung .....	85
3.3.8.1	Enzymatischer Verdau der Proteine .....	85
3.3.8.2	Analyse der Peptid-Fragmente mittels Massenspektrometrie .....	86
3.3.9	Bestimmung der enzymkinetischen Daten der SIEO .....	86
3.3.9.1	Synthese und Reinigung von HMMF-Derivaten .....	86
3.3.9.2	Michaelis-Menten-Kinetik.....	86
3.3.10	Vorversuche mit Proteinrohextrakten aus Erdbeerfrüchten.....	87
3.3.10.1	Gewinnung eines Proteinextrakts aus Erdbeerfrüchten .....	87
3.3.10.2	Enzymassay zur Ermittlung der Enzymaktivität.....	88
<b>4</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>89</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

A	Adenylat
A <sub>595/260/280</sub>	Absorption bei 595 nm, 260 nm oder 280 nm
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BDHMF	2-Butyliden-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon
BHMF	2-Butyl-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon
BisAA	Bisacrylamid
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar(e)
C	Cytidylat
CBB	Coomassie Brilliant Blau
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CIP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
C <sub>t</sub>	<i>Threshold cycle</i>
DAHP	3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHQS	3-Dehydroquinat-Synthase
DMMF	2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)furanon
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E4P	Erythrose-4-phosphat
EDHMF	2-Ethyliden-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHMF	2-Ethyl-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon
EIC	<i>Extracted ion chromatogram</i>
EPSP	5-Enolpyruvyl-3-shikimatphosphat
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FaDHQS	<i>Fragaria x ananassa</i> 3-Dehydroquinat-Synthase
FaEO	<i>Fragaria x ananassa</i> Enon-Oxidoreduktase
FaQR	<i>Fragaria x ananassa</i> Chinon-Oxidoreduktase

---

FD	<i>Flavour Dilution</i>
G	Guanylat
HDMF	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i> )-furanon
HMF	4-Hydroxy-5-methyl-3(2 <i>H</i> )-furanon
HMMF	4-Hydroxy-5-methyl-2-methylen-3(2 <i>H</i> )-furanon
HMPDF	4-Hydroxy-5-methyl-2-propyliden-3(2 <i>H</i> )-furanon
HMPF	4-Hydroxy-5-methyl-2-propyl-3(2 <i>H</i> )-furanon
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigchromatographie)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
IR	Infrarot
IS	Interner Standard
$k_{\text{kat}}$	Wechselzahl, molare Aktivität
$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LMW HSP	<i>low-molecular-weight heat shock protein</i> (kleines Hitzeschockprotein)
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
M	Molarität, mol/l
mM	millimolar
MBS	3-Mercaptobenzoessäure
MOPS	3-Morpholinpropansulfonsäure
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
NADH	Nicotinamidadenin-dinucleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenin-dinucleotid-phosphat (reduzierte Form)
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
pI	Isoelektrischer Punkt
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription

s	Sekunde
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIEO	<i>Solanum lycopersicum</i> Enon-Oxidoreduktase
T	Thymidylat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
$v_{\max}$	Maximale Umsatzgeschwindigkeit
VvDHQS	<i>Vitis vinifera</i> 3-Dehydroquinat-Synthase
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>

Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren:

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## ZUSAMMENFASSUNG

Viele Verbindungen tragen zum Aroma der Erdbeere *Fragaria x ananassa* bei. Der wichtigste Aromastoff ist jedoch 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (HDMF). Die Biosynthese dieser Verbindung verläuft ausgehend von D-Fructose-1,6-diphosphat über das Zwischenprodukt 4-Hydroxy-5-methyl-2-methylen-3(2H)-furanon (HMMF) zu HDMF, welches unter Verbrauch eines Reduktionsäquivalents NADH gebildet wird. Den letzten Schritt von HMMF zu HDMF katalysiert in der Erdbeere die *Fragaria x ananassa* Enon-Oxidoreduktase (FaEO). HDMF wird nicht nur in der Erdbeere gebildet, sondern ist auch in anderen Früchten wie der Tomate (*Solanum lycopersicum*) oder Weintrauben (*Vitis vinifera*) nachweisbar. Das der FaEO entsprechende Enzym in der Tomate stimmt in der Proteinsequenz zu 71 % mit FaEO überein und wird als *Solanum lycopersicum* Enon-Oxidoreduktase (SIEO) bezeichnet. Beide Enzyme wurden bereits kloniert und heterolog exprimiert, kinetische Daten aber nur für FaEO bestimmt. Da HMMF, das eigentliche Substrat von FaEO und SIEO, reaktiv und instabil und daher für die Aufnahme kinetischer Daten nicht geeignet ist, wurden die Substratanaloga 2-Ethyliden-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon, 4-Hydroxy-5-methyl-2-propyliden-3(2H)-furanon und 2-Butyliden-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon synthetisiert. SIEO wurde heterolog in *Escherichia coli* exprimiert und das rekombinante Enzym mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten und Wechselzahlen sind bei SIEO für die drei getesteten Substrate etwas niedriger als bei FaEO. Die Michaelis-Menten-Konstanten für die drei Substrate sind bei beiden Enzymen etwa gleich. Die niedrigste Michaelis-Menten-Konstante und damit die höchste Affinität zeigen beide Enzyme bei dem Substrat 2-Butyliden-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon mit  $K_M = 1,13$  mM für SIEO und  $K_M = 0,82$  mM für FaEO. Die katalytischen Effizienzen von SIEO und FaEO für die drei getesteten Substrate unterscheiden sich nur in geringem Maße, sind aber von SIEO etwas niedriger als die von FaEO.

Mit Hilfe von stabil transgenen Erdbeerpflanzen, in denen das für FaEO codierende Gen dauerhaft herabreguliert ist, sollten die Auswirkungen der Gen-Stillegung untersucht werden. Zunächst wurde dafür der relative HDMF-Gehalt der Erdbeerfrüchte verschiedener transgener Linien bestimmt. Nur in zwei der neun untersuchten Linien war der HDMF-Gehalt im Vergleich zu den Kontrolllinien deutlich reduziert. Aus den Früchten dieser zwei Linien wurden die Proteine extrahiert und eine zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt. Durch Vergleich des Proteoms der transgenen Erdbeerfrüchte und des Proteoms der Kontrollfrüchte wurden sieben

Proteinspots detektiert, die in ihrer Expression verändert waren. Zwei der sieben Proteine waren in beiden verwendeten transgenen Linien deutlich herabreguliert. Durch massenspektrometrische Analyse wurden diese Polypeptide als zwei Allozyme oder Isoenzyme der FaEO identifiziert. Die Stilllegung des für FaEO codierenden Gens hat die Expression des Proteins deutlich reduziert. Obwohl das Genom von *Fragaria x ananassa* bislang noch nicht vollständig sequenziert ist, konnten durch massenspektrometrische Analyse weitere regulierte Proteine als stress-induzierte Polypeptide charakterisiert werden.

Bisher ist kein Enzym bekannt, das an der Umsetzung von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HMMF, dem ersten Schritt der HDMF-Biosynthese, beteiligt ist. Durch Versuche mit Proteinrohextrakten aus Erdbeerfrüchten konnte gezeigt werden, dass die Reaktion enzymatisch katalysiert wird. Es wurden Ähnlichkeiten der Reaktionsabläufe und Substrate mit der Umsetzung der 3-Dehydroquinat-Synthase, einem Enzym des Shikimatwegs, festgestellt.

Um zu klären, ob es sich bei der Reaktion von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HMMF um eine durch 3-Dehydroquinat-Synthase katalysierte Nebenreaktion handelt, wurde zunächst eine Genexpressionsanalyse von zwei unterschiedlichen für 3-Dehydroquinat-Synthase codierenden Gensequenz-Fragmenten aus *Fragaria x ananassa* durchgeführt. Dabei wurde die Expression der Gene in verschiedenen Geweben und während der Fruchtreifung mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion untersucht. Während die Gensequenz *FaDHQS1* vor allem in Blättern, Blüten und unreifen grünen Früchten exprimiert wurde, konnten hohe Gehalte an *FaDHQS2*-Transkripten in unreifen weißen Früchten nachgewiesen werden. Folglich wurde der offene Leserahmen von *FaDHQS2* kloniert und das korrespondierende Protein heterolog in *Escherichia coli* exprimiert. Das rekombinante Enzym zeigte jedoch keine 3-Dehydroquinat-Synthase-Aktivität.

Da HDMF auch in Weintrauben gebildet wird und in dem entschlüsselten Genom von *Vitis vinifera* eine für eine 3-Dehydroquinat-Synthase kodierende homologe Gensequenz gefunden wurde, wurde auch der offene Leserahmen dieses Gens kloniert. Das rekombinante Protein ließ sich jedoch nicht heterolog exprimieren. Somit konnte zwar nicht der Bildungsweg von HMMF geklärt werden, die Expressionsdaten unterstützen aber die Hypothese der zweiphasigen Bildung von Polyphenolen während der Erdbeerfruchtreifung, deren Vorläufer über den Shikimatweg synthetisiert werden.

## SUMMARY

Numerous compounds contribute to the flavour of the strawberry *Fragaria x ananassa*. However, the most important flavour compound is 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (HDMF). The biosynthesis of this substance starts with D-fructose-1,6-diphosphate via the intermediate 4-hydroxy-5-methyl-2-methylen-3(2H)-furanone (HMMF) to HDMF, which is formed by consumption of the reducing agent NADH. In strawberry the last step from HMMF to HDMF is catalysed by *Fragaria x ananassa* enone oxidoreductase (FaEO). HDMF accumulates not only in strawberry but is also detected in other fruit such as tomato (*Solanum lycopersicum*) or grape (*Vitis vinifera*). The protein sequence of the corresponding enzyme of FaEO in tomato matches the sequence of FaEO to 71 % and is called *Solanum lycopersicum* enone oxidoreductase (SIEO). Both enzymes were previously cloned and heterologously expressed, but kinetic data were only determined for FaEO. Since HMMF, the actual substrate of FaEO and SIEO, is reactive and unstable and therefore not suitable for obtaining kinetic data, the substrate analogs 2-ethylidene-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone, 4-hydroxy-5-methyl-2-propylidene-3(2H)-furanone and 2-butyldiene-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone were synthesized. SIEO was heterologously expressed in *Escherichia coli* and the recombinant enzyme was purified by affinity chromatography. The maximum reaction velocities and turnover numbers for the three tested substrates are lower for SIEO than for FaEO. The Michaelis-Menten constants for the three substrates are approximately the same for both enzymes. Both enzymes show the lowest Michaelis-Menten constant and therefore the highest affinity for the substrate 2-butyldiene-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone with  $K_M = 1,13$  mM for SIEO and  $K_M = 0,82$  mM for FaEO. The catalytic efficiencies of SIEO and FaEO for the three tested substrates differ only to a minor degree, but are lower for SIEO than for FaEO.

Stable transgenic strawberry plants were generated in which the gene encoding for FaEO was permanently downregulated. The effects caused by the knock-down of this gene were analyzed. At first the relative HDMF content of strawberry fruit from different transgenic lines was determined. Only in two of nine analyzed lines the HDMF-content was clearly reduced compared to the control lines. Proteins were extracted from fruit of these two lines and two-dimensional gel electrophoresis was carried out. Comparison of the proteome of the transgenic lines to the proteome of the control fruit revealed seven proteins that changed in their expression. Two of the seven protein spots were down regulated in both transgenic lines. These polypeptides were identified as two allozymes or isozymes of FaEO by mass spectrometric analysis. Silencing of the *FaEO*

gene clearly reduced the expression of the protein. Despite the fact that the genome of *Fragaria x ananassa* is not fully sequenced yet further regulated proteins could be characterized as stress-induced polypeptides by mass spectrometric analysis.

Until now no enzyme is known which takes part in the conversion of D-fructose-1,6-diphosphate to HMMF, the first step in HDMF biosynthesis. Experiments with raw protein extracts from strawberries showed that the reaction is enzymatically catalyzed. Similarities of the reaction process and the substrates with the reaction catalyzed by 3-dehydroquinate synthase were found.

To test whether the reaction of D-fructose-1,6-diphosphate to HMMF is a side reaction catalyzed by 3-dehydroquinate synthase, gene expression analyses of two different *Fragaria x ananassa* gene fragments encoding for 3-dehydroquinate synthase were carried out. The gene expression in different tissues and during fruit ripening was determined by quantitative polymerase chain reaction. While gene sequence *FaDHQS1* was mainly detected in leaves, flowers and unripe green fruit, high contents of *FaDHQS2*-transcripts were detected in unripe white fruits. Therefore, the *FaDHQS2* open reading frame was cloned and the corresponding protein heterologously expressed in *Escherichia coli*. However, the recombinant enzyme did not show 3-dehydroquinate synthase activity.

As HDMF accumulates also in grapes and the genome of *Vitis vinifera* is accessible a homologous gene sequence encoding for a 3-dehydroquinate synthase was cloned from *V. vinifera*. However, the recombinant protein could not be heterologously expressed in host organisms. Therefore, it was not possible to elucidate the formation pathway of HDMF in detail but the expression data support the hypothesis of the two-phase-formation of polyphenols during fruit ripening, because the precursors are synthesized via the shikimate pathway.



## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Die Erdbeere

#### 1.1.1 Botanische Einordnung

##### 1.1.1.1 Arten und Sorten

Die Erdbeere (*Fragaria*) gehört zur Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*) und stellt eine eigene Gattung in der Unterfamilie Rosoideae dar. Bereits vor 2000 Jahren war die in Europa heimische Wildform *Fragaria vesca* bekannt und wurde von den Griechen und Römern kultiviert. Die diploide Walderdbeere zeichnet sich durch ein intensives Aroma aus, jedoch konnte bis heute die Größe der Früchte nicht gesteigert werden. Heutzutage hat die oktaploide Kulturerdbeere *F. ananassa* aufgrund ihrer großen, roten Früchte und ihres Aromas die größte Bedeutung auf dem Weltmarkt (Hancock, 1999). Sie entstand in der Mitte des 18. Jahrhunderts in Holland durch eine Kreuzung der großfruchtigen amerikanischen Erdbeere *F. virginiana* mit der aromareichen Chile-Erdbeere *F. chiloensis* und vereint in sich die positiven Eigenschaften der Eltern. Der französische Botaniker Antoine Nicolas Duchesne nannte sie aufgrund ihres Aromas Ananas-Erdbeere.

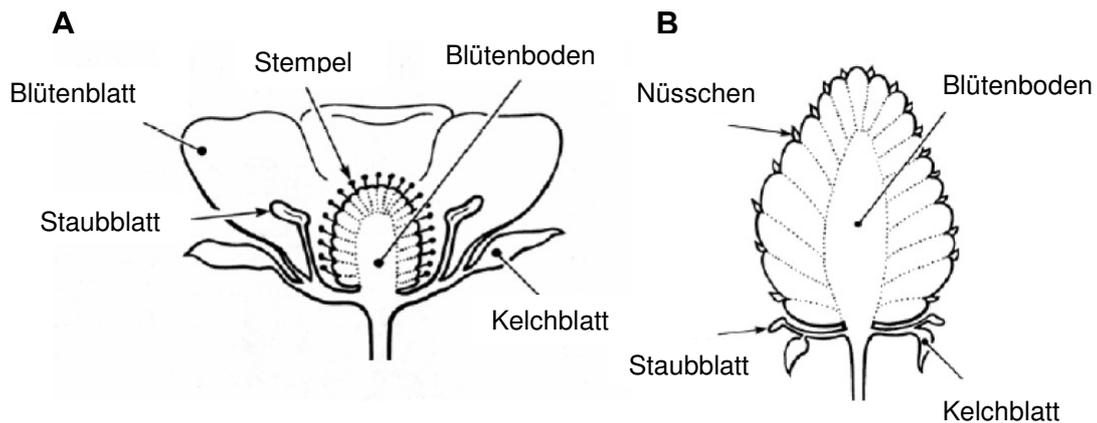
In den letzten zwei Jahrhunderten entstanden vor allem in Europa und Nordamerika weit über tausend Sorten mit unterschiedlichen Boden- und Klimaansprüchen, verschiedenem Aussehen und Geschmack. Die in Kalifornien gezüchteten Varietäten Camarosa und Chandler werden heutzutage häufig in warmen Klimaten angebaut, während in den kälteren Klimaten die Varietät Elsanta große Bedeutung erlangt hat.

##### 1.1.1.2 Morphologie

Die Erdbeere ist eine mehrjährige, krautige Pflanze, deren Blätter, Wurzeln und Blütenstände aus einem zentralen Vegetationskegel hervorgehen (Hancock, 1999). Erdbeerpflanzen können sich vegetativ vermehren, indem ausgehend von den Blattachselknospen der Mutterpflanze Ausläufer gebildet werden, die oberirdisch in horizontaler Richtung wachsen.

Die Blüten der Erdbeere sind weiß und besitzen zehn Kelchblätter, fünf Blütenblätter, 20 bis 30 Staubblätter und zahlreiche Stempel (Abb. 1A) (Hancock, 1999). Die Bestäubung der Blüten erfolgt durch Insekten, insbesondere durch Honigbienen. Nach der Bestäubung entwickeln sich die Stempel zu Nüsschen, die auf dem stark verdickten Blütenboden sitzen. Diese Nüsschen sind die eigentlichen Früchte der Erdbeere, die aus botanischer Sicht eine Sammelnussfrucht ist (Abb. 1B). Umgangssprachlich wird hingegen meist der verdickte Blütenboden als Erdbeerfrucht

bezeichnet. Der Blütenboden besteht aus einem weißlichen Mark, das von einer durch Anthocyane rotgefärbten Rinde umschlossen wird, in der die Nüsschen eingebettet sind. Die Nüsschen werden durch Leitbündel mit Nährstoffen versorgt. Sowohl die Nüsschen als auch die Leitbündel sind lignifiziert (Suutarinen et al., 1998). Im Folgenden wird aus Gründen der Verständlichkeit die gesamte Sammelnussfrucht, also der verdickte Blütenboden mit den Nüsschen, als Erdbeerfrucht bezeichnet.



**Abb. 1: Aufbau der Erdbeerblüte (A) und der Erdbeerfrucht (B) (Hancock, 1999).**

#### 1.1.1.3 Fruchtwachstum und Fruchtreifung

Bezüglich des Reifeverhaltens gibt es die Einteilung in klimakterische oder nicht-klimakterische Früchte. Klimakterische Früchte produzieren während der Reifung Ethylen, weisen eine erhöhte Respiration auf und besitzen die Fähigkeit, nach der Ernte nachzureifen. Bananen sind ein typisches Beispiel für klimakterische Früchte. Da bislang bei Erdbeeren keine der für klimakterische Früchte typischen Merkmale nachgewiesen wurden, zählte man die Erdbeere zu den nicht-klimakterischen Früchten. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass bei der Fruchtreifung der Erdbeere geringe Mengen Ethylen nach einem charakteristischen Muster, ähnlich wie bei der klimakterischen Tomate, produziert werden und die Respiration ansteigt (Iannetta et al., 2006). Daher scheint eine strikte Trennung in klimakterische und nicht-klimakterische Früchte nicht mehr zeitgemäß zu sein.

Die Entwicklung von der Blüte bis zur reifen Erdbeerfrucht umfasst einen Zeitraum von etwa 30 Tagen und lässt sich in zwei Phasen einteilen. In der ersten Phase reifen die Nüsschen und der Blütenboden vergrößert sich durch Zellteilung. In der zweiten Phase

teilen sich die Zellen des Blütenbodens nicht mehr, sondern die bestehenden Zellen vergrößern sich.

Wichtig für die Fruchtreifung der Erdbeere ist das Phytohormon Auxin (Indolessigsäure), andere Hormone wie Gibberelline, Cytokinine und Abscisinsäure scheinen dagegen einen geringen Einfluss auf das Fruchtwachstum zu haben (Perkins-Veazie, 1995). Das Auxin wird in den Nüsschen gebildet und durch die Leitbündel zu den Blütenstängeln transportiert. In weißen Früchten und in den Nüsschen ist der höchste Gehalt an Auxin nachweisbar. Dann nimmt der Auxingehalt im Blütenboden stark ab und die Reifung des Blütenbodens beginnt (Given et al., 1988). Dabei wächst der Blütenboden durch Zellvergrößerung, wobei verschiedene Sekundärmetabolite gebildet und akkumuliert werden. Zu den wichtigsten Sekundärmetaboliten gehören die farbgebenden Anthocyane und die für das Erdbeeraroma typischen Geruchs- und Geschmacksstoffe.

### 1.1.2 Aromastoffe

Die Zusammensetzung des Erdbeeraromas wurde bereits intensiv untersucht. Es wird angenommen, dass mehr als 360 flüchtige Verbindungen zum Aroma beitragen (Schieberle und Hofmann, 1997). Der Beitrag, den die einzelnen Verbindungen zur Aromabildung leisten, ist jedoch sehr unterschiedlich und die Zusammensetzung des Aromas ist sehr stark abhängig von der Sorte und den Wachstumsbedingungen. Dennoch wurde in verschiedenen Studien festgestellt, dass zu den wichtigsten Aromastoffen der Erdbeere insbesondere Ethylbutanoat, Ethylhexanoat und die entsprechenden Methylester, (*Z*)-3-Hexenal und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (HDMF) zählen (Larsen et al., 1992; Perez et al., 1992; Schieberle und Hofmann, 1997). Einen Überblick über einige wichtige Aromastoffe der Erdbeere und ihre Geruchsqualität gibt Tab. 1.

Bei der Untersuchung von Aromakomponenten spielt weniger die Aromastoffkonzentration, sondern vielmehr der eigentliche Beitrag des Stoffes zum Aroma der Frucht eine Rolle. Um diesen Beitrag zu messen wurden verschiedene Methoden entwickelt. Zum einen gibt es die Möglichkeit den Aromawert einer Substanz zu bestimmen. Der Aromawert ist definiert als der Quotient aus der Konzentration des Aromastoffs im Lebensmittel und dessen Geruchsschwellenwert, der niedrigsten Konzentration, bei der diese Verbindung noch als solche wahrgenommen wird. Die nach dieser Berechnung erhaltenen Aromawerte stellen Maßangaben dar, die direkte Vergleiche zwischen verschiedenen Aromastoffen zulassen (Rothe und Thomas, 1963).

**Tab. 1: Geruchsaktive flüchtige Verbindungen eines frischen Erdbeersaftes**  
(Schieberle und Hofmann, 1997)

Verbindung	Geruchsqualität
HDMF	karamellartig
(Z)-3-Hexenal	grün
Methylbutanoat	fruchtig
Ethylbutanoat	fruchtig
Ethyl-2-methylbutanoat	fruchtig
Ethyl-3-methylbutanoat	fruchtig
Methyl-2-methylbutanoat	fruchtig
Methyl-3-methylbutanoat	fruchtig
2,3-Butandion	butterartig
Ethyl-2-methylpropanoat	fruchtig

Eine andere Möglichkeit die Aromawirksamkeit verschiedener Substanzen zu vergleichen ist die Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse. Dabei wird ein Aromaextrakt kontinuierlich verdünnt und durch Gaschromatographie-Olfaktometrie der Verdünnungsfaktor bestimmt, bei dem eine Verbindung gerade noch erkennbar ist (Ullrich und Grosch, 1987). Je höher dieser Verdünnungsfaktor, auch *Flavour Dilution* (FD) –Faktor genannt, ist, desto aromawirksamer ist die Substanz.

In einer Studie aus dem Jahr 1982 wurden in drei verschiedenen Erdbeersorten (Annelie, Alaska P., Senga Sengana) die höchsten Aromawerte für Ethylhexanoat, Ethylbutanoat, (*E*)-2-Hexenal und 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2*H*)-furanon (DMMF) ermittelt (Hirvi und Honkanen, 1982). Im Unterschied dazu hatten in der Walderdbeere jedoch Ethylbutanoat, DMMF, Methylantranilat und Myrtenol die höchsten Aromawerte. Für die in einer weiteren Studie untersuchten Früchte der Sorte Senga Sengana wurden als Verbindungen mit den höchsten Aromawerten Ethylbutanoat, Ethylhexanoat und HDMF ermittelt (Larsen und Poll, 1992). Die nachfolgende Studie der gleichen Arbeitsgruppe, die mit sechs verschiedenen Erdbeersorten durchgeführt wurde, ergab, dass es sich bei HDMF, Ethylhexanoat und Linalool um Verbindungen handelt, die unabhängig von der Sorte einen wichtigen Beitrag zum Erdbeeraroma leisten (Larsen et al., 1992).

Die Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse einer unbekannteren Erdbeersorte ergab die höchsten FD-Faktoren für HDMF, (Z)-3-Hexenal, Methylbutanoat, Ethylbutanoat und Ethyl-2-methylpropanoat (Schieberle und Hofmann, 1997). Die sensorische Untersuchung eines Modell-Erdbeersaftes, der die zwölf wichtigsten Aromastoffe enthielt, ergab, dass das Fehlen von HDMF und (Z)-3-Hexenal in der Mischung zu einer signifikanten Änderung des Geruchseindrucks führt.

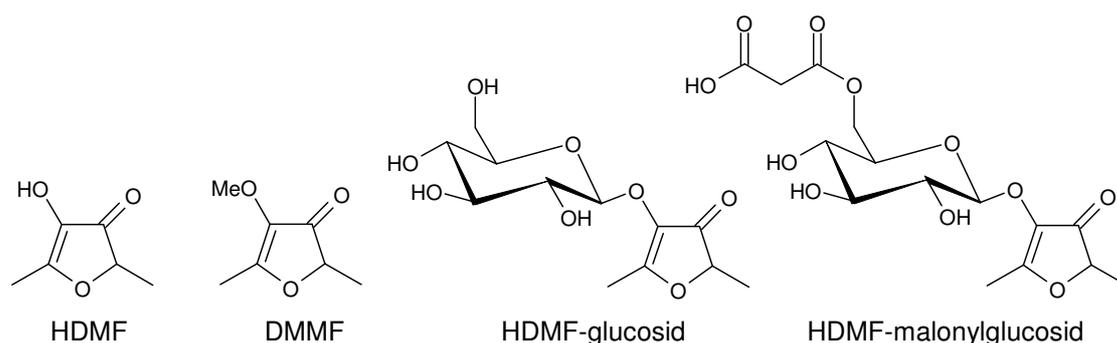
Bei einer ähnlichen sensorischen Analyse einer Modell-Aromalösung mit wichtigen Aromastoffen der Sorte Senga Sengana zeigte sich, dass zwar die Verbindungen mit den höchsten Aromawerten auch als die wichtigsten Aromastoffe angesehen werden können, jedoch auch Komponenten mit niedrigen Aromawerten zum typischen Erdbeeraroma beitragen (Larsen und Poll, 1992).

Kein Aromastoff ist allein genommen in der Lage ein natürliches Erdbeeraroma zu simulieren, eine sogenannte „character impact compound“ wurde für die Erdbeere nicht gefunden. Jedoch wurde in den genannten Studien gezeigt, dass es sich bei HDMF um eine Verbindung handelt, die von entscheidender Bedeutung für das natürliche Aroma der Kultur-Erdbeersorten ist.

## 1.2 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon

### 1.2.1 Vorkommen und Bedeutung von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon

Erstmals wurde HDMF bei Untersuchungen zur Maillard-Reaktion von Hodge durch Erhitzen von L-Rhamnose in Gegenwart von Piperidinacetat dargestellt (Hodge et al., 1963). Die eindeutige Struktur von HDMF wurde jedoch erst durch die Arbeitsgruppe um Rodin bewiesen, die aus frisch gepresstem Ananassaft eine nach „verbrannter Ananas“ riechende Verbindung aufgrund der Massen-, IR-, NMR- und UV-Spektren als HDMF identifizierten (Abb. 2) (Rodin et al., 1965). Diese Daten und die Struktur von HDMF wurden kurze Zeit später durch die Wiederholung der von Hodge 1963 beschriebenen Synthese bestätigt (Willhalm et al., 1965).



**Abb. 2: Strukturformeln von HDMF und seinen Derivaten.** 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (HDMF), 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanon (DMMF), HDMF- $\beta$ -D-glucopyranosid (HDMF-glucosid) und HDMF-6'-O-malonyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (HDMF-malonylglucosid).

Neben der Ananas wurde HDMF in den darauffolgenden Jahren in vielen weiteren Früchten nachgewiesen. In der Erdbeere wurde HDMF erstmals 1970 beschrieben (Sundt, 1970), einige Jahre später auch in der arktischen Moosbeere (Kallio, 1976).

Des Weiteren ist HDMF in Himbeeren (Honkanen et al., 1980) und in Weintrauben (Rapp et al., 1980) enthalten. Auch in Mangos (Pickenhagen et al., 1981) und in Tomaten (Buttery et al., 1994) wurde HDMF nachgewiesen.

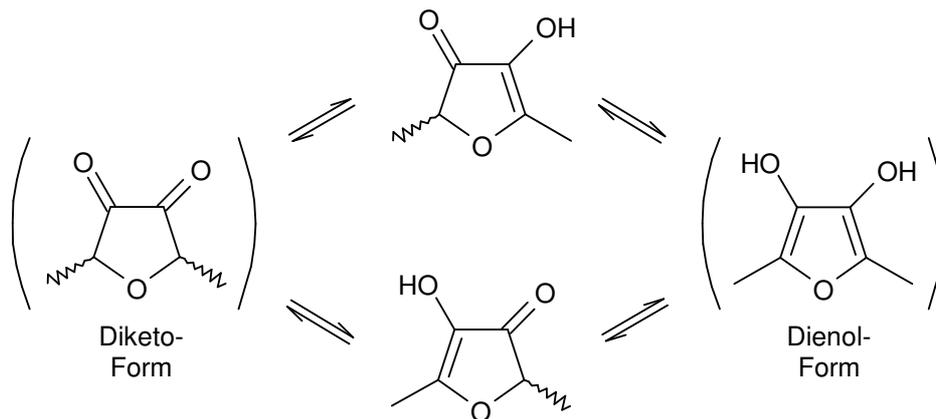
Das methylierte Derivat von HDMF, 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2*H*)-furanon, trägt insbesondere zum Aroma der Walderdbeere *F. vesca* bei (Pyysalo et al., 1979). In vielen der genannten Früchte liegt HDMF in gebundener und somit stabilisierter Form als HDMF- $\beta$ -D-glucopyranosid und HDMF-6'-O-malonyl- $\beta$ -D-glucopyranosid vor (Mayerl et al., 1989; Roscher et al., 1996). HDMF und seine Derivate kommen nicht in allen Teilen der genannten Pflanzen vor, sondern wurden bisher ausschließlich in Blüten und Früchten nachgewiesen. Aus Wurzeln, Stängeln und Blättern konnte bislang keine der Substanzen isoliert werden. In der Erdbeere nehmen die genannten Furanone sortenunabhängig während der Reifung zu und der Gesamtfuranongehalt erreicht im überreifen Stadium sein Maximum (Perez et al., 1996).

HDMF liegt aber nicht nur in Pflanzen vor, sondern entsteht auch bei der thermischen Behandlung von Lebensmitteln. In protein- und kohlenhydratreichen Lebensmitteln kommt es durch Hitzeeinwirkung zur Maillard-Reaktion, bei der Aminoverbindungen mit reduzierenden Zuckern über verschiedene Schritte zu einem komplexen Gemisch von Verbindungen reagieren (Ledl und Schleicher, 1990). Viele dieser Verbindungen tragen als sogenannte „Röstaromen“ wesentlich zum Geschmack, Geruch und zur Farbe dieser Lebensmittel bei. HDMF wurde beispielsweise in der Brotkruste (Schieberle und Grosch, 1994), in frisch aufgebrühtem Kaffee (Blank et al., 1992) und in Popcorn (Schieberle, 1991) detektiert. Des Weiteren entsteht HDMF auch bei der Fermentation von Lebensmitteln mit Mikroorganismen wie der Käseherstellung (Preininger und Grosch, 1994). Interessanterweise wurde HDMF auch im männlichen Sexualhormon der Schabe *Eurycotis floridana* identifiziert (Farine et al., 1994).

HDMF ist aufgrund seiner Geruchs- und Geschmackseigenschaften von großem Interesse für die Lebensmittelindustrie, die es zur Aromatisierung verschiedener Lebensmittel verwendet. In industriellem Maßstab wird HDMF heutzutage hauptsächlich ausgehend von 3-Hexin-2,5-diol nach der von Re entwickelten chemischen Synthese produziert (Re et al., 1973). Eine Alternative zur Herstellung von HDMF stellt die chemisch-enzymatische Methode der Arbeitsgruppe von Newman dar, bei der im ersten Schritt p-Xylen enzymatisch durch eine Dioxygenase zu (*Z*)-Cyclohexadiendiol umgesetzt wird und bei der anschließenden Ozonolyse durch Ringöffnung HDMF entsteht (Newman et al., 2004).

### 1.2.2 Eigenschaften

HDMF besitzt ein asymmetrisches Kohlenstoffatom an Position C-2 und ist daher eine chirale Verbindung. Der für enzymatische Reaktionen typische Enantiomeren-Überschuss ist bei der Isolierung von HDMF aus pflanzlichen Quellen jedoch nicht nachweisbar, was auf eine Racemisierung durch Keto-Enol-Tautomerie zurückzuführen ist (Bruche et al., 1991; Raab et al., 2003). Durch die Enol-Struktur kann HDMF in vier tautomeren Formen dargestellt werden, allerdings konnten die Dienol- und die Diketo-Form bisher nicht isoliert werden (Abb. 3) (Rodin et al., 1965).



**Abb. 3: Tautomere Grenzstrukturen von HDMF**

HDMF liegt in Reinstform kristallin vor und ist sehr gut wasserlöslich. In Gegenwart von Luftsauerstoff ist die Verbindung äußerst instabil und es lassen sich schnell oxidative Zersetzungsreaktionen feststellen. Die Lagerfähigkeit kann unter Stickstoffatmosphäre und bei niedrigen Temperaturen verbessert werden (Henry und Silverstein, 1966). Auch in wässriger Lösung finden Zersetzungs Vorgänge statt, allerdings ist die Geschwindigkeit der Zersetzung anhängig vom pH-Wert der Lösung. Im Sauren ist HDMF wesentlich stabiler als im Neutralen (Hirvi et al., 1980). Die geringe Stabilität gestaltete den Nachweis von HDMF zum Teil sehr schwierig. Deswegen war HDMF bei frühen gaschromatographischen Untersuchungen mit hohen Temperaturen und aktiven Oberflächen der Trennsäulen schlecht detektierbar. Durch Messung mit „fused silica“ Kapillarsäulen wurden die Ergebnisse deutlich verbessert (Blank et al., 1992; Schwab et al., 1997). Die unterschiedlichen Ergebnisse von Untersuchungen des gleichen Lebensmittels durch verschiedene Arbeitsgruppen sind zum Teil auch auf die geringe Stabilität von HDMF zurückzuführen, da HDMF bei Anwendung bestimmter Aufreinigungsmethoden zerstört werden kann. Zum anderen kann durch Hitze einwirkung bei der Aufarbeitung HDMF auch erst gebildet werden. Dies erschwert den quantitativen Nachweis von HDMF in Lebensmitteln.

Der Geruchseindruck von HDMF wurde abhängig von der Konzentration recht unterschiedlich beschrieben, in höheren Konzentrationen als karamellartig und süß, in niedrigeren Konzentrationen als fruchtig nach Ananas oder Erdbeere riechend (Re et al., 1973). Die Geruchseigenschaften sind auch abhängig von den vorliegenden Enantiomeren des HDMF. Das (-)-Enantiomer riecht stark süßlich und karamellartig, das (+)-Enantiomer hinterlässt einen insgesamt schwächeren und weniger süßen Geruchseindruck (Bruche et al., 1995). HDMF besitzt einen sehr niedrigen Geruchsschwellenwert, der je nach Bestimmungsmethode zwischen 0,03 und 1700 ppb in wässriger Lösung liegt (Schwab et al., 1997).

### 1.2.3 Biosynthese von HDMF und seinen Derivaten in der Erdbeerfrucht

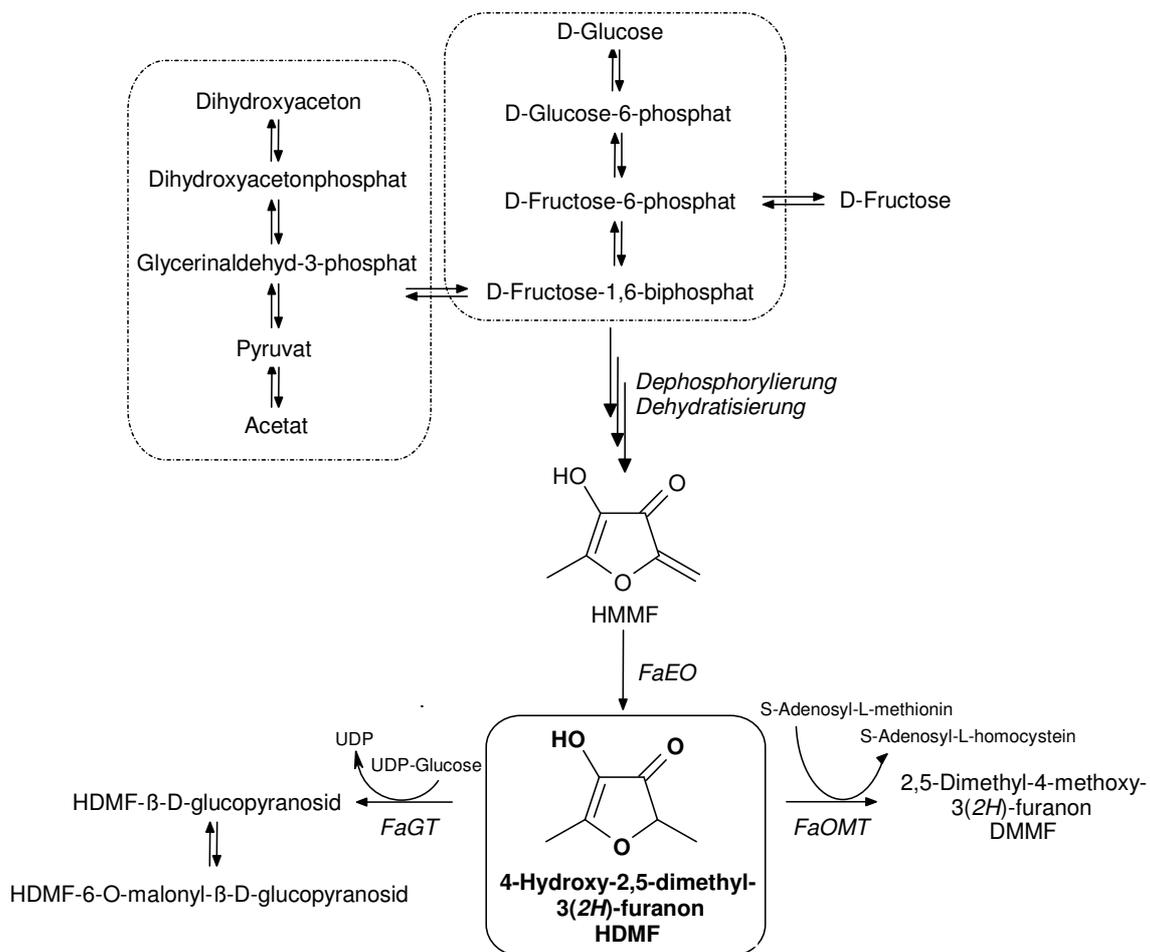
Obwohl HDMF seit über 30 Jahren als bedeutender pflanzlicher Aromastoff bekannt ist, wurde erst 1992 über die ersten Untersuchungen zur Biosynthese von HDMF in Erdbeeren berichtet (Pisarnitskii et al., 1992). In dieser Studie wurde ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Methylpentosen, wie L-Rhamnose und L-Fucose, und dem Gehalt an HDMF beobachtet und daher eine Bildung von HDMF über eine Maillard-analoge Dehydratisierung der Methylpentosen vermutet.

In späteren Metabolisierungsstudien, die mit 6-Desoxyketosen in Erdbeerkalluskulturen durchgeführt wurden, wurde nach der Gabe von 6-Desoxy-D-fructose der höchste Gehalt an HDMF- $\beta$ -D-glucopyranosid gefunden (Zabetakis und Holden, 1996). Die Arbeitsgruppe um Zabetakis postulierte nach verschiedenen Untersuchungen, dass es zwei unterschiedliche Biosynthesewege für HDMF und HDMF- $\beta$ -D-glucopyranosid gibt. Beide Wege gehen von der Reaktion von D-Lactaldehyd, das aus 1,2-Propandiol gebildet wird, mit Dihydroxyacetonphosphat zu 6-Desoxy-D-fructose-1-phosphat aus. Freies HDMF soll dann aus 6-Desoxy-D-fructose-1-phosphat über eine Phosphatdehydrogenase- und eine Alkoholdehydrogenase-katalysierte Reaktion gebildet werden (Zabetakis et al., 1999). Die Bildung des Glucosids soll hingegen über eine Reaktion von 6-Desoxy-D-fructose-1-phosphat mit UDP-Glucose zu einem D-Desoxyanalogon der Saccharose verlaufen, das anschließend zu HDMF- $\beta$ -D-glucopyranosid reduziert wird (Zabetakis und Holden, 1996).

Die Untersuchung der Biosynthese von HDMF in einem Hefestamm, der für die Fermentation von Sojasaucen verwendet wird, ergab, dass HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat gebildet wird (Hecquet et al., 1996). Dieses Ergebnis wurde durch Isotopenexperimente mit  $1\text{-}^{13}\text{C}$ -D-Fructose-1,6-diphosphat bestätigt (Dahlen et al., 2001).

In einer anderen Studie wurden zwölf verschiedene radioaktiv markierte mögliche Vorläufer-Verbindungen in Erdbeeren injiziert und anschließend die Einbaurate der

Substanzen in HDMF und seine Derivate bestimmt (Roscher et al., 1998). D-Glucose, D-Glucose-6-phosphat, D-Fructose und insbesondere D-Fructose-1,6-diphosphat waren die effektivsten Vorläufer. L-Rhamnose und D-Lactaldehyd, die von Pisarnitskii bzw. Zabetakis vorgeschlagenen Prekursoren, wurden nicht in HDMF oder seine Derivate eingebaut. Auch in einer Studie mit stabil markierter 1-Desoxy-D-Fructose und 6-Desoxyhexosen wurden festgestellt, dass diese Verbindungen, anders als von Zabetakis postuliert, nicht als Prekursoren dienen (Wein et al., 2001). Durch den Einsatz von  $^{13}\text{C}_6$ -D-Fructose gelang schließlich der Beweis, dass die vollständige Kohlenstoffkette der D-Fructose in die Furanonstruktur eingebaut wird (Schwab, 1998).



**Abb. 4: Postulierter Biosyntheseweg von HDMF und seinen Derivaten in der Erdbeerfrucht (nach Roscher et al. 1998).** *Fragaria x ananassa* Enon-Oxidoreduktase (FaEO), *F. x ananassa* O-Methyltransferase (FaOMT), *F. x ananassa* Glycosyltransferase (FaGT)

Bei der Quantifizierung von HDMF und seinen Derivaten aus verschiedenen Stadien der Erdbeerfruchtreifung wurde deutlich, dass die Bildung der HDMF-Derivate direkt aus HDMF ohne einen zweiten Biosyntheseweg abläuft (Perez et al., 1996). Dies

wurde durch die Umsetzung von radioaktiv markiertem S-Adenosyl-L-methionin (SAM) und HDMF bestätigt. In der Studie wurde gezeigt, dass DMMF aus HDMF durch die Übertragung einer Methylgruppe gebildet wird und dass HDMF auch der Vorläufer von HDMF- $\beta$ -D-glucopyranosid und dem malonylierten Derivat ist (Roscher et al., 1997). Einige Jahre später wurde eine SAM abhängige O-Methyltransferase (FaOMT) aus der Erdbeere isoliert, die den Reaktionsschritt von HDMF zu DMMF katalysiert (Wein et al., 2002).

Ein weiterer Schritt der HDMF-Biosynthese wurde durch die Klonierung und Charakterisierung einer Enon-Oxidoreduktase aus der Erdbeere aufgeklärt. Dieses als FaEO bezeichnete Enzym katalysiert die Umsetzung von 4-Hydroxy-5-methyl-2-methylen-3(2H)-furanon (HMMF), einem reaktiven Zwischenprodukt, zu HDMF (Klein et al., 2007).

In Abb. 4 sind die Ergebnisse der Studien von Perez und Mitarbeitern (1996), Roscher und Mitarbeitern (1997, 1998), Schwab (1998), Wein und Mitarbeitern (2002) und Klein und Mitarbeitern (2007) zusammengefasst.

### **1.3 NAD(P)H-abhängige Chinon-Oxidoreduktasen**

#### **1.3.1 Reaktionsmechanismus und Substrate**

Enzyme werden entsprechend der von ihnen katalysierten Reaktion in sechs Enzymhauptklassen eingeteilt. Oxidoreduktasen sind Enzyme der ersten Hauptklasse und katalysieren meist unter Verbrauch oder Bildung von NAD(P)H Redoxreaktionen. Eine Gruppe in dieser Hauptklasse bilden die NAD(P)H-abhängigen Chinon-Oxidoreduktasen. Die erste in Säugetieren beschriebene Chinon-Oxidoreduktase ist die DT-Diaphorase (Ernster und Navazio, 1958), die ein breites Substratspektrum von Chinonen bis hin zu aromatischen Nitroverbindungen akzeptiert und unspezifisch gegenüber Nicotinamidadenin-dinucleotid (NADH) und Nicotinamidadenin-dinucleotid-phosphat (NADPH) reagiert. Der Reaktionsmechanismus der DT-Diaphorase basiert auf einer Zwei-Elektronen-Übertragung. Hierbei werden nacheinander zwei Elektronen auf Chinon und das intermediär entstehende Semichinonradikal übertragen, wobei das reaktive und potentiell toxische Semichinonradikal im Enzym-Substrat-Komplex gebunden bleibt (Cadenas, 1995). Da dabei eine Entstehung von Sauerstoffradikalanionen unterbunden wird, wird die Reaktion der DT-Diaphorase auch als Entgiftungsvorgang bezeichnet. Allerdings sind nicht alle entstehenden Hydrochinone stabil und manchmal führt die Reaktion zu einem aktiveren Produkt, durch das wiederum reaktive Sauerstoffradikale entstehen können (Ross et al., 2000). Außerdem gehen aus der Zwei-Elektronen-Übertragung auf Nitroverbindungen auch

Nitrosamine hervor. Es entstehen durch die DT-Diaphorase-Reaktion also auch toxische Verbindungen (Cadenas, 1995).

Crystalline sind Strukturproteine der Augenlinse. Die Substratspezifität, die Reaktionscharakteristika und die physikochemischen Eigenschaften der aus Meerschweinchen isolierten  $\zeta$ -Crystalline zeigen, dass es sich bei diesem Protein um eine aktive NADPH-abhängige Chinon-Oxidoreduktase handelt (Rao et al., 1992). Im Gegensatz zur DT-Diaphorase katalysieren  $\zeta$ -Crystalline bei chinoiden Substraten eine Ein-Elektronen-Übertragung, bei der reaktive Semichinonradikale entstehen (Rao et al., 1992).

Pflanzliche Chinon-Oxidoreduktasen werden häufig in DT-Diaphorase-ähnliche und  $\zeta$ -Crystallin-ähnliche Enzyme eingeteilt, obwohl bisher keine Sequenzähnlichkeiten zu diesen Enzymen nachgewiesen wurden. Die Zuordnung erfolgt aufgrund des unterschiedlichen Reaktionsmechanismus, einer Ein- oder Zwei-Elektronen-Übertragung. Diese Einteilung wird jedoch nicht unterstützt durch neuere Forschungsergebnisse, wonach der Reaktionsmechanismus einiger Oxidoreduktasen abhängig ist vom zur Verfügung stehenden Substrat (Mano et al., 2000).

Eine Zuordnung anhand von Sequenzähnlichkeiten ist schwierig, denn obwohl die bisher beschriebenen Oxidoreduktasen ähnliche Reaktionen katalysieren stimmen ihre Sequenzen oft nur in Cofaktor-, Cosubstrat- oder Metallbindungsstellen überein.

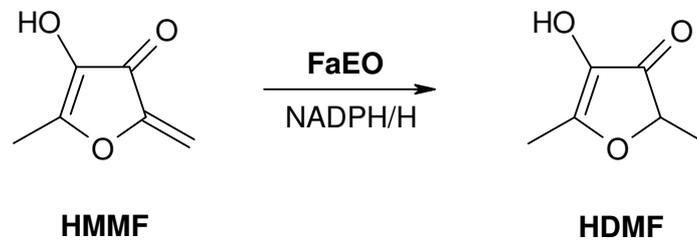
### 1.3.2 Enon-Oxidoreduktasen der Erdbeere und Tomate

Neueste Ergebnisse der Untersuchung der HDMF-Biosynthese in der Erdbeere haben die Beteiligung des Enzyms *Fragaria x ananassa* Enon-Oxidoreduktase (FaEO) an der Synthese dieses wichtigen Aromastoffs gezeigt. Dieses Enzym wurde ursprünglich als *Fragaria x ananassa* Chinon-Oxidoreduktase (FaQR) bezeichnet, wurde aber aufgrund der katalysierten Reaktion in *Fragaria x ananassa* Enon-Oxidoreduktase umbenannt (Klein et al., 2007).

FaEO katalysiert abhängig von dem zur Verfügung stehenden Substrat eine Ein- oder Zwei-Elektronen-Übertragung. Mit Phenanthrenchinon wird die Oxidation von NADH durch Ein-Elektron-Übertragung katalysiert, wohingegen bei Anwesenheit von  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonyl-Verbindungen zwei Elektronen auf die Doppelbindung übertragen werden.

Durch Klonierung und anschließende heterologe Expression der FaEO wurde das bislang unbekanntes Intermediat HMMF als natürliches Substrat identifiziert. In der Erdbeere erfolgt eine Reduktion der Doppelbindung von HMMF, wodurch der Aromastoff HDMF gebildet wird (Abb. 5). Diese Reaktion zeigt ein deutliches Optimum bei pH 6 und bei Anwesenheit von NADPH als Reduktionsäquivalent.

Eine Untersuchung der Genexpression von FaEO in verschiedenen Reifestadien der Erdbeerfrucht zeigte, dass die Transkriptmenge während des Reifungsprozesses ansteigt und in der roten reifen Frucht ein Maximum erreicht. Dies steht in Einklang mit der steigenden Enzymaktivität während der Reifung und der ansteigenden Konzentration an gebildetem HDMF und dessen Derivaten (Raab et al., 2006).



**Abb. 5: Reduktion von 4-Hydroxy-5-methyl-2-methylen-3(2H)-furanon (HMMF) zu 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (HDMF) katalysiert durch FaEO.**

HDMF wird nicht nur in der Erdbeere, sondern auch in verschiedenen anderen Früchten wie Tomate und Ananas gebildet. Durch einen Abgleich der cDNA-Sequenz der FaEO mit einer Tomaten-Expressions-Bibliothek und einer Ananas-cDNA-Datenbank wurde eine Vollängen-cDNA aus der Tomate und ein cDNA-Teilstück aus der Ananas gefunden. Die Übereinstimmung mit der Protein-Sequenz der FaEO beträgt 71 bzw. 73 % (Abb. 6). Das Protein aus der Tomate, *Solanum lycopersicum* Enon-Oxidoreduktase (SIEO), enthält ein mögliches Transit-Protein mit einer Länge von etwa 60 Aminosäuren am N-Terminus, das wahrscheinlich den Transport des Proteins in Chloroplasten vermittelt. In der Sequenz der FaEO wurde keinerlei Signal-Peptid gefunden. Die Ausgangssubstanz für die HDMF-Biosynthese, D-Fructose-1,6-diphosphat, kommt sowohl in Chloroplasten als auch im Cytosol vor, es ist also möglich, dass die HDMF-Bildung in beiden zellulären Kompartimenten stattfindet (Klein et al., 2007). Gegen die mögliche Bildung in beiden Kompartimenten spricht, dass die Synthese erst in den späten Reifephase abläuft, in denen keine Chloroplasten mehr vorhanden sind.

<b>FaEO</b>	-----	1
<b>SIEO</b>	MEALLSSTTLQLKPLHPPSSFSSLHSPFSSISVLRVKGSKKAETFIQRSNFSTVLPLRVS	60
<b>FaEO</b>	----MAAAPSE---SIPSVNKAWVYSEYGKTSVDLKFDPSSVAVPEVKEDQVLIKVVAASL	53
<b>SIEO</b>	ASSQAAAAETSTSI SIPSEMKAWSYTDYG--SVDVLKLESNAVDPDIKEDQVLIKIVAAAL	119
<b>FaEO</b>	NPVDFKRALGYFKD TDSPLPTVPGYDVAGVVVKVGSQVTKFKVGDDEVYGDLNEAALVNPT	113
<b>SIEO</b>	NPVDFKRRLGKFKATDSPLPTVPGYDVAGVVVKVGSQVKGLKEGDEVYGDIHEKALDGP	179
<b>FaEO</b>	RFGSLAEYTAADERVLAHKPKDLSFIEAASLPLAIETAYEGLERAELSAGKVSILVIGGAG	173
<b>SIEO</b>	QFGSLAEYTAVEEKLVALKPKNLSFAEAAAALPLAIETAYEGLEKAGFSSGKVSILVIGGAG	239
<b>FaEO</b>	GVGTHIIQLAKHVFGASKVAATASTKCLDFLRTLGVDLAIDYTKENIEDLPEKFDVVYDA	233
<b>SIEO</b>	GVGSLVIQLAKHVFGASKVAATSSTGKLELLKSLGADLAIDYTKENFEDLPDKFDVVYDS	299
<b>FaEO</b>	VGETDKAVKAVKEGGKVVTVVGPATPPAIHFVLT SKG SVLEKLPYLESGKVKPVLDP	293
<b>SIEO</b>	VGQGEKAVKVVKEGGSVVVLTVAVTTPPGFRFVVTSNGEMLKKNLPYLESGKVKPVIDPK	359
<b>FaEO</b>	PYPFTKLVEAFGYLESSRATGKVVVYPIP	322
<b>SIEO</b>	PFSFDKVVDAFSYLETGRATGKVVVYHIP	388

**Abb. 6: Alignment von FaEO (GenBank Accession-Nr. AY048861) und SIEO (Accession-Nr. TC124720) auf Proteinebene.** Die Sequenzen wurden mit der ClustalW Methode angeordnet (Thompson et al., 1994). Identische Aminosäuren sind grau hinterlegt.

## 1.4 3-Dehydroquinat-Synthese

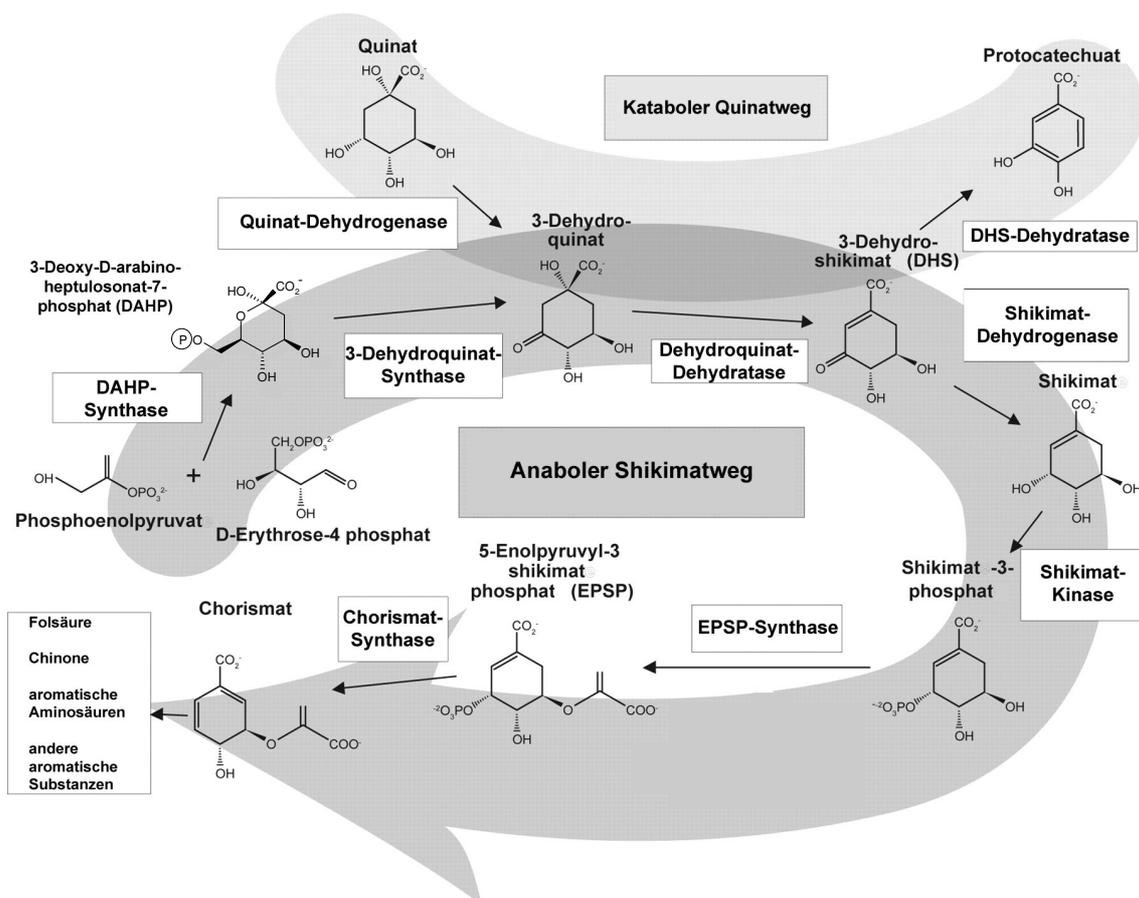
### 1.4.1 Der Shikimat-Stoffwechsel

#### 1.4.1.1 Allgemeine Bedeutung des Shikimat-Stoffwechsels

Der Shikimat-Stoffwechselweg (kurz Shikimatweg) ist als Reaktionsweg für die Biosynthese von aromatischen Verbindungen von großer Bedeutung (Abb. 7). Benannt ist dieser Stoffwechselweg nach der organischen Säure Shikimat, die zum ersten Mal aus der Japanischen Sternanis *Illicium religiosum* (japanisch shikimi-no-ki) isoliert wurde (Eykmann, 1891).

Der Shikimatweg kommt ausschließlich in Bakterien, eukaryotischen Mikroorganismen und Pflanzen vor und ist für diese Organismen essentiell. Als Shikimatweg im engeren Sinn bezeichnet man die Biosynthese von Chorismat, die ausgehend von einer Kondensation von Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-phosphat (E4P) in sieben Schritten über das Zwischenprodukt Shikimat erfolgt. Chorismat ist unter anderem Ausgangsprodukt für die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan (Herrmann und Weaver, 1999). Bakterien, die mehr als 90 % ihrer Stoffwechselenergie für die Proteinbiosynthese nutzen, bilden über den Shikimatweg fast ausschließlich aromatische Aminosäuren. Höhere Pflanzen hingegen nutzen den Shikimatweg in nicht unerheblichem Umfang für die Biosynthese

von Sekundärmetaboliten, die sich entweder aus den aromatischen Aminosäuren oder den Intermediaten des Shikimatweges ableiten (Herrmann, 1995). Unter anderem werden über die aromatischen Aminosäuren Substanzen, die dem Fraßschutz dienen (Dixon und Paiva, 1995), Pflanzenhormone und Pflanzenpigmente gebildet. Bei verholzenden Pflanzen fließt ein Großteil des gebildeten Phenylalanins in die Produktion von Lignin (Whetten und Sederoff, 1995). Ausgehend von Chorismat, dem Endprodukt des Shikimatweges, gibt es Biosynthesewege die direkt zu verschiedenen Sekundärmetaboliten wie Folaten und Quinonen führen (Herrmann, 1995).



**Abb. 7: Anaboler Shikimatweg im engeren Sinn und teilweise überlappender kataboler Quinatweg.** Im Shikimatweg werden Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat in sieben enzymatisch katalysierten Reaktionen zu Chorismat umgesetzt. (Lindner et al., 2005)

Die Tatsache, dass der Shikimatweg nur in Bakterien, Pilzen und Pflanzen, nicht jedoch in höheren tierischen Organismen stattfindet, macht ihn zu einem interessanten Ziel bei der Suche nach Herbiziden und Antibiotika (Coggins et al., 2003). Das bereits seit den siebziger Jahren bekannte und intensiv eingesetzte Herbizid Glyphosat inhibiert 5-Enolpyruvyl-3-shikimatphosphat (EPSP)-Synthase, ein Enzym des Shikimatweges (Jaworski, 1972; Steinrücken und Amrhein, 1980). Durch Glyphosat in

Kombination mit Pyrimethamin, einem Inhibitor der Folatsynthese, wurde eine auch für den Menschen gefährliche Infektion durch den Parasiten *Toxoplasma gondii*, die zur sogenannten Toxoplasmose führt, in Mäusen erfolgreich behandelt (Roberts et al., 1998). Auch alle weiteren Schritte des Shikimatweges sind potentiell interessant. Die Tatsache, dass die Strukturen fast aller beteiligten Enzyme bekannt sind, wird eine schnell voranschreitende Entwicklung potenter Inhibitoren ermöglichen (Coggins et al., 2003).

#### 1.4.1.2 Beschreibung des Shikimatweges

Der Shikimatweg setzt sich aus sieben hintereinander ablaufenden Reaktionen zusammen, beginnend mit der Kondensation von PEP und E4P bis zur Bildung von Chorismat. Einen Überblick über die Reaktionsabfolge gibt Abb. 7.

Im ersten Schritt des Shikimatwegs findet die Kondensation von E4P aus dem Pentosephosphatzyklus und PEP, einem Intermediat der Glykolyse, statt, bei der eine Phosphatgruppe des PEP abgespalten wird. Diese Reaktion wird durch DAHP-Synthase (EC 2.5.1.54) katalysiert. Das entstehende 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP) ist ein heterozyklisches Derivat, das sich von 2-Deoxy-D-glucose-6-phosphat ableitet.

Im zweiten Schritt findet die durch 3-Dehydroquinat-Synthase katalysierte Reaktion von DAHP zu 3-Dehydroquinat statt. Diese Reaktion wird im Folgenden gesondert betrachtet, da sie einen Schwerpunkt dieser Arbeit bildet.

Durch die Eliminierung von Wasser aus 3-Dehydroquinat wird die erste Doppelbindung des aromatischen Ringsystems eingeführt. Katalysiert wird diese Reaktion zu 3-Dehydroshikimat durch das Enzym Dehydroquinat-Dehydratase (EC 4.2.1.10).

Die anschließende Reduktion der Ketogruppe in Position 3 durch Shikimatdehydrogenase (EC 1.1.1.25) führt zur Synthese von Shikimat. Cosubstrat ist bei dieser Reaktion gewöhnlich NADPH.

Im fünften Schritt wird die Phosphorylierung von Shikimat unter ATP-Verbrauch zu Shikimat-3-phosphat durch Shikimatkinase (EC 2.7.1.71) katalysiert.

Durch Reaktion eines weiteren Moleküls PEP mit Shikimat-3-phosphat unter Abspaltung einer Phosphatgruppe entsteht der Enolpyruvylether 5-Enolpyruvyl-3-shikimatphosphat (EPSP). Diese Reaktion wird durch EPSP-Synthase (EC 2.5.1.19) katalysiert.

Durch die nachfolgende Eliminierung der Phosphatgruppe wird im letzten Schritt die zweite Doppelbindung in das Ringsystem eingeführt. Es findet die Bildung von Chorismat statt, katalysiert durch Chorismat-Synthase (EC 4.6.1.4). Die Bezeichnung „Chorismat“ leitet sich von dem griechischen Wort „choris“ ab, das ins Deutsche übersetzt „Zweig“ bedeutet. Vom Chorismat aus verzweigen sich die Biosynthesewege

in unterschiedliche Richtungen, wobei sich in verschiedenen Organismen eine Vielzahl möglicher Folgereaktionen anschließen.

Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin werden ausgehend von Chorismat über den Prephenatweg gebildet, während Tryptophan über die Anthranilatroute entsteht.

Die einzelnen Reaktionen und Intermediate des Shikimatweges sind in höheren Pflanzen und in Mikroorganismen identisch. Jedoch unterscheiden sich die beteiligten Enzyme zum Teil erheblich in ihrer Primärstruktur und die Organisation der Gene, die für diese Enzymaktivitäten codieren, variiert stark.

In den meisten Bakterien wird jeder der sieben Reaktionsschritte von einem eigenständigen Protein katalysiert und die dazugehörigen Gene lassen keine räumliche Nähe im Genom erkennen (Berlyn und Giles, 1969). In höheren Pflanzen werden die Schritte 3 und 4 des Shikimatweges hingegen durch ein bifunktionelles Enzym, die Dehydroquinat-Dehydratase/Shikimatdehydrogenase, katalysiert, während an den übrigen Schritten monofunktionale Enzyme beteiligt sind (Mousdale et al., 1987).

Sowohl in Pflanzen als auch in Bakterien existieren von vielen Enzymen des Shikimatweges mehrere Isoformen.

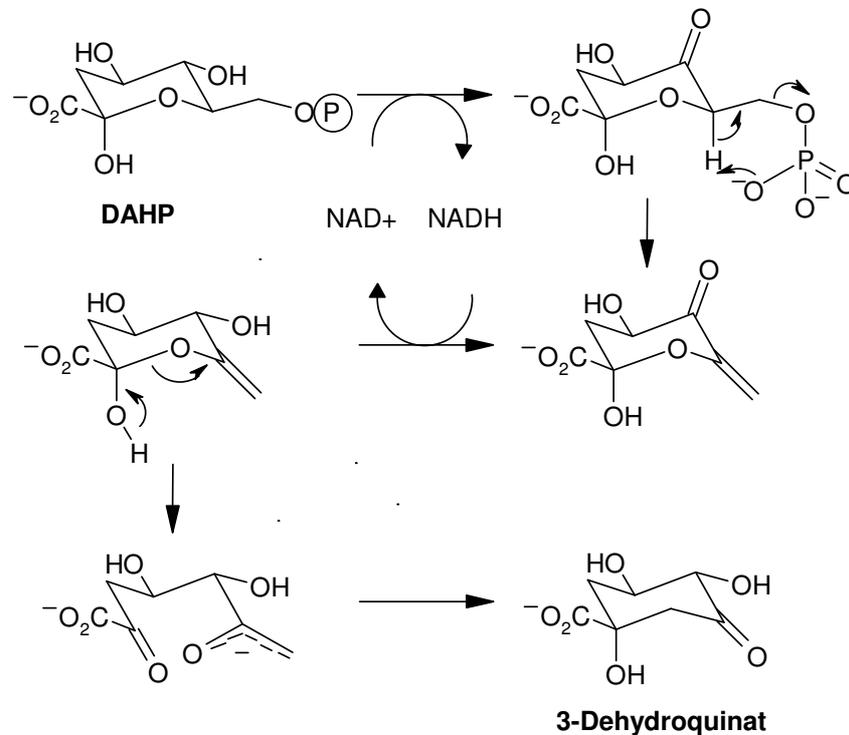
Zwischen den pflanzlichen Enzymen und den entsprechenden prokaryotischen Homologen gibt es eine höhere strukturelle Ähnlichkeit als zu den Enzymen pilzlicher Herkunft. Dies drückt sich auch in der gänzlich anderen Organisation der Enzyme in Pilzen aus. In Pilzen sind die fünf enzymatischen Reaktionsschritten 2 bis 7 in einem pentafunktionellen Polypeptid, dem sogenannten 'AROM-Komplex' zusammengefasst (Ahmed und Giles, 1969).

Die Enzyme des 'AROM-Komplexes' sind nicht in derselben Reihenfolge angeordnet wie die Reaktionen im Stoffwechsel ablaufen. Es gibt zwei Regionen innerhalb des Komplexes, wobei in der N-terminalen Hälfte die Domänen für 3-Dehydroquinat-Synthase und EPSP-Synthase liegen und in der C-terminalen Hälfte die Domänen für Shikimatkinase, Dehydroquinat-Dehydratase und Shikimatdehydrogenase (Hawkins und Smith, 1991).

#### **1.4.2 Reaktionsmechanismus der 3-Dehydroquinat-Synthase**

Das Enzym 3-Dehydroquinat-Synthase (DHQS) mit der EC-Nummer 4.2.3.4 gehört zur vierten Enzymhauptklasse und ist somit eine Lyase. Lyasen katalysieren die nicht-hydrolytische Spaltung eines Moleküls in zwei Produkte unter Bildung einer Doppelbindung oder einer Ringstruktur. Die Spaltung erfolgt an C-C-, C-O-, C-S-, C-N-

oder anderen Bindungen, jedoch nicht in Form einer Hydrolyse oder Oxidation. Chemisch gesehen handelt es sich um eine Eliminierung.



**Abb. 8: Der zweite Schritt des Shikimatweges: durch DHQS katalysierte Reaktion von DAHP zu 3-Dehydroquinat.** Die Reaktionsfolge umfasst Oxidation,  $\alpha,\beta$ -Eliminierung, Reduktion, Ringöffnung und intramolekulare Aldolkondensation.

DHQS katalysiert den zweiten Schritt des Shikimatweges, die Umsetzung von 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphat (DAHP) zu 3-Dehydroquinat (Abb. 8). Diese Umsetzung setzt sich aus einer Reihe unterschiedlicher Reaktionen zusammen. Im ersten Schritt wird die Hydroxy-Gruppe an C-5 von DAHP unter Verbrauch von  $\text{NAD}^+$  oxidiert. Es entsteht ein Keton, dessen Phosphatrest durch eine  $\alpha,\beta$ -Eliminierung abgespalten wird. Anschließend wird die im ersten Schritt gebildete Ketogruppe wieder reduziert, wobei  $\text{NAD}^+$  regeneriert wird. Die Reaktion ist insgesamt also redox-neutral. Im vierten Schritt erfolgt die Öffnung des Halbacetals und es entsteht ein intermediäres Enolat-Ion, das anschließend durch eine intramolekulare Aldolkondensation zum Endprodukt 3-Dehydroquinat zyklisiert.

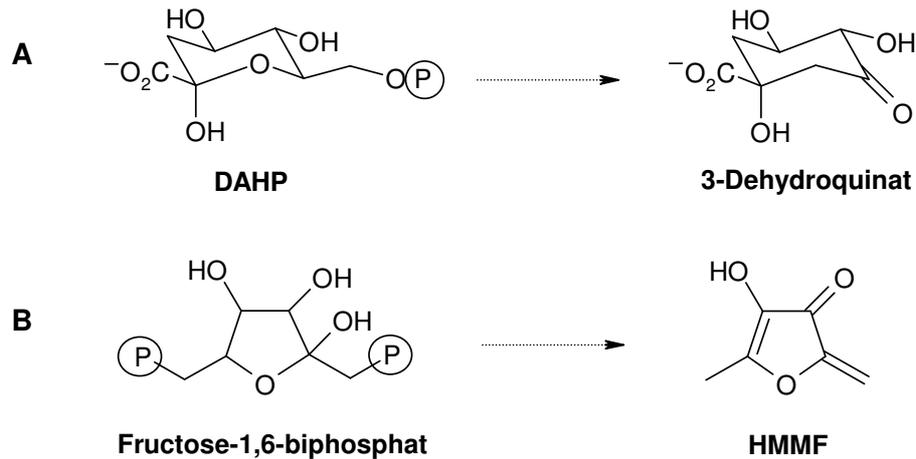
Neben katalytischen Mengen des Cosubstrats  $\text{NAD}^+$  benötigt DHQS auch ein divalentes Metallion als Cofaktor. Abhängig vom jeweiligen Organismus kann beispielsweise  $\text{Zn}^{2+}$  oder  $\text{Co}^{2+}$  für die vollständige katalytische Aktivität des Enzyms als Cofaktor notwendig sein (Bischoff et al., 1996; Dewick, 1995a)

Es ist zu beachten, dass die beiden Wasserstoffatome an der Position C-7 des DAHP fixiert bleiben und sich somit im Produkt an der Stelle C-2 befinden.

DHQS wurde lange als ein „katalytisches Wunder“ angesehen wegen der Fähigkeit mehrere aufeinanderfolgende chemische Reaktionen an einem aktiven Zentrum durchzuführen (Carpenter et al., 1998). Es gab jedoch erhebliche Diskussionen darüber, ob DHQS aktiv in alle Schritte involviert ist oder ob einige Schritte spontan ablaufen. Es ist außergewöhnlich, dass ein relativ kleines monomeres Enzym (Frost et al., 1984) eine Reaktionsfolge katalysiert, die vier unterschiedliche Reaktionsmechanismen umfasst: Redox-Reaktionen, eine  $\alpha,\beta$ -Eliminierung, eine Ringöffnung und eine intramolekulare Aldolkondensation (Widlanski et al., 1989). Mittlerweile scheint festzustehen, dass nicht alle Schritte aktiv katalysiert werden, sondern dass DHQS wahrscheinlich nur für den Oxidations- und Reduktionsschritt verantwortlich ist und somit die intermediär entstehende Enolpyranose das eigentliche Reaktionsprodukt ist (Bartlett et al., 1994; Bartlett und Satake, 1988; Dewick, 1995b). Jedoch wird angenommen, dass durch die Bindung an das Enzym eine bestimmte Konformation vorgegeben ist und so ausschließlich 3-Dehydroquinat entsteht und keine unerwünschten Nebenprodukte wie beispielweise 1-*epi*-3-Dehydroquinat gebildet werden.

#### **1.4.3 Mögliche Beteiligung der 3-Dehydroquinat-Synthase an der HDMF-Biosynthese**

Ausgangsprodukt der Biosynthese von HDMF in der Erdbeerfrucht ist D-Fructose-1,6-diphosphat. Die gesamte Kohlenstoffkette dieser Verbindung findet sich nach der Bildung des Aromastoffs in HDMF wieder (Schwab, 1998). Die Biosynthese verläuft über das reaktive Zwischenprodukt HMMF, das durch das Enzym FaEO zu HDMF reduziert wird (Klein et al., 2007). Welches Enzym an der Katalyse der Reaktionen von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HMMF beteiligt ist, ist bislang noch nicht geklärt. Um von der Ausgangsverbindung D-Fructose-1,6-diphosphat zu HMMF zu gelangen, muss eine Folge verschiedener Reaktionen ablaufen, die eine Dephosphorylierung und eine Dehydratisierung umfassen. Diese Abfolge ähnelt der durch DHQS katalysierten Reaktionsabfolge, die eine Oxidation, Eliminierung der Phosphatgruppe, Reduktion, Ringöffnung und intramolekulare Aldolkondensation umfasst. Auch die Edukte und Produkte beider Reaktionen weisen strukturelle Ähnlichkeiten auf, die in Abb. 9 dargestellt sind.



**Abb. 9: Edukte und Produkte der ablaufenden Reaktionen:** Reaktion von DAHP zu 3-Dehydroquinat (**A**), Reaktion von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HMMF (**B**).

Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeiten und der ablaufenden Reaktionsfolgen besteht die Möglichkeit, dass die Reaktion von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HMMF eine Nebenreaktion der DHQS darstellt und durch dieses Enzym katalysiert wird. Eine derartige Nebenreaktion einer DHQS ist bislang noch nicht beschrieben. Um diese Hypothese einer durch DHQS katalysierten Nebenreaktion, die zu dem Zwischenprodukt HMMF der HDMF-Biosynthese führt, zu bestätigen, wäre die funktionelle Charakterisierung einer DHQS aus der Erdbeere notwendig.

## 1.5 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten neue Erkenntnisse zur Biosynthese von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon erlangt werden.

Durch vorangegangene Studien wurde der in Abb. 4 gezeigte Biosyntheseweg für HDMF in der Erdbeerfrucht postuliert (Roscher et al., 1998). Die Biosynthese verläuft demnach ausgehend von D-Fructose-1,6-diphosphat über das reaktive Zwischenprodukt 4-Hydroxy-5-methyl-2-methylen-3(2*H*)-furanon zu HDMF. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Umsetzung von HMMF zu HDMF durch die Enon-Oxidoreduktase FaEO katalysiert wird, wodurch der letzte Schritt in der Biosynthese von HDMF aufgeklärt wurde (Klein et al., 2007). Durch einen Abgleich der cDNA-Sequenz der FaEO mit einer Tomaten-Expressions-Bibliothek wurde eine Vollängen-cDNA aus der Tomate gefunden, deren Proteinsequenz zu 71 % mit der Sequenz der FaEO übereinstimmt. Sowohl FaEO als auch das entsprechende Enzym SIEO aus der Tomate wurden kloniert, in *E.coli* heterolog exprimiert und die kinetischen Daten der FaEO für die Umsetzung von HMMF und verschiedenen HMMF-Derivaten

bestimmt. In dieser Arbeit sollten die kinetischen Daten der SIEO ermittelt werden um die funktionelle Charakterisierung dieser zwei Enzyme abzuschließen, wofür zunächst die Synthese der HMMF-Derivate nötig war.

Um einen Einblick in das Proteom der Erdbeerfrucht zu erhalten und die Auswirkungen einer dauerhaften Stilllegung des für FaEO codierenden Genabschnitts auf das Proteom festzustellen, sollten transgene Erdbeerfrüchte mittels 2-D-Gelelektrophorese untersucht werden. Um die Auswirkungen auf Metabolitebene zu beobachten, wurden Untersuchungen von Extrakten der transgenen Früchte mit Hochleistungsflüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS) durchgeführt.

Parallel dazu sollte ein weiterer Schritt in der Biosynthese von HDMF aufgeklärt werden, die Reaktion von D-Fructose-1,6-diphosphat zu 4-Hydroxy-5-methyl-2-methylen-3(2H)-furanon (HMMF). Hierfür sollte zunächst versucht werden, ein an der Umsetzung beteiligtes Enzym mittels klassischer Proteinaufreinigung mit anschließenden Aktivitäts-Assays partiell zu reinigen und zu charakterisieren. Durch Vergleich der Edukte und Produkte und den während der Umsetzung ablaufenden Reaktionen wurde eine Ähnlichkeit zwischen der während der HDMF-Biosynthese ablaufenden Reaktion und der durch DHQS katalysierten Reaktionsabfolge entdeckt. Durch Klonierung, heterologe Expression und funktionelle Charakterisierung einer DHQS aus Erdbeeren sollte eine mögliche Rolle dieses Enzyms bei der HDMF-Biosynthese aufgeklärt werden.

Da die Aromakomponente HDMF auch in anderen Früchten, wie in Weintrauben, gebildet wird (Rapp et al., 1980), sollte auch eine DHQS aus *Vitis vinifera* mit in die Untersuchungen einbezogen werden.

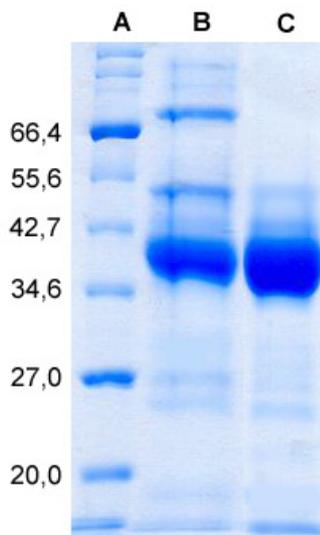
## 2 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 2.1 Charakterisierung der *Solanum lycopersicum* Enon-Oxidoreduktase

Die in der Erdbeerfrucht an der Biosynthese von HDMF beteiligte *Fragaria x ananassa* Enon-Oxidoreduktase FaEO ist bereits in einer früheren Arbeit heterolog exprimiert und charakterisiert worden (Klein et al., 2007). Um die zu 71% mit der Proteinsequenz der FaEO übereinstimmende *Solanum lycopersicum* Enon-Oxidoreduktase SIEO zu charakterisieren und die kinetischen Daten zu bestimmen, wurde auch dieses Enzym heterolog exprimiert und mit verschiedenen Substraten umgesetzt. Die eingesetzten Substrate wurden zunächst synthetisiert und aufgereinigt. Nach erfolgter Umsetzung wurden die gebildeten Produkte mittels Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS) quantifiziert.

#### 2.1.1 Expression und Aufreinigung von SIEO

Zur heterologen Expression der SIEO wurde der Vektor pET 29a(+) verwendet. Dieser Vektor enthält eine für einen His-Tag kodierende Sequenz. Bei der Expression entsteht so ein Fusionsprotein aus der ursprünglichen Zielsequenz und dem His-Tag am C-terminalen Ende, wodurch eine Aufreinigung des Enzym aus dem Rohextrakt mittels Affinitätschromatographie ermöglicht wird. Als Wirt dient der proteasedefiziente *Escherichia coli*-Stamm BL 21 (DE3) *pLysS*. Die Expression wurde bei einer Temperatur von 16°C durchgeführt, um durch die verlangsamte Proteinsynthese möglichst große Mengen an nativem funktionstüchtigem Protein zu erhalten. Nach der Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie, bei der der His-Tag mit matrixgebundenem  $\text{Co}^{2+}$  chelatiert wird, wurde zur weiteren Aufreinigung die Methode der Ultrafiltration eingesetzt. Durch den Einsatz von Ultrafiltrationseinheiten mit Membranausschlussgrößen von 50 kDa und 30 kDa war es möglich, Proteine mit einem Molekulargewicht größer 50 kDa abzutrennen und den Anteil an Proteinen mit einem Molekulargewicht kleiner 30 kDa zu verringern. Das Zielprotein mit einem Molekulargewicht von 41,7 kDa konnte so in höherer Reinheit erhalten werden. Die Überprüfung der Expression und Aufreinigung erfolgte durch Auftrennung mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung (Abb. 10). Die so erhaltene aufgereinigte Proteinfraction wurde für die Versuche zur Charakterisierung und zur Bestimmung der kinetischen Daten eingesetzt.



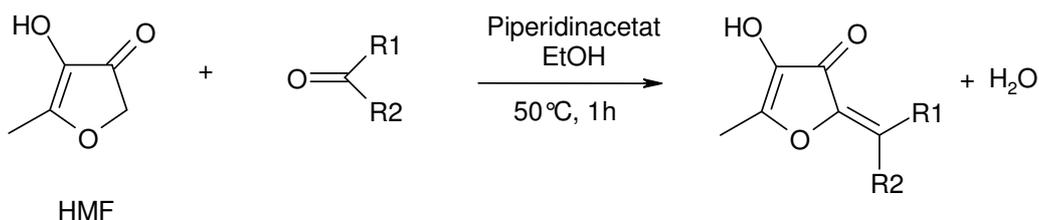
**Abb. 10: SDS-PAGE von SIEO-Proteinlösungen nach Aufreinigung einer Expressionskultur mittels Affinitätschromatographie und Ultrafiltration.** Aufgetragen wurden die Proteinlösung nach Affinitätschromatographie (**B**), nach anschließender Ultrafiltration (**C**) sowie ein Molekulargewichtsmarker in kDa (**A**).

### 2.1.2 Synthese von ungesättigten 4-Hydroxy-3(2H)-furanonen als Substraten

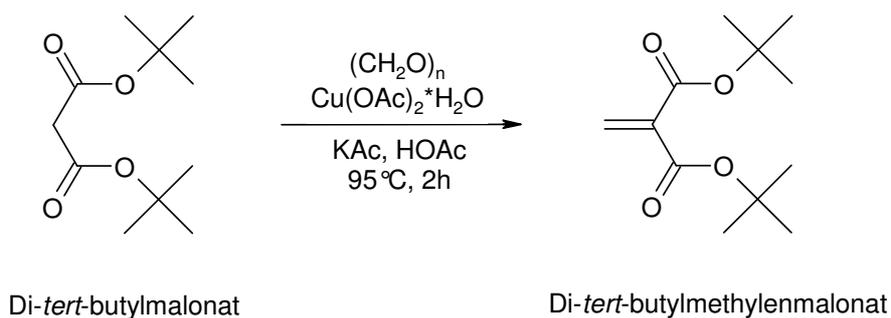
Das natürliche Substrat sowohl von FaEO als auch von SIEO ist HMMF. Da HMMF als  $\alpha,\beta$ -ungesättigtes Keton sehr reaktiv ist, weil Alkohole, Thiole und Wasser an die exocyclische Doppelbindung addiert werden können (Vollhardt et al., 2000), ist die Synthese von HMMF zwar möglich, es kann jedoch aufgrund der Instabilität nicht zur Bestimmung der kinetischen Daten eingesetzt werden. Um diese Enzyme dennoch zu charakterisieren und kinetische Daten zu bestimmen, wurden in einer früheren Arbeit zur Charakterisierung von FaEO strukturell verwandte Substrate eingesetzt, die aufgrund einer längeren Seitenkette erhöhte Stabilität gegenüber Additionsreaktionen als HMMF aufweisen. Da diese HMMF-ähnlichen Substanzen nicht kommerziell bezogen werden können, wurden die Substanzen selbst synthetisiert.

#### 2.1.2.1 Synthesebedingungen

4-Hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon (HMF) kondensiert unter Bedingungen der Maillard-Reaktion mit Zuckerabbauprodukten, die eine Carbonylfunktion besitzen, zu ungesättigten Bräunungsprodukten (Ledl und Severin, 1978). In Modellversuchen wurde gezeigt, dass HMF mit verschiedenen aliphatischen, aromatischen und heterocyclischen Aldehyden und Ketonen mit Piperidinacetat als Katalysator zu farbigen Verbindungen reagiert (Abb. 11).



**Abb. 11: Umsetzung von 4-Hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon (HMF) mit Aldehyden oder Ketonen zu Bräunungsprodukten (Ledl und Severin, 1978), z. B. R1 = CH<sub>3</sub> und R2 = CH<sub>3</sub>, R1 = CH<sub>3</sub> und R2 = CH(OH)CH<sub>3</sub> oder R1 = H und R2 = CH=N-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.**

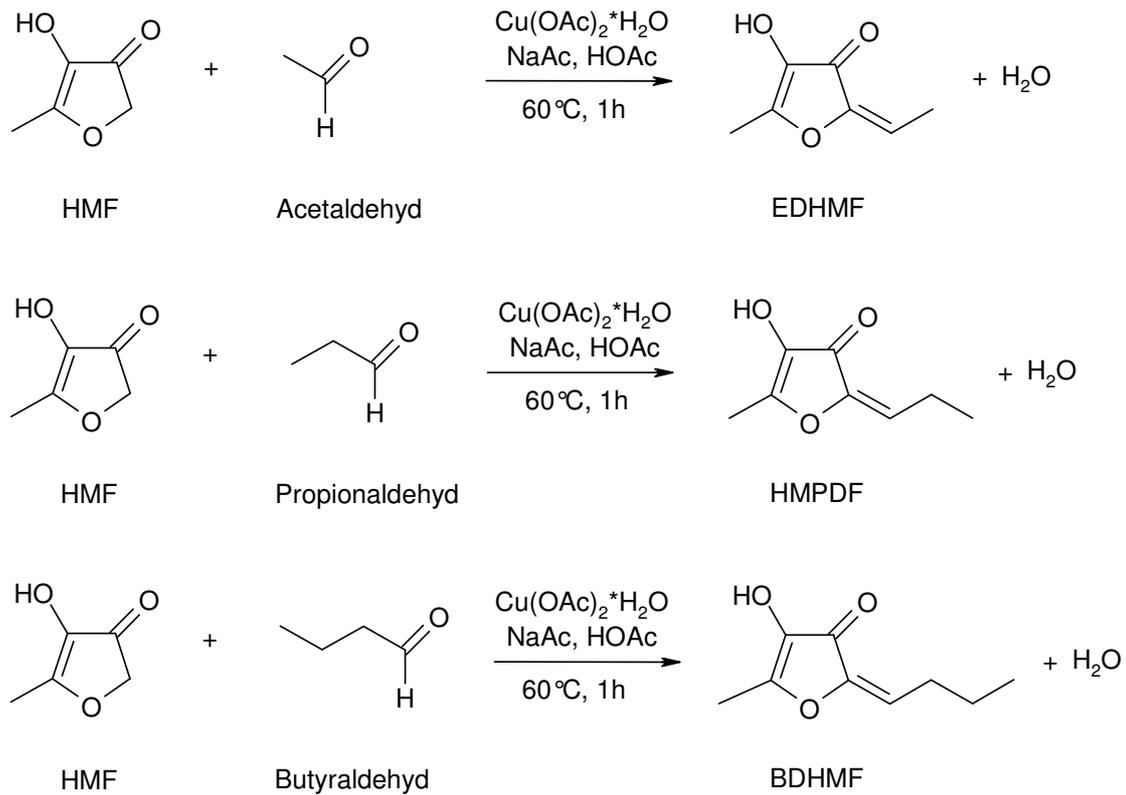


**Abb. 12: Umsetzung von Di-*tert*-butylmalonat mit Paraformaldehyd zu Di-*tert*-butylmethylene malonat (Ballesteros et al., 1983).**

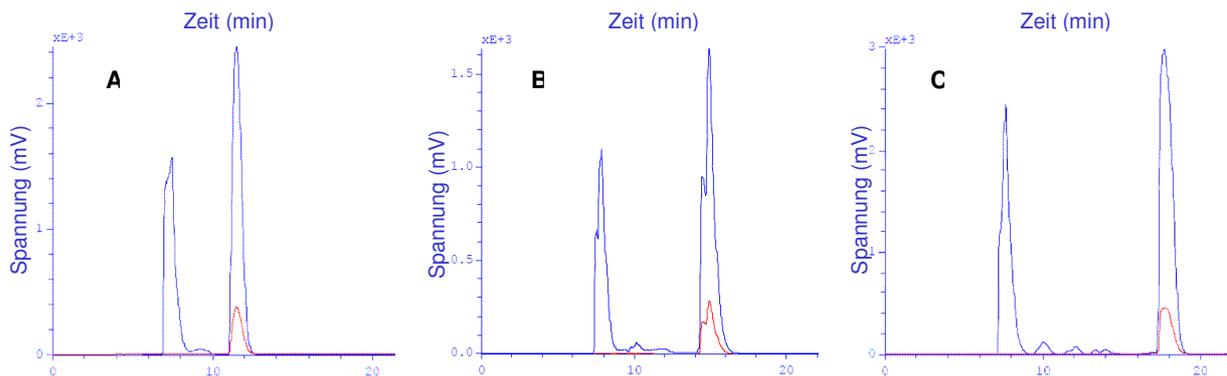
Durch eine Knoevenagel-Reaktion zwischen Di-*tert*-butylmalonat und Paraformaldehyd entsteht unter Zugabe von Kaliumacetat und Kupferacetat in Essigsäure Di-*tert*-butylmethylene malonat (Abb. 12) (Ballesteros et al., 1983). Di-*tert*-butylmethylene malonat spielt als elektrophiles Alken eine wichtige Rolle bei organischen Synthesen. In Anlehnung an die beiden Methoden wurden die ungesättigten 4-Hydroxy-3(2H)-furanone durch Reaktion von HMF mit verschiedenen Aldehyden synthetisiert. Die ablaufenden Reaktionen und die Reaktionsbedingungen sind in Abb. 13 dargestellt.

#### 2.1.2.2 Aufreinigung der Syntheseprodukte

Die erhaltenen Syntheseprodukte wurden mittels präparativer HPLC aufgereinigt, wodurch das eingesetzte Substrat HMF und Nebenprodukte aus dem Reaktionsansatz entfernt wurden. Die synthetisierten Substrate weisen Absorptionsmaxima bei 259 nm und 349 nm auf, wohingegen HMF nur ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 259 nm besitzt. Durch UV-Detektion mit den Wellenlängen 259 nm und 349 nm war so sehr einfach möglich, die Syntheseprodukte von der Ausgangssubstanz zu unterscheiden. Die Retentionszeiten der Substanzen EDHMF, HMPDF und BDHMF nehmen bei einer HPLC-Trennung an einer RP-Phase mit zunehmender Länge der Kohlenstoffkette am C2-Rest der Grundstruktur zu (Abb. 14). Die Reinheit der synthetisierten Substrate wurde anschließend mittels LC-MS-Untersuchung überprüft.



**Abb. 13: Synthese der ungesättigten 4-Hydroxy-3(2H)-furanone durch Reaktion von HMF mit verschiedenen Aldehyden.** (EDHMF: 2-Ethyliden-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon, HMPDF: 4-Hydroxy-5-methyl-2-propyliden-3(2H)-furanon, BDHMF: 2-Butyliden-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon)

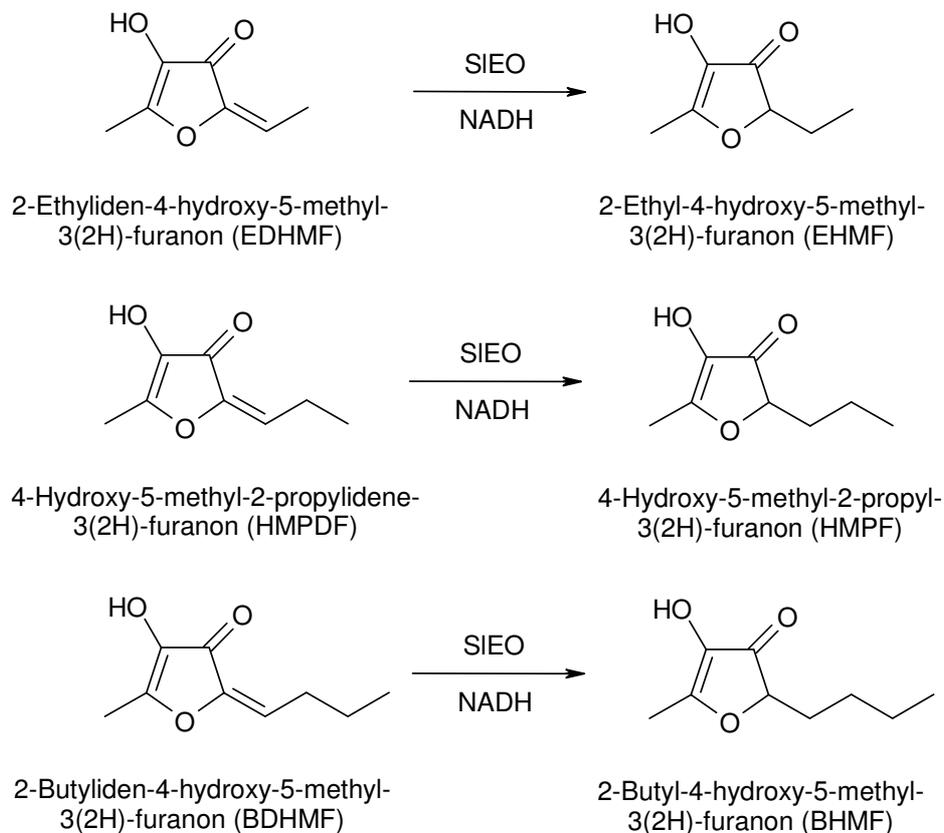


**Abb. 14: Chromatogramme der präparativen HPLC-Aufreinigung der synthetisierten Substrate EDHMF (A), HMPDF (B) und BDHMF (C).** UV-Detektion mit Wellenlänge 259 nm (blaue Linie) und 349 nm (rote Linie).

### 2.1.3 Bestimmung der kinetischen Daten von SIEO

SIEO ist eine Oxidoreduktase und benötigt daher zur Umsetzung zusätzlich zum Substrat ein Reduktionsäquivalent wie NADH oder NADPH. Bei einer solchen Reaktion von zwei Edukten zu einem Produkt spricht man von einer Reaktion zweiter Ordnung, deren Reaktionsgeschwindigkeit abhängig von den Konzentrationen der beiden Edukte ist. In dem Sonderfall, dass eines der beiden Edukte in einem sehr hohen Überschuss vorliegt, ist die Konzentrationsänderung dieses Edukts über die Zeit der Reaktion verschwindend gering und die Reaktionsgeschwindigkeit folgt den Gesetzmäßigkeiten einer Reaktion erster Ordnung. Wenn dieser Fall vorliegt, ist es bei dieser sogenannten Reaktion pseudoerster Ordnung möglich, die kinetischen Daten für das andere Edukt aufzunehmen. Bei der untersuchten Reaktion wurde daher das Reduktionsäquivalent NADH im Überschuss zugegeben und somit war die Bestimmung von  $K_M$ -,  $k_{kat}$ - und  $v_{max}$ -Werten für die eingesetzten Substrate möglich.

Da das natürliche Substrat HMMF nicht zur Aufnahme der kinetischen Daten eingesetzt werden kann, wurden die strukturell verwandten 4-Hydroxy-3(2H)-furanone EDHMF, HMPDF und BDHMF verwendet (Abb. 15).



**Abb. 15:** Durch SIEO katalysierte enzymatische Umsetzung der ungesättigten 4-Hydroxy-3(2H)-furanone zu den entsprechenden gesättigten Verbindungen.

Für die Konzentrationsbestimmung der in der Enzymreaktion gebildeten Produkte wurde eine Kalibriergerade mit der kommerziell erhältlichen Substanz EHMF aufgenommen. Da die anderen Produkte nicht kommerziell erhältlich sind, wurde aufgrund der ähnlichen Ionisation die EHMF-Kalibriergerade für die Berechnung aller Kinetiken verwendet. Die erhaltenen Mengen an BHMF und HMPF sind somit als „EHMF-Äquivalente“ anzusehen.

Die Substrate EDHMF, HMPDF und BDHMF wurden für jede Messreihe frisch synthetisiert und aufgereinigt und als Reinsubstanz eingewogen. Von den anschließend in Ethanol gelösten Substraten wurden definierte Mengen (140  $\mu\text{M}$  – 7,5 mM) mit 3  $\mu\text{g}$  des aufgereinigten Enzyms sowie mit NADH (12 mM) in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) für 35 min inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend mittels LC-MS gemessen und die Menge an entstandenem Produkt über das Verhältnis zum Internen Standard HDMF berechnet. Die Auswertung erfolgte über das Linearisierungsverfahren von Hanes mit dem Programm Hyper32 (Version 1.0.0).

Zur Bestimmung der Parameter  $v_{\text{max}}$ ,  $K_{\text{M}}$ , und  $k_{\text{kat}}$ , die eine enzymatische Reaktion charakterisieren, wurde die in jedem Reaktionsansatz eingesetzte Stoffmenge gegen den Mittelwert der Umsatzgeschwindigkeit  $v$ , berechnet aus der Doppelbestimmung, aufgetragen.

Mit dem Auswerteprogramm Hyper32 wurden aus den entsprechenden Wertepaaren für Substratkonzentration und Umsatzgeschwindigkeit über den jeweiligen Hanes Plot die Enzymparameter  $v_{\text{max}}$  und  $K_{\text{M}}$  für die eingesetzten Substrate berechnet. Die Wechselzahl  $k_{\text{kat}}$  wurde durch Division der maximalen Umsatzgeschwindigkeit durch die Enzymkonzentration im Test erhalten. Die katalytische Effizienz wurde über Division von  $k_{\text{kat}}$  und  $K_{\text{M}}$  berechnet.

**Tab. 2: Kinetische Daten von SIEO im Vergleich mit FaEO für die Reduktion der Substrate EDHMF, HMPDF und BDHMF zu den Produkten EHMF, HMPF und BHMF:  $v_{\text{max}}$ ,  $K_{\text{M}}$ ,  $k_{\text{kat}}$  und  $k_{\text{kat}} / K_{\text{M}}$  (Klein et al., 2007).**

	$v_{\text{max}}$ [nmol s <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ]		$K_{\text{M}}$ [mM]		$k_{\text{kat}}$ [s <sup>-1</sup> ]		$k_{\text{kat}} / K_{\text{M}}$ [s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]	
	SIEO	FaEO	SIEO	FaEO	SIEO	FaEO	SIEO	FaEO
EDHMF	9,41 ± 0,07	56 ± 3	1,59 ± 0,02	2,14 ± 0,07	0,39 ± 0,01	1,94 ± 0,03	0,25 ± 0,01	0,90 ± 0,03
HMPDF	8,05 ± 1,58	78 ± 9	2,41 ± 1,06	1,04 ± 0,26	0,34 ± 0,05	2,69 ± 0,50	0,14 ± 0,06	2,60 ± 0,50
BDHMF	3,68 ± 0,02	41 ± 17	1,13 ± 0,01	0,82 ± 0,40	0,15 ± 0,01	1,43 ± 0,7	0,14 ± 0,01	1,90 ± 0,95

Aus den in Tab. 2 dargestellten Ergebnissen der Bestimmung der kinetischen Daten für SIEO lässt sich ableiten, dass EDHMF mit einer katalytischen Effizienz von  $0,25 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  das beste Substrat für SIEO ist, gefolgt von HMPDF und BDHMF mit einer katalytischen Effizienz von jeweils  $0,14 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ .

#### 2.1.4 Diskussion

Die heterologe Expression der SIEO wurde nach Standardprotokollen durchgeführt und die Aufreinigung erfolgte über Affinitätschromatographie mittels His-Tag. Um SIEO in möglichst reiner Form zu erhalten und um störende bakterielle Enzyme abzutrennen wurde ein weiterer Aufreinigungsschritt über Ultrafiltration angewendet, der bereits von Raab et al. (2006) zur Aufreinigung der FaEO (damals noch als FaQR bezeichnet) beschrieben wurde.

Im Vergleich zur 322 Aminosäuren umfassenden Sequenz der FaEO ist die Proteinsequenz der SIEO um 66 Aminosäuren länger und umfasst 388 Aminosäuren. Die zusätzlichen Aminosäuren, die SIEO am N-Terminus enthält, könnten ein Transit-Protein darstellen, das den Transport des Proteins in Chloroplasten vermittelt. Durch das Transit-Peptid kommt auch der Unterschied im Molekulargewicht zustande, während FaEO ein berechnetes Molekulargewicht von 34,3 kDa hat, liegt das berechnete Molekulargewicht von SIEO mit 41,7 kDa über dem der FaEO. Die genaue Molekulargewichtsbestimmung des exprimierten Enzyms mittels SDS-PAGE ist schwierig, da die Bande relativ breit ist, jedoch liegt die Bande etwas unterhalb der 42,7 kDa-Markerbande und stimmt somit gut mit dem berechneten Molekulargewicht überein. Durch die Ultrafiltrations-Aufreinigung ergibt sich, dass es sich bei dem vorliegenden aktiven Enzym um ein Monomer handelt. Zwar ist diese Tatsache für eine Chinon-Oxidoreduktase eher ungewöhnlich, da diese Enzyme häufig als Homodimere, Homotetramere oder Multimere vorliegen (Kim et al., 2003; Maruyama et al., 2003; Patridge und Ferry, 2006), aber es steht in Einklang mit dem Vorkommen der FaEO, die auch als Monomer vorliegt (Raab et al., 2006).

Die Einteilung von pflanzlichen Chinon-Oxidoreduktasen in DT-Diaphorase-ähnliche und  $\zeta$ -Crystallin-ähnliche Enzyme erfolgt aufgrund des unterschiedlichen Reaktionsmechanismus, einer Ein- bzw. Zwei-Elektronen-Übertragung. DT-Diaphorase katalysiert die Übertragung von zwei Elektronen auf Chinon, wodurch das stabile Produkt Hydrochinon gebildet wird.  $\zeta$ -Crystalline katalysieren bei chinoiden Substraten hingegen eine Ein-Elektronen-Übertragung, die zur Entstehung von reaktiven Semichinonradikalen führt. Neuere Forschungsergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass der Reaktionsmechanismus einiger Oxidoreduktasen abhängig ist von dem zur Verfügung stehenden Substrat (Mano et al., 2000).

Die in der Pflanze durch die NAD(P)H-abhängigen Enon-Oxidoreduktasen FaEO und SIEO katalysierte Reaktion von HMMF zu HDMF stellt wahrscheinlich eine Zwei-Elektronen-Übertragung dar. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dieser Reaktion um zwei direkt nacheinander ablaufende Ein-Elektronen-Übertragungen handelt, bei denen sich das Intermediat nicht vom Enzym-Substrat-Komplex lösen kann, ein Mechanismus der für die von DT-Diaphorase katalysierte Reaktion bereits vorgeschlagen wurde (Tedeschi et al., 1995).

In einem Substratscreening, das mit heterolog exprimierter FaEO durchgeführt wurde, wurde festgestellt, dass FaEO keine der folgenden  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonylverbindungen umsetzt: 2*E*-Hexenal, 3*E*-Hexen-2-on, 5-Methyl-3*E*-hexen-2-on, 1,2-Cyclohexadion, 2,3-Butandion, Cumarin, Astaxanthin, Zimtaldehyd, *p*-Cumarsäure, Ferulasäure, Dimethoxyzimsäure und Benzil. Die einzigen Substanzen, die in diesem Screening zu ihren gesättigten Derivaten umgesetzt wurden, waren die synthetisierten Substanzen HMMF, EDHMF, HMPDF und BDHMF (Klein et al., 2007). Aufgrund der Erkenntnisse über die strukturellen Anforderungen an die Substrate und der Tatsache, dass FaEO und auch SIEO eine Doppelbindung, die einer Carbonylgruppe benachbart ist, reduzieren ohne die Carbonylgruppe zu verändern, wurden die ursprünglich als Chinon-Oxidoreduktasen bezeichneten Enzyme in Enon-Oxidoreduktasen umbenannt. Da eine hohe Übereinstimmung in der Proteinsequenz von FaEO und SIEO gegeben ist und die beiden Enzyme in der Pflanze die gleiche Reaktion katalysieren, wurde für SIEO kein weiteres Substratscreening durchgeführt. Die Ermittlung von kinetischen Daten für das natürliche Substrat HMMF war aufgrund der hohen Reaktivität und Instabilität der Substanz nicht möglich. Es wurden daher die biochemischen Daten von SIEO mit EDHMF, HMPDF und BDHMF als Substraten bestimmt.

Da die zu testenden Substanzen nicht kommerziell erhältlich sind, war es notwendig die Verbindungen zu synthetisieren. Die Umsetzung von HMF mit verschiedenen Aldehyden führt nach Ledl et al. (1978) zu einem großen Spektrum an  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Verbindungen. Durch Reaktion von HMF mit den Aldehyden Acetaldehyd, Propionaldehyd und Butyraldehyd war es möglich, die stabilen ungesättigten 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanone EDHMF, HMPDF und BDHMF zu erhalten.

Um das Enzym SIEO zu charakterisieren, wurde die enzymkinetischen Parameter  $v_{\max}$ ,  $K_M$ ,  $k_{\text{kat}}$  und  $k_{\text{kat}} / K_M$  bestimmt und mit den Daten von FaEO verglichen (Tab. 2).

Enzymatisch katalysierte Reaktionen sind durch das Phänomen der Sättigung gekennzeichnet: Auch bei sehr hohen Substratkonzentrationen kann die Umsatzgeschwindigkeit  $v$  eines Enzyms nicht über eine maximale Umsatzgeschwindigkeit  $v_{\max}$  hinausgehen. Angegeben wird die Umsatzgeschwindigkeit  $v$  als Substratstoffmenge, die pro Sekunde pro mg Enzym umgesetzt wird. Die

maximalen Umsatzgeschwindigkeiten von SIEO für die drei untersuchten Substrate EDHMF, HMPDF und BDHMF sind jeweils etwa um den Faktor 6 - 11 niedriger als die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten der FaEO. Die daraus berechnete Wechselzahl gibt an, wie viele Moleküle des Substrats vom aktiven Zentrum des Enzyms pro Sekunde umgesetzt werden.

Auch die Wechselzahlen für die drei Substrate liegen bei SIEO jeweils etwa um den Faktor 5 - 10 niedriger als die Wechselzahlen der FaEO. Da sich die Wechselzahl  $k_{\text{kat}}$  auf die Anzahl der umgesetzten Substratmoleküle pro Enzymmolekül bezieht, ist diese als ein besseres Maß für die vergleichende Charakterisierung von Enzymen anzusehen als die maximale Umsatzgeschwindigkeit: Das Enzym SIEO setzt bei Substratsättigung von den Substraten EDHMF und HMPDF 0,39 bzw. 0,34 Moleküle pro Sekunde um, von dem Substrat BDHMF 0,15 Moleküle. BDHMF wird im aktiven Zentrum der SIEO daher weniger schnell reduziert als die Substrate EDHMF und HMPDF, was sich möglicherweise durch die längere Kohlenstoffkette am C-2-Rest des Furanonrings erklären lässt.

Das Enzym FaEO reduziert bei Substratsättigung pro Sekunde 1,94 Moleküle EDHMF, 2,69 Moleküle HMPDF und 1,43 Moleküle BDHMF. Die Umsetzung des Substrats HMPDF durch FaEO erfolgt daher am schnellsten, gefolgt von EDHMF und BDHMF. Jedoch unterscheiden sich die Wechselzahlen für die Reduktion der drei Substrate nur gering, was bedeuten könnte, dass die Länge der Kohlenstoffkette des C2-Rests des Furanonrings einen eher unbedeutenden Einfluss auf die Umsetzung durch FaEO hat. Da es sich bei EDHMF, HMPDF und BDHMF um HMMF-analoge Verbindungen handelt, die sich ausschließlich in der Länge des C2-Kohlenstoffrests unterscheiden, ist stark anzunehmen, dass sich die Wechselzahlen der beiden Enzyme SIEO und FaEO für ihr natürliches Substrat HMMF im selben Rahmen bewegen, wie die bestimmten Wechselzahlen für die drei untersuchten Substrate.

Die Anzahl der Substratmoleküle EDHMF, HMPDF und BDHMF, die von der FaEO und SIEO pro Sekunde reduziert werden, sind eher im niedrigen Bereich angesiedelt. Die höchsten Wechselzahlen erreichen beispielsweise Enzyme wie die NADPH Chinon-Oxidoreduktase (EC 1.6.99.6) aus *Kluyveromyces marxianus* für das Substrat 1,4-Benzochinon mit 950000 [1/s] oder die Katalase (EC 1.11.1.6) beim Abbau des Zellgiftes  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit 950000 [1/s] (Daten aus BRENDA The Enzyme Information System, (Chang et al., 2009).

Ein weiterer Parameter für die Charakterisierung von Enzymen ist die Michaeliskonstante  $K_M$ . Sie ist als ein Maß für die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat anzusehen und ist als diejenige Substratkonzentration zu verstehen, bei der die halb-maximale Umsatzgeschwindigkeit  $v$  erreicht wird. Je niedriger die

Michaeliskonstante ist, desto höher ist die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat. Bei SIEO wurde die höchste Affinität für das Substrat BDHMF gemessen, ( $K_M = 1,13 \text{ mM}$ ) gefolgt von den Substraten EDHMF ( $K_M = 1,59 \text{ mM}$ ) und HMPDF ( $K_M = 2,41 \text{ mM}$ ). FaEO zeigt die höchste Affinität für das Substrat BDHMF ( $K_M = 0,82 \text{ mM}$ ), gefolgt von den Substraten HMPDF ( $K_M = 1,04 \text{ mM}$ ) und EDHMF ( $K_M = 2,14 \text{ mM}$ ).

Die Affinitäten von SIEO und FaEO zu den getesteten Substraten unterscheiden sich insgesamt jedoch nur in geringem Maße, weshalb angenommen werden kann, dass die Länge der Kohlenstoffkette am C2-Rest des Furanonrings für die Affinität der Enzyme zu ihren Substraten eine eher untergeordnete Rolle spielt. Einen größeren Einfluss auf die Affinität scheinen eher die Furanonstruktur und funktionelle Gruppen wie die Ketogruppe zu haben.

Unter physiologischen Bedingungen sind Enzyme meist nicht mit Substrat gesättigt, was bedeutet, dass nicht die maximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht wird. Ein für die Bestimmung der Wirksamkeit eines Enzyms sinnvoller Parameter ist daher die Angabe der katalytischen Effizienz  $k_{\text{kat}} / K_M$ , in welche die Wechselzahl und die Michaeliskonstante eines Enzyms mit eingehen. Je größer die Wechselzahl  $k_{\text{kat}}$  und je kleiner die Michaeliskonstante  $K_M$ , desto größer ist die katalytische Effizienz eines Enzyms ( $k_{\text{kat}}$ -über- $K_M$ -Kriterium).

Die katalytische Effizienz der SIEO ist mit  $0,25 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$  für das Substrat EDHMF am größten, für die Substrate HMPDF und BDHMF ist sie gleich groß ( $k_{\text{kat}} / K_M = 0,14 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ). FaEO katalysiert dagegen die Reduktion von HMPDF mit der größten Effizienz ( $k_{\text{kat}} / K_M = 2,60 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ), gefolgt von BDHMF ( $k_{\text{kat}} / K_M = 1,90 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ) und EDHMF ( $k_{\text{kat}} / K_M = 0,90 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ). Die katalytischen Effizienzen von SIEO und FaEO für die drei getesteten Substrate unterscheiden sich nur in geringerem Maße, tendenziell sind die katalytischen Effizienzen von SIEO jedoch etwas niedriger als die von FaEO. Die Länge der Kohlenstoffkette am C2-Rest des Furanonrings scheint eine geringe Bedeutung für die katalytische Effizienz der Enzyme zu haben. Es ist daher davon auszugehen, dass die katalytische Effizienz der beiden Enzyme für ihr natürliches Substrat HMMF in der gleichen Größenordnung wie für die getesteten Substrate liegt. Die höhere Effizienz der FaEO korreliert mit der höheren Konzentration von HDMF in Erdbeeren gegenüber Tomaten (Buttery et al., 1994; Perez et al., 1996).

Die katalytischen Raten und Wechselzahlen von Enzymen des Sekundärmetabolismus liegen häufig einige Größenordnungen niedriger als die von Enzymen des Primärmetabolismus. Pflanzen sind jedoch häufig in der Lage, diese schlechten Effizienzen zu kompensieren und hohe Syntheseraten zu erreichen, in dem das Enzym

zu einem bestimmten Zeitpunkt sehr hoch exprimiert wird (Pichersky und Gang, 2000). Bei FaEO handelt es sich um ein Enzym, das reifekorreliert exprimiert wird und in der reifen Erdbeerfrucht die maximale Expression erreicht (Raab et al., 2006). Diese reifekorrelierte Expression kann im Zusammenspiel mit der Tatsache, dass die höchsten Konzentrationen von HMMF, dem natürlichen Substrat der FaEO, auch in reifen roten Früchten detektiert wurden (Klein et al., 2007), trotz der eigentlich schlechten katalytischen Effizienz des Enzyms zu einer effektiven Bildung von HDMF in der Erdbeerfrucht führen.

Zu dem Expressionsmuster der SIEO in der Tomate liegen keine Daten vor. Es ist also möglich, dass auch bei diesem Enzym eine reifekorrelierte Steigerung der Expression stattfindet. Dass HMMF auch in der Tomatenfrucht vorliegt und als Substrat für SIEO bei der HDMF-Biosynthese dient, wurde von Klein et al. (2007) gezeigt.

## 2.2 Enon-Oxidoreduktase-herabregulierte Erdbeerfrüchte

In einer spanischen Arbeitsgruppe wurden stabil transgene Erdbeerpflanzen der Varietät *Fragaria x ananassa* var. Chandler hergestellt, bei denen das Gen, das für die *Fragaria x ananassa* Enon-Oxidoreduktase codiert, herabreguliert wurde. Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgte über einen bereits beschriebenen Mechanismus (Quesada et al., 2009). Mittels quantitativer PCR wurde der Grad der Herabregulation in verschiedenen Linien geprüft. Es wurde Extrakte aus den Früchten verschiedener Linien gewonnen und mit LC-MS untersucht, um den HDMF-Gehalt der Früchte zu bestimmen. Durch Auswertung von 2-D-Gelelektrophorese-Gelen von Proteinextrakten der transgenen Früchte wurden die Auswirkungen einer dauerhaften Stilllegung des für FaEO codierenden Genabschnitts auf das Proteom untersucht.

### 2.2.1 Metabolit-Untersuchung der FaEOi-Früchte

Die Untersuchung der Metabolite erfolgte mittels LC-MS-Messung mit zusätzlicher UV-Detektion von Ethylacetat-Extrakten der transgenen Erdbeerfrüchte. Die transgenen Pflanzen wurden in Spanien hergestellt und dort kultiviert. Der Grad der Herabregulation des FaEO-Gens in den verschiedenen transgenen Erdbeerlinien wurde mit quantitativer PCR bestimmt (Tab. 3).

**Tab. 3: Ergebnisse der quantitativen PCR der verschiedenen transgenen Linien.**

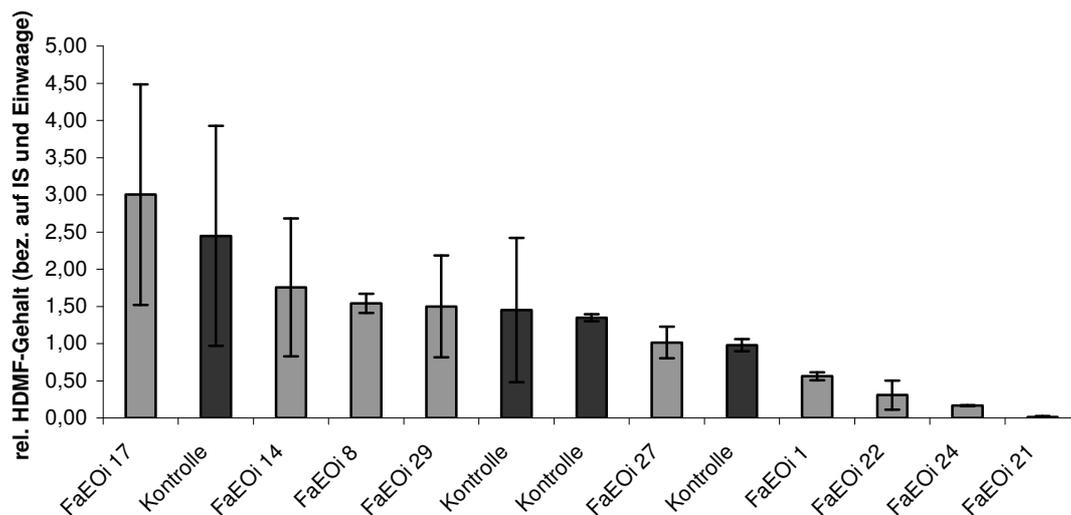
Linie	Menge an Transkript im Vergleich zur Kontrolle
FaEOi-1	1,76 %
FaEOi-8	4,20 %
FaEOi-14	2,63 %
FaEOi-17	2,65 %
FaEOi-21	3,01 %
FaEOi-22	1,63 %
FaEOi-24	2,09 %
FaEOi-27	1,12 %
FaEOi-29	3,12 %

Die geernteten Früchte wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und nach Deutschland geschickt. Da nur eine geringe Anzahl an Erdbeeren zur Verfügung stand, mussten Früchte unterschiedlichster Größe und Färbung eingesetzt werden. Als

Kontrolle dienten Früchte von Erdbeerpflanzen der gleichen Varietät, die nicht mit dem Antisense-FaEO-Gen transfiziert wurden, sondern in die ein GUS-Kontrollkonstrukt eingebaut wurde.

In roten Erdbeerfrüchten der Varietät Chandler ist HDMF mit einem Gehalt von 13,69  $\mu\text{g}$  pro g Frischgewicht das mengenmäßig bedeutendste Furanon, gefolgt von HDMF- $\beta$ -D-glucopyranosid mit einem Gehalt von 2,37  $\mu\text{g/g}$  und 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)furanon mit einem Gehalt von 0,30  $\mu\text{g/g}$  (Perez et al., 1996). Die Herabregulation der FaEO hat somit vorrausichtlich den größten Einfluss auf den Gehalt an HDMF, der in den transgenen Früchten deutlich verringert sein sollte.

Bei der Untersuchung der transgenen Früchte war nicht der absolute Gehalt an HDMF von Interesse, sondern es sollte der HDMF-Gehalt der transgenen Früchte mit dem HDMF-Gehalt der Kontrollfrüchte verglichen werden. Daher wurde der relative Gehalt an HDMF bezogen auf den Internen Standard HMF und auf die Einwaage berechnet und die HDMF-Gehalte über diesen relativen Gehalt verglichen.

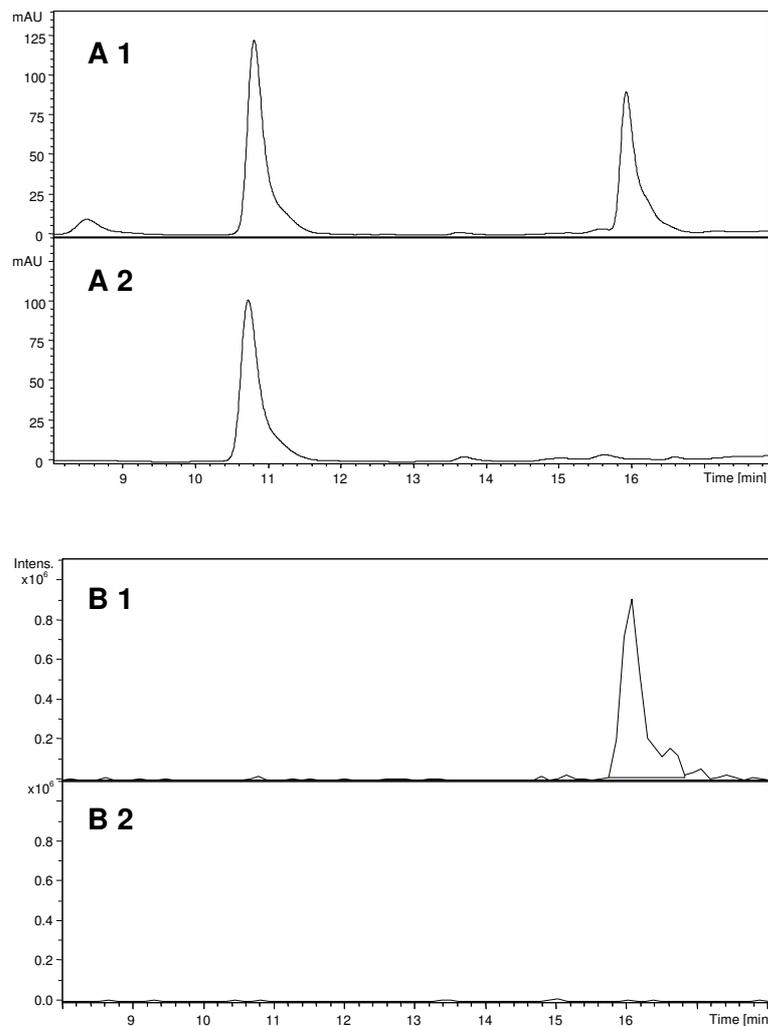


**Abb. 16: Graphische Darstellung der relativen HDMF-Gehalte der transgenen Erdbeerfrüchte im Vergleich zu Kontrollfrüchten.** Nach Ethylacetat-Extraktion mit anschließender LC-MS-Messung wurde unter Einbeziehung des Internen Standards HMF und der Einwaage der relative HDMF-Gehalt bestimmt. Die Gehalte der Kontrollfrüchte sind dunkel dargestellt.

Wie in Abb. 16 deutlich zu erkennen ist, schwanken die relativen HDMF-Gehalte der vier Kontrollfrüchte zwischen 0,98 und 2,48, die die starke biologische Variabilität widerspiegeln.

Der relative HDMF-Gehalt der Linie FaEOi 17 liegt mit 3,00 über dem höchsten Gehalt einer Kontrollfrucht. Die Gehalte der Linien FaEOi 14, 8, 29 und 27 liegen etwa im

Bereich der Kontrollfrüchte. Lediglich die relativen HDMF-Gehalte der Linien FaEOi 1, 22, 24 und 21 liegen signifikant unterhalb des niedrigsten Gehalts einer Kontrollfrucht. Die besten Erfolge der Herabregulation der FaEO und somit die niedrigsten relativen HDMF-Gehalte wurden mit den Linien FaEOi 24 und 21 mit Gehalten von 0,17 bzw. 0,01 erzielt. In den Früchten der Linie FaEOi 21 ist praktisch kein HDMF enthalten (Abb. 17).



**Abb. 17:** UV-Chromatogramm bei 280 nm (A) und EIC-Chromatogramm der Ionenspur  $m/z$  129 (B) einer Kontrollfrucht (1) und einer Frucht der Linie FaEOi 21 (2). Bei dem Peak mit der Retentionszeit 10,8 min (A) handelt es sich um den Internen Standard HMF, bei dem Peak mit der Retentionszeit 16,0 min (A und B) um HDMF.

Da für die Untersuchung des Proteoms der transgenen Erdbeerfrüchte mittels 2-D-Gelelektrophorese aufgrund der hohen Anzahl an transgenen Linien nicht alle verwendet werden konnten, wurde über die Untersuchung der HDMF-Gehalte eine Auswahl getroffen. Neben den Kontrollfrüchten wurden nur Früchte der transgenen Linien FaEOi 24 und FaEOi 21 zur Herstellung von Proteinextrakten für die

2-D-Gelelektrophorese verwendet, da diese die niedrigsten relativen HDMF-Gehalte aufwiesen.

## **2.2.2 Effekte der Herabregulation des FaEO-Gens auf das Proteom der Erdbeerfrüchte**

Inwieweit die Herabregulation des FaEO-Gens einen Einfluss auf das Proteom der transgenen Erdbeerfrüchte hat, wurde mittels Proteomanalyse untersucht. Dazu wurde eine zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt. Prinzip dieser Untersuchung ist die isoelektrische Fokussierung (IEF) der Proteine in einer ersten Dimension und deren nachfolgende Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in einer zweiten Dimension.

Um den Einfluss der Herabregulation festzustellen wurden neben Früchten der transgenen Linien FaEOi 21 und 24 auch Kontrollfrüchte zur 2-D-Gelelektrophorese verwendet, um das Proteom der transgenen Früchte mit dem der Kontrollfrüchte vergleichen zu können.

### **2.2.2.1 Durchführung der Proteomanalyse**

Um unterschiedlich exprimierte Proteine der transgenen Früchte im Vergleich zu den Kontrollfrüchten erkennen zu können, war eine hohe Reproduzierbarkeit der 2-D-Gele notwendig, die durch optimale Proteinextraktion und Durchführung der 2-D-Gelelektrophorese erreicht wurde.

Der kritischste Punkt einer Proteomanalyse ist die Proteinextraktion und die Probenvorbereitung. Die Erdbeerfrucht zählt aufgrund ihrer niedrigen Proteinkonzentration und des hohen Gehalts an Zuckern und phenolischen Verbindungen zu den Geweben, aus denen sich Proteine nur schwer isolieren lassen. Daher wurde zur Proteinisolierung eine Methode verwendet, die speziell für solche schwierigen Pflanzengewebe entwickelt wurde (Saravanan und Rose, 2004). Durch Extraktion mit Phenol und anschließender Ausfällung der Proteine mit methanolischer Ammoniumacetat-Lösung wurden ausreichende Proteinmengen isoliert. Um für die isoelektrische Fokussierung und die anschließende SDS-PAGE eine gute Löslichkeit der Proteine, insbesondere auch der Membranproteine, zu erreichen, ist eine Mischung aus 7 M Harnstoff und 2 M Thioharnstoff mit CHAPS verwendet worden (Rabilloud et al., 1997).

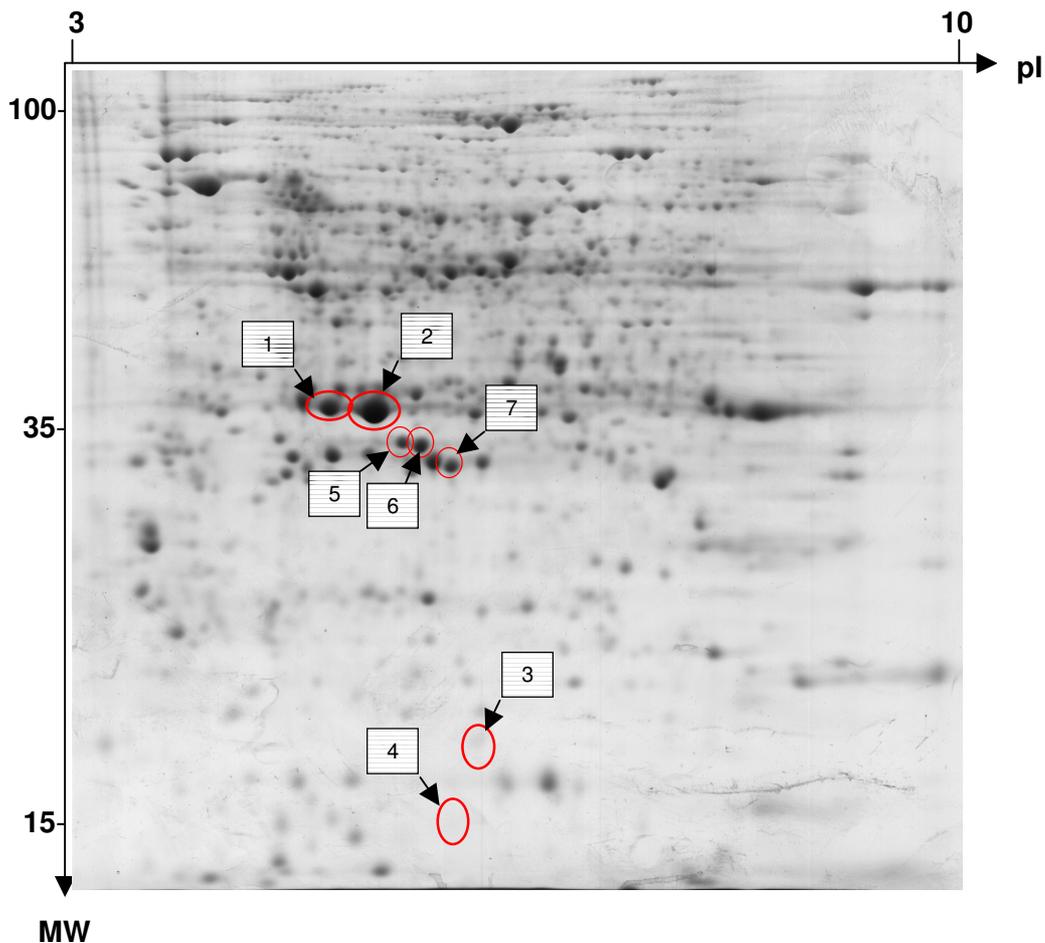
Die 2-D-Gelelektrophorese wurde in Anlehnung an die Protokolle von Görg und Mitarbeitern durchgeführt (Görg et al., 2004; Görg et al., 2007). Die Probenapplikation

bei der IEF erfolgte mittels *Cup Loading*, da dadurch im Vergleich zum *In-gel-Rehydration-Loading* verlässlichere Ergebnisse, insbesondere bei quantitativen Analysen, erreicht werden (Görg et al., 2007). Um eine zu hohe Salzkonzentration, die eine optimale Fokussierung der Proteine in der ersten Dimension stören kann, zu verhindern, wurden die Proben vor der eigentlichen Fokussierung durch eine zweistündige Vorlaufzeit bei niedriger Spannung entsalzt.

Die quantitative Auswertung der Gele erfolgte nach einer kolloidalen Coomassie-Färbung, die nach einem Protokoll von Neuhoff und Mitarbeitern durchgeführt wurde (Neuhoff et al., 1988). Bei Auftragen einer Menge von genau 550 µg Protein wurde so ein gutes Färbeergebnis erzielt.

#### 2.2.2.2 Proteomanalyse mittels 2D-PAGE

Die Proteine der transgenen Erdbeerfrüchte wurden aufgereinigt und anschließend mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt. Die 2-D-PAGE-Gele wurden mit Coomassie gefärbt, eingescannt und die Bilddateien nachfolgend softwaregestützt ausgewertet. Die Spotmuster der Gele der transgenen Erdbeerfrüchte, in denen das für FaEO codierende Gen herabreguliert war, wurden mit den Gelen der Kontrollfrüchte verglichen. Im Folgenden werden aus Gründen des einfacheren Verständnisses die verwendeten Kontrollfrüchte als „Kontrollgruppe“ und die transgenen Erdbeerfrüchte als „Experimentalgruppe“ bezeichnet. Ein Proteinspot galt als reguliert, wenn dessen durchschnittliche Spotintensität aus drei unabhängigen Experimenten wenigstens um den Faktor 0,3 bzw. 5 zwischen Kontroll- und Experimentalgruppe variierte (Regulationsfaktor 2D-PAGE  $\leq 0,3$  bzw.  $\geq 5,0$ ). Des Weiteren wurden nur solche Proteinspots näher betrachtet, die in mindestens zwei von drei Gelen der Kontrollgruppe und in mindestens zwei von drei Gelen der Experimentalgruppe vorhanden waren. Diese Vorgaben schränkten die Anzahl der Spots auf 26 ein. Durch manuelle Kontrolle der absoluten Spotintensitäten dieser 26 Proteinspots wurden sechs herausgefiltert, bei denen eine deutliche Regulation entweder in einer der beiden Experimentalgruppen FaEOi 21 und 24 oder auch in beiden Gruppen vorhanden war. Durch die manuelle Kontrolle der Gele wurde ein weiterer Proteinspot gefunden, der durch die oben genannten Kriterien herausgefallen war. Er war in keinem der Kontrollgele vorhanden, aber in den Gelen der Experimentalgruppe FaEOi 21 als deutlicher Spot zu erkennen. Diese sieben in den Experimentalgruppen deutlich veränderten Proteinspots wurden ausgewählt und massenspektrometrisch analysiert (Abb. 18).



**Abb. 18: Regulierte Proteine dargestellt anhand des Proteoms der Kontrollgruppe nach 2D-PAGE.** Repräsentatives 2D-PAGE-Gel nach kolloidaler Coomassie-Färbung. Die rot markierten Proteinspots sind in mindestens einer der beiden Experimentalgruppen FaEOi 21 und 24 mindestens 0,3- bzw. 5-fach reguliert im Vergleich zur Kontrollgruppe (pI = isoelektrischer Punkt; MW = Molekulargewicht).

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse wurden mit der MSDB, einer Proteinsequenz-Datenbank, die geführt wird von dem Proteomics-Department des Hammersmith Campus of Imperial College London, abgeglichen. In Tab. 4 sind die Ergebnisse für die regulierten Proteine dargestellt. Angegeben sind die Regulationsfaktoren in den Experimentalgruppen FaEOi 21 und 24, die aus der Datenbank erhaltenen Informationen und die Sequenzabdeckung. Eine Identifizierung war lediglich für sechs der untersuchten Spots möglich, aufgrund der ungenügenden massenspektrometrischen Daten konnte Spot-Nr. 7 nicht identifiziert werden.

**Tab. 4: Übersicht über die regulierten Proteine in den Experimentalgruppen FaEOi 21 und 24.** (RF = Regulationsfaktor; MW = Molekulargewicht laut Datenbank; pI = isoelektrischer Punkt laut Datenbank; SA = Sequenzabdeckung)

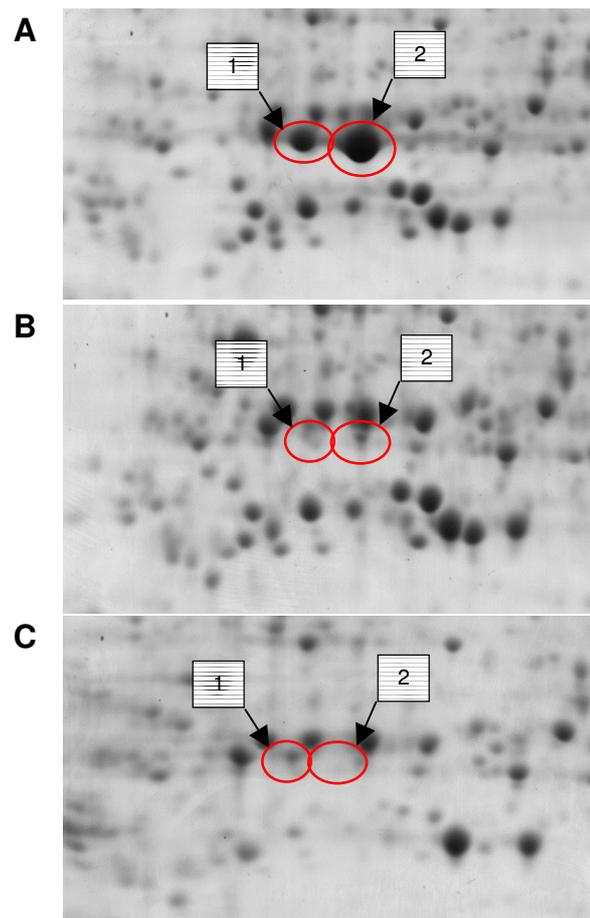
Spot-Nr.	RF FaEOi 21 / 24	Protein-Name	MSDB-Code	MW	pI	SA [%]
1	0,29 / 0,21	Quinone oxidoreductase - <i>Fragaria x ananassa</i>	Q84V25_FRAAN	34,2	5,56	54
2	0,09 / 0,04	Putative quinone oxidoreductase - <i>Fragaria x ananassa</i>	Q94110_FRAAN	36,2	6,62	52
3	5,55 / ---	Defensin bzw. Disease resistance response proteine	---	---	---	---
4	--- / ---	LMW heat shock protein - <i>Fragaria x ananassa</i>	O49962_FRAAN	17,4	6,17	42
5	0,70 / 0,07	NADPH Quinonoxidoreductase chain J - <i>Lupinus luteus</i>	---	---	---	---
6	0,92 / 0,11	R/FR photoreceptor (Fragment) - <i>Citrus limon</i>	Q84P46_CITLI	24,4	6,48	24
7	0,90 / 0,18	---	---	---	---	---

Nicht alle untersuchten Protein-Spots waren in den beiden Experimentalgruppen in gleicher Weise bzw. um den gleichen Faktor reguliert. Nur zwei Protein-Spots wiesen eine sehr ähnliche Regulation in beiden Experimentalgruppen auf, während sich die Regulationsfaktoren der anderen Spots zum Teil deutlich unterschieden.

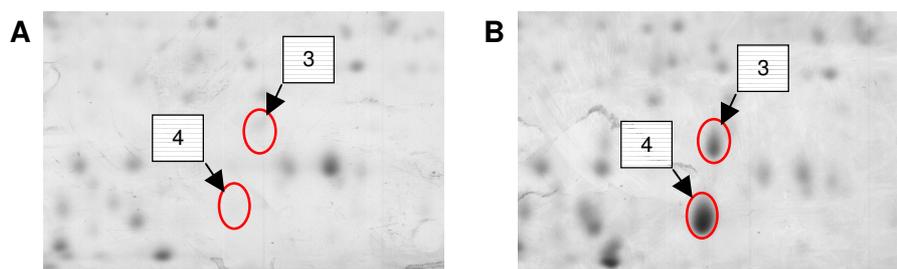
Spot-Nr. 1 und 2 waren im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl in Experimentalgruppe FaEOi 21 als auch in Experimentalgruppe FaEOi 24 mit Regulationsfaktoren von 0,29 bzw. 0,21 deutlich herabreguliert (Abb. 19).

Spot-Nr. 3 hatte in der Kontrollgruppe eine sehr niedrige Intensität und war in Experimentalgruppe FaEOi 21 um Faktor 5,55 hochreguliert. In Experimentalgruppe FaEOi 24 wurde der Spot nicht detektiert. Ähnlich verhält es sich mit Spot-Nr. 4, der weder in der Kontrollgruppe noch in Experimentalgruppe FaEOi 24 detektiert wurde, sondern nur in Experimentalgruppe FaEOi 21 deutlich sichtbar war (Abb. 20). Aufgrund des Fehlens des Spots in der Kontrollgruppe war die Bestimmung eines Regulationsfaktors für Spot-Nr. 4 nicht möglich.

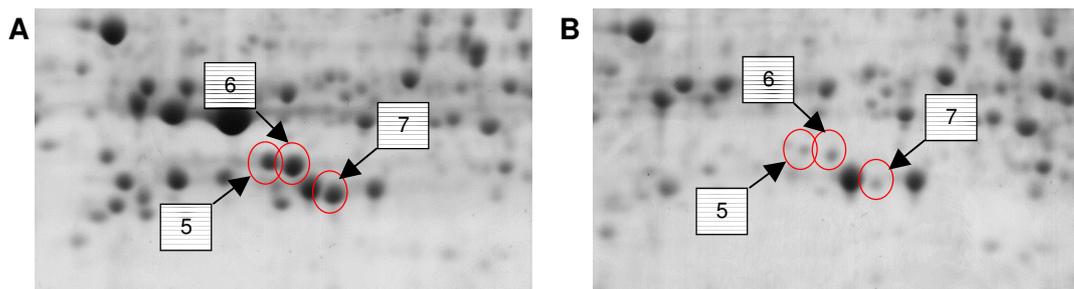
Die Spot-Nr. 5, 6 und 7 waren mit Regulationsfaktoren von 0,07, 0,11 bzw. 0,18 in der Experimentalgruppe FaEOi 24 deutlich herabreguliert, während diese Spots in der Experimentalgruppe FaEOi 21 mit Regulationsfaktoren von 0,70 bis 0,92 nur eine sehr geringfügige oder fast keine Herabregulation aufwiesen (Abb. 21).



**Abb. 19: 2-D-PAGE-Gelausschnitte zur vergrößerten Darstellung der Spots 1 und 2.** Die unterschiedliche Spotintensität in der Kontrollgruppe (A) und in den Experimentalgruppen FaEOi 21 (B) und FaEOi 24 (C) ist deutlich zu erkennen.



**Abb. 20: 2-D-PAGE-Gelausschnitte zur vergrößerten Darstellung der Spots 3 und 4.** In der Experimentalgruppe FaEOi 21 (B) ist eine deutliche Hochregulation der beiden Spots im Vergleich zur Kontrollgruppe (A) zu erkennen.



**Abb. 21: 2-D-PAGE-Gelausschnitte zur vergrößerten Darstellung der Spots 5, 6 und 7.** In der Experimentalgruppe FaEOi 24 (**B**) ist eine deutliche Herabregulation der Spots im Vergleich zur Kontrollgruppe (**A**) zu erkennen.

### 2.2.3 Diskussion

#### 2.2.3.1 Auswahl der transgenen Erdbeerlinien zur weiteren Verwendung

Die Ergebnisse der quantitativen PCR zeigten, dass die Transkriptmenge des FaEO-Gens in allen aus Spanien erhaltenen transgenen Erdbeerlinien gegenüber der Kontrolllinie deutlich reduziert war. Es war daher zu erwarten, dass auch die Menge des Enzyms FaEO und somit auch die HDMF-Konzentration niedriger ausfallen würde als in den Kontrolllinien. Bei der Bestimmung des relativen HDMF-Gehaltes von Früchten der transgenen Linien im Vergleich zu den Kontrolllinien wurde jedoch nur in wenigen Linien deutlich niedrigere relative HDMF-Gehalte festgestellt, während in den meisten Linien Gehalte in der Größenordnung der Kontrollen gemessen wurden. Eine eindeutige Korrelation von FaEO-Transkriptmenge und HDMF-Gehalt war nicht zu erkennen. Es müssen somit weitere Kontrollmechanismen eine Rolle spielen.

#### 2.2.3.2 Proteinextraktion und Durchführung der Proteomanalyse

Das Proteom umfasst alle Proteine, die in einem Gewebe zu einem bestimmten Zeitpunkt unter bestimmten Bedingungen exprimiert werden. Da Proteine strukturelle und funktionelle Schlüssel-moleküle sind, ist die Charakterisierung des Proteoms notwendig um die Funktionsweise biologischer Systeme zu verstehen (Beranova-Giorgianni, 2003). Die einzige Möglichkeit, um Tausende von Proteinen simultan aufzutrennen und so das Proteom untersuchen zu können, ist die 2-D-Gelelektrophorese (Marouga et al., 2005). Um die hohe Auflösung der 2-D-Gelelektrophorese nutzen zu können, müssen die Proteine einer Probe denaturiert, disaggregiert, reduziert und in Lösung gebracht werden, um molekulare Interaktionen zu unterbinden und um sicherzustellen, dass jeder Spot eines 2-D-Gels

ein individuelles Polypeptid repräsentiert (Görg et al., 2007). Daher spielen die Probenvorbereitung und die Proteinextraktion bei der Durchführung einer 2-D-Gelelektrophorese eine überaus wichtige Rolle. Die Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial ist meist problematischer als die Extraktion anderer Gewebe, da pflanzliche Gewebe häufig reich an Proteasen sind und Speicherpolysaccharide, Lipide, phenolische Verbindungen und verschiedenste Sekundärmetaboliten enthalten, die die Proteinextraktion und anschließende Analyse beeinflussen können (Saravanan und Rose, 2004). Insbesondere die Proteinextraktion aus Früchten stellt eine schwierige Aufgabe dar, da Früchte einen hohen Anteil störender Substanzen enthalten. Der Proteingehalt ist jedoch sehr gering (Song et al., 2006). Ein wichtiger Schritt in der Probenvorbereitung für die 2-D-Gelelektrophorese ist die Abtrennung von Polysacchariden der Zellwand, den Pektinen, die vor allem positiv geladene Proteine binden können und einen großen Einfluss auf die Migration der Proteine in der 2-D-Gelelektrophorese haben (Saravanan und Rose, 2004). Die in dieser Arbeit verwendete Methode beruht auf der Extraktion der Proteine durch Phenol und anschließende Fällung mit methanolischer Ammoniumacetat-Lösung (Saravanan und Rose, 2004). Mit dieser Methode ließ sich eine große Menge an Protein, die für die anschließende Analyse eingesetzt werden konnte, extrahieren. Die gute Abtrennung störender Substanzen mit diesem Protokoll lässt sich an der Qualität der 2-D-Gele erkennen, in denen die Proteinspots eine gute Fokussierung und Auflösung aufweisen. Da das Proteom einer Zelle bzw. eines Organismus ein dynamisches System ist, das durch zahlreiche Parameter wie z. B. Kulturbedingungen und Differenzierungsgrad beeinflusst wird, ist es wichtig die Bedingungen der Proteomanalyse soweit wie möglich zu standardisieren um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Die Durchführung der Probenvorbereitung und der 2-D-PAGE erfolgte daher durch eine exakte Einhaltung der beschriebenen Protokolle.

Nach der 2-D-PAGE wurden die Gele mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Die Sensitivität dieser Proteinfärbung liegt bei etwa 10-30 ng pro Spot (Barrett et al., 2005; Candiano et al., 2004). Eine höhere Sensitivität kann durch Silberfärbung erreicht werden, mit der noch Proteinspots von unter 1 ng detektiert werden können. Da die Silberfärbung jedoch keine Endpunktfärbung darstellt, ist die Reproduzierbarkeit gering und die Intensität der Färbung kann von Gel zu Gel variieren. Die Silberfärbung ist daher nicht für quantitative Untersuchungen geeignet (Westermeier und Marouga, 2005).

Im Gegensatz dazu ist die Färbung mit kolloidalem Coomassie eine Endpunktfärbung, bei der durch Zusatz von Methanol eine komplette Durchfärbung des Gels erreicht wird und somit gute Ergebnisse, die zur quantitativen Auswertung geeignet sind, erzielt werden (Neuhoff et al., 1988; Westermeier und Marouga, 2005). Für die in Rahmen

dieser Arbeit untersuchten Proteine war die Sensitivität der Coomassie-Färbung ausreichend und es wurde eine gute Färbung der 2-D-Gele erreicht.

Eine Hauptschwierigkeit der 2-D-Gelelektrophorese besteht trotz technischer Verbesserungen in der begrenzten Reproduzierbarkeit der 2-D-Gele (Barrett et al., 2005). Um statistisch sinnvolle quantitative Aussagen zu erhalten, ist es daher notwendig Mehrfachbestimmungen durchzuführen. In dieser Arbeit wurden jeweils drei Erdbeerfrüchte einer Gruppe gepoolt um Schwankungen, die durch die biologische Variabilität auch innerhalb einer Gruppe vorhanden sind, auszugleichen. Aus diesem Pool wurden dann jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt. Als reguliert wurden nur diejenigen Proteine angesehen, deren Expression zwischen Kontroll- und Experimentalgruppe mindestens um den Faktor 0,3 bzw. 5 verändert war. Da der Variationskoeffizient der relativen Proteinmenge bei Experimenten der gleichen Probe, also technischen Replikaten, in einem Bereich von 16 bis 39 % liegt, muss sich die Expression mindestens um den Faktor 2 unterscheiden um eine statistische Signifikanz zu erreichen (Barrett et al., 2005). Mit den angewendeten Faktoren kann also eine sinnvolle quantitative Aussage getroffen werden.

#### 2.2.3.3 Regulierte Proteine der transgenen Erdbeerlinien

Die Ergebnisse der vergleichenden Proteomanalyse der Kontrollgruppe und der Experimentalgruppen FaEOi 21 und 24 zeigen, dass die Herabregulation des FaEO-Gens einen Einfluss auf die Expression verschiedener Proteine hat. Der Großteil der etwa 900 Protein-Spots war in den drei untersuchten Gruppen ähnlich exprimiert, jedoch wurden in den Experimentalgruppen sieben deutlich veränderte Proteinspots detektiert, die einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen wurden. Von diesen sieben Spots waren fünf herabreguliert und nur zwei waren in ihrer Expression erhöht. Eine abschließende Aussage, dass die Herabregulation des FaEO-Gens nur einen Einfluss auf diese sieben Proteine der Erdbeerfrucht hat, kann damit jedoch nicht getroffen werden, da zum einen bei der durchgeführten 2-D-Gelelektrophorese nicht das gesamte Proteom eines Gewebes dargestellt wird und beispielsweise sehr große und sehr kleine Proteine oder auch hydrophobe Proteine unter Standardbedingungen nicht erfasst werden (Beranova-Giorgianni, 2003). Zum anderen müssen die Proteine in einer gewissen Kopienzahl im Gewebe vorliegen um mit der kolloidalen Coomassie-Färbung angefärbt zu werden. So können Membranproteine oder Regulatorproteine mit der durchgeführten 2-D-Gelelektrophorese nur schlecht erfasst werden.

Um nach der 2-D-Gelelektrophorese die Protein-Spots von Interesse zu identifizieren wird meist ein enzymatischer Verdau durchgeführt. Die dabei gebildeten Peptide werden extrahiert und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Häufig geschieht dies durch eine „*peptide mass fingerprint*“-Analyse, bei der aus den

gebildeten Peptiden ein für das Protein typisches Profil erhalten wird, das mit den in einer Datenbank enthaltenen Profilen abgeglichen wird. Die „*peptide mass fingerprint*“-Analyse ist allerdings schwierig bei Spezies, von deren Genom und Proteom nur Fragmente bekannt sind (Carpentier et al., 2008), da dann die Chance signifikante und konservierte Peptide zu finden sinkt und die „*peptide mass fingerprint*“-Analyse zu keinen oder falsch positiven Ergebnissen führt (Mathesius et al., 2002).

Das Genom von *Fragaria x ananassa* ist bislang noch nicht vollständig sequenziert, im Gegensatz zu Genomen von *Arabidopsis thaliana* oder *Oryza sativa*, die häufig als Modell-Pflanzen verwendet werden. Die Untersuchung des Proteoms der Erdbeere führt daher zu einer niedrigen Proteinidentifizierungsrate. So wurden bei der 2-D-PAGE basierten Analyse von 241 Protein-Spots der Erdbeere lediglich 97 Spots erfolgreich identifiziert, was einer Erfolgsrate von etwa 40 % entspricht (Alm et al., 2007). Im Gegensatz dazu wurden bei einer Untersuchung von 52 Protein-Spots von *Oryza sativa* 51 Spots, also fast 100%, erfolgreich identifiziert (Yang et al., 2007).

Von den sieben detektierten regulierten Proteinspots konnten nur sechs anhand der massenspektrometrischen Analyse zugeordnet werden. Die massenspektrometrischen Daten für Spot-Nr. 7 waren nicht ausreichend um über die Datenbankabfrage eine Identifizierung durchzuführen.

Da das Genom der Erdbeere nicht vollständig sequenziert ist, ist es möglich, dass die Sequenz des untersuchten Proteins nicht in der Datenbank, mit der das Profil des Proteins abgeglichen wird, vorhanden ist. Bei einem derartigen Fall kann es sinnvoll sein, Treffer aus anderen Spezies näher zu betrachten, da diese homolog zu dem gesuchten Protein sein können.

Spot 1 und 2, die in den Experimentalgruppen FaEOi 21 und 24 im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich herabreguliert waren, wurden durch die „*peptide mass fingerprint*“-Analyse als „*Fragaria x ananassa* Quinone Oxidoreductase“ bzw. „putative *Fragaria x ananassa* Quinone Oxidoreductase“ identifiziert. Da FaEO ursprünglich als *Fragaria x ananassa* Chinon-Oxidoreduktase (FaQR) bezeichnet wurde und der Name nachträglich aufgrund der katalysierten Reaktion in *Fragaria x ananassa* Enon-Oxidoreduktase geändert wurde (Klein et al., 2007), handelt es sich bei den gefundenen Datenbankeinträgen um das in den transgenen Erdbeerlinien herabregulierte Enzym FaEO. Die zwei unterschiedlichen Datenbankeinträge entsprechen zwei Formen des Enzyms FaEO. Es könnte sich hierbei um Isoenzyme oder Allozyme handeln. Im Gegensatz zu Isoenzymen, die die gleiche Reaktion katalysieren, aber von unterschiedlichen Genen stammen, stellen Allozyme Enzyme dar, die aus verschiedenen Allelen desselben Gens entstehen. Bei einer octaploiden Pflanze wie *Fragaria x ananassa* ist das Auftreten von verschiedenen Allelen desselben Gens nicht ungewöhnlich und es ist durchaus wahrscheinlich, dass mehr als

zwei verschiedene Allele des FaEO-Gens existieren. Die Auftrennung der zwei Iso- bzw. Allozyme durch die 2-D-Gelelektrophorese resultiert aus der leicht unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung, durch die sowohl der isoelektrische Punkt als auch das Molekulargewicht verändert ist. Die durch Raab et al. (2006) vorgenommene Charakterisierung erfolgte mit dem Spot 2 entsprechenden Protein, daher handelt es sich bei diesem intensivsten Spot der Kontrollgruppe um eine aktive Form des Enzyms FaEO. Ob das andere Protein Spot 1 eine weitere aktive Form der FaEO darstellt, kann hier nicht festgestellt werden, da Allozyme, die häufig durch Punktmutationen entstehenden, durch diese Veränderungen zum Teil inaktiviert sind. Es ist allerdings auch möglich, dass die Mutationen keinen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms haben oder die Aktivität sogar noch verstärken. Darüber kann hier jedoch keine Aussage getroffen werden.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass in den beiden transgenen Erdbeerlinien FaEOi 21 und 24 die durch RNAi induzierte Herabregulation des Enzyms FaEO erfolgreich war, da sowohl bei der 2-D-Gelelektrophorese stark herabregulierte Spots der beiden Formen der FaEO festgestellt wurden, als auch deutlich verringerte HDMF-Konzentrationen bei der Metabolit-Analyse detektiert wurden (Kap. 2.2.3.1).

Spot 3 war in der Kontrollgruppe und auch in der Experimentalgruppe FaEOi 24 nicht vorhanden und wurde nur in der Experimentalgruppe FaEOi 21 detektiert. Für diesen Spot wurde über die „*peptide mass fingerprint*“-Analyse als wahrscheinlichste Übereinstimmung ein Defensin festgestellt, allerdings ist die Qualität des MS-Spektrums schlecht und eine sichere Identifizierung ist mit den vorhandenen Daten nicht möglich. Es besteht allerdings durchaus die Möglichkeit, dass es sich bei dem Spot tatsächlich um ein Defensin handelt. Defensine sind Polypeptide mit einer Kettenlänge von weniger als 100 Aminosäuren, die antimikrobielle Eigenschaften haben und zur Pathogenabwehr dienen (Ganz, 2003). Sie kommen wahrscheinlich in allen Pflanzen vor (Lay und Anderson, 2005) und wurden auch bereits in Früchten wie Paprika (Meyer et al., 1996) und Pfirsich (Wisniewski et al., 2003) nachgewiesen. Es gibt Hinweise, dass in Pflanzen die Induktion der Expression von Defensinen nicht nur durch Infektion mit Pathogenen ausgelöst wird, sondern auch durch Stress, der beispielsweise durch Trockenheit, erhöhte Salzkonzentration oder Kälte verursacht wird (Lay und Anderson, 2005). Da das Einbringen fremder DNA und die daraus resultierende Transgenität einen massiven Eingriff in den Organismus der Erdbeerpflanze bedeutet, der für die Pflanze durch die Herabregulation eines Gens zu erhöhtem Stress führen kann, ist die verstärkte Expression eines Defensins eine mögliche Reaktion der betreffenden Pflanze.

Die „*peptide mass fingerprint*“-Analyse von Spot 4 ergab, dass es sich bei diesem Protein um ein Hitzeschockprotein aus *Fragaria x ananassa* mit niedrigem

Molekulargewicht handelt, ein sogenanntes „*low-molecular-weight heat shock protein*“ (LMW HSP). Viele Organismen reagieren auf hohe Temperaturen mit der Synthese dieser evolutionär konservierten Polypeptide (Neta-Sharir et al., 2005). Allerdings kann die Expression von HSPs auch durch andere Stressfaktoren ausgelöst werden (Vierling, 1991). HSPs sollen verschiedene Aufgaben in der Pflanze haben. So sollen sie unter anderem an der Erhaltung der Zellstruktur unter Stressbedingungen und dem Schutz der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung beteiligt sein. Die biochemischen Funktionen der HSPs sind jedoch noch immer unbekannt (Medina-Escobar et al., 1998). Bei dem identifizierten Protein handelt es sich um ein HSP, das bereits durch Medina-Escobar et al. (1998) kloniert und charakterisiert wurde und zu den Klasse 1 LMW HSP zählt. In den durchgeführten Northern Blot-Experimenten wurden entsprechende RNA-Transkripte dieses Proteins nur in Erdbeerfrüchten, nicht jedoch in Wurzeln, Blüten und Blättern nachgewiesen. Außerdem wurde gezeigt, dass dieses Protein ein Reifungsstadium-abhängiges Expressionsmuster während des Fruchtreifungsprozesses durchläuft, wobei die höchste Expression im späten weißen Stadium stattfindet. Im anschließenden „turning“-Stadium und in der reifen, roten Frucht nimmt die Expression wieder ab. Obwohl die Funktion dieses Proteins noch nicht bekannt ist, deuten die Ergebnisse der Untersuchungen darauf hin, dass dieses HSP eine Rolle bei der Fruchtreifung spielt und beispielsweise zum Schutz des Embryos vor dem Austrocknen oder zur Erleichterung der Keimung nach Rehydratation dienen könnte.

Die Untersuchung von Spot 5 lieferte einige nicht spezifische Resultate, unter anderem eine Übereinstimmung mit einer NADPH Quinon-Oxidoreduktase aus *Lupinus luteus*. Wie *Fragaria x ananassa* gehört auch *Lupinus luteus* zur Unterklasse der Rosenähnlichen (Rosidae). Möglicherweise handelt es sich bei dem Protein-Spot um eine weitere Chinon-Oxidoreduktase der Erdbeere, deren zugehöriges Gen bislang noch nicht sequenziert und charakterisiert wurde. Wie bereits erläutert wurde, ist das Genom der Erdbeere nicht vollständig sequenziert, so dass die Übereinstimmung mit einem Protein einer anderen Pflanzenart ein Hinweis auf eine Chinon-Oxidoreduktase sein kann. Dieses Protein wird auch von der Herabregulierung des FaEO-Gens beeinflusst und weist deshalb in den Früchten der transgenen Erdbeerlinien eine niedrigere Expression als in der Kontrollgruppe auf. Um Informationen über die Sequenz und die Funktion dieses Protein zu erhalten wäre eine de novo-Sequenzierung und eine Klonierung und Charakterisierung dieses Protein-Spots notwendig. Diese Informationen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht gewonnen werden.

Für Spot 6 wurde über die „*peptide mass fingerprint*“-Analyse eine Ähnlichkeit mit einem Fragment eines R/FR Photorezeptors aus *Citrus limon* gefunden. Bei einem

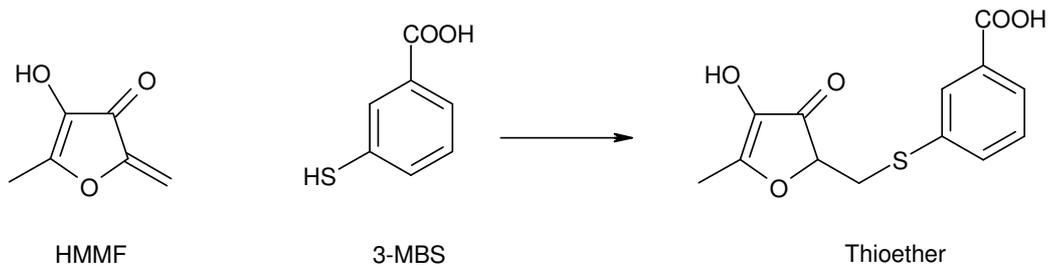
R/FR Photorezeptor handelt es sich um ein Chromoprotein, das Phytochrom, dessen Zustand durch Licht beeinflusst wird. Es wird vorwiegend bei Dunkelheit gebildet und liegt zunächst als biologisch inaktive Rotlicht absorbierende  $P_R$ -Form vor, wobei P die Abkürzung für Phytochrom ist und R für „red“ steht. Durch Photokonversion wird das Protein in die biologisch aktive  $P_{FR}$ -Form umgewandelt, die „far red“ – also dunkelrotes – Licht absorbiert. Bei natürlichem Licht stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht der  $P_R$ -Form und der  $P_{FR}$ -Form ein (Franklin und Quail, 2010). Die Frage, ob es sich bei dem herabregulierten Protein-Spot 6 tatsächlich um einen Photorezeptor aus *Fragaria x ananassa* handelt, kann mit den vorliegenden Informationen nicht abschließend beantwortet werden. Die Sequenzübereinstimmung mit dem Photorezeptor-Fragment aus *Citrus limon* beträgt nur etwa 24 %. Um genauere Informationen zu erhalten wäre auch hier, wie bereits bei Spot 6 erklärt, eine de novo-Sequenzierung und eine Klonierung und Charakterisierung dieses Protein-Spots notwendig.

### 2.3 Charakterisierung von 3-Dehydroquinat-Synthasen

Bisher ist erst ein Enzym, das an der HDMF-Biosynthese beteiligt ist, kloniert und funktionell charakterisiert worden (Klein et al., 2007; Raab et al., 2006). Das als FaEO bezeichnete Enzym katalysiert die Reaktion von 4-Hydroxy-5-methyl-2-methylen-3(2H)-furanon (HMMF), einem Zwischenprodukt, zu HDMF. Ein weiterer Schritt in der Biosynthese von HDMF ist die Reaktion von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HMMF. Bislang ist kein Enzym bekannt, das an der ablaufenden Reaktionsfolge beteiligt ist.

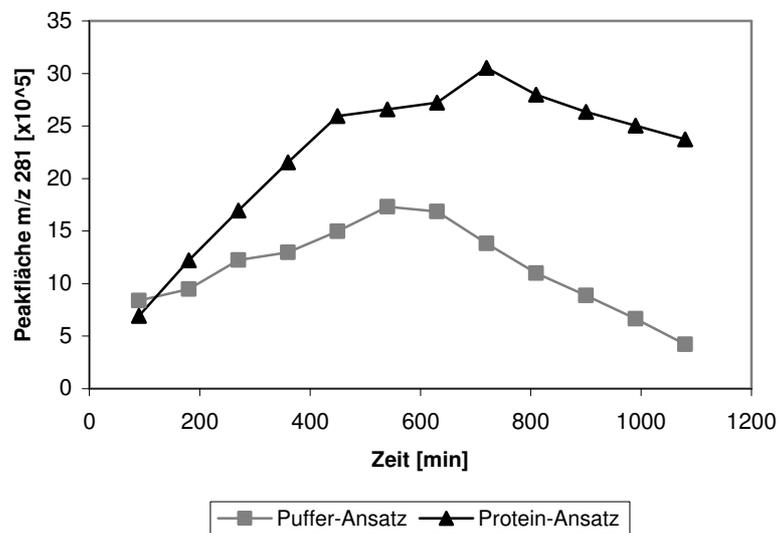
#### 2.3.1 Vorversuche mit Proteinrohextrakten aus Erdbeerfrüchten

Durch Vorversuche, die mit Proteinrohextrakten aus Erdbeerfrüchten durchgeführt wurden, sollte gezeigt werden, dass die Reaktion von D-Fructose-1-6-diphosphat zu HMMF enzymatisch katalysiert wird. Da es sich bei HMMF um eine reaktive und instabile Substanz handelt, die abhängig vom Lösungsmittel rasch abgebaut wird (Klein et al., 2007), musste HMMF in eine stabile, detektierbare Verbindung umgesetzt werden. Dies geschah durch Zugabe von 3-Mercaptobenzoessäure. Die  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindung HMMF reagiert mit der nucleophilen 3-Mercaptobenzoessäure zu dem stabilen Thioether 3-[[4-Hydroxy-5-methyl-3-oxo-2,3-dihydrofuran-2-yl)methyl]thio}benzoessäure (Abb. 22), der mittels LC-MS detektiert werden konnte.



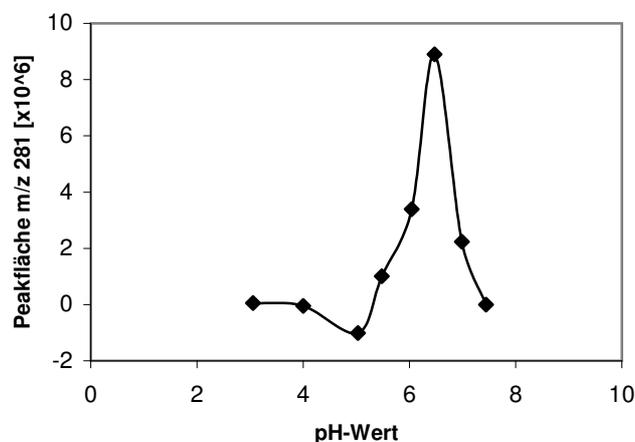
**Abb. 22: Stabilisierungsreaktion von HMMF.** HMMF reagiert mit 3-Mercaptobenzoessäure (3-MBS) zu 3-[[[(4-Hydroxy-5-methyl-3-oxo-2,3-dihydrofuran-2-yl)methyl]thio]benzoessäure (Thioether).

Der Proteinrohextrakt wurde aus Erdbeerfrüchten durch Homogenisieren, Zentrifugieren und anschließender Gelfiltration zur Abtrennung niedermolekularer Substanzen gewonnen. Mittels einer Zeitstudie wurde die rein chemische Bildung des Thioethers mit der Bildung durch den Proteinrohextrakt verglichen (Abb. 23). Nach 18 h war die Thioetherkonzentration im Ansatz mit Protein deutlich höher als in dem Kontrollansatz, der lediglich Puffer enthält.



**Abb. 23: Zeitstudie zum Vergleich der chemischen und enzymatischen Bildung des Thioethers.** Die Reaktion wurde in Bis-Tris-Puffer bei pH 6 durchgeführt. Als Cofaktor wurde  $Mn^{2+}$  und als Cosubstrat  $NAD^+$  zugesetzt. Der Puffer-Ansatz enthielt kein Protein, im Protein-Ansatz war Proteinrohextrakt aus der Erdbeerfrucht enthalten. Relative Mengen des HMMF-Thioethers wurden über die Peakfläche des Pseudomoleküls m/z 281 mittels LC-MS bestimmt. Experimentelle Details siehe Kap. 3.3.10.2.

Das pH-Optimum der enzymatischen Bildung des Thioethers ist in McIlvaine-Puffer bestimmt worden (Abb. 24). In diesem Puffersystem wurde die höchste Aktivität bei pH 6,5 ermittelt.

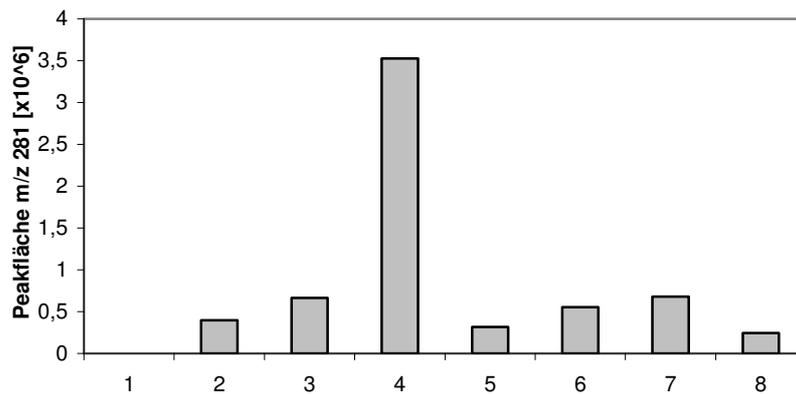


**Abb. 24: Einfluss des pH-Werts auf die Bildung des Thioethers.** Die Ansätze wurden 24 h bei 30°C in McIlvaine-Puffer bei verschiedenen pH-Werten inkubiert. Relative Mengen des HMMF-Thioethers wurden über die Peakfläche des Pseudomoleküliions m/z 281 mittels LC-MS bestimmt. Experimentelle Details siehe Kap. 3.3.10.2.

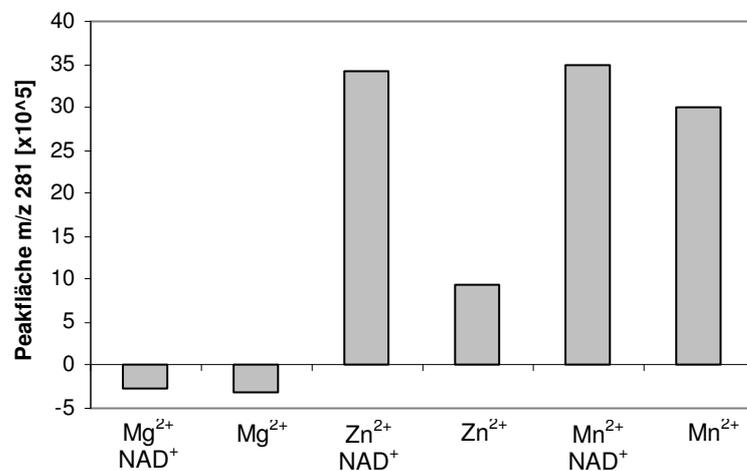
Die Reaktion zum Thioether verlief langsam und es war eine relativ lange Inkubationszeit notwendig. Um auszuschließen, dass ein anderes Substrat als D-Fructose-1,6-diphosphat besser umgesetzt wird, wurden D-Fructose (1), D-Fructose-1-phosphat (2), D-Fructose-6-phosphat (3), D-Fructose-1,6-phosphat (4), D-Glucose (5), D-Glucose-1-phosphat (6), D-Glucose-6-phosphat (7) und D-Glucose-1,6-phosphat (8) in einer Konzentration von jeweils 0,04 M eingesetzt und die enzymatische Bildung des Thioethers miteinander verglichen (Abb. 25). D-Fructose-1,6-diphosphat wurde in diesem Versuch als bestes Substrat bestätigt, die Umsatzrate dieser Verbindung war etwa um Faktor 5 höher als bei den anderen getesteten Substraten.

Weiterhin wurde die Abhängigkeit der Reaktion von zweiwertigen Metallionen bestimmt (Abb. 26). Es ist deutlich zu erkennen, dass unter Zusatz von zweiwertigen Magnesiumionen ( $Mg^{2+}$ ) die enzymatische Reaktion nicht abläuft. Hingegen ist nach Zugabe von zweiwertigen Zinkionen ( $Zn^{2+}$ ) und Manganionen ( $Mn^{2+}$ ) eine Steigerung der enzymatischen Reaktion zu sehen.

Um zu testen, ob bei der ablaufenden Reaktion ein Cosubstrat benötigt wird, die bei Redoxreaktionen häufig an der Umsetzung beteiligt sind, wurden NADH/ $H^+$  als Reduktionsmittel und  $NAD^+$  als Oxidationsmittel zugegeben. Der Zusatz von NADH/ $H^+$  steigerte die enzymatische Bildung des Thioethers nicht, hingegen war nach Zusatz von  $NAD^+$  eine Steigerung der Umsetzung nachweisbar (Abb. 26).



**Abb. 25: Vergleich der gebildeten Mengen an HMMF-Thioether in Abhängigkeit von unterschiedlichen Substraten.** Es wurden die Substrate D-Fructose (1), D-Fructose-1-phosphat (2), D-Fructose-6-phosphat (3), D-Fructose-1,6-phosphat (4), D-Glucose (5), D-Glucose-1-phosphat (6), D-Glucose-6-phosphat (7) und D-Glucose-1,6-phosphat (8) in einer Konzentration von jeweils 0,04 M eingesetzt. Relative Mengen des HMMF-Thioethers wurden über die Peakfläche des Pseudomoleküls m/z 281 mittels LC-MS bestimmt. Experimentelle Details siehe Kap. 3.3.10.2.



**Abb. 26: Einfluss von zweiwertigen Metallionen und NAD+ auf die enzymatische Bildung des Thioethers.** Es erfolgte ein Zusatz von Magnesiumionen (Mg<sup>2+</sup>), Zinkionen (Zn<sup>2+</sup>) und Manganionen (Mn<sup>2+</sup>), jeweils mit und ohne zusätzliche Zugabe von NAD<sup>+</sup>. Relative Mengen des HMMF-Thioethers wurden über die Peakfläche des Pseudomoleküls m/z 281 mittels LC-MS bestimmt. Experimentelle Details siehe Kap. 3.3.10.2.

Die Ergebnisse der Vorversuche mit einem Proteinrohextrakt aus Erdbeerfrüchten weisen deutlich darauf hin, dass die Reaktion von D-Fruktose-1,6-diphosphat zu HMMF enzymatisch katalysiert wird. Durch Zusatz des Cosubstrats  $\text{NAD}^+$  und verschiedener zweiwertiger Metallionen wird die enzymatische Umsetzung gesteigert. Da sich die weitere Isolierung des verantwortlichen Enzyms aufgrund des uneinheitlichen Erdbeer-Ausgangsmaterials während des Jahres als sehr schwierig gestaltete, wurde die alternative Strategie der Klonierung und heterologen Expression von Kandidatengenen gewählt.

Neben den bereits erläuterten Ähnlichkeiten der Substrate und der Reaktionsabfolge deuten die bisherigen Ergebnisse auf eine mögliche Beteiligung der DHQS an der HMMF-Biosynthese hin, denn DHQS benötigt  $\text{NAD}^+$  als Cosubstrat und ein zweiwertiges Metallion als Cofaktor (Bischoff et al., 1996). Es sollten deshalb potentielle DHQS-Gene der Erdbeere und anderer HDMF-bildenden Pflanzenarten kloniert und heterolog exprimiert werden.

### 2.3.2 3-Dehydroquinat-Synthase-Gensequenzen

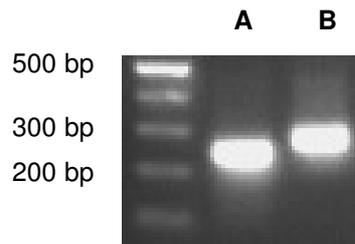
Aus den Datenbanken „Genome Database for Rosaceae“ (Jung et al., 2008) und „GenBank“ (Benson et al., 2005) waren zwei *Expressed Sequence Tag* (EST)-Fragmente, Accession-Nr. DY671781 und DY676094, aus *Fragaria vesca* bekannt. Eine BLAST-Suche der beiden 566 bzw. 767 Basenpaare umfassenden Fragmente ergab für beide eine hohe Übereinstimmung mit 3-Dehydroquinat-Synthase-Sequenzen verschiedener Organismen. Zwischen den beiden Fragmenten konnte jedoch keine Übereinstimmung festgestellt werden. Da das Genom von *Fragaria x ananassa* bislang noch nicht vollständig sequenziert ist, gab es keine Vollängensequenzen von 3-Dehydroquinat-Synthasen der Erdbeere. Die Fragmente werden im Folgenden als *FaDHQS-Fragment1* (DY671781) bzw. *FaDHQS-Fragment2* (DY676094) bezeichnet.

Das Genom von *Vitis vinifera* ist seit 2007 entschlüsselt (Jaillon et al. 2007). Aus dem Vitis Grape Genome Browser wurde eine Sequenz identifiziert, die wahrscheinlich für eine 3-Dehydroquinat-Synthase codiert (GSVIVT00020921001) und im Folgenden als *VvDHQS-putativ* bezeichnet wird.

### 2.3.3 Genexpressionsanalyse der *Fragaria x ananassa* DHQS-Fragmente

Die Genexpression der zwei *Fragaria x ananassa* DHQS-Fragmente *FaDHQS-Fragment1* und *FaDHQS-Fragment2* wurde in verschiedenen Geweben der Erdbeere mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) unter Verwendung eines

Fluoreszenzfarbstoffes untersucht. Hierfür wurde zunächst RNA aus Blättern (Bl), geschlossenen Blüten (B-g), offenen Blüten (B-o) und grünen (G), weißen (W) und roten Erdbeerfrüchten (R) isoliert. Nach einer DNase-Behandlung wurde die RNA revers in cDNA transkribiert. Die Primerpaare FaDHQS-Frag1\_qPCR\_fw und FaDHQS-Frag1\_qPCR\_rev bzw. FaDHQS-Frag2\_qPCR\_fw und FaDHQS-Frag2\_qPCR\_rev ergaben in der PCR-Reaktion ein Amplifikat von 237 bzw. 268 bp (Abb. 27).



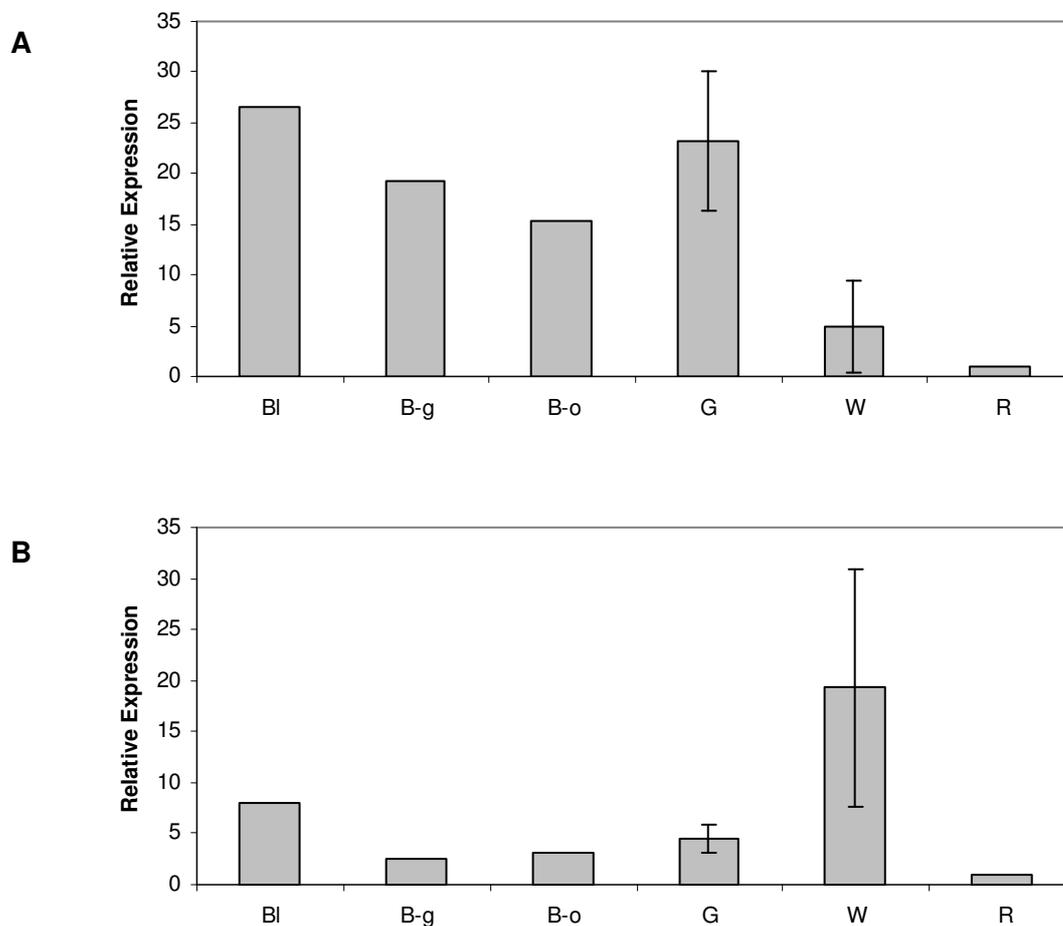
**Abb. 27: Überprüfung der für die quantitative PCR verwendeten Primerpaare. A** DNA-Fragment von 237 bp für *FaDHQS-Fragment1*, **B** DNA-Fragment von 268 bp für *FaDHQS-Fragment2*.

Um sicherzustellen, dass es sich bei dem Produkt der PCR-Reaktion um das gewünschte Fragment handelt, wurde das amplifizierte DNA-Fragment sequenziert. Die Ergebnisse der quantitativen PCR wurden mit dem Referenzgen RNA Interspacer 16S–23S normalisiert (Casado-Diaz et al., 2006) und als relative Expression bezogen auf rote Früchte (R) nach der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode dargestellt (Livak und Schmittgen, 2001). Abb. 28 zeigt die Genexpression von *FaDHQS-Fragment1* und *FaDHQS-Fragment2* in den untersuchten Geweben. Bei *FaDHQS-Fragment1* wird in Blättern, geschlossenen Blüten, offenen Blüten und in der grünen Frucht eine hohe Genexpression detektiert. Während der Fruchtreifung geht die Expression deutlich zurück, so dass in der weißen und roten Frucht nur geringe Transkriptmengen nachweisbar sind.

Anders verhält es sich bei *FaDHQS-Fragment2*. Hier ist in Blättern, geschlossenen Blüten, offenen Blüten und in der grünen Frucht die Genexpression gering. In der weißen Frucht steigt die Expression sehr stark an, um dann in der roten Frucht wieder abzusinken. Bei beiden untersuchten DHQS-Fragmenten ändert sich die Expression während der Fruchtreifung.

Die Expression des an der HDMF-Biosynthese beteiligten Enzyms FaEO steigt im Verlauf der Fruchtreifung an (Raab et al., 2006), genauso wie der HDMF-Gehalt in der Erdbeerfrucht. Das Expressionsmuster von *FaDHQS-Fragment2* korreliert besser mit den bisherigen Erkenntnissen zur HDMF-Biosynthese als das Expressionsmuster von

*FaDHQS-Fragment1*, daher wird im Folgenden nur mit *FaDHQS-Fragment2* weitergearbeitet.



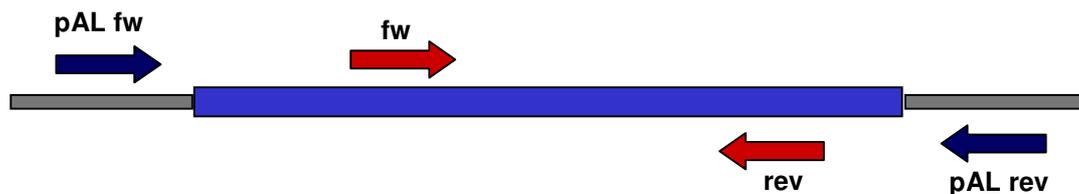
**Abb. 28: Genexpressionsstudie der zwei *FaDHQS*-Fragmente in verschiedenen Geweben der Erdbeere.** Expression in Blatt (Bl), geschlossener Blüte (B-g), offener Blüte (B-o), grüner Frucht (G), weißer Frucht (W) und roter Frucht (R). Die relativen Expressionswerte beziehen sich auf rote Früchte (R). **A** Expressionsstudie von *FaDHQS-Fragment1*, **B** Expressionsstudie von *FaDHQS-Fragment2*.

### 2.3.4 Klonierung von Vollängensequenzen

#### 2.3.4.1 Klonierung der *Fragaria x ananassa* 3-Dehydroquinat-Synthase

Da keine Vollängensequenz für *FaDHQS* bekannt war, sondern die Datenbank nur ein Fragment von 767 bp (*FaDHQS-Fragment2*) enthielt, musste zunächst der vollständige offene Leserahmen ermittelt werden, um anschließend eine heterologe Expression dieses Enzyms durchführen zu können. Dies geschah durch den Einsatz einer cDNA-Bibliothek, die von Prof. Dr. Victoriano Valpuesta (Universidad de Málaga, Spanien) zur

Verfügung gestellt wurde. Zur Herstellung dieser cDNA-Bibliothek wurde RNA aus weißen, grünen und roten Früchten gepoolt, aus der RNA nach dem SMART<sup>TM</sup>-Ansatz doppelstängige cDNA hergestellt (Zhu et al., 2001) und diese cDNA anschließend normalisiert (Zhulidov et al., 2004). Nach gerichteter Ligation der normalisierten cDNA in den pAL-Vektor wurden *Escherichia coli* (*E. coli*) transformiert und aus einer Kultur dieser *E. coli* die Plasmid-DNA isoliert. Diese Plasmid-DNA wurde als Template für die Polymerase-Kettenreaktionen eingesetzt.



**Abb. 29: Schematische Darstellung der Klonierung der Vollängensequenz der FaDHQS aus der cDNA-Bibliothek.** Als Template für die Polymerase-Kettenreaktionen wird Plasmid-DNA verwendet, die die in einen pAL-Vektor integrierte cDNA-Bibliothek enthält. Nach Amplifikation mit einem vektorspezifischen Vorwärts-Primer (pAL fw) und einem genspezifischen Rückwärts-Primer (rev) bzw. einem genspezifischen Vorwärts-Primer (fw) und einem vektorspezifischen Rückwärts-Primer (pAL rev), kann aus der Kombination der beiden erhaltenen Sequenzen die Volllänge des offenen Leserahmens des gesuchten Gens zusammengesetzt werden.

Durch Kombination aus einem vektorspezifischen Vorwärts-Primer (pAL fw) und einem genspezifischen Rückwärts-Primer (rev) bzw. einem genspezifischen Vorwärts-Primer (fw) und einem vektorspezifischen Rückwärts-Primer (pAL rev) (Abb. 29) wurden zwei Sequenzen erhalten, aus denen die Vollängensequenz der *Fragaria x ananassa* 3-Dehydroquinat-Synthase (*FaDHQS*) zusammengesetzt wurde. *FaDHQS* weist einen offenen Leserahmen von 1071 bp auf und codiert für ein Protein mit 356 Aminosäuren (Abb. 30). Zur biochemischen Charakterisierung der *FaDHQS* wurde der vollständige offene Leserahmen mit einer korrekturlesenden Polymerase amplifiziert und subkloniert. Hierfür wurden Primer verwendet, die vor der Start-Codon und nach dem Stopp-Codon Restriktionsschnittstellen einführten. Der subklonierte offene Leserahmen wurde vollständig sequenziert und anschließend in einen Expressionsvektor kloniert.

<b>FaDHQS</b>	-----MSFRS-----SKKTVW	11
<b>VvDHQS</b>	MLLVKSKSCLISWEVHSITNSSNNSGKRARLQFSSRVTCSSHSSSVTSAGYRQHKVWV	60
<b>FaDHQS</b>	VWTESKQVMTAAVERGWNTFVFQ--SQKLADDWSSIALIDPLLMKEGGIFDSENRVATV	69
<b>VvDHQS</b>	IWTESKQVMTAAVERGWNTFIFPPDHRELATEWSSIALIHPLFIKEGKLFDFSEGRGVATV	120
<b>FaDHQS</b>	FEVSSPEELEQLQPEENGVGENVVVDLLDWQVIPAENIVAFAFQGSQKTVFAVSKTFVEAQV	129
<b>VvDHQS</b>	YDVTSPQQLQLQPEDKQADNVIINLLDWQVIPAENIVAFAFQGSHTVFAISKSPSEAQI	180
<b>FaDHQS</b>	FFEALEHGLGGVVLKVEDVQAVLDLKDYFDRRDEVGNILSLTKAIVTGVQVAGMGDRVCV	189
<b>VvDHQS</b>	FLEALEQGLGGVVLKVEDATAVLELKDYFDRRNEEDNNILSLTKATITQIHISGMGDRVCV	240
<b>FaDHQS</b>	DLCSLMRPGEGLLVGSFARGLFLVHSECLSNYIASRPFVRNAGPVHAYVAIPGGKTSYL	249
<b>VvDHQS</b>	DLCSLMRPGEGLLVGSFARGLFLVHSECLSNYIASRPFVRNAGPVHAYVAIPGGKTCYL	300
<b>FaDHQS</b>	SELKAGKEVILVDQEGHQRTAIVGRAKIETRPLILVEAKMCSDDQTIYSILVQNAETVAL	309
<b>VvDHQS</b>	SELVTGKEVIVVDQNGKQRTAIVGRVKIETRPLILVEAKGDSDNGLTLYSVLLQNAETVAL	360
<b>FaDHQS</b>	VCPKKESSGRKTAIPVTSLVKVGDEIMLRLQGGARHTGIEIQEFIVEK-	356
<b>VvDHQS</b>	ICPSQSGYQKKAIPVTSLVKVGDEVLLRVQGGARHTGIEIQEFIVEK-	407

**Abb. 30: Alignment von FaDHQS und VvDHQS auf Proteinebene.** Die Sequenzen wurden mit der ClustalW Methode angeordnet (Thompson et al., 1994). Identische Aminosäuren sind grau hinterlegt.

#### 2.3.4.2 Klonierung der *Vitis vinifera* 3-Dehydroquinat-Synthase

Eine Gensequenz, die für eine 3-Dehydroquinat-Synthase codiert, wurde dem *Vitis* Grape Genome Browser entnommen und als *VvDHQS-putativ* bezeichnet. Bei der Amplifizierung war ein Genfragment mit einer Länge von 1218 bp zu erwarten. Die für die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzten Primer enthielten vor der Start-Codon und nach dem Stopp-Codon Bereiche, die jeweils für eine Restriktionsschnittstelle codierten, um eine spätere Klonierung in einen Expressionsvektor zu ermöglichen. Die Sequenzierung der so amplifizierten Sequenz *VvDHQS* ergab einige Abweichungen zu der aus der Datenbank entnommenen Sequenz *VvDHQS-putativ*. *VvDHQS* weist einen offenen Leserahmen von 1224 bp auf und codiert für ein Protein mit 407 Aminosäuren (Abb. 30).

	1010	1020	1030	1040	1050
<i>VvDHQS-putativ</i>	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....				
	TCCTTGTGGAGGCCAAGG----	TTTA--	TAATGGTACTCTTTATAGTGCCTTCI		
<i>VvDHQS</i>	.....GAGA..C.GA.....				

**Abb. 31: Ausschnitt aus den Gensequenzen von *VvDHQS-putativ* und *VvDHQS*.** *VvDHQS* enthält ab Position 1019 bp einen Einschub von 6 bp im Vergleich zu der aus der Datenbank entnommenen *VvDHQS-putativ*.

Neben sechs Punktmutationen gibt es eine größere Abweichung zwischen *VvDHQS-putativ* und *VvDHQS*, die zu der um 6 bp längeren Sequenz von *VvDHQS* führt. Ein Ausschnitt aus den Gensequenzen in diesem Bereich ist in Abb. 31 dargestellt.

Die Veränderungen der Gensequenz führen zu Abweichungen in der Aminosäuresequenz des Enzyms, die in Tab. 5 aufgelistet sind. Ein Alignment von *FaDHQS* und *VvDHQS* auf Proteinebene ergab eine Übereinstimmung der Sequenzen von 67 % (Abb. 30).

Nachdem der subklonierte offene Leserahmen vollständig sequenziert war, wurde *VvDHQS* in einen Expressionsvektor kloniert.

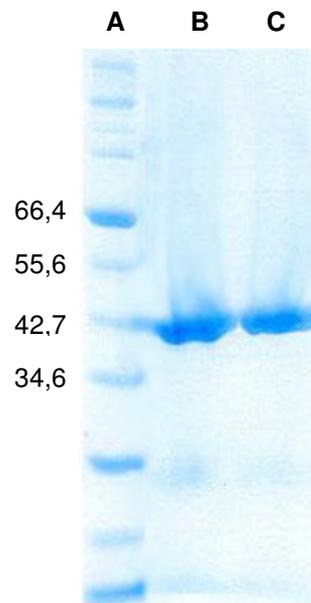
**Tab. 5: Abweichungen der Aminosäuresequenz von *VvDHQS-putativ* zu *VvDHQS*.**

Aminosäure-Position	<i>VvDHQS-putativ</i>	<i>VvDHQS</i>
16	Alanin	Valin
31	Glutamin	Arginin
83	Leucin	Prolin
340	-	Glycin
341	-	Asparaginsäure
342	Valin	Serin
343	Tyrosin	Asparaginsäure
389	Leucin	Valin

### 2.3.5 Heterologe Expression

Um eine Beteiligung an der HDMF-Biosynthese nachzuweisen und um eine biochemische Charakterisierung zu ermöglichen, wurden die beiden 3-Dehydroquinat-Synthasen aus der Erdbeere bzw. aus Wein heterolog in *Escherichia coli* exprimiert. Zur heterologen Expression wurde der vollständige offene Leserahmen von *FaDHQS* bzw. *VvDHQS* in den Expressionsvektor pET-29a(+) kloniert. In diesem Vektor werden die rekombinanten Proteine mit einem N-terminalen *S-Tag*-Protein exprimiert, so dass es möglich ist, das jeweilige Zielprotein nach der Expression über diesen *S-Tag* aufzureinigen. Als Expressionsstamm wurde *E. coli* BL21 (DE3) pLys verwendet. Dieser Stamm zeigt eine verringerte Proteaseaktivität und enthält einen Promotor, der unter Kontrolle eines *lacUV5* Operon steht. Durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG) wurde die Proteinexpression induziert, die über Nacht bei 16°C

erfolgte, was die Menge an aktivem, löslichen Protein erhöhen sollte (Ford et al., 1998). Die Zellen wurden anschließend durch Behandlung mit einer Ultraschall-Sonotrode aufgeschlossen, und affinitätschromatographisch isoliert. Auf diese Weise konnte das Enzym FaDHQS in löslicher Form heterolog exprimiert und aufgereinigt werden (Abb. 32).



**Abb. 32: SDS-PAGE von rekombinanter FaDHQS nach Aufreinigung einer Expressionskultur mittels Affinitätschromatographie über den S-Tag.** Aufgetragen wurden das 1. Eluat nach Affinitätschromatographie (**B**), das 2. Eluat (**C**) sowie ein Molekulargewichtsmarker in kDa (**A**).

Das Molekulargewicht der im SDS-Page-Gel deutlich zu erkennenden Bande stimmt gut mit dem erwarteten Molekulargewicht des rekombinanten Enzyms überein. FaDHQS hat ein berechnetes Molekulargewicht von 38,9 kDa und der S-Tag ein berechnetes Molekulargewicht von 4,5 kDa. Zu erwarten war daher eine Bande bei einem Molekulargewicht von 43,4 kDa. Zeitgleich wurde als Kontrolle ein *E.coli* Stamm aufgearbeitet, der den pET-29a(+) Leervektor enthielt. Im SDS-PAGE-Gel war für diese Kontrolle keine Bande zu sehen.

Die heterologe Expression und Aufreinigung des Enzyms VvDHQS wurde auf die gleiche Art und Weise durchgeführt wie bei FaDHQS. Jedoch war auf dem entsprechenden SDS-PAGE-Gel keine Bande zu erkennen, die dem Enzym VvDHQS entsprach. Die Expression von rekombinanter VvDHQS war daher nicht möglich.

### 2.3.6 Biochemische Charakterisierung

Vor den Untersuchungen zu einer möglichen Beteiligung der FaDHQS an der HMMF-Biosynthese sollte zunächst geklärt werden, ob das rekombinante Enzym in aktiver Form vorlag. Das Substrat von DHQS im zweiten Schritt des Shikimatwegs ist 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonat-7-phosphat (DAHP), das zu 3-Dehydroquinat umgesetzt wird. Da DAHP kommerziell nicht erhältlich ist, wurde ein gekoppelter Aktivitätstest eingesetzt. Zunächst sollte eine DAHP-Synthase aus *Saccharomyces cerevisiae*, die den ersten Schritt des Shikimatwegs katalysiert, Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat zu DAHP umsetzen. Wenn nach Zugabe von FaDHQS die entstandene DAHP-Menge wieder abnimmt, liegt das Enzym FaDHQS in aktiver Form vor. Grundlage für diesen gekoppelten Aktivitätstest war ein photometrischer DAHP-Synthase-Assay (Jensen und Nester, 1966; Srinivasan und Sprinson, 1959). Hierfür wurde ein Rohproteinextrakt, der eine DAHP-Synthase enthielt, mit Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat versetzt, um DAHP zu bilden. Nach Abbruch der enzymatisch katalysierten Reaktionen durch Zusatz von Trichloressigsäure wurde Natriumperodat zugegeben, um DAHP zu  $\beta$ -Formylpyruvat zu oxidieren. Mit Natriumarsenit wurde überschüssiges Periodat reduziert und anschließend Thiobarbitursäure zugesetzt, die mit  $\beta$ -Formylpyruvat zu einer intensiv pinkfarbenen Verbindung reagiert, die ein Absorptionsmaximum bei 549 nm besitzt. Diese entstandene Verbindung wurde durch photometrische Messung nachgewiesen.

Um die Aktivität von FaDHQS zu testen wurden zwei Ansätze untersucht. Zum ersten Ansatz wurde nach Bildung von DAHP das Enzym FaDHQS zugesetzt, bei einem zweiten Ansatz wurde lediglich Puffer zugegeben. Die Differenz aus diesen beiden Ansätzen entsprach dann dem durch FaDHQS umgesetzten Anteil von DAHP. Bei beiden Ansätzen fand die Farbreaktion statt und die pinkfarbene Verbindung konnte photometrisch vermessen werden. Allerdings wurde in beiden Ansätzen die gleiche Extinktion gemessen, es fand also keine Umsetzung von DAHP zu 3-Dehydroquinat durch FaDHQS statt.

Um die mögliche Beteiligung der FaDHQS an der HMMF-Biosynthese zu überprüfen wurde auch die Bildung des Thioethers nach Umsetzung von D-Fructose-1,6-diphosphat unter Zugabe von 3-Mercaptobenzoessäure getestet (Kap. 2.3.1). Es konnte jedoch keine Bildung des Thioethers nachgewiesen werden.

## 2.4 Diskussion

### 2.4.1 Genexpressionsprofile

Die zwei untersuchten 3-Dehydroquinat-Synthase-Gene *FaDHQS-Fragment1* und *FaDHQS-Fragment2* werden reifekorreliert exprimiert. *FaDHQS-Fragment1* weist hohe Transkriptmengen in den Blüten auf, die höchsten Transkriptmengen sind jedoch in der grünen Frucht und in Blattgewebe zu finden. Mit der Fruchtreifung sinkt die Expression deutlich ab. *FaDHQS-Fragment2* zeigt ein völlig anderes Genexpressionsprofil. Während in Blattgewebe, Blüten und in der grünen Frucht niedrige Transkriptmengen zu finden sind, steigt die Expression in der weißen Frucht deutlich an um dann in der roten Frucht wieder stark zurückzugehen.

Das Vorkommen von zwei unterschiedlichen Gensequenzen für ein Enzym des Shikimatwegs, die unterschiedliche gewebespezifische Genexpressionsprofile zeigen, wurde bereits für zwei DAHP-Synthase-Gene in der Tomate (*Solanum lycopersicum*), *LeDHS1* und *LeDHS2*, beschrieben (Görlach et al., 1993). Weitere Untersuchungen zu Enzymen des Shikimatwegs der Tomate deuten darauf hin, dass auch Gene, die für eine Shikimatkinase, eine EPSP-Synthase, zwei Chorismat-Synthase-Isoenzyme und eine 3-Dehydroquinat-Synthase codieren, Genexpressionsprofile aufweisen, die dem der *LeDHS2* gleichen (Bischoff et al., 1996). Die Beobachtung, dass die gewebespezifischen Expressionsprofile nicht für alle Gene gleich sind, deutet darauf hin, dass nicht in allen Geweben der gleiche Anteil an Dehydroquinat zu Chorismat umgesetzt wird. Die Enzyme mit übereinstimmenden gewebespezifischen Expressionsprofilen sind wahrscheinlich am Primärstoffwechsel beteiligt, während die Enzyme mit abweichenden Genexpressionsprofilen eher die Synthese von Produkten des Sekundärstoffwechsels katalysieren.

*FaDHQS-Fragment1* zeigt eine hohe Ähnlichkeit zu der beschriebenen 3-Dehydroquinat-Synthase aus *Solanum lycopersicum* (GenBank Accession-Nr. AAL77575.1). Bei der Untersuchung des Expressionsprofils dieser *Solanum lycopersicum* DHQS wurden keine Früchte verwendet, daher ist ein Vergleich der Expressionsprofile nicht möglich (Bischoff et al., 1996). Die Ähnlichkeit der Sequenzen deutet darauf hin, dass es sich bei *FaDHQS-Fragment1* um ein Gen handelt, das für ein Enzym codiert, welches am Primärstoffwechsel beteiligt ist.

Für Enzyme der HMMF-Biosynthese ist es wahrscheinlich, dass ihre Expression im Verlauf der Fruchtreifung ansteigt, wie dies auch bei FaEO der Fall ist (Raab et al., 2006). Die Expression von *FaDHQS-Fragment2* steigt in der weißen Frucht deutlich an und sinkt in der roten Frucht bereits wieder ab. FaDHQS2 könnte somit sowohl die Vorläufer der Polyphenole als auch den HDMF-Prekursor liefern.

### 2.4.2 Heterologe Expression

Es war nicht möglich, das Enzym VvDHQS heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Eine mögliche Ursache wäre ein Stoppcodon innerhalb der Sequenz, das einen Abbruch der Translation zur Folge hätte. Diese Möglichkeit wurde durch Analyse der Sequenzierergebnisse ausgeschlossen. Es wurde auch kontrolliert, ob der offene Leserahmen des Enzyms in das Plasmid *in frame* eingebaut wurde, da durch eine Verschiebung das Ablesen des Leserahmens nicht mehr möglich wäre. Der vollständige offene Leserahmen von VvDHQS war jedoch korrekt in dem Plasmid enthalten. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass das exprimierte Protein nach dem Zellaufschluss nicht im Überstand mit den löslichen Proteinen enthalten war, sondern sich in sogenannten Einschlusskörperchen (engl. *inclusion bodies*) im Rückstand befand. Es ist häufig der Fall, dass überexprimierte Enzyme aufgrund von falscher Faltung in diesen unlöslichen Aggregaten enthalten sind (Baneyx und Mujacic, 2004). Eine Aufreinigung aus dem Überstand führt dann nicht zur Anreicherung des Enzyms. Auf ein SDS-PAGE-Gel wurde auch ein Teil des Pellets, das die Einschlusskörperchen enthalten würde, aufgetragen, jedoch war auch hier keine mit VvDHQS übereinstimmende Proteinbande sichtbar. Durch Verwendung des gleichen Vektors und Expressionsstamms wie bei der heterologen Expression von FaDHQS und der bestehenden Ähnlichkeit der Gensequenzen beider Enzyme war davon auszugehen, dass die Expression von VvDHQS wie auch die Expression von FaDHQS in diesem System gelingen würde. Bei Einsatz eines anderen Vektors und Expressionsstamms oder bei Verwendung eines anderen Expressionssystems wie *Saccharomyces cerevisiae* wäre eine Expression eventuell möglich.

### 2.4.3 Biochemische Charakterisierung

Im Enzymassay konnte keine Aktivität von FaDHQS nachgewiesen werden. Dies kann im Wesentlichen auf zwei Ursachen beruhen. Entweder wurde das Enzym nicht in aktiver Form exprimiert oder die Bedingungen des Aktivitätstests waren nicht optimal. Bisher ist nur die Expression einer 3-Dehydroquinat-Synthase aus einer höheren Pflanze (Tomate) beschrieben worden. Allerdings wurde das Enzym nicht heterolog exprimiert, aufgereinigt und dann auf seine Aktivität hin untersucht, sondern es wurde ein DHQS-defizienter *E. coli* Stamm mit einem *Solanum lycopersicum* DHQS enthaltenden Plasmid transformiert, der anschließend wieder DHQS-Aktivität zeigte (Bischoff et al., 1996). Es ist möglich, dass ein Enzym nach heterologer Expression in *E. coli* nicht die richtige Konformation erlangt oder die Aktivität aufgrund von proteolytischer Degradation wieder verloren geht (Baneyx und Mujacic, 2004). Bakterien wie *E. coli* können nicht alle post-translationalen Modifikationen durchführen,

die eventuell für eine richtige Faltung des Enzyms notwendig wären. Die Ausbildung von stabilen Disulfid-Brücken ist im reduzierenden Mileu des Cytoplasma von *E. coli* praktisch nicht möglich (Ritz und Beckwith, 2001). Möglicherweise war das Enzym nach der Expression und Aufreinigung nicht aktiv, weil es seine Funktionalität durch Denaturierungsprozesse verloren hatte. Es ist jedoch auch möglich, dass die Bedingungen im Enzymassay nicht den Anforderungen des Enzyms entsprachen. Der angewendete gekoppelte Aktivitätstest ist vorher noch nicht beschrieben worden. Da in der Literatur kein derartiger Assay für eine 3-Dehydroquinat-Synthase beschrieben ist, war es schwierig, die optimalen Reaktionsbedingungen einzustellen, bei denen das rekombinante Enzym Aktivität zeigen würde.

Es konnte keine Aktivität des Enzyms FaDHQS nachgewiesen werden, daher kann nicht bestätigt, aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass der erste Schritt der HDMF-Biosynthese von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HMMF durch das Enzym 3-Dehydroquinat-Synthase in einer Nebenreaktion katalysiert wird.

Der Bildungsweg von HMMF konnte zwar nicht geklärt werden, aber die Expressionsdaten der FaDHQS mit einem Maximum in unreifen grünen Früchten unterstützen die Hypothese der zweiphasigen Bildung von Polyphenolen während der Erdbeerfruchtreifung. Zimtsäure, ein Vorläufer der Polyphenole, wird aus Phenylalanin, das aus dem Shikimat-Stoffwechsel stammt, über die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) gebildet, deren Expression auch in der frühen Phase der Fruchtreifung bereits ein Maximum zeigt (Cheng und Breen, 1991; Halbwirth et al., 2006).

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich, Fluka, Riedel de Haën (alle Taufkirchen), Merck, Applichem (beide Darmstadt) und Carl Roth (Karlsruhe) bezogen. Alle Lösungen wurden mit destilliertem Wasser hergestellt. Zur Isolierung von RNA wurde DEPC-Wasser verwendet. Zur Herstellung von DEPC-Wasser wurde destilliertes Wasser mit 5 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) pro Liter Wasser versetzt, über Nacht gerührt und anschließend autoklaviert.

##### 3.1.2 Pflanzenmaterial

Erdbeerfrüchte (*Fragaria x ananassa* Sorte Polka) wurden im lokalen Handel erworben. Die verwendeten stabil transgenen Erdbeerfrüchte wurden von Prof. Juan Muñoz-Blanco (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, Spanien) zur Verfügung gestellt.

Blattmaterial von *Vitis vinifera* Sorte Spätburgunder stammte vom Lehrstuhl für Zierpflanzenbau (Technische Universität München).

##### 3.1.3 Bakterien- und Hefestämme

Folgende Bakterien- und Hefestämme wurden in dieser Arbeit verwendet:

- *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe)
- *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen, Darmstadt) mit Chloramphenicol-Resistenz (34 mg/l)
- *Saccharomyces cerevisiae* RH2424

Der Hefestamm *S. cerevisiae* RH2424 wurde von Prof. Braus (Institut für Molekulare Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt.

##### 3.1.4 Vektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Vektoren verwendet. Transformierte Organismen wurden über die angegebenen Antibiotika-Resistenzen selektiert.

- pGEM-T (Promega); Ampicillin-Resistenz (100 mg/l)
- pET-29a(+) (Novagen); Kanamycin-Resistenz (15 mg/l)

- pAL 17.3 (Evrogen, Moskau, Russland); Ampicillin-Resistenz (100 mg/l)
- pME2385 (Prof. Braus, Universität Göttingen); Ampicillin-Resistenz (100 mg/l)

### 3.1.5 Enzyme

Reverse Transkriptase:	iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, München)
DNA-Polymerasen:	Phusion DNA Polymerase (Finnzymes, Finnland) Taq DNA Polymerase (New England Biolabs) peqGold Red-Master-Mix Y (peqLab) iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad)
Restriktionsenzyme:	EcoRI, NotI, Sall, SphI (New England Biolabs) SpeI (Fermentas)
Sonstige Enzyme:	T4 DNA Ligase (Promega) Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP) (New England Biolabs) DNaseI (Sigma-Aldrich)

### 3.1.6 Primer

#### Vektorspezifische Primer

M13	5'-TGTA AACGACGGCCAG-3'
M13r	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGG-3'
T7term	5'-TGCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
pAL_fw	5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG-3'
pAL_rev	5'-CACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCC-3'

#### Klonierung der offenen Leserahmen

FaDHQS_fw	5'-AAGTGGGCAACATATTGAGTTTGACCAAAGCC-3'
FaDHQS_rev	5'-ATAGGCATGTACAGGTCCCGCATTGACTCG-3'
FaDHQS_Sall_fw	5'-ACGCGTCGACTCATGTCTGTTTCGGAGCTCG-3'
FaDHQS_NotI_rev	5'-TGCGGCCGCTTATTTCTCCACAATGAATTCTTG-3'
VvDHQS_EcoRI_fw	5'-GGAATTCATGCTCTTAGTCAAGTCCAAGAGTTGC-3'
VvDHQS_NotI_rev	5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCATTTTTCAACAAT AAACTC-3'

## Quantitative PCR

FaDHQS-Frag1_qPCR_fw	5'-CGTCAAGCTGACCGTAGCG-3'
FaDHQS-Frag1_qPCR_rev	5'-CAACGGCGCAACTCTGGTGT-3'
FaDHQS-Frag2_qPCR_fw	5'-AAGGGAGTCAGAAGACGGTG-3'
FaDHQS-Frag2_qPCR_rev	5'-TCCTTCACCAGGTCTCATGAG-3'

**3.1.7 Kommerziell erhältliche Kits für molekularbiologische Arbeiten**

- Plasmid-Isolierung: Wizard Plus SV Miniprep Kit (Promega)
- Gelextraktion: QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)

**3.1.8 Sonstiges Material**

- Talon™-Harz (BD Biosciences, Clontech, Mountain View, USA)
- Talon™ 2 ml Disposable Gravity Column, Polypropylene (BD Biosciences)
- S-Potein-Agarose (Novagen)
- Protein-Fertiggel: ProGel-Tris-Glycin-Gel, 12 %, 1 mm Schichtdicke (Anamed, Gross-Bieberau, Deutschland)

**3.1.9 Medien, Puffer und sonstige Lösungen****Medien**

LB-Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl pH 7,0
LB-Agar	LB-Medium 1,5 % Agar
SOC-Medium	20 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 0,5 g/l NaCl 2,5 mM KCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 2 mM Glucose (separat steril filtriert)

YPD-Medium	20 g/l Pepton 10 g/l Hefeextrakt 20 g/l Glucose
BMMD-Medium	6,7 g/l <i>Yeast nitrogen base w/o amino acids</i> (Difco™, BD Diagnostics, Heidelberg) 36 mM Citronensäure 126 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 6,5 auf 850 ml auffüllen und autoklavieren 20 g Glucose mit Wasser zu 100 ml lösen, getrennt autoklavieren und zugeben 38,5 mg Histidin 57,6 mg Leucin in 50 ml Wasser lösen, getrennt autoklavieren und zugeben

### Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

TFB1-Puffer	30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl <sub>2</sub> 50 mM MnCl <sub>2</sub> 100 mM RbCl 15 % Glycerin pH 5,8 (mit 1 M Essigsäure eingestellt) steril filtriert
-------------	---

TFB2-Puffer	100 mM MOPS 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM RbCl 15 % Glycerin pH 6,5 (mit 1 M KOH eingestellt) steril filtriert
-------------	---

### Lösungen zur Agarose-Gelelektrophorese

1x TAE-Puffer	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA
---------------	---

10x DNA-Ladepuffer	0,21 % Orange G 0,1 M EDTA 50 % Glycerin pH 8,0
DNA Größenstandard	Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas)

### Lösungen zum Arbeiten mit Proteinen

Protein-Extraktions-Puffer	0,7 M Saccharose 0,1 M KCl 0,5 M Tris-HCl 50 mM EDTA pH 8 1 mM PMSF 2 % $\beta$ -Mercaptoethanol
1x His-Extraktions/Wasch-Puffer	50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 300 mM NaCl pH 7,0
1x His-Elutions-Puffer	1x His-Extraktions/Wasch-Puffer 150 mM Imidazol
1x S-Tag-Binde/Wasch-Puffer	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0,1 % Triton X-100 pH 7,5
1x S-Tag-Elutions-Puffer	1x S-Tag-Binde/Wasch-Puffer 0,2 M Citronensäure pH 2
Bradford-Lösung	0,01 % Coomassie Brilliantblau G-250 5 % Ethanol 8,5 % Phosphorsäure in $\text{H}_2\text{O}$
McIlvaine-Puffer	0,1 M Citronensäure 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

in einem bestimmten Verhältnis mischen um gewünschten pH-Wert zu erhalten

### Lösungen für SDS-PAGE

1x Tris/Glycin/SDS-Puffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS pH 8,3
Protein-Lade-Puffer	4x Roti-Load (Roth)
Protein-Größenstandard	Protein Marker, Broad Range (2-212 kDa) (New England BioLabs)
Coomassie-Färbelösung	120 ml Methanol 24 ml Eisessig 330 mg Coomassie Brilliantblau G-250 120 ml H <sub>2</sub> O
Entfärbelösung	7 % Eisessig 10 % Methanol in H <sub>2</sub> O

### Lösungen für 2-D-Gelelektrophorese

IEF-Puffer	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 4 % CHAPS 2 % Pharmalyte pH 3-10 (GE Healthcare, München) 1 % DTT
Rehydrierungspuffer	6 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 1 % CHAPS 0,5 % Pharmalyte pH 3-10 0,4 % DTT 0,002 % Bromphenolblau (Zugabe in Form einer 1 %igen Stammlösung)

---

Bromphenolblau-Stammlösung	1 % Bromphenolblau 50 mM Tris
Gelpuffer	1,5 M Tris 0,4 % SDS pH 8,6
Gellösung	12,5 % AA/BisAA-Lösung (30 %/0,8 %) 25 % Gelpuffer 5 % Glycerin 0,05 % APS 0,005 % TEMED
Verdrängungslösung	50 % Glycerin 0,01 % Bromphenolblau einige Körnchen Tris
Äquilibrierungspuffer I	6 M Harnstoff 30 % Glycerin 2 % SDS 0,05 M Tris-HCl 1 % DTT 0,002 % Bromphenolblau (Zugabe in Form einer 1 %igen Stammlösung) pH 8,8
Äquilibrierungspuffer II	6 M Harnstoff 30 % Glycerin 2 % SDS 0,05 M Tris-HCl 4 % Iodacetamid 0,002 % Bromphenolblau (Zugabe in Form einer 1 %igen Stammlösung) pH 8,8
Agaroselösung	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin

	0,1 % SDS
	0,5 % Agarose
	0,002 % Bromphenolblau (Zugabe in Form einer 1 %igen Stammlösung)
1x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % SDS
Fixierlösung	40 % Ethanol 10 % Eisessig
Färbelösung	0,1 % Coomassie Brilliantblau G-250 25 % Methanol 10 % Ammoniumsulfat 2 % Phosphorsäure

### **Lösungen für den enzymatischen Protein-Verdau**

Waschlösung	100 mM Ammoniumhydrogencarbonat
Entfärbelösung	50 % Acetonitril 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat
Digestion-Puffer	50 mM Ammoniumhydrogencarbonat 5 mM CaCl <sub>2</sub> pH 8,3
Trypsin-Lösung	20 µg Trypsin in 100 µl 1 mM HCl (0,2 mg/ml)
Extraktionslösung I	25 mM Ammoniumhydrogencarbonat
Extraktionslösung II	5 % Ameisensäure in Acetonitril

### **Weitere Lösungen**

1000x Ampicillin	25 mg/ml, steril filtriert
1000x Chloramphenicol	34 mg/ml Ethanol, steril filtriert
1000x Kanamycin	15 mg/ml, steril filtriert
1000x IPTG	238 mg/ml, steril filtriert

1000x X-Gal 50 mg/ml Dimethylformamid, steril filtriert

### 3.2 Geräte

#### 3.2.1 Flüssigkeitschromatographie-Elektrospray-Massenspektrometrie

HPLC	Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn)
Pumpe	Agilent 1100 Quarternäre Pumpe
Trennsäule	Luna C-18 (150 mm lang, 2 mm Innendurchmesser, Partikelgröße 5 µm) von Phenomenex
Vorsäule	Security Guard Cartridges (Phenomenex)
Säulentemperatur	25 °C
Fließmittel	A: Wasser (Merck) mit 0,1 % Ameisensäure (Roth) B: Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure (Riedel de Haën)
Fluss	0,2 ml/min
Gradienten	Untersuchung der Enzymassays zur Bestimmung der kinetischen Daten: 0-30 min: 0-100 % B Untersuchung der Erdbeerextrakte zur Bestimmung des relativen HDMF-Gehalts: 0-40 min: 0-100 % B Messung des Thioethers: 0 min: 0 % B, 10 min: 20 % B, 20 min: 100 % B, 25 min: 100 % B
Detektor	Agilent UV Variable Wavelength Detector
Massenspektrometer	Bruker Daltonics esquire 3000plus Ionenfalle (Bruker Daltonics, Bremen)
Ionisierungsspannung	-4000 V
Endplattenspannung	-500 V
Trockengas	Stickstoff (330 °C, 9 l/min)
Kollisionsgas	Helium (3,56 x 10 <sup>-6</sup> mbar)
Kollisionsenergie	1,0 V
Scan-Bereich	50 bis 800 m/z
Scan-Auflösung	13 000 m/z/s
ICC Target	30 000 oder 200 ms
Auswertung	DataAnalysis 3.1 Softwarepaket (Bruker Daltonics)

#### 3.2.2 Präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

HPLC	Analytische HPLC Maxi-Star (Knauer, Berlin)
Degasser	4-Wege-Degasser (Knauer)

Pumpe	HPLC Maxi Star Niederdruckpumpe mit analytischem Pumpenkopf und Dynamic Mixing Chamber (Knauer)
Injektor	Vier-Wege-Ventil Nr. 7125 (Rheodyne), Probenschleife 225 µl (Knauer)
Trennsäule	Synergi 4u Fusion RP-80, 250 mm x 15 mm, 4 µm (Phenomenex, Aschaffenburg)
Fließmittel	A: 0,05 % Ameisensäure in Wasser B: 0,05 % Ameisensäure in Acetonitril
Fluss	5 ml/min
Gradient	0 min: 25 % B; 20 min: 60 % B; 21 min: 100 % B; 25 min: 100 % B; 26 min: 0 % B; 35 min: 0 % B;
Detektor	UV-Detektor Nr. 29815 mit variabler Wellenlänge (Knauer)
Wellenlänge	259 nm; 349 nm
Auswertung	Software Eurochrom 2000 (Knauer)

### 3.2.3 Massenspektrometer zur Analyse der Peptid-Extrakte

Massenspektrometer	QToF-Ultima Global (Waters, Eschborn)
Kapillarspannung	3 kV
Linsenspannung	50 V
Desolvationstemperatur	200 °C
Desolvations-Gasfluss	350 l/h
Linsen-Gasfluss	50 l/h
Auswertung	Masslynx 4.0 (Waters)

### 3.2.4 Geräte zur 2-D-Gelelektrophorese

Rehydratationssystem	Immobiline DryStrip Reswelling Tray (GE Healthcare)
Äquilibrierungsröhren	Equilibration Tube Set (GE Healthcare)
Keramikschaalen	Ettan IPGphor Strip Holder (Amersham)
Fokussierungssystem	Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System-UM (Amersham, Freiburg)
Gelgießkammer	PROTEAN plus® Multi-Casting Chamber (Bio-Rad)
Gelelektrophoresekammer	PROTEAN Plus™ Dodeca Cell (Bio-Rad)
Gelkassetten	PROTEAN plus® Hinged Spacer Plates 25 x 20,5 x 0,1 cm <sup>3</sup> (Bio-Rad)

**3.2.5 Sonstige Geräte**

Thermocycler	iCycler iQ mit Optical Systems Software 3.0a (Bio-Rad) Primus 96 advanced (Peqlab Biotechnologie, Erlangen)
Spektralphotometer	Nicolet evolution 100 (Thermo, Cambridge, England) Nanodrop ND-1000 UV/Vis (Peqlab Biotechnologie)
Zentrifugen	Beckman Avanti J-25 (Beckman, Madrid, Spanien) Sigma 4K15 (Sigma, Osterode) Eppendorf 5415R (Eppendorf) Mini Spin 5452 (Eppendorf)
Sterile Werkbank	Waldner FAZ 3 (Waldner Laboreinrichtung, Wangen)
Autoklav	HST 4-5-7 (Zirbus Technology, Bad Grund)
Geldokumentation	SYNGENE G:BOX (Syngene, Cambridge, UK) mit Software GeneSnap Version 6.07.04
Speed-Vac	Christ RVC 2-18 (Christ)
Waagen	TP-214 (Denver Instrument, Göttingen) Scout Pro SP U 4001 (Ohaus, Pine Brook, USA)
pH-Meter	CG 820 (Ingold, Hofheim)
Ultraschallbad	RK103H (Bandelin Electronic, Berlin)
Ultraschall-Sonotrode	Bandelin Sonopuls UW2200 (Bandelin Electronic)
Schüttelinkubatoren	GFL3033 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) GFL3032 (Gesellschaft für Labortechnik)
Thermomixer	Eppendorf Comfort 1,5 ml (Eppendorf)
Rotationsverdampfer	Laborota 4000 mit Vakuumpumpe Rotavac (Heidolph, Schwabach)
Wasserbad	HC 5/6 (Julabo Labortechnik, Seelbach)
Vortexer	REAX 2000 (Heidolph, Schwabach)
Überkopfschüttler	Rotator (Labinco, DG Breda, Niederlande)
Ultra-Turrax	T18 basic (IKA-Werke, Staufen)
Mikrowelle	Sharp R-4V10(B) (Sharp Electronics, Hamburg)
Elektrophorese-Kammern	Mini-Vertikal-Doppel-Elektrophoresekammer (Roth) mit Stromversorgung Consort E835 (Consort, Turnhout, Belgien) Midi-Horizontal-Gelelektrophoresekammer (Roth) mit Stromversorgung Consort E132 (Consort)

### 3.2.6 Software und Internetressourcen

- BioEdit Version 7.0.4.1 (Hall, 1999)
- GenBank  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>)
- Genome Database for Rosaceae  
(<http://www.bioinfo.wsu.edu/gdr/>)
- Hyper32 Version 1.0.0  
(<http://homepage.ntlworld.com/john.easterby/hyper32.html>)
- Isis Draw Version 2.5 (MDL Information System)
- MASCOT *peptide mass fingerprint* über [www.expasy.org](http://www.expasy.org)
- mYiQ Optical Systems Software (Bio-Rad)
- NCBI BLAST (Altschul et al., 1990; Altschul et al., 1997)  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)
- Proteomweaver Version 3.0.9.3 (Definiens, München)
- Vitis Grape Genome Browser  
(<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>)

## 3.3 Methoden

### 3.3.1 Allgemeine molekularbiologische Techniken

#### 3.3.1.1 Isolierung von RNA

Die verwendete Methode basiert auf einem Protokoll zur Nucleinsäure-Isolierung aus Pflanzen durch Fällung mit unterschiedlichen Lösungsmitteln (Manning, 1991). 2 g tiefgefrorenes Pflanzenmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zu einem feinen Puder zerrieben, mit 5 ml Extraktionspuffer (0,2 M Tris, 10 mM EDTA, mit Borsäure auf pH 7,6 eingestellt), 250 µl 10 % SDS und 100 µl β-Mercaptoethanol versetzt und durch Vortexen gemischt. Nach Zugabe von 5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 20 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgenommen und mit DEPC-Wasser auf 20 ml aufgefüllt. Es wurden 450 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 8 ml 2-Butoxyethanol zugegeben und eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach 15 min Zentrifugieren bei 15000g und 4 °C wurde der Überstand mit 12 ml 2-Butoxyethanol versetzt und eine weitere Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde 15 min bei 15000g und 4 °C zentrifugiert und der Rückstand je einmal mit 1 ml 70 % Ethanol und 1 ml 100 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur wurde der Rückstand in 1 ml DEPC-Wasser gelöst, mit

330  $\mu\text{l}$  12 M Lithiumchlorid versetzt und die RNA über Nacht bei 4°C ausgefällt. Nach 30 min Zentrifugieren bei 15000g und 4°C wurde der Rückstand je einmal mit 500  $\mu\text{l}$  70 % Ethanol und 500  $\mu\text{l}$  100 % Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 35  $\mu\text{l}$  DEPC-Wasser gelöst. Die Konzentration der RNA wurde durch Messung bei 260 nm bestimmt und mit folgender Gleichung berechnet.

$$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$$

Die Verunreinigung der RNA mit Proteinen kann aus dem Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$  abgeschätzt werden. Eine reine RNA-Lösung weist hierbei einen Wert von 2,0 auf (Glasel, 1995).

### 3.3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Vervielfältigung bekannter und unbekannter DNA-Fragmente wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Für Standard-Anwendungen wie Kolonie-PCR wurde ein kommerziell erhältlicher Master-Mix (peqGold Red-Master-Mix Y) eingesetzt, der eine *Taq* Polymerase, dNTPs und einen Ladepuffer enthielt. Anwendungen, die eine hohe Genauigkeit erfordern, wie die Klonierung von Vollängen, wurden mit einer *proof-reading* Phusion Polymerase durchgeführt, die sich durch eine niedrigere Fehlerrate im Vergleich zu einer herkömmlichen *Taq* Polymerase auszeichnet. In Tab. 6 sind die verwendeten Ansätze beschrieben. Die Menge an Wasser wurde der verwendeten Menge an Template angepasst.

**Tab. 6:** Pipettierschema für die Polymerase-Kettenreaktion

Master-Mix	Phusion
6 $\mu\text{l}$ 2x Master-Mix	4 $\mu\text{l}$ 5x HF Puffer
-	0,4 $\mu\text{l}$ dNTPs
0,5 $\mu\text{l}$ Vorwärts-Primer (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$ Vorwärts-Primer (10 $\mu\text{M}$ )
0,5 $\mu\text{l}$ Rückwärts-Primer (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$ Rückwärts-Primer (10 $\mu\text{M}$ )
x $\mu\text{l}$ Template	1 $\mu\text{l}$ Template
-	0,2 $\mu\text{l}$ Phusion™ Polymerase
ad 12 $\mu\text{l}$ H <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu\text{l}$ H <sub>2</sub> O

Die PCR wurde anschließend in einem Thermocycler mit den in Tab. 7 aufgeführten Temperaturprogrammen durchgeführt.

**Tab. 7:** Temperaturprogramme für die Polymerase-Kettenreaktion

	Master-Mix	Phusion
Vordenaturierung	5 min bei 94 °C	30 s bei 98 °C
Denaturierung	15 s bei 94 °C	10 s bei 98 °C
Primerhybridisierung	40x { 15 s bei 65 °C	40x { 15 s bei 65 °C
Elongation	{ 15 s bei 72 °C	{ 40 s bei 72 °C
finale Elongation	5 min bei 72 °C	5 min bei 72 °C

### 3.3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Hierfür wurde ein 1 %iges Agarose-Gel hergestellt, das 0,00005 % Ethidiumbromid enthielt. Die Proben wurden mit 10x DNA-Ladepuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und 30-45 min bei 7 Volt/cm aufgetrennt. Die Visualisierung des Gels erfolgte mit einem Geldokumentationssystem. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurden die entsprechenden Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA mit einem Gelextraktions-Kit isoliert.

### 3.3.1.4 Subklonierung

Zur Subklonierung von PCR-Produkten wurde der pGEM-T-Vektor verwendet, der in linearisierter Form mit einem T-Überhang erhältlich ist und somit eine rasche Ligation von PCR-Produkten mit A-Überhang ermöglicht. Da die Phusion Polymerase PCR-Produkte mit glatten Enden erzeugt, wurden vor der Ligation A-Überhänge angehängt, indem folgender Ansatz 30 min bei 70 °C erhitzt wurde.

- 15 µl PCR-Produkt
- 2 µl 10x Thermopol-Puffer
- 0,5 µl dATP (2 mM)
- 1 µl *Taq* Polymerase
- 1,5 µl H<sub>2</sub>O

Zur Ligation eines PCR-Produktes mit A-Überhang in den pGEM-T-Vektor wurde folgender Ansatz pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

- 9 µl 2x Rapid Ligation Puffer
- 7 µl PCR-Produkt mit A-Überhang
- 1 µl pGEM-T-Vektor
- 1 µl T4 DNA Ligase

### 3.3.1.5 Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligation klebriger Enden

Um eine Ligation eines DNA-Fragments in einen Expressionsvektor zu ermöglichen, wurden der Vektor und das DNA-Fragment mit Restriktionsenzymen verdaut, wobei „klebrige Enden“ entstanden. Es wurden jeweils zwei verschiedene

Restriktionsenzyme in einem Ansatz verwendet um eine gerichtete Ligation in den Vektor zu erreichen. Pro Ansatz, der in dem vom Hersteller für den Doppelverdau empfohlenen Puffer durchgeführt wurde, wurde mindestens 1 Unit Enzym pro  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Um eine Religation zu vermeiden wurde zu dem Restriktionsansatz eines Vektors 1  $\mu\text{l}$  CIP gegeben und der Vektor eine Stunde bei 37°C dephosphoryliert.

Die Restriktionsansätze wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 3.3.1.3) und das gewünschte DNA-Fragment aus dem Gel mit einem kommerziell erhältlichen Kit isoliert. Folgender Ansatz wurde für eine Ligation eines DNA-Fragments in einen Vektor verwendet:

- 1,5  $\mu\text{l}$  10x T4 DNA Ligase Puffer
- 1  $\mu\text{l}$  T4 DNA Ligase
- 0,5  $\mu\text{g}$  Vektor (ein Molanteil)
- x  $\mu\text{l}$  DNA-Fragment (mind. ein Molanteil)
- ad 15  $\mu\text{l}$  Wasser

Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

#### 3.3.1.6 Herstellung kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli* Zellen wurde eine modifizierte Rubidiumchlorid-Methode verwendet (Hanahan, 1985). Von einer Übernachtskultur eines entsprechenden *E. coli* Stammes wurden 2,5 ml zu 250 ml LB-Medium (mit 20 mM Magnesiumsulfat) gegeben und bei 37°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte ( $\text{OD}_{600}$ ) von 0,4-0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 4500g und 4°C zentrifugiert, das Pellet in 100 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 10 ml eiskaltem TFB2-Puffer suspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

#### 3.3.1.7 Transformation von *Escherichia coli*

50  $\mu\text{l}$  kompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut, zu 18  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 45 s wurde der Ansatz kurz auf Eis gekühlt, anschließend mit 250  $\mu\text{l}$  SOC-Medium gemischt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden auf LB-Agarplatten, welche die entsprechenden Antibiotika enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Im Fall des pGEM-T-Vektors enthielten die Agarplatten zusätzlich IPTG und X-Gal.

### 3.3.1.8 Überprüfung der Kolonien nach der Transformation

Um sicherzugehen, dass die nach einer Transformation erhaltenen Kolonien das gewünschte Plasmid enthielten, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurde ein Teil einer Kolonie in ein PCR-Gefäß überführt und mit einem PCR-Gemisch aus Mastermix und genspezifischen Primern (Kap. 3.1.6) gemischt. Wurde durch die PCR ein Fragment der gewünschten Größe erhalten, bestätigte dies die richtige Transformation.

### 3.3.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA zu isolieren wurden 5 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika mit positiven Kolonien (Kap. 3.3.1.8) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 125 rpm geschüttelt. Aus der Übernachtskultur wurde mit einem kommerziell erhältlichen Kit die Plasmid-DNA isoliert.

### 3.3.1.10 Sequenzierung von DNA

Ca. 0,8 µg Plasmid-DNA wurden auf genau 10 µl verdünnt und an Microsynth (Balgach, Schweiz) geschickt, wo die Sequenzierung mit vektorspezifischen Primern (Kap. 3.1.6) durchgeführt wurde.

## 3.3.2 Klonierung von 3-Dehydroquinat-Synthasen

### 3.3.2.1 Klonierung der *Fragaria x ananassa* 3-Dehydroquinat-Synthase

Zur Klonierung der Vollängensequenz der DHQS aus *Fragaria x ananassa* wurde eine normalisierte cDNA-Bibliothek verwendet, die von Prof. Dr. Victoriano Valpuesta (Universidad de Málaga, Spanien) zur Verfügung gestellt wurde. Bei der Herstellung der cDNA-Bibliothek, die von Evrogen JCS (Moskau, Russland) durchgeführt wurde, wurde RNA von grünen, weißen und roten Früchten verwendet. Die cDNA-Bibliothek wurde im pAL 17.3-Vektor erstellt und in *E. coli* transformiert. Zur Klonierung stand die aus *E. coli* isolierte Plasmid-DNA als Template zur Verfügung.

Zunächst wurde eine PCR (Kap. 3.3.1.2) mit zwei verschiedenen Primer-Kombinationen durchgeführt, einmal wurde ein vektorspezifischer Vorwärts-Primer mit einem genspezifischen Rückwärts-Primer kombiniert und einmal ein genspezifischer Vorwärts-Primer mit einem vektorspezifischen Rückwärts-Primer (Kap. 3.1.6). Die genspezifischen Primer wurden dabei so gewählt, dass die beiden entstehenden Sequenzen sich zum Teil überlappten. Die Produkte der PCR-Reaktion wurden subkloniert (Kap. 3.3.1.4) und sequenziert (Kap. 3.3.1.10). In der überlappenden Region der beiden Teilstücke lag eine BamHI-Schnittstelle, an der die beiden PCR-Produkte mit dem entsprechenden Enzym geschnitten wurden (Kap. 3.3.1.5).

Nachdem die beiden Teilstücke ligiert worden waren (Kap. 3.3.1.5), wurde eine PCR mit Primern, die am Anfang und am Ende des offenen Leserahmens lagen und jeweils eine Restriktionsschnittstelle enthielten (Kap. 3.1.6), durchgeführt um den gesamten offenen Leserahmen mit zwei Restriktionsschnittstellen zu erhalten. Dieser wurde dann in den pGEM-T-Vektor subkloniert, in *E. coli* transformiert und die Plasmid-DNA isoliert. Mit den entsprechenden Restriktionsenzymen wurde das DNA-Stück aus dem Vektor geschnitten und in den Expressionsvektor pET-29a(+) ligiert (Kap. 3.3.1.5). Um sicherzustellen, dass das DNA-Stück korrekt in den Leserahmen des Expressionsvektors eingefügt wurde, wurden kompetente *E. coli* TOP10 Zellen mit dem Vektor transformiert, die Plasmid-DNA isoliert und nochmals sequenziert. Zur heterologen Expression wurden kompetente *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Zellen mit dem Expressionsvektor transformiert.

### 3.3.2.2 Klonierung der *Vitis vinifera* 3-Dehydroquinat-Synthase

Die Sequenz der Volllänge der *Vitis vinifera* DHQS war bereits aus einer Datenbank bekannt (Jaillon et al.2007). Als Template für die PCR-Reaktion wurde cDNA aus Blättern verwendet. Die PCR wurde mit Primern, die am Anfang und am Ende des offenen Leserahmens lagen und jeweils eine Schnittstelle enthielten (Kap. 3.1.6), durchgeführt (Kap. 3.3.1.2). Das erhaltene DNA-Stück wurde subkloniert (Kap. 3.3.1.4) und sequenziert (Kap. 3.3.1.10). Aus der isolierten Plasmid-DNA wurde das DNA-Stück mit den beiden entsprechenden Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen Expressionsvektor pET-29a(+) ligiert (Kap. 3.3.1.5). Der Expressionsvektor wurde in *E. coli* TOP 10 Zellen transformiert und zur Überprüfung der Ligation sequenziert. Die Herstellung des Expressionsstammes erfolgte durch Transformation des Expressionsvektors in kompetente *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Zellen.

## 3.3.3 Allgemeine biochemische Methoden

### 3.3.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode von Bradford (Bradford, 1976) angewandt. Die Probe wurde mit Puffer oder Wasser auf 100 µl verdünnt, mit 1 ml Bradford-Lösung versetzt und gut gemischt. Innerhalb von 10 min wurde die Absorption bei 595 nm gegen einen Blindwert ohne Protein gemessen. Über eine Kalibriergerade, die mit 1-10 µg Rinderserumalbumin erstellt wurde, wurde die Proteinkonzentration ermittelt.

$$\text{Protein } [\mu\text{g}] = (A_{595} - 0,0378) / 0,032$$

### 3.3.3.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Untersuchung von Proteinlösungen auf Größe und Reinheit des Zielproteins wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dazu wurden 15  $\mu$ l Proteinlösung mit 5  $\mu$ l Protein-Lade-Puffer versetzt. Die vorbereiteten Proben und der Protein-Größenstandard wurden 10 min bei 95 °C denaturiert, auf Eis gekühlt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben auf ein Tris-Glycin-Gel (12 %, 1 mm Schichtdicke) (Anamed, Groß-Bieberau, Deutschland) aufgetragen und in einer vertikalen Gelkammer für eine Stunde bei einer konstanten Stromstärke von 60 mA aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie-Färbelösung für eine Stunde gefärbt und über Nacht in Entfärbelösung geschüttelt.

### 3.3.3.3 Heterologe Expression in *Escherichia coli*

Zur Expression der rekombinanten Enzyme wurden einzelne Zellen über Nacht in LB-Medium mit Kanamycin und Chloramphenicol bei 37°C und 125 rpm angezogen. Am nächsten Tag wurden 200 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit 2 ml Vorkultur angeimpft und bei 37°C und 125 rpm bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,4 bis 0,6 kultiviert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und die Kultur über Nacht bei 16°C und 125 rpm geschüttelt. Die Kulturen wurden 15 min bei 4°C und 3000g abzentrifugiert und entweder direkt weiterverwendet oder bei -20°C eingefroren.

### 3.3.3.4 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Für den Zellaufschluss wurden die aus 200 ml Kultur geernteten Zellen in 5 ml 1x S-Tag-Binde/Wasch-Puffer bzw. 1x His-Extraktions/Wasch-Puffer (mit 0,1 % TritonX100) suspendiert und viermal je 30 s mit einer Ultraschall-Sonotrode (Intensität 10 %) aufgeschlossen. Zwischen den Ultraschallbehandlungen wurde 30 s auf Eis inkubiert. Nach dem Aufschluss wurde 20 min bei 15000g und 4°C zentrifugiert und der Überstand, der die löslichen Proteine enthielt, weiterverwendet.

### 3.3.3.5 His-Tag-Affinitätschromatographie

Das mit einem His-Tag exprimierte Enzym SIEO wurde durch Affinitätschromatographie mit Talon™-Harz aufgereinigt. Hierfür wurde der Überstand des Ultraschallaufschlusses zu 1 ml einer 50%igen Talon™-Harz-Suspension gegeben und 30 min in einem Überkopfmischer bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde 5 min bei 1200g und 4°C zentrifugiert und zweimal mit 1x His-Extraktions/Wasch-Puffer gewaschen. Das Harz wurde dann in eine vom Hersteller mitgelieferte *gravity flow column* gegeben, mit 1x His-Extraktions/Wasch-Puffer gewaschen und das

gebundene Enzym mit 1,5 ml 1x His-Elutions-Puffer eluiert. Das Eluat wurde bei 4 °C aufbewahrt.

#### 3.3.3.6 Aufreinigung mittels Ultrafiltration

Das SIEO enthaltende Eluat der His-*Tag*-Affinitätschromatographie wurde in einem weiteren Schritt mittels Ultrafiltration aufgereinigt. Dazu wurde das Eluat zunächst mit 0,1 M Phosphatpuffer (mit 0,025 M NaCl, pH 7) auf ein Gesamtvolumen von ca. 25 ml verdünnt und auf eine Ultrafiltrationseinheit mit einer Membranausschlussgröße von 50 kDa (Vivaspin 20, 50 kDa) gegeben. Bei 4 °C und 4000g wurde solange zentrifugiert, bis der Überstand nur noch etwa 500 µl betrug. Der Durchfluss, der alle Proteine kleiner als 50 kDa enthielt, wurde über eine Ultrafiltrationseinheit mit einer Membranausschlussgröße von 30 kDa (Vivaspin 20, 30 kDa) zentrifugiert, bis der Überstand auf der Säule etwa 400 µl betrug. Dieser Überstand enthielt die aufgereinigte SIEO mit einem Molekulargewicht von 41,7 kDa. Die Konzentration der erhaltenen Protein-Lösung wurde mittels Bradford-Assay bestimmt und zur Überprüfung der Reinheit wurde eine SDS-PAGE durchgeführt.

#### 3.3.3.7 S-*Tag*-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der mit S-*Tag* exprimierten Enzyme FaDHQS und VvDHQS erfolgte über Affinitätschromatographie mit S-Protein-Agarose. Der Überstand des Ultraschallaufschlusses wurde zu 1 ml 50 %iger S-Protein-Agarose-Suspension gegeben, eine Stunde in einem Überkopfmischer bei 4 °C inkubiert und anschließend 10 min bei 500g und 4 °C zentrifugiert. Die Agarose wurde dreimal mit 1x S-*Tag*-Binde/Wasch-Puffer gewaschen. Zur Elution des S-*Tag*-Fusionproteins wurde 750 µl 1x S-*Tag*-Elutions-Puffer zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Die Elution wurde zweimal durchgeführt und die Eluate bei 4 °C aufbewahrt.

#### 3.3.3.8 Heterologe Expression in *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Expression der DAHP-Synthase wurden einzelne Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* RH2424, die den Vektor pME2385 enthielten, zwei Tage in BMMD-Medium mit 670 µM Methionin bei 30 °C und 125 rpm angezogen. Dann wurde die optische Dichte (OD<sub>600</sub>) bestimmt und ein Teil der Vorkultur so mit BMMD-Medium mit 400 µM Methionin verdünnt, dass man eine 200 ml Hauptkultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,15 erhielt. Die Hauptkultur wurde 24 h bei 30 °C und 125 rpm bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 4 kultiviert. Die Kultur wurden 20 min bei 4 °C und 4000g abzentrifugiert und die geernteten Zellen bei -20 °C eingefroren.

### 3.3.3.9 Zellaufschluss mit gewaschenen Glasperlen

Für den Zellaufschluss wurden die aus 200 ml Kultur geernteten Zellen in 10 ml Phosphatpuffer (10 mM, pH 6,8) suspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden erneut durch Zentrifugation für 5 min bei 4000g pelletiert. Das Pellet wurde in 2,5 ml eiskaltem Phosphatpuffer aufgenommen und mit 10 g gewaschenen Glasperlen (425-600 µm) versetzt. Für eine Dauer von 30 min wurde abwechselnd 30 s geschüttelt und 30 s auf Eis gestellt. Der Überstand wurde abpipettiert und aufbewahrt. Zu dem Rückstand wurde nochmals 4 ml Phosphatpuffer gegeben, kurz zentrifugiert und der Überstand mit dem ersten Überstand vereinigt. Die vereinigten Überstände wurden 10 min bei 15000g und 4°C zentrifugiert und der Überstand, der die löslichen Proteine enthielt, als Rohproteinextrakt direkt für Enzymassays eingesetzt.

### 3.3.4 Enzymassay zur biochemischen Charakterisierung von FaDHQS

Zu 70 µl Phosphatpuffer (100 mM, pH 6,8) wurden jeweils 40 µl Erythrose-4-phosphat (10 mM) und 40 µl Phosphoenolpyruvat (10 mM) pipettiert. Die DAHP-Bildung wurde durch Zugabe von 50 µl Rohproteinextrakt (3.3.3.9) gestartet und für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl aufgereinigte FaDHQS, 2 µl NAD<sup>+</sup> (1 mM) und 2 µl MnCl<sub>2</sub> (10 mM) zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 40 µl Trichloressigsäure (20 %) gestoppt und 5 min bei 13400 rpm abzentrifugiert. 100 µl des Überstands wurden mit 10 µl Natriumperodat (25 mM in 125 mM Schwefelsäure) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Natriumarsenit (2 % in 0,5 M HCl) und Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur wurde die Farbreaktion durch Zusatz von 800 µl Thiobarbitursäure (0,3 %) gestartet und 10 min im siedenden Wasserbad inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte sofort bei 549 nm.

### 3.3.5 Genexpressionsanalyse

#### 3.3.5.1 Pflanzenmaterial

Um eine Genexpressionsanalyse durchzuführen, wurden während der Fruchtreifung Blätter, geschlossene Blüten, offene Blüten und grüne, weiße und rote Erdbeerfrüchte geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

#### 3.3.5.2 DNase-Behandlung und reverse Transkription

Die RNA-Isolierung aus den Erdbeerfrüchten wurde nach der in Kap. 3.3.1.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Vor der reversen Transkription wurde die RNA

gemäß folgendem Ansatz mit DNase I behandelt, um mögliche DNA-Kontaminationen zu entfernen.

- 1 µg RNA
- 1 µl 10x DNaseI Reaktions-Puffer
- 1 µl DNase I
- ad 10 µl Wasser

Der Ansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann 1 µl Stopp-Lösung (50 mM EDTA) zugegeben und 10 min auf 70°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde die reverse Transkription durchgeführt, indem zum bisherigen Ansatz folgende Komponenten pipettiert wurden:

- 4 µl 5x iScript Reaktions-Mix
- 1 µl iScript Reverse Transkriptase
- 4 µl Wasser

Die Reaktion fand während folgendem Temperaturprogramm statt.

- 5 min 25°C
- 30 min 42°C
- 5 min 85°C

Ein Teil der erhaltenen cDNA wurde mit Wasser 1:8000 verdünnt um als Template für das Referenzgen (RNA Interspacer 16S–23S) eingesetzt zu werden.

### 3.3.5.3 Quantitative PCR

Zunächst wurden für jede der zwei untersuchten 3-Dehydroquinat-Synthasen je ein genspezifischer Vorwärts- und Rückwärts-Primer (Kap. 3.1.6) ausgewählt, mit denen ein Fragment von etwa 237 bzw. 268 bp amplifiziert wurde. Die Primer wurden mittels einer normalen PCR überprüft und das amplifizierte DNA-Fragment sequenziert (Kap. 3.3.1.10). Als Referenzgen zum Normalisieren der erhaltenen Ergebnisse wurde ein RNA Interspacer 16S–23S –Gen verwendet (Casado-Diaz et al., 2006).

Jeder PCR-Ansatz wurde in dreifacher Ausführung nach folgendem Schema pipettiert:

- 12,5 µl iQ SYBR Green Supermix
- 0,4 µl Vorwärts-Primer (10 mM)
- 0,4 µl Rückwärts-Primer (10 mM)
- 1 µl cDNA
- ad 25 µl Wasser

In der Negativkontrolle wurde anstatt cDNA Wasser verwendet. Die qPCR wurde anschließend mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt.

- |            |      |       |
|------------|------|-------|
| 3 min 30 s | 95°C |       |
| 30 s       | 95°C | } 40x |
| 30 s       | 60°C |       |

Um zu überprüfen, ob das korrekte Produkt amplifiziert wurde, wurde anschließend eine Schmelzkurve aufgenommen. Des Weiteren wurden die Ansätze mittels Gelelektrophorese (Kap. 3.3.1.3) überprüft.

#### 3.3.5.4 Datenauswertung

Um die relative Genexpression zu berechnen wurden mit der MyiQ Optical Systems Software die  $C_t$ -Werte bestimmt. Der  $C_t$ -Wert ist genau die Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenz einen festgelegten Schwellenwert, der für jeden Ansatz identisch ist, übersteigt. Die  $C_t$ -Werte sind indirekt proportional zum  $\log_2$  der ursprünglich in der Probe vorhandenen Kopienzahl. Zur Normalisierung auf das Referenzgen wurde die Differenz aus den  $C_t$ -Werten des Zielgens und des Referenzgens gebildet ( $\Delta C_t$ ). Die relative Expression wurde dann, bezogen auf die Werte von roten Erdbeeren, nach folgenden Formeln berechnet:

$$\Delta C_t = C_t (\text{Zielgen}) - C_t (\text{Referenzgen})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{Probe}) - \Delta C_t (\text{Kontrolle})$$

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

#### 3.3.6 Herstellung von Ethylacetat-Extrakten aus Erdbeerfrüchten

Zur Messung der Metabolite in der Erdbeerfrucht wird ein Ethylacetat-Extrakt hergestellt. Etwa 1,0 g der mit flüssigem Stickstoff homogenisierten Erdbeerfrüchte werden mit 500  $\mu\text{l}$  Ethylacetat versetzt und es werden 50  $\mu\text{l}$  in Ethylacetat gelöstem HMF mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml als Interner Standard zugesetzt. Nach 15 min Mischen durch Vortexen wird durch 15 min Zentrifugieren bei 13400 rpm eine Phasentrennung erreicht. Die obere organische Phase wird vorsichtig abgenommen und in einem neuen Gefäß aufbewahrt. Die untere Phase wird nochmals mit 500  $\mu\text{l}$  Ethylacetat versetzt und wie bereits beschrieben gemischt und zentrifugiert. Die organischen Überstände werden vereint und 20  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  hinzugegeben. Das Ethylacetat wird in 35 Minuten bei 37°C im Speed-Vac entfernt, wobei die gelösten Substanzen in das Wasser überführt werden. Die verbliebene Wasserphase wird anschließend auf 50  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Nach dem Abzentrifugieren der ungelösten Bestandteile durch 45 min Zentrifugation bei 13400 rpm wird der klare Überstand direkt für die LC-MS-Analyse eingesetzt (Kap. 3.2.1).

#### 3.3.7 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die Durchführung der 2D-PAGE basiert auf der Methode von Görg mit geringen Modifikationen (Görg et al., 2004; Görg et al., 2007).

### 3.3.7.1 Protein-Isolierung

Das verwendete Protokoll für die Protein-Isolierung aus Erdbeerfrüchten basiert auf einer Methode, die für Pflanzengewebe entwickelt wurde, aus denen sich Proteine nur schwer isolieren lassen (Saravanan und Rose, 2004). Zunächst wurde 2 g fein zerriebenes Pflanzenmaterial zu 0,15 g PVPP und 15 ml Protein-Extraktions-Puffer gegeben, gemischt und 30 min auf Eis inkubiert, wobei alle 5 min kräftig gemischt wurde. Nach Zugabe von 15 ml Phenol pH 8,0 wurde die Probe unter den gleichen Bedingungen wie vorher inkubiert und anschließend mit 15000g bei 4°C 20 min zentrifugiert. Die obere Phenolphase wurde abgenommen und zweimal mit je 12 ml Protein-Extraktions-Puffer gewaschen. Nach Zugabe des fünffachen Volumens an Ammoniumacetat-Lösung (8 mM in Methanol) wurden die Proteine über Nacht bei -20°C ausgefällt. Die Proteine wurden mit 15000g bei 4°C 30 min abzentrifugiert und das Pellet einmal mit 6 ml eiskaltem Methanol und zweimal mit je 6 ml eiskaltem Aceton gewaschen. Die Proben wurden bei -80°C aufbewahrt. Vor der weiteren Verwendung wurden die Proteine in 120 µl IEF-Puffer gelöst und die Konzentration nach der Bradford-Methode bestimmt (Kap. 3.3.3.1).

### 3.3.7.2 Erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in der ersten Dimension mittels isoelektrischer Fokussierung. Die 18 cm langen Gelstreifen mit einem nicht linearen immobilisierten pH-Gradienten von 3-10 (Immobiline DryStrips, pH 3-10 NL, GE Healthcare) wurden über Nacht mit je 350 µl Rehydrierungspuffer rehydriert. Die Streifen wurden in Keramikschalen gelegt und mit Silikonöl bedeckt, um ein Austrocknen während der IEF zu verhindern. Es wurden genau 550 µg der in IEF-Puffer gelösten Protein-Probe mittels *Cup Loading* auf das anodische Ende des Streifens aufgegeben. Beim *Cup Loading* werden trichterförmige Aufsätze, sogenannte *Sample Cups*, auf den Streifen aufgesetzt und die Probe in den Aufsatz pipettiert.

**Tab. 8:** Protokoll der isoelektrischen Fokussierung

Schritt	Betriebsart	Spannung [V]	Zeit [h:min]	Volt-Stunden [Vh]
1	Step-n-Hold	100	1:00	100
2	Step-n-Hold	150	1:00	150
3	Gradient	500	0:10	52
4	Gradient	4000	1:30	3445
5	Step-n-Hold	8000	-	25000
Volt-Stunden gesamt				28747

Die IEF erfolgte bei 20 °C und einer konstanten Stromstärke von 50 µA je Gelstreifen bis zum Erreichen von ca. 29.000 Volt-Stunden (Tab. 8). Für jede Probe wurden drei Replikate angefertigt. Bis zur zweiten Dimension wurden die Gelstreifen bei -80 °C gelagert.

#### 3.3.7.3 Herstellung von SDS-Gele für die zweite Dimension

Die Gele für die zweite Dimension wurden in einer Gelgießkammer nach einer von Anderson beschriebenen Methode gegossen (Anderson und Anderson, 1978). Die 12,5 %igen SDS-Gele hatten eine Größe von 25 cm x 20,5 cm x 0,1 cm (H x B x D). Nachdem die Gellösung über einen Schlauch am Boden der Kammer bis zur gewünschten Höhe eingefüllt war, wurde die Gellösung durch Verdrängungslösung ersetzt, bis keine Gellösung mehr im Schlauch war. Die Gele wurden mit Wasser überschichtet und für 24 Stunden auspolymerisiert.

#### 3.3.7.4 Zweite Dimension

Während der zweiten Dimension wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die aufgetauten Gelstreifen der ersten Dimension wurden je 15 min in speziellen Plastikröhren in Äquilibriumspuffer I und anschließend in Äquilibriumspuffer II inkubiert. Die Streifen wurden dann kurz in 1:1 mit Wasser verdünntem 1x SDS-Laufpuffer getaucht, bevor sie auf die Gele aufgelegt und mit 2 ml warmer Agaroselösung fixiert wurden. Die Gelkassetten wurden in die mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllte Laufkammer eingesetzt und die zweite Dimension erfolgte dann bei 20 °C über Nacht unter folgenden Bedingungen:

1. 5 mA/Gel für 2 h
2. 15 mA/Gel für mind. 16 h

Die zweite Dimension wurde beendet, sobald die Bromphenolblau-Lauffront etwa einen Zentimeter von dem unteren Gel-Ende entfernt war.

#### 3.3.7.5 Kolloidale Coomassie-Färbung

Nach der zweiten Dimension wurden die SDS-Gele über kolloidale CBB-Färbung angefärbt. Die Anfärbung erfolgte nach einer modifizierten Methode von Neuhoff (Neuhoff et al., 1988), deren Nachweisgrenze bei etwa 10-30 ng Protein liegt. Nach der Entnahme der Gele aus den Gelkassetten wurden die Gele über Nacht bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln in Fixierlösung inkubiert. Die anschließende Inkubation in Färbelösung erfolgte unter den gleichen Bedingungen. Die Gele wurden in Wasser entfärbt, bis der Gel-Hintergrund fast vollständig transparent war, und anschließend eingescannt (Kap. 3.3.7.6). Nach zweistündiger Inkubation in 7 %iger Essigsäure wurden die Gele eingeschweißt und bei 4 °C aufbewahrt.

### 3.3.7.6 Softwaregestützte Auswertung der Gele

Um Unterschiede im Proteom der transgenen Früchte im Vergleich zu den Kontrollfrüchten festzustellen, wurden die einzelnen Proteinspots über eine spezielle Software ausgewertet und verglichen. Die angefärbten Gele wurden hierfür im Durchlichtmodus (16 bit Graustufen, 300 dpi) gescannt. Die Bilddateien der Gele wurden dann in die Proteomweaver-Software importiert, mit welcher die Spotdetektion, das *matching* der Gele von transgenen Früchten und Kontrollfrüchten und die Normalisierung der Spotintensitäten erfolgte. Diese von der Software automatisch durchgeführten Schritte wurden überprüft und gegebenenfalls manuell korrigiert. Im weiteren wurden nur Spots betrachtet, deren Intensität sich um mindestens Faktor 0,3 bzw. 5 zwischen transgenen Früchten und Kontrollfrüchten unterschied.

## 3.3.8 Protein-Identifizierung

### 3.3.8.1 Enzymatischer Verdau der Proteine

Für die Protein-Identifizierung wurden die Proteine zunächst durch einen enzymatischen In-Gel-Verdau in spezifische Peptid-Fragmente zerlegt. Die zu analysierenden Gel-Spots wurden ausgeschnitten, 5 min mit 50 µl Waschlösung bei 300 rpm geschüttelt und der Überstand verworfen. Zum Entfärben wurde zweimal 50 µl Entfärbelösung zugegeben und mind. 20 min bei 300 rpm inkubiert. Dann wurden die Gelstücke durch zehnmütige Inkubation mit 50 µl Acetonitril dehydriert und 10 min in der Speed-Vac getrocknet. Die getrockneten Gelstücke wurden in 50 µl Waschlösung 10 min rehydriert, anschließend wurde der Dehydrierungs- und der Trocknungsschritt wiederholt. Nach Zugabe von 22 µl Digestion-Puffer und 3,13 µl Trypsin-Lösung wurde 45 min auf Eis inkubiert und der Überstand abgenommen. Die Gelstücke wurden mit Digestion-Puffer bedeckt, um ein Austrocknen während der Inkubation über Nacht bei 37°C und 350 rpm zu verhindern. Nach dem Verdau wurden die Proben kurz zentrifugiert, der Überstand abgenommen und gekühlt aufbewahrt. Die Gelstücke wurde zunächst mit 25 µl Extraktionslösung I 20 min inkubiert, dann wurde 25 µl Acetonitril zugegeben und weitere 15 min inkubiert. Der Überstand wurde mit dem ersten Überstand vereinigt und weiter gekühlt aufbewahrt. Nach zweimaliger Inkubation mit Extraktionslösung II für je 20 min wurden alle Überstände, die die Peptid-Fragmente enthielten, vereinigt und in der Speed-Vac getrocknet. Die Extrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

### 3.3.8.2 Analyse der Peptid-Fragmente mittels Massenspektrometrie

Die Peptid-Extrakte wurden in 5%iger Ameisensäure aufgenommen und vor der Injektion in das Massenspektrometer mit Stage-Tips C18 (Proxeon, Odense, Dänemark) gereinigt. Dazu wurden die Tips mit 10  $\mu$ l 50%igem Methanol vorbehandelt und mit 10  $\mu$ l 5%iger Ameisensäure equilibriert. Anschließend wurden die Peptid-Extrakte aufgetragen und zweimal mit je 10  $\mu$ l 5%iger Ameisensäure gewaschen. Die gereinigten Fragmente wurden zweimal mit je 10  $\mu$ l eines Wasser/Methanol/Ameisensäure-Gemisches (45:50:5) eluiert. Das Probenvolumen wurde mit einem Wasser/Acetonitril/Ameisensäure-Gemisch (39,5:60:0,5) auf 50  $\mu$ l ergänzt und mit einer Flussrate von 5  $\mu$ l/min in das Massenspektrometer geleitet. Nach der massenspektrometrischen Analyse der Peptid-Extrakte (Kap. 3.2.3) wurden die Ergebnisse zur Suche in der MASCOT *peptide mass fingerprint* – Datenbank herangezogen.

### 3.3.9 Bestimmung der enzymkinetischen Daten der SIEO

#### 3.3.9.1 Synthese und Reinigung von HMMF-Derivaten

Das Syntheseprotokoll für die HMMF-Derivate EDHMF, HMPDF und BDHMF leitet sich aus den Vorschriften von Ballesteros und Ledl für eine Knoevenagel-Reaktion ab (Ballesteros et al., 1983; Ledl und Severin, 1978). Die Derivate wurden durch die Reaktion von HMF mit den Aldehyden Acetaldehyd, Propionaldehyd und Butyraldehyd gebildet. Dazu wurden 2,6 mmol HMF, 1,6 mmol Natriumacetat und 1,2 mmol Kupferacetat in 4,5 ml konzentrierter Essigsäure gelöst und mit 2,7 mmol des jeweiligen Aldehyds versetzt. Der Reaktionsansatz wurde unter Rühren und Rückfluss für eine Stunde auf 60°C erhitzt und nach dem Abkühlen mit 9 ml Wasser versetzt. Nach mehrmaliger Flüssig-Flüssig-Extraktion des Reaktionsansatzes mit einem n-Pentan/Diethylether-Gemisch (1:1) wurden die organischen Phasen vereinigt und im Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (1:1) gelöst und mittels präparativer HPLC (Kap. 3.2.2) gereinigt. Die Überprüfung der Reinheit der synthetisierten Substanzen EDHMF, HMPDF bzw. BDHMF erfolgt über eine LC-MS-Messung (Kap. 3.2.1).

#### 3.3.9.2 Michaelis-Menten-Kinetik

Die Bestimmung der enzymkinetischen Daten  $v_{\max}$ ,  $K_M$  und  $k_{\text{kat}}$  für die Umsetzung der drei Substrate EDHMF, HMPDF und BDHMF wurde über LC-MS-Messungen durchgeführt.

Die Assays wurden in 0,1 M Phosphatpuffer (mit 0,025 M NaCl, pH 7) mit 3  $\mu$ g

aufgereinigtem Enzym durchgeführt. Die Konzentration des Kosubstrats NADH betrug 12 mM, die Substrate wurden in Konzentrationen von 140  $\mu\text{M}$  bis 7,5 mM eingesetzt. Die Ansätze wurden genau 35 min bei 30 °C und 450 rpm inkubiert. Als Interner Standard (IS) wurde nach der Inkubationszeit HDMF zugegeben. Es wurde von jedem Ansatz eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die LC-MS-Messung erfolgte mit einer Methode, die für das entsprechende Produkt optimiert war (Kap. 3.2.1).

Da für die Produkte BHMF und HMPF keine Referenzsubstanzen verfügbar waren und daher keine Kalibriergerade für diese Produkte erstellt werden konnte, wurde aufgrund der ähnlichen Ionisation die EHMF-Kalibriergerade für die Berechnung aller Kinetiken verwendet. Die erhaltenen Mengen an BHMF und HMPF sind somit als „EHMF-Äquivalente“ anzusehen.

Sowohl für die Kalibriergerade als auch für die einzelnen Messungen wurde jeweils das Verhältnis der Produkt-Peakfläche zur HDMF-Peakfläche (IS) berechnet, so dass die Produkt-Konzentration der Assays dann über die Gleichung der Kalibriergeraden ermittelt werden konnte.

$$y = 179,3 x - 0,0799$$

$$R^2 = 0,9995$$

$$x_{\text{EHMF}} = c_{\text{EHMF}} \text{ in der Lösung}$$

$$x_{\text{HMPF}} = c_{\text{HMPF}} \text{ in der Lösung}$$

$$x_{\text{BHMF}} = c_{\text{BHMF}} \text{ in der Lösung}$$

$$y_{\text{EHMF}} = \text{Verhältnis Peakfläche m/z (+) 143 / Peakfläche m/z (+) 129}$$

$$y_{\text{HMPF}} = \text{Verhältnis Peakfläche m/z (+) 157 / Peakfläche m/z (+) 129}$$

$$y_{\text{BHMF}} = \text{Verhältnis Peakfläche m/z (+) 171 / Peakfläche m/z (+) 129}$$

Die berechnete Umsatzgeschwindigkeit in nkat / mg wurde gegen die jeweils eingesetzte Substratkonzentration (mM) aufgetragen und mit dem Regressionsprogramm Hyper 32 über das Hanes-Linearisierungsverfahren die Enzymparameter  $v_{\text{max}}$ ,  $K_{\text{M}}$ , und  $k_{\text{kat}}$  berechnet.

### 3.3.10 Vorversuche mit Proteinrohextrakten aus Erdbeerfrüchten

#### 3.3.10.1 Gewinnung eines Proteinextrakts aus Erdbeerfrüchten

Für die Herstellung des Proteinextrakts wurden 30 g entweder frische oder gefrorene Erdbeeren mit dem Ultraturax bzw. mit dem Mörser homogenisiert, 1,5 g Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) zugegeben und mit 15 ml Wasser verdünnt. Der pH-Wert dieses Gemischs wurde auf 6 bzw. 6,5 eingestellt und anschließend zweimal für

je 30 min zentrifugiert, zunächst bei 5000g, anschließend bei 15000g. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand über Glaswolle filtriert.

Die Abtrennung von niedermolekularen Stoffen aus dem Proteinextrakt erfolgte mittels Gelfiltration. 15 ml des Extrakts wurden über eine Sephadex® GF-25-Chromatographiesäule (2,5 cm x 30 cm) filtriert und zehn Fraktionen von je 10 ml gesammelt. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde mit der Bradford-Methode bestimmt (Kap. 3.3.3.1).

#### 3.3.10.2 Enzymassay zur Ermittlung der Enzymaktivität

Zur Ermittlung der Enzymaktivität der proteinhaltigen Fraktionen wurde die Bildung des Thioethers aus HMMF und 3-Mercaptobenzoessäure mittels LC-MS untersucht. Ein 270 µl Ansatz enthielt 225 µl Proteinlösung, 70 mM D-Fructose-1,6-diphosphat und 0,6 mM 3-Mercaptobenzoessäure in 20 mM Bis-Tris-Puffer (pH 6; 6,5). Je nach Ansatz zusätzlich wurden 1,8 mM NAD<sup>+</sup> bzw. 1,8 mM NADH/H<sup>+</sup>, 1,3 mM Mn<sup>2+</sup>, 1,3 mM Zn<sup>2+</sup> oder 1,3 mM Mg<sup>2+</sup> zugegeben. Der Ansatz wurde für 24 Stunden bei 30 °C und 450 rpm inkubiert. Nach kurzem Abzentrifugieren (3 min, 12000g) der unlöslichen Bestandteile wurden die Assays direkt mittels LC-MS analysiert (Kap. 3.2.1). Als Blindwert wurde jeweils ein Ansatz, der statt Proteinlösung Pufferlösung enthielt, hergestellt. Zur Identifizierung der Enzymaktivität wurden die Signalflächen der Ionenspur m/z (+) 281 bei 20,1 Minuten im Ionenchromatogramm integriert und mit dem der Blindwerte verglichen.

## 4 LITERATURVERZEICHNIS

**Ahmed, S. I. und Giles, N. H.** (1969) Organization of enzymes in the common aromatic synthetic pathway: Evidence for aggregation in fungi. *Journal of Bacteriology*, **99**, 231-237.

**Alm, R., Ekefjard, A., Krogh, M., Häkkinen, J. und Emanuelsson, C.** (2007) Proteomic variation is as large within as between strawberry varieties. *Journal of Proteome Research*, **6**, 3011-3020.

**Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J.** (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**, 403-410.

**Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**, 3389-3402.

**Anderson, N. L. und Anderson, N. G.** (1978) Analytical techniques for cell fractions. XXII. Two-dimensional analysis of serum and tissue proteins: multiple gradient-slab gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, **85**, 341-354.

**Ballesteros, P., Roberts, B. W. und Wong, J.** (1983) Synthesis of di-*tert*-butyl methylenemalonate, a sterically hindered 1,1-dicarbonyl alkene. *Journal of Organic Chemistry*, **48**, 3603-3605.

**Baneyx, F. und Mujacic, M.** (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, **22**, 1399-1408.

**Barrett, J., Brophy, P. M. und Hamilton, J. V.** (2005) Analysing proteomic data. *International Journal for Parasitology*, **35**, 543-553.

**Bartlett, P. A., McLaren, K. L. und Marx, M. A.** (1994) Divergence between the enzyme-catalyzed and noncatalyzed synthesis of 3-dehydroquinone. *Journal of Organic Chemistry*, **59**, 2082-2085.

**Bartlett, P. A. und Satake, K.** (1988) Does dehydroquinone synthase synthesize dehydroquinone? *Journal of the American Chemical Society*, **110**, 1628-1630.

**Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. und Wheeler, D. L.** (2005) GenBank. *Nucleic Acids Research*, **33**, D34-D38.

**Beranova-Giorgianni, S.** (2003) Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **22**, 273-281.

**Berlyn, M. B. und Giles, N. H.** (1969) Organization of enzymes in the polyaromatic synthetic pathway - separability in bacteria. *Journal of Bacteriology*, **99**, 222-230.

**Bischoff, M., Rösler, J., Raesecke, H.-R., Görlach, J., Amrhein, N. und Schmid, J.** (1996) Cloning of a cDNA encoding a 3-dehydroquinase synthase from a higher plant, and analysis of the organ-specific and elicitor-induced expression of the corresponding gene. *Plant Molecular Biology*, **31**, 69-76.

**Blank, I., Sen, A. und Grosch, W.** (1992) Potent odorants of the roasted powder and brew of Arabica coffee. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **195**, 239-245.

**Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.

**Bruche, G., Dietrich, A. und Mosandl, A.** (1995) Stereoisomeric flavour compounds LXXI: Determination of the origin of aroma-active dihydrofuranones. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **201**, 249-252.

**Bruche, G., Schmarr, H. G., Bauer, A., Mosandl, A., Rapp, A. und Engel, L.** (1991) Stereoisomere Aromastoffe LI: Stereodifferenzierung chiraler Furanone Möglichkeiten und Grenzen der herkunftsspezifischen Aromastoff-Analyse. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **193**, 115-118.

**Buttery, R. G., Takeoka, G. R., Krammer, G. E. und Ling, L. C.** (1994) Identification of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (Furaneol) and 5-methyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in fresh and processed tomato. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **27**, 592-594.

**Cadenas, E.** (1995) Antioxidant and prooxidant functions of DT-Diaphorase in quinone metabolism. *Biochemical Pharmacology*, **49**, 127-140.

**Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. und Righetti, P. G.** (2004) Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, **25**, 1327-1333.

**Carpenter, E. P., Hawkins, A. R., Frost, J. W. und Brown, K. A.** (1998) Structure of dehydroquinase synthase reveals an active site capable of multistep catalysis. *Nature*, **394**, 299-302.

**Carpentier, S. C., Panis, B., Vertommen, A., Swennen, R., Sergeant, K., Renaut, J., Laukens, K., Witters, E., Samyn, B. und Devreese, B.** (2008) Proteome analysis of non-model plants: A challenging but powerful approach. *Mass Spectrometry Reviews*, **27**, 354-377.

**Casado-Diaz, A., Encinas-Villarejo, S., de los Santos, B., Schiliro, E., Yubero-Serrano, E., Amil-Ruiz, F., Pocovi, M. I., Pliego-Alfaro, F., Dorado, G., Rey, M., Romero, F., Muñoz-Blanco, J. und Caballero, J.** (2006) Analysis of strawberry genes differentially expressed in response to *Colletotrichum* infection. *Physiologia Plantarum*, **128**, 633-650.

**Chang, A., Scheer, M., Grote, A., Schomburg, I. und Schomburg, D.** (2009) BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Research*, **37**, D588-D592.

**Cheng, G. W. und Breen, P. J.** (1991) Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **116**, 865-869.

**Coggins, J. R., Abell, C., Evan, L. B., Frederickson, M., Robinson, D. A., Roszak, A. W. und Laphorn, A. P.** (2003) Experiences with the shikimate-pathway enzymes as targets for rational drug design. *Biochemical Society Transactions*, **31**, 548-552.

**Dahlen, T., Hauck, T., Wein, M. und Schwab, W.** (2001) 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone as a secondary metabolite from D-fructose-1,6-diphosphate metabolism by *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **91**, 352-358.

**Dewick, P. M.** (1995a) The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, **12**, 101-133.

**Dewick, P. M.** (1995b) The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, **12**, 579-607.

**Dixon, R. A. und Paiva, N. L.** (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, **7**, 1085-1097.

- Ernster, L. und Navazio, F.** (1958) Soluble diaphorase in animal tissues. *Acta Chemica Scandinavica*, **12**, 595-595.
- Eykmann, J. F.** (1891) Über die Shikimisäure. *Ber.Dtsch.Chem .Ges.*, **24**, 1278-1303.
- Farine, J. P., Lequere, J. L., Duffy, J., Everaerts, C. und Brossut, R.** (1994) Male sex pheromone of cockroach *Eurycotis Floridana* (Walker) (Blattidae, Polyzosteriinae): Role and composition of tergites 2 and 8 secretions. *Journal of Chemical Ecology*, **20**, 2291-2306.
- Ford, C. M., Boss, P. K. und Hoj, P. B.** (1998) Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize *Bronze-1* locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 9224-9233.
- Franklin, K. A. und Quail, P. H.** (2010) Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 11-24.
- Frost, J. W., Bender, J. L., Kadonaga, J. T. und Knowles, J. R.** (1984) Dehydroquinase synthase from *Escherichia coli*: Purification, cloning, and construction of overproducers of the enzyme. *Biochemistry*, **23**, 4470-4475.
- Ganz, T.** (2003) Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, **3**, 710-720.
- Given, N. K., Venis, M. A. und Gierson, D.** (1988) Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta*, **174**, 402-406.
- Glasel, J. A.** (1995) Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques*, **18**, 62-63.
- Görg, A., Klaus, A., Lück, C., Weiland, F., Drews, O., Wildgruber, R., Scheibe, B. und Weiss, W.** (2007) Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis. A laboratory manual.
- Görg, A., Weiss, W. und Dunn, M. J.** (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, **4**, 3665-3685.
- Görlach, J., Beck, A., Henstrand, J. M., Handa, A. K., Herrmann, K. M., Schmid, J. und Amrhein, N.** (1993) Differential expression of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) genes encoding shikimate pathway isoenzymes. I. 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. *Plant Molecular Biology*, **23**, 697-706.

- Halbwirth, H., Puhl, I., Haas, U., Jezik, K., Treutter, D. und Stich, K.** (2006) Two-phase flavonoid formation in developing strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 1479-1485.
- Hall, T. A.** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.
- Hanahan, D.** (1985) DNA Cloning. Volume 1. London, IRL Press.
- Hancock, J. F.** (1999) Strawberries. New York, CABI Publishing.
- Hawkins, A. R. und Smith, M.** (1991) Domain structure and interaction within the pentafunctional arom polypeptide. *European Journal of Biochemistry*, **196**, 717-724.
- Hecquet, L., Sancelme, M., Bolte, J. und Demuyne, C.** (1996) Biosynthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone by *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 1357-1360.
- Henry, D. W. und Silverstein, R. M.** (1966) A rational synthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, a flavor component of pineapple. *Journal of Organic Chemistry*, **31**, 2391-2394.
- Herrmann, K. M.** (1995) The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell*, **7**, 907-919.
- Herrmann, K. M. und Weaver, L. M.** (1999) The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**, 473-503.
- Hirvi, T. und Honkanen, E.** (1982) The volatiles of two new strawberry cultivars, "Annelie" and "Alaska Pioneer", obtained by backcrossing of cultivated strawberries with wild strawberries, *Fragaria vesca*, Rügen and *Fragaria virginiana*. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **175**, 113-116.
- Hirvi, T., Honkanen, E. und Pyysalo, T.** (1980) Stability of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)furanone and 2,5-dimethyl-4-methoxy-3(2H)furanone in aqueous buffer solutions. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **13**, 324-325.
- Hodge, J. E., Fisher, B. E. und Nelson, E. C.** (1963) Dicarboxyls, reductones, and heterocyclics produced by reactions of reducing sugars with secondary amine salts. *Am.Soc.Brewing Chemists, Proceedings*, 84-92.

**Honkanen, E., Pyysalo, T. und Hirvi, T.** (1980) The aroma of finnish wild raspberries, *Rubus-Idaeus*, L. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **171**, 180-182.

**Iannetta, P. P. M., Laarhoven, J.-L., Medina-Escobar, N., James, E. K., McManus, M. T., Davies, H. V. und Harren, F. J. M.** (2006) Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. *Physiologia Plantarum*, **127**, 247-259.

**Jaillon, O., Aury, J. M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Huguene, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyère, C., Billault, A., Segurens, B., Gouyvenoux, M., Ugarte, E., Cattonaro, F., Anthouard, V., Vico, V., Del Fabbro, C., Alaux, M., Di Gaspero, G., Dumas, V., Felice, N., Paillard, S., Juman, I., Moroldo, M., Scalabrin, S., Canaguier, A., Le Clainche, I., Malacrida, G., Durand, E., Pesole, G., Laucou, V., Chatelet, P., Merdinoglu, D., Delledonne, M., Pezzotti, M., Lecharny, A., Scarpelli, C., Artiguenave, F., Pè, M. E., Valle, G., Morgante, M., Caboche, M., Adam-Blondon, A. F., Weissenbach, J., Quétier, F., Wincker, P., The French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization** (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, **449**, 463-467.

**Jaworski, E. G.** (1972) Mode of action of *N*-Phosphonomethylglycine - Inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **20**, 1195-1198.

**Jensen, R. A. und Nester, E. W.** (1966) Regulatory enzymes of aromatic amino acid biosynthesis in *Bacillus subtilis* I. Purification and properties of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, **241**, 3365-3372.

**Jung, S., Staton, M., Lee, T., Blenda, A., Svancara, R., Abbott, A. und Main, D.** (2008) GDR (Genome Database for Rosaceae): integrated web-database for Rosaceae genomics and genetics data. *Nucleic Acids Research*, **36**, D1034-D1040.

**Kallio, H.** (1976) Identification of vacuum steam-distilled aroma compounds in press juice of arctic bramble, *Rubus arcticus* L. *Journal of Food Science*, **41**, 555-562.

**Kim, W. H., Chung, J. H., Back, J. H., Choi, J. Y., Cha, J. H., Koh, H. Y. und Han, Y. S.** (2003) Molecular cloning and characterization of an NADPH quinone oxidoreductase

from *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **36**, 442-449.

**Klein, D., Fink, B., Arold, B., Eisenreich, W. und Schwab, W.** (2007) Functional characterization of enone oxidoreductases from strawberry and tomato fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 6705-6711.

**Larsen, M. und Poll, L.** (1992) Odor thresholds of some important aroma compounds in strawberries. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **195**, 120-123.

**Larsen, M., Poll, L. und Olsen, C. E.** (1992) Evaluation of the aroma composition of some strawberry (*Fragaria ananassa* Duch) cultivars by use of odor threshold values. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, **195**, 536-539.

**Lay, F. T. und Anderson, M. A.** (2005) Defensins - Components of the innate immune system in plants. *Current Protein & Peptide Science*, **6**, 85-101.

**Ledl, F. und Schleicher, E.** (1990) Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper - neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin. *Angewandte Chemie*, **102**, 597-626.

**Ledl, F. und Severin, T.** (1978) Bräunungsreaktionen von Pentosen mit Aminen - Untersuchung zur Maillard-Reaktion, XIII [1]. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **167**, 410-413.

**Lindner, H. A., Nadeau, G., Matte, A., Michel, G., Menard, R. und Cygler, M.** (2005) Site-directed mutagenesis of the active site region in the quinate/shikimate 5-dehydrogenase YdiB of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 7162-7169.

**Livak, K. J. und Schmittgen, T. D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta CT)</sup> method. *Methods*, **25**, 402-408.

**Manning, K.** (1991) Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. *Analytical Biochemistry*, **195**, 45-50.

**Mano, J., Babiychuk, E., Belles-Boix, E., Hiratake, J., Kimura, A., Inzea, D., Kushnir, S. und Asada, K.** (2000) A novel NADPH:diamide oxidoreductase activity in

*Arabidopsis thaliana* P1 zeta-crystallin. *European Journal of Biochemistry*, **267**, 3661-3671.

**Marouga, R., David, S. und Hawkins, E.** (2005) The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **382**, 669-678.

**Maruyama, A., Kumagai, Y., Morikawa, K., Taguchi, K., Hayashi, H. und Ohta, T.** (2003) Oxidative-stress-inducible *qorA* encodes an NADPH-dependent quinone oxidoreductase catalysing a one-electron reduction in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology-Sgm*, **149**, 389-398.

**Mathesius, U., Imin, N., Chen, H. C., Djordjevic, M. A., Weinman, J. J., Natera, S. H. A., Morris, A. C., Kerim, T., Paul, S., Menzel, C., Weiller, G. R. und Rolfe, B. G.** (2002) Evaluation of proteome reference maps for cross-species identification of proteins by peptide mass fingerprinting. *Proteomics*, **2**, 1288-1303.

**Mayerl, F., Naf, R. und Thomas, A. F.** (1989) 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone glucoside: Isolation from strawberries and synthesis. *Phytochemistry*, **28**, 631-633.

**Medina-Escobar, N., Cardenas, J., Munoz-Blanco, J. und Caballero, J. L.** (1998) Cloning and molecular characterization of a strawberry fruit ripening-related cDNA corresponding a mRNA for a low-molecular-weight heat-shock protein. *Plant Molecular Biology*, **36**, 33-42.

**Meyer, B., Houlne, G., PozuetaRomero, J., Schantz, M. L. und Schantz, R.** (1996) Fruit-specific expression of a defensin-type gene family in bell pepper - Upregulation during ripening and upon wounding. *Plant Physiology*, **112**, 615-622.

**Mousdale, D. M., Campbell, M. S. und Coggins, J. R.** (1987) Purification and characterization of bifunctional dehydroquinase-shikimate: NADP oxidoreductase from pea seedlings. *Phytochemistry*, **26**, 2665-2670.

**Neta-Sharir, I., Isaacson, T., Lurie, S. und Weiss, D.** (2005) Dual role for tomato heat shock protein 21: Protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. *Plant Cell*, **17**, 1829-1838.

**Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. und Ehrhardt, W.** (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, **9**, 255-262.

**Newman, L. M., Garcia, H., Hudlicky, T. und Selifonov, S. A.** (2004) Directed evolution of the dioxygenase complex for the synthesis of furanone flavor compounds. *Tetrahedron*, **60**, 729-734.

**Patridge, E. V. und Ferry, J. G.** (2006) WrbA from *Escherichia coli* and *Archaeoglobus fulgidus* is an NAD(P)H : Quinone oxidoreductase. *Journal of Bacteriology*, **188**, 3498-3506.

**Perez, A. G., Olias, R., Sanz, C. und Olias, J. M.** (1996) Furanones in strawberries: Evolution during ripening and postharvest shelf life. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 3620-3624.

**Perez, A. G., Rios, J. J., Sanz, C. und Olias, J. M.** (1992) Aroma components and free amino-acids in strawberry variety Chandler during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, 2232-2235.

**Perkins-Veazie, P.** (1995) Growth and ripening of strawberry fruit. *Horticultural Reviews*, **17**, 267-297.

**Pichersky, E. und Gang, D. R.** (2000) Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*, **5**, 439-445.

**Pickenhagen, W., Velluz, A., Passerat, J. P. und Ohloff, G.** (1981) Estimation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (FURANEOL®) in cultivated and wild strawberries, pineapples and mangoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **32**, 1132-1134.

**Pisarnitskii, A. F., Demechenko, A. G., Egorov, I. A. und Cvelesiani, R. K.** (1992) Methylpentoses are probable precursors of furanones in fruits. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **28**, 97-100.

**Preininger, M. und Grosch, W.** (1994) Evaluation of key odorants of the neutral volatiles of Emmentaler cheese by the calculation of odor activity values. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **27**, 237-244.

**Pyysalo, T., Honkanen, E. und Hirvi, T.** (1979) Volatiles of wild strawberries, *Fragaria vesca* L., compared to those of cultivated berries, *Fragaria x ananassa* cv. Senga Sengana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **27**, 19-22.

**Quesada, M. A., Blanco-Portales, R., Pose, S., Garcia-Gago, J. A., Jimenez-Bermudez, S., Munoz-Serrano, A., Caballero, J. L., Pliego-Alfaro, F., Mercado, J.**

**A. und Munoz-Blanco, J.** (2009) Antisense down-regulation of the *FaPG1* gene reveals an unexpected central role for polygalacturonase in strawberry fruit softening. *Plant Physiology*, **150**, 1022-1032.

**Raab, T., Hauck, T., Knecht, A., Schmitt, U., Holzgrabe, U. und Schwab, W.** (2003) Tautomerism of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone: Evidence for its enantioselective biosynthesis. *Chirality*, **15**, 573-578.

**Raab, T., Lopez-Raez, J. A., Klein, D., Caballero, J. L., Moyano, E., Schwab, W. und Munoz-Blanco, J.** (2006) FaQR, required for the biosynthesis of the strawberry flavor compound 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, encodes an enone oxidoreductase. *Plant Cell*, **18**, 1023-1037.

**Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A. und Lunardi, J.** (1997) Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, **18**, 307-316.

**Rao, P. V., Krishna, C. M. und Zigler, J. S.** (1992) Identification and characterization of the enzymatic activity of  $\alpha$ -crystallin from guinea pig lens. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 96-102.

**Rapp, A., Knipser, W., Engel, L., Ullemeyer, H. und Heimann, W.** (1980) Fremdkomponenten im Aroma von Trauben und Weinen interspezifischer Rebsorten. I. Die Erdbeernote. *Vitis*, **19**, 13-23.

**Re, L., Maurer, B. und Ohloff, G.** (1973) Ein einfacher Zugang zu 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (Furaneol), einem Aromabestandteil von Ananas und Erdbeere. *Helvetica Chimica Acta*, **56**, 1882-1894.

**Ritz, D. und Beckwith, J.** (2001) Roles of thiol-redox pathways in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **55**, 21-48.

**Roberts, F., Roberts, C. W., Johnson, J. J., Kyle, D. E., Krell, T., Coggins, J. R., Coombs, G. H., Milhous, W. K., Tzipori, S., Ferguson, D. J. P., Chakrabarti, D. und McLeod, R.** (1998) Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. *Nature*, **393**, 801-805.

**Rodin, J. O., Himel, C. M., Silverstein, R. M., Leeper, R. W. und Gortner, W. A.** (1965) Volatile flavor and aroma components of pineapple. I. Isolation and tentative identification of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. *Journal of Food Science*, **30**, 280-285.

**Roscher, R., Bringmann, G., Schreier, P. und Schwab, W.** (1998) Radiotracer studies on the formation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in detached ripening strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 1488-1493.

**Roscher, R., Herderich, M., Steffen, J. P., Schreier, P. und Schwab, W.** (1996) 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanone 6'-O-malonyl-beta-D-glucopyranoside in strawberry fruits. *Phytochemistry*, **43**, 155-159.

**Roscher, R., Schreier, P. und Schwab, W.** (1997) Metabolism of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in detached ripening strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 3202-3205.

**Ross, D., Kepa, J. K., Winski, S. L., Beall, H. D., Anwar, A. und Siegel, D.** (2000) NAD(P)H : quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chemico-Biological Interactions*, **129**, 77-97.

**Rothe, M. und Thomas, B.** (1963) Aromastoffe des Brotes. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **119**, 302-310.

**Saravanan, R. S. und Rose, J. K. C.** (2004) A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics*, **4**, 2522-2532.

**Schieberle, P.** (1991) Primary odorants in popcorn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**, 1141-1144.

**Schieberle, P. und Grosch, W.** (1994) Potent odorants of rye bread crust - differences from the crumb and from wheat bread crust. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **198**, 292-296.

**Schieberle, P. und Hofmann, T.** (1997) Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 227-232.

**Schwab, W.** (1998) Application of stable isotope ratio analysis explaining the bioformation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in plants by a biological Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 2266-2269.

**Schwab, W. und Roscher R.** (1997) 4-Hydroxy-3(2H)-furanones: Natural and Maillard products. *Recent Research Developments in Phytochemistry*, 643-673.

**Song, J., Braun, G., Bevis, E. und Doncaster, K.** (2006) A simple protocol for protein extraction of recalcitrant fruit tissues suitable for 2-DE and MS analysis. *Electrophoresis*, **27**, 3144-3151.

**Srinivasan, P. R. und Sprinson, D. B.** (1959) 2-Keto-3-deoxy-D-arabo-heptonic acid 7-phosphate synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, **234**, 716-722.

**Steinrücken, H. C. und Amrhein, N.** (1980) The herbicide Glyphosate is a potent inhibitor of 5-Enolpyruvyl-shikimic-acid 3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **94**, 1207-1212.

**Sundt, E.** (1970) The development and future of flavor research. *Naeringsmiddelindustrien*, **23**, 5-13.

**Suutarinen, J., Änäkäinen, L. und Autio, K.** (1998) Comparison of light microscopy and spatially resolved fourier transform infrared (FT-IR) microscopy in the examination of cell wall components of strawberries. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, **31**, 595-601.

**Tedeschi, G., Chen, S. und Massey, V.** (1995) DT-Diaphorase - Redox potential, steady-state, and rapid reaction studies. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 1198-1204.

**Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J.** (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.

**Ullrich, F. und Grosch, W.** (1987) Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **184**, 277-282.

**Vierling, E.** (1991) The roles of heat-shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **42**, 579-620.

**Vollhardt, K. P. C. und Schore, N. E.** (2000) Organische Chemie. Weinheim, Wiley-VCH.

**Wein, M., Lavid, N., Lunkenbein, S., Lewinsohn, E., Schwab, W. und Kaldenhoff, R.** (2002) Isolation, cloning and expression of a multifunctional O-methyltransferase

capable of forming 2,5-dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone, one of the key aroma compounds in strawberry fruits. *Plant Journal*, **31**, 755-765.

**Wein, M., Lewinsohn, E. und Schwab, W.** (2001) Metabolic fate of isotopes during the biological transformation of carbohydrates to 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 2427-2432.

**Westermeier, R. und Marouga, R.** (2005) Protein detection methods in proteomics research. *Bioscience Reports*, **25**, 19-32.

**Whetten, R. und Sederoff, R.** (1995) Lignin biosynthesis. *Plant Cell*, **7**, 1001-1013.

**Widlanski, T., Bender, S. L. und Knowles, J. R.** (1989) Dehydroquinase synthase: The use of substrate analogues to probe the late steps of the catalyzed reaction. *Biochemistry*, **28**, 7572-7582.

**Willhalm, B., Stoll, M. und Thomas, A. F.** (1965) 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-2,3-dihydrofuran-3-one. *Chemistry & Industry*, 1629-1630.

**Wisniewski, M. E., Bassett, C. L., Artlip, T. S., Webb, R. P., Janisiewicz, W. J., Norelli, J. L., Goldway, M. und Droby, S.** (2003) Characterization of a defensin in bark and fruit tissues of peach and antimicrobial activity of a recombinant defensin in the yeast, *Pichia pastoris*. *Physiologia Plantarum*, **119**, 563-572.

**Yang, P. F., Chen, H., Liang, Y. und Shen, S. H.** (2007) Proteomic analysis of de-etiolated rice seedlings upon exposure to light. *Proteomics*, **7**, 2459-2468.

**Zabetakis, I. und Holden, M. A.** (1996) The effect of 6-deoxy-D-fructose on flavour bioformation from strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Elsanta) callus cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **45**, 25-29.

**Zabetakis, I., Moutevelis-Minakakis, P. und Gramshaw, J. W.** (1999) The role of 2-hydroxypropanal in the biosynthesis of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one in strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Elsanta) callus cultures. *Food Chemistry*, **64**, 311-314.

**Zhu, Y. Y., Machleder, E. M., Chenchik, A., Li, R. und Siebert, P. D.** (2001) Reverse transcriptase template switching: A SMART (TM) approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques*, **30**, 892-897.

**Zhulidov, P. A., Bogdanova, E. A., Shcheglov, A. S., Vagner, L. L., Khaspekov, G. L., Kozhemyako, V. B., Matz, M. V., Meleshkevitch, E., Moroz, L. L., Lukyanov, S. A. und Shagin, D. A.** (2004) Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease. *Nucleic Acids Research*, **32**, e37, 1-8.

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

---

Name: Arol  
Vorname: Beate  
Geburtsdatum: 18. Juli 1981  
Geburtsort: Ansbach

## Berufserfahrung

---

seit 02/2009 Sachbearbeiterin am Bayerischen Landesamt für  
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Erlangen

## Promotion und Studium

---

02/2006 – 12/2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fachgebiet  
Biomolekulare Lebensmitteltechnologie der Technischen  
Universität München

02/2005 – 01/2006 Praktikum am Bayerischen Landesamt für Gesundheit  
und Lebensmittelsicherheit, Erlangen und Würzburg  
Abschluss: 2. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

10/2000 – 11/2004 Studium der Lebensmittelchemie an der Julius-  
Maximilians-Universität Würzburg  
Abschluss: 1. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

## Schulbildung

---

09/1991 – 06/2000 Platen-Gymnasium Ansbach  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

09/1987 – 07/1991 Grundschule in Ansbach

Auszüge dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

**Klein, D., Fink, B., Arold, B., Eisenreich, W. und Schwab, W.** (2007) Functional characterization of enone oxidoreductases from strawberry and tomato fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 6705-6711.