

Technische Universität München  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
Department für Lebensmittel und Ernährung  
Fachgebiet Biomolekulare Lebensmitteltechnologie

**Reifekorrelierte Enzyme des Sekundärstoffwechsels von  
Erdbeeren (*Fragaria x ananassa*)  
Expression und Funktion**

**Stefan Lunkenbein**

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 (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender

Univ. Prof. Dr. Karl-Heinz Engel

Prüfer der Dissertation

1. Univ. Prof. Dr. Wilfried Schwab

2. Univ. Prof. Dr. Peter Schieberle

Die Dissertation wurde am 17.10.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 06.02.2006 angenommen.







**Reifekorrelierte Enzyme des Sekundärstoffwechsels von  
Erdbeeren (*Fragaria x ananassa*)  
Expression und Funktion**

Meiner Familie

Stefan Lunkenbein im März 2006



Die vorliegende Dissertation "Reifekorrelierte Enzyme des Sekundärstoffwechsels von Erdbeeren (*Fragaria x ananassa*) – Expression und Funktion" wurde von Januar 2001 bis Januar 2003 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg, in Zusammenarbeit mit dem Julius-von-Sachs Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Universität Würzburg, sowie dem Plant Research International, Wageningen, Niederlande durchgeführt. Aufgrund der angenommenen Professur meines Doktorvaters an der Technischen Universität München wurde die Arbeit von Februar 2003 bis April 2004 am dortigen Fachgebiet Biomolekulare Lebensmitteltechnologie fertig gestellt.

Auszüge dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht oder als Manuskript eingereicht:

#### **Originalartikel**

- 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 J.*, **31**(6), 755-765
- Lunkenbein, S., Bellido, M. L., Aharoni, A., Salentijn, E. M. J., Kaldenhoff, R., Coiner, H. A., Munoz-Blanco, J. und Schwab, W.** (2006) Cinnamate metabolism in ripening fruit: characterisation of an UDP-Glucose:cinnamate glucosyltransferase from strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Plant Phys.* **140**(3), 1047-1058
- Lunkenbein, S., Coiner, H. A., de Vos, R., Schaart, J. G., Boone, M. J., Krens, F. A., Schwab, W. und Salentijn, E. M. J.** (2006) Molecular characterization of a stable antisense chalcone synthase phenotype in strawberry (*Fragaria x ananassa*) *J.Agric. Food Chem.* **54**(6), 2145-2153
- Lunkenbein, S., Salentijn, E. M. J., Coiner, H. A. und Schwab, W.** (2006) Up- and downregulation of *Fragaria x ananassa* O-methyltransferase: impacts on flavor and phenylpropanoid metabolism. *J.Exp. Bot.* (zur Veröffentlichung eingereicht).

## Vorträge

### **Lunkenbein, S., Aharoni, A. und Schwab, W.**

Isolierung, Klonierung und Expression von Glycosyltransferasen reifender Erdbeerfrüchte.

Tagung: Regionalverband Bayern (Lebensmittelchemische Gesellschaft in der GdCh), TU München, Garching 24.03.2003

### **Aharoni, A., Giri, A., Verstappen, F., Lunkenbein, S., Schwab, W. und Bouwmeester, H.**

Fruit flavour genes: multiple pathways and multiple substrates for the corresponding enzymes

7th International Congress of Plant Molecular Biology, 23. – 28.06.2003, Barcelona, Spanien

### **Schwab, W., Lunkenbein, S., und Salentijn, E. M. J.**

Veränderungen im Sekundärstoffwechsel von Erdbeerfrüchten nach Herabregulation der Chalkonsynthese durch Antisense-Technologie.

Tagung: Regionalverband Bayern (Lebensmittelchemische Gesellschaft in der GdCh), LGL Erlangen, Erlangen 07.03.2005

### **Schwab, W., Lunkenbein, S., Salentijn, E. M. J. und Aharoni, A.**

Genetic engineering of strawberry flavour

11. Weurman Flavour Research Symposium 21. – 24. Juni 2005, Roskilde, Dänemark

## Posterbeiträge

### **Griesser, M., Lunkenbein, S., Aharoni, A. und Schwab, W.**

Klonierung und funktionelle Heterologe Expression einer Anthocyanidin O-Glukosyltransferase aus Erdbeerfrüchten.

Tagung: Regionalverbände Südwest und Bayern (Lebensmittelchemische Gesellschaft in der GdCh), Universität Würzburg 8.3.2004

### **Landmann, C., Lunkenbein, S., Aharoni, A. und Schwab, W.**

Substrate einer heterolog exprimierten Zimtsäure-O-glucosyltransferase.

Tagung: Regionalverbände Südwest und Bayern (Lebensmittelchemische Gesellschaft in der GdCh), Universität Würzburg 8.3.2004

### **Lunkenbein, S., Salentijn, E. M. J., Aharoni, A., Kaldenhoff, R., Coiner, H. A. und Schwab, W.**

Veränderter Gehalt an Phenylpropanoid-Glucose-Estern in transgenen Erdbeerpflanzen (*Fragaria x ananassa*).

Tagung: Regionalverbände Südwest und Bayern (Lebensmittelchemische Gesellschaft in der GdCh), Universität Würzburg 8.3.2004

## Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Wilfried Schwab gilt mein herzlicher Dank für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, die vielfältige Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff, Fakultät für Biologie, Technische Universität Darmstadt, danke ich für die Zusammenarbeit und die Betreuung bei den molekularbiologischen Arbeiten während der Zeit in Würzburg.

Herrn Prof. Dr. Peter Schreier, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Universität Würzburg, bin ich dankbar für die Möglichkeit während der Zeit von Januar 2001 bis Januar 2003 an seinem Lehrstuhl zu forschen.

Ganz besonders möchte ich bei Dr. Asaph Aharoni und Dr. Elma Salentijn, Plant Research International, Wageningen, Niederlande, für die molekularbiologischen Unterweisungen und die vielfältige Hilfestellung bei der Herstellung der rekombinanten Enzyme sowie der Herstellung und Analyse der transgenen Erdbeerpflanzen bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitskreise Kaldenhoff und Schreier in Würzburg für die vielfältige Unterstützung und die gute Arbeitsatmosphäre bedanken – hier vor allem bei Tobi und Thommy für die tolle Zeit im ‚Bubenlabor‘.

Für die außergewöhnlich gute Arbeitsatmosphäre im Fachgebiet Biomolekulare Lebensmitteltechnologie, die vielen guten Ratschläge und Diskussionen sowie die Hilfestellung möchte ich mich bei allen Mitarbeitern in Freising sehr herzlich bedanken. Hier seien besonders Dorothee Klein für die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre in unserem gemeinsamen Büro, sowie Heather Coiner für die langwierigen Auswertungen der LC-MS Läufe erwähnt.

Den Korrekturlesern meiner Dissertation Markus Griesser, Gregor Kalinowski, Dorothee Klein, Christian Landmann und Holger Schmidt sei für ihre fachlichen und grammatikalischen Verbesserungsvorschläge gedankt.

Der German-Israeli Foundation for Scientific Research and Development (GIF) und der Degussa danke ich, dass sie durch die Bereitstellung der finanziellen Mittel diese Arbeit ermöglicht haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>A EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1 ERDBEEREN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Botanische Sicht .....	1
1.2 Lebensmittelchemische und ernährungsphysiologische Sicht .....	5
1.3 Biochemische und molekularbiologische Sicht .....	13
<b>2 Enzyme des Sekundärstoffwechsels .....</b>	<b>17</b>
2.1 Chalconsynthasen (CHS).....	17
2.2 O-Methyltransferasen (OMT) .....	22
2.3 Glycosyltransferasen (GT) .....	28
<b>3 Problemstellungen .....</b>	<b>36</b>
<b>B ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>38</b>
<b>1 Untersuchungen eines CHS Gegensinn Phänotyps hinsichtlich der Sekundärmetabolite .....</b>	<b>38</b>
1.1 Vorarbeiten der Kooperationspartner .....	38
1.2 Vergleichende Analyse der CHS AS Linie 20 und von Kontrollfrüchten.....	39
1.2.1 Untersuchung der glycosidisch gebundenen Formen mittels LC-UV-ESI-MS <sup>n</sup> .....	40
1.2.2 Untersuchung der flüchtigen Verbindungen mittels GC-MS .....	41
1.3 Zusammenfassung und Diskussion .....	43
<b>2 Multifunktionelle O-Methyltransferase aus Erdbeeren – Expression und Funktion .....</b>	<b>47</b>
2.1 Korrelationsanalyse <i>FaOMT</i> mRNA zu 2,5-Dimethyl-3(2 <i>H</i> )-furanonen.....	47
2.2 Auswirkungen der Hoch- und Herabregulierung einer <i>Fragaria x ananassa</i> O-Methyltransferase ( <i>FaOMT</i> ) auf Sekundärmetabolite .....	49
2.2.1 Herstellung transgener Pflanzen mit veränderter Expression von <i>FaOMT</i> ....	49
2.2.2 Quantitative mRNA Analyse von transgenen Erdbeerpflanzen .....	50
2.2.3 Quantifizierung von Metaboliten in transgenen und Kontroll-Pflanzen .....	51
2.3 Zusammenfassung und Diskussion .....	55
<b>3 Glycosyltransferasen des Sekundärstoffwechsels von Erdbeeren – Expression und Funktion.....</b>	<b>58</b>
3.1 Isolierung und Analyse der GT-Sequenzen .....	58
3.2 Herstellung rekombinanter Fusionsproteine.....	63
3.3 Biochemische Charakterisierung von <i>FaGT2</i> .....	64
3.3.1 Temperaturoptimum, Reaktionszeit, pH-Optimum.....	64
3.3.2 Substrate zur Bestimmung der Substratspezifität.....	65
3.4 <i>FaGT2</i> Expression und Korrelation der entsprechenden Metabolite.....	73
3.5 Transgene Erdbeeren zur Funktionsanalyse von <i>FaGT2</i> .....	75

3.5.1 Herstellung der transgenen Erdbeeren und Quantifizierung der Transkripte.	75
3.5.2 Quantifizierung der Metabolite in transgenen und Kontroll-Pflanzen.....	76
3.6 Zusammenfassung und Diskussion .....	79
<b>C MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>87</b>
<b>1 Material.....</b>	<b>87</b>
1.1 Chemikalien und Arbeitsmaterialien.....	87
1.2 Enzyme.....	87
1.3 Pflanzenmaterial .....	88
1.4 Medien und Pufferlösungen .....	88
1.5 Säulenchromatographie, Festphasenextraktion.....	91
<b>2 Geräte.....</b>	<b>93</b>
2.1 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS).....	93
2.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).....	94
2.3 Flüssigchromatographie-Ultraviolett-Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (LC-UV-ESI-MS <sup>n</sup> ).....	97
2.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	98
2.5 Flüssigszintillationszähler (LSC) .....	98
2.6 Schüttelinkubator .....	98
2.7 UV-Vis-Spektralphotometer .....	98
2.8 Sonstige Geräte – Software.....	99
<b>3 Methoden.....</b>	<b>101</b>
3.1 Darstellung von Metaboliten.....	101
3.1.1 Zimtsäure- $\beta$ -D-glucoseester .....	101
3.1.2 5-Hydroxyferulasäure .....	102
3.1.3 p-Cumaryl-1-acetat.....	103
3.2 Gewinnung der Erdbeerextrakte .....	103
3.3 Verfahren mit Ribonukleinsäuren (RNA).....	104
3.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA für Northern-Analyse.....	104
3.3.2 Elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel .....	105
3.3.3 Transferverfahren für RNA .....	106
3.3.4 Radioaktive Markierung von RNA.....	106
3.3.5 Hybridisierung von Nukleinsäuren.....	107
3.4 Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA) .....	108
3.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	108
3.4.2 Spaltung der DNA durch Restriktionsendonucleasen.....	109
3.4.3 Auftrennung und Wiedergewinnung von DNA Fragmenten.....	109
3.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	110
3.4.5 Ligation und Transformation.....	110
3.4.6 Konstruktion der <i>FaGT</i> und <i>FaRT</i> Expressionsplasmide.....	111
3.5 Heterologe Expression.....	114
3.6 Verfahren mit Proteinen .....	114
3.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	114
3.6.2 Konzentrationsbestimmung .....	115
3.6.3 Western-Blot.....	116

---

3.6.4 Aktivitätsassay .....	118
3.7 Herstellung transgener Pflanzen .....	118
3.7.1 Herstellung der Konstrukte und Transformation der Pflanzen .....	118
3.7.2. Quantitative RNA-Analyse transgener Erdbeerpflanzen mittels quantitativer Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (QRT-PCR) .....	121
3.7.2.1 Isolation von Gesamt-RNA aus Erdbeeren .....	121
3.7.2.2 Rücktranskription von RNA in cDNA .....	122
3.7.2.3 Quantitative Echtzeit PCR (QRT-PCR) .....	123
<b>D ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>127</b>
<b>E SUMMARY .....</b>	<b>131</b>
<b>F LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>134</b>

## Abkürzungsverzeichnis

2-BE	2-Butoxyethanol
2n	diploider Chromosomensatz in Zellen
4CL	p-Cumarsäure:CoA Ligase
Abb.	Abbildung
AcS	Acetosyringon
AEVA	Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse
AS	Antisense (Gegensinn Richtung)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat-p-Toluidinsalz
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase
CAD	Zimtalkohol Dehydrogenase
CaMV 35S	Blumenkohlmosaikvirus 35S Promotor (Cauliflower mosaic virus)
CCOMT	Caffeoyl CoA O-Methyltransferase (Kaffeensäure-CoA O-Methyltransferase)
CCR	Zimtsäure-CoA Reduktase
cDNA	copy DNA (komplementäre DNA)
CHI	Chalconisomerase
CHS	Chalconsynthase
CoA	Coenzym A
COMT	Caffeic acid O-Methyltransferase (Kaffeensäure O-Methyltransferase)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cv.	Cultivar (Kulturvarietät)
d	Dublett
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dbp	DNA-Bindungsprotein
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dd	Doppeldublett
df	Filmdicke der Kapillare
DFR	Dihydroflavonolreduktase
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	DNA-Ribonuklease, Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dpm	Desintegrations per minute (Zerfälle pro Minute)
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EC	Enzyme Commission (Enzym Klassifizierungsnummer)

EB-Puffer	Extraktionspuffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoßionisierung
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector (Verdampfungs-Lichtstreuendetektor)
ESI	Elektrosprayionisierung
EST	Expressed Sequence Tags
F3H	Flavonol-3-Hydroxylase
F	Forward (Vorwärts)
FaGT	<i>Fragaria x ananassa</i> Glycosyltransferase
FaOMT	<i>Fragaria x ananassa</i> O-Methyltransferase
FaRT	<i>Fragaria x ananassa</i> Rhamnosyltransferase
FD	Flavour Dilution (Aroma-Verdünnung)
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Fallbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
gi	GenBank <sup>®</sup> GenInfo Identifizierungsnummer
Glc	Glucose
GT	Glycosyltransferase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
HRGC	High Resolution Gas Chromatography (Kapillargaschromatographie)
ICC	Ion count control
i.D.	innerer Durchmesser
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
kb	Kilobasen
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Luria-Bertani
LC-UV-ESI-MS <sup>n</sup>	Flüssigchromatographie-Ultraviolett-Spektrometrie-Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
LSC	Liquid Scintillation Counting (Flüssigszintillationsmessung)
M	Molekülion
m	Multipllett
$m/z$	Masse-Ladungsverhältnis
MEN-Puffer	Morpholinopropansulfonsäure/EDTA/Natriumacetat-Puffer
mRNA	Messenger RNA (Boten-RNS)
MS	Massenspektrometrie
MS <sup>n</sup>	Tandemmassenspektrometrie
N <sup>(<i>i</i>)</sup>	Natürliche Zahl (0, 1, 2, ...)
NBT	Nitroblau Tetrazolium

NDP	Nucleotiddiphosphat
NDP-GT	Nucleotiddiphosphat-Glycosyltransferase
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernmagnetische Resonanz)
OD <sub>xxx</sub>	Optische Dichte bei xxx nm
OMT	O-Methyltransferase
ORF	Open Reading Frame (offenes Leseraster)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PP	Probenpuffer
PRI	Plant Research International, Wageningen, Niederlande
PSPG	Plant Secondary Product Glycosyltransferases
q	Quartett
QRT-PCR	Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (Quantitative Realtime Polymerase Chain Reaction)
R	Reverse (Rückwärts)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
s	Singulett
S	Sense (Sinn Richtung)
SAAT	Strawberry Acyl-CoA Alcohol Transferase (Erdbeere Acyl-CoA Alkohol Transferase)
SAH	S-Adenosyl-L-homocystein
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC-Puffer	Natriumcitrat-Puffer
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris/Borat/EDTA-Puffer
THF	Tetrahydrofuran
T <sub>R</sub>	Retentionszeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	Atomare Masseneinheit
U	Unit (µmol/min)
UDP	Uridindiphosphat
UDPG	Uridindiphosphatglucose
UDPG*	Uridindiphosphatglucose, radioaktiv markiert
UDP-GT	Uridindiphosphatglucose-Glycosyltransferase
upm	Umdrehungen pro Minute

---

UV	Ultraviolett
$V_{\max}$	Maximale Umsatzgeschwindigkeit
x	haploide Chromosomengrundzahl
XAD	Spezialadsorberharz aus Amberlite® XAD

## Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

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

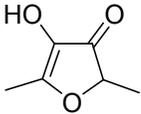
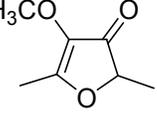
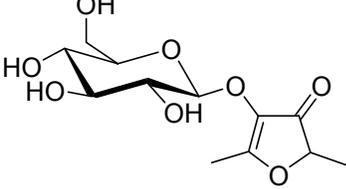
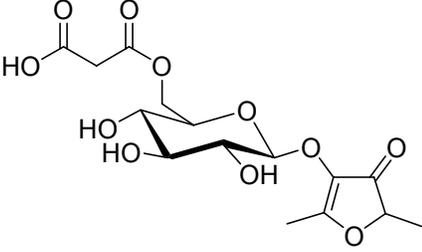
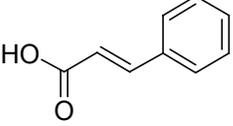
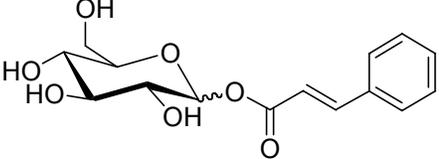
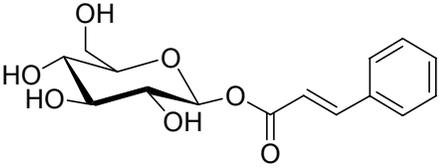
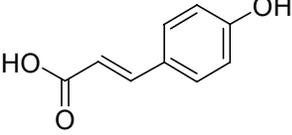
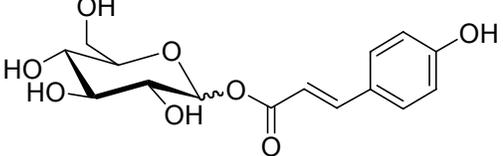
## Datenbankeinträge der mRNA Sequenzen

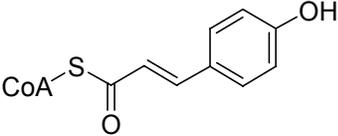
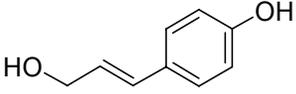
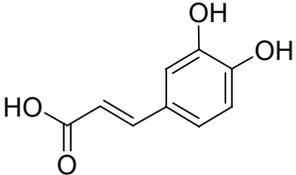
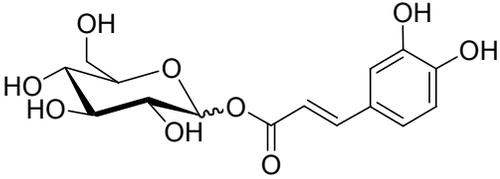
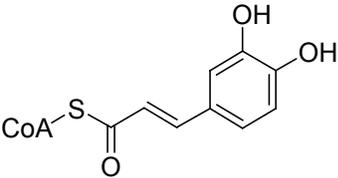
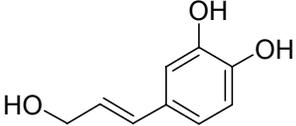
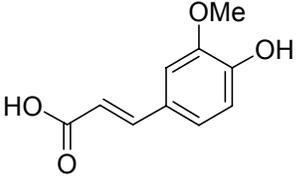
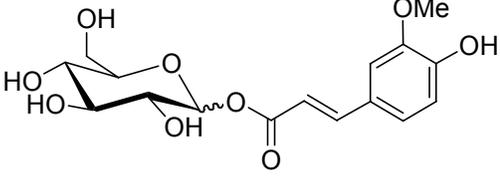
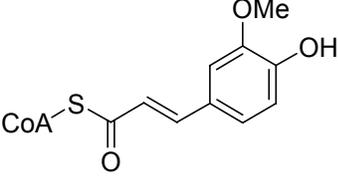
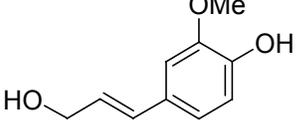
Interne Nomenklatur	GenBank® Accession Number
CHS	AI795154
FaOMT	AF220491
FaGT1	AY663784
FaGT2	AY663785
FaGT3	AY663786
FaRT1	AY663787

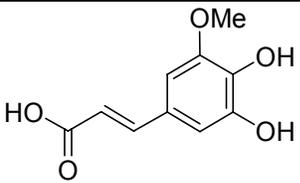
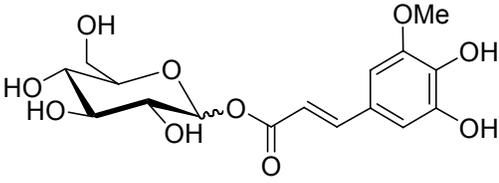
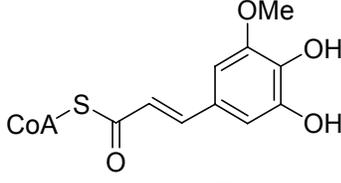
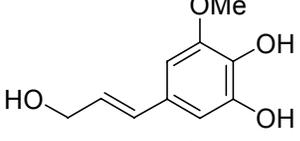
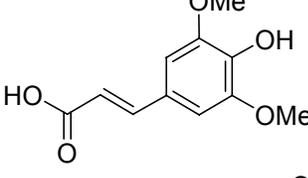
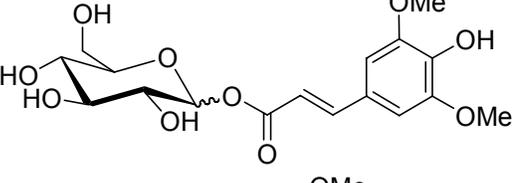
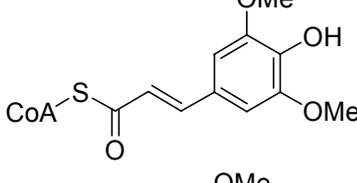
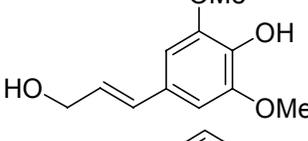
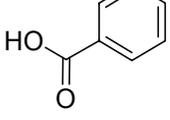
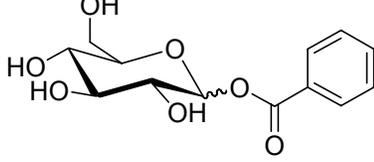
## Anmerkung:

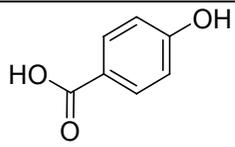
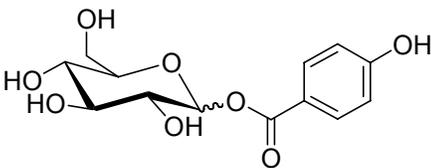
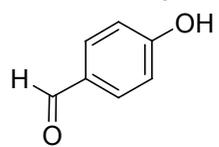
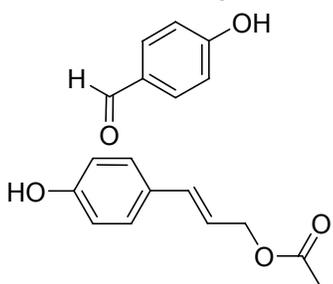
Die Namen von Gensequenzen (z. B. *FaGT*) erfolgten in kursiver Schreibweise, wohingegen die entsprechenden Proteine (FaGT) in normaler Schreibweise dargestellt wurden.

Für die in dieser Arbeit häufiger vorkommenden furanoiden und phenolischen Verbindungen wurden folgende Abkürzungen gewählt:

Abkürzung	Verbindung	Strukturformel
<b>1</b>	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i> )-furanon (Furaneol <sup>®</sup> )	
<b>1a</b>	4-Methoxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i> )-furanon (Methoxyfuraneol, Mesifuran)	
<b>1b</b>	2,5-Dimethyl-4-O-β-D-glucose-3(2 <i>H</i> )-furanon	
<b>1c</b>	2,5-Dimethyl-4-O-(6'-O-malonyl)-β-D-glucose-3(2 <i>H</i> )-furanon	
<b>2</b>	Zimtsäure	
<b>2a</b>	Zimtsäure-D-glucoseester	
<b>2b</b>	Zimtsäure-β-D-glucoseester 1-O- <i>trans</i> -Zimtsäure-β-D-glucopyranose	
<b>3</b>	p-Cumarsäure	
<b>3a</b>	p-Cumarsäure-D-glucoseester	

Abkürzung	Verbindung	Strukturformel
3b	p-Cumarsäure-CoA	
3c	p-Cumarylalkohol	
4	Kaffeensäure	
4a	Kaffeensäure-D-glucoseester	
4b	Kaffeensäure-CoA	
4c	Kaffeeylalkohol	
5	Ferulasäure	
5a	Ferulasäure-D-glucoseester	
5b	Ferulasäure-CoA	
5c	Coniferylalkohol	

Abkürzung	Verbindung	Strukturformel
6	5-Hydroxyferulasäure	
6a	5-Hydroxyferulasäure-D-glucoseester	
6b	5-Hydroxyferulasäure-CoA	
6c	5-Hydroxy-Coniferylalkohol	
7	Sinapinsäure	
7a	Sinapinsäure-D-glucoseester	
7b	Sinapinsäure-CoA	
7c	Sinapylalkohol	
8	Benzoessäure	
8a	Benzoessäure-D-glucoseester	

Abkürzung	Verbindung	Strukturformel
<b>9</b>	p-Hydroxybenzoesäure	
<b>9a</b>	p-Hydroxybenzoesäure-D-glucoseester	
<b>9b</b>	p-Hydroxybenzaldehyd	
<b>10</b>	p-Cumaryl-1-acetat (2 <i>E</i> )-3-(4-Hydroxyphenyl)prop-2-en-1-yl acetat	

## A Einleitung

### 1 Erdbeeren

#### 1.1 Botanische Sicht

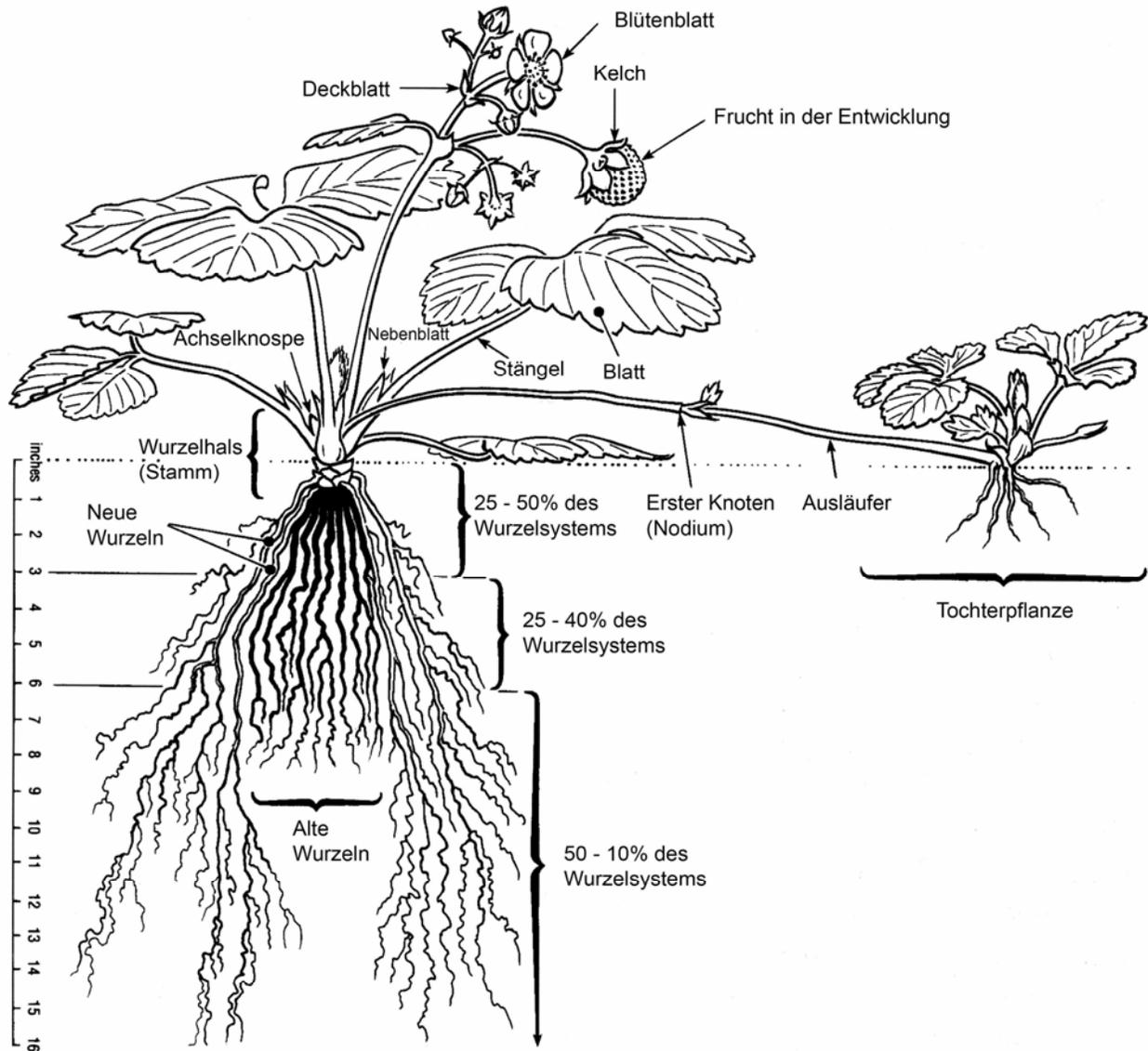


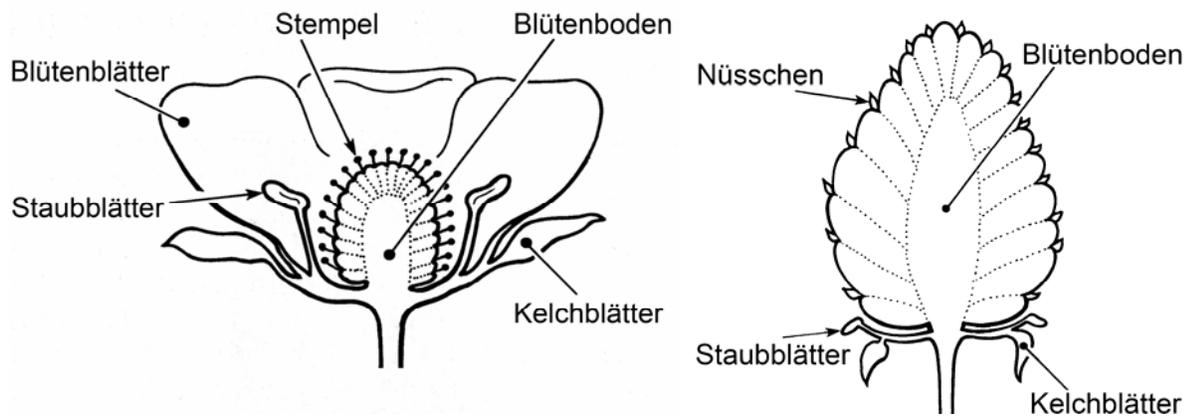
Abb. A-1: Eine sich entwickelnde Erdbeerpflanze (Hancock, 1999)

Erdbeeren, d. h. die Gattung *Fragaria*, gehören zur Familie der Rosengewächse (*Rosaceae*). Erdbeerfrüchte (im Folgenden kurz Erdbeeren genannt) sind botanisch

gesehen Sammelnussfrüchte. Die hochgeschätzte Erdbeere war eine der ersten Nutzpflanzen, die systematisch gezüchtet wurde. So entstanden in den letzten zwei Jahrhunderten viele neue Sorten, vor allem in Europa und Nordamerika, seit einigen Dekaden auch in der ganzen Welt (Hancock, 1999).

Die krautige Erdbeerpflanze ist mehrjährig und besitzt einen zentralen Vegetationskegel aus dem Blätter, Wurzeln und Blütenstände hervorgehen. Der Vegetationskegel besteht aus einem Zentralzylinder, umgeben von einem Leitbündelring. Der Zentralzylinder besteht überwiegend aus Mark, mit einer dünnen Schicht Kambium, das das Mark umgibt. An der Spitze jeden Laubblattes um den Vegetationskegel sitzt eine Achselknospe aus dem oberirdische, horizontal wachsende Ausläufer hervorgehen können. Nach Ausbildung zweier langer Internodien enden diese in einer Tochterrosettenpflanze an dem zweiten Nodium mit sprossbürtigen Wurzeln. Diese kann sogleich wieder Ausläufer als Achselprodukte entwickeln, so dass innerhalb eines Jahres vegetativ eine Vielzahl von Tochterpflanzen entsteht (Abb. A-1; Franke, 1997).

Die Blütenstände der Erdbeerpflanze sind eine modifizierte Sprossachse, die mit einer primären Blüte abschließt. Auf die primäre Blüte folgen in der Regel zwei sekundäre, vier tertiäre und acht quartäre Blüten. Eine typische Blüte besitzt zehn Kelchblätter, fünf Blütenblätter, 20 – 30 Staubblätter und zahlreiche Fruchtblätter (Abb. A-2). Erdbeeren werden von Insekten, besonders von Bienen bestäubt (Hancock, 1999).



**Abb. A-2:** Erdbeerblüte und die Erdbeerfrucht (Hancock, 1999)

Die Fruchtblätter entwickeln sich zu kleinen Nüsschen und sind die wahren Früchte der Erdbeere (Abb. A-2). Diese Nüsschen sitzen nach der Blüte dem stark vergrößerten Blütenboden, dem eigentlich genießbaren Teil der Sammelnussfrucht, auf. Dieser gliedert sich in das weißliche, dem Zentralzylinder entsprechende Mark und die von Anthocyanen rot gefärbte Rinde. Die Nüsschen werden durch Leitbündel mit Nährstoffen versorgt. Die noch vorhandenen Staub- und Kelchblätter umgeben die Sammelnussfrucht am Grunde. Sowohl Nüsschen als auch Leitbündel sind lignifiziert (Suutarinen und Mitarbeiter, 1998).

In Europa heimisch ist die diploide ( $2n = 2x = 14$ ) Walderdbeere, *Fragaria vesca*, die meist wild gesammelt wird. Größere Bedeutung hat jedoch ein in Holland aus *F. chiloensis* (Chile-Erdbeere, octaploid,  $2n = 8x = 56$ ) und *F. virginiana* (Scharlach-Erdbeere, octaploid,  $2n = 8x = 56$ ) gezüchteter Hybrid mit dem Namen *Fragaria x ananassa* (octaploid,  $2n = 8x = 56$ ). *F. chiloensis* und *F. virginiana* selbst sind sehr variabel und besitzen eine Anzahl sich ergänzender Charakterzüge. Das Wachstum der Erdbeerfrucht kann in das Wachstum der Nüsschen und des Blütenbodens differenziert werden. Die Entwicklung der Nüsschen erfolgt vor dem Anschwellen des Blütenbodens. Nach Ausreifen des Embryos steigt die Bildungsrate des Blütenbodens stark an und die Fruchtreifung wird initiiert. Die maximale Größe der Nüsschen wird vor dem eigentlichen Fruchtwachstum erreicht. Die Stadien der Entwicklung der Beere lassen sich als geschlossene Blüte (nicht gezeit), offene Blüte, klein grün, grün, weiß, rot werdend (auch: pink, unterteilt in T1 und T2) und rot/reif klassifizieren (Abb. A-3). Die Frucht erreicht das maximale Gewicht und die maximale Größe im roten, reifen Zustand (Perkins-Veazie, 1995). Ähnlich wie andere Früchte scheint auch die Erdbeerfrucht eine Art Senke für die von der Pflanze synthetisierten Verbindungen zu sein, wobei die Assimilate vornehmlich in die Frucht und nicht die Nüsschen transportiert werden. Das Hauptassimilat ist dabei die in den Blättern gebildete Saccharose (Perkins-Veazie, 1995).

Das Fruchtwachstum der Erdbeere wird primär durch Auxin (Indolessigsäure) stimuliert, wogegen Gibberelline, Cytokinine und Abscisinsäure einen geringen Einfluss auf das Fruchtwachstum haben dürften. Auxin wird in den Nüsschen gebildet und basipetal durch die Leitbündel zu den Blütenstängeln transportiert (Perkins-Veazie, 1995)



**Abb. A-3:** Verschiedene Stadien der Erdbeerfruchtentwicklung - obere Reihe: Blüte (B, von oben fotografiert, andere von der Seite), kleine grüne Frucht (sG), große grüne Frucht (G); weiße Frucht (W); untere Reihe: rot werdende (pinke) Frucht (frühes Stadium T1, spätes Stadium T2) und reife Frucht (R).

Die Fruchtreifung ist ein Prozess der zwischen Fruchtwachstum und Seneszenz steht und sich mit diesen überlappt. Reifung kann durch Pflanzenhormone wie Ethen, Gibberellin, Cytokinin, Abscisinsäure und Auxin gebremst oder beschleunigt werden. Im Allgemeinen werden klimakterische und nichtklimakterische Früchte unterschieden. Erstere zeigen im Verlauf der Fruchtreifung einen Atmungsanstieg und eine vermehrte Ethenproduktion, z. B. Banane, Apfel und Tomate. Der Ethenanstieg kann dabei vor, während oder nach dem Atmungsanstieg stattfinden. Andere Früchte zeigen einen stetigen Abfall in der Atmungsaktivität im Verlauf der Reifung, ohne Anstieg in der Ethenproduktion und werden als nichtklimakterisch klassifiziert. Beispiele hierfür sind Weintrauben und Erdbeeren. Diese Differenzierung in klimakterisch und nichtklimakterisch ist für den Handel wichtig, da hiervon der Erntezeitpunkt abhängig ist, d. h. Ernte im reifen oder unreifen Zustand. Von wissenschaftlichem Interesse sind aber vor allem Fragestellungen bezüglich Lager- und Transportstabilität in Verbindung mit einem guten Aroma der betreffenden Früchte.

Wie auch in anderen Früchten ist der Reifungsprozess der Erdbeerfrucht charakterisiert durch einen Anstieg der löslichen Verbindungen in der Frucht, der Bildung von Aroma- und Geschmacksstoffen sowie Veränderungen in Fruchtform und –größe, Textur und die Bildung von Farbstoffen.

## 1.2 Lebensmittelchemische und ernährungsphysiologische Sicht

Frische, reife Erdbeeren setzen sich aus etwa 90% Wasser und 10% anderer Bestandteile, hier vor allem Saccharose, D-Glucose und D-Fructose, zusammen. Eine grobe Zusammenstellung der Hauptbestandteile der Erdbeerfrucht, die aber je nach Sorte und Grad der Reife schwanken kann, zeigt Tab. A-1.

**Tab. A-1:** Zusammensetzung der reifen Erdbeerfrucht [jeweils pro 100 g Frischgewicht] (zusammengestellt aus Perkins-Veazie (1995); Hancock (1999); Souci und Mitarbeiter (2000))

Komponente	Gehalt
Wasser	92 g
Protein	0,6 g
Gesamtfett	0,4 g
Kohlenhydrate	7 g
Fructose	1,7 – 3,5 g
Glucose	1,4 – 3,1 g
Saccharose	0,2 – 2,5 g
Pektin	500 - 1360 mg
Mineralstoffe	
Ca	14 mg
Fe	0,4 mg
Mg	10 mg
P	19 mg
K	166 mg
Na	1 mg

Komponente	Gehalt
Zn, Cu, Mn	< 0,5 mg
Vitamine	
Vitamin C	26 - 120 mg
Andere	< 0,5 mg
Organische Säuren	
Zitronensäure	420 – 1240 mg
Äpfelsäure	90 – 680 mg
Bernsteinsäure	100 mg
Oxalsäure	24 mg
Weinsäure	17 mg
Brenztraubensäure	5 mg
Chinasäure	2 mg
Gesamtphenole	58 – 210 mg
Gesamt Anthocyane	55 – 145 mg
Pelargonidin-3-glucosid	88 % von Gesamt
Cyanidin-3-glucosid	12 % von Gesamt
Flavonoide	
Kämpferol	1,2 mg
Quercetin	860 µg

Erdbeeren sind Früchte mit einem ausgesprochen hohen Gehalt an Vitamin C bei einem Brennwert von weniger als 100 kJ/100 g. Abgesehen vom Aussehen und dem Zuckergehalt ist für den Konsumenten sicherlich das Aroma der betreffenden Erdbeersorte von größter Bedeutung.

Von den mehr als 300 beschriebenen flüchtigen Substanzen (Latrasse, 1991) werden etwa fünf bis über zehn zu den wichtigen Komponenten gezählt, die zum Aroma der Erdbeere beitragen. Das charakteristische Erdbeeraroma ist somit die Summe der Geruchseindrücke einer Anzahl flüchtiger Verbindungen. Eine ‚character impact‘ Verbindung, also eine Substanz, die alleine das Aroma von Erdbeeren determiniert, wurde nicht gefunden.

Der Beitrag einer flüchtigen Verbindung zum Aroma hängt von seiner Aromawirksamkeit (Geruchsschwelle) und der Konzentration der betreffenden Substanz ab. Aus diesen beiden Parametern kann der Aroma-Wert abgeleitet werden (Konzentration/Aromawirksamkeit) (Larsen und Poll, 1992). Definitionsgemäß tragen somit Aroma-Werte größer ein zum Aroma der Frucht bei, und das umso stärker je höher der Wert ist. Berechnungen der Aroma-Werte für 24 flüchtige Verbindungen von *F. x ananassa* cv. Senga Sengana unter Verwendung der Geruchsschwellenwerte wässriger Lösungen der einzelnen Stoffe und der Konzentrationen im Erdbeerextrakt wurden von Larsen und Poll (1992) durchgeführt. Dabei konnte Buttersäureethylester, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (**1**) und Hexansäureethylester als die Komponenten mit den höchsten Aroma-Werten bestimmt werden, gefolgt von Buttersäuremethylester, Linalool, 2-Heptanon und 2-Methylbuttersäure.

Fischer und Hammerschmidt (1992) bestimmten die Schlüsselkomponenten des Aromas von Senga Sengana Erdbeeren mittels Aromaextraktverdünnungsanalyse (AEVD). Bei der AEVD wird ein Aliquot eines Aromaextraktes gaschromatographisch aufgetrennt und der Trägergasstrom nach Verlassen der Trennsäule abgerochen (GC/Olfaktometrie). Danach wird der Aromaextrakt mit Lösungsmittel sukzessive verdünnt und jede Verdünnung gaschromatographisch/olfaktometrisch analysiert. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis kein Aromastoff mehr wahrgenommen werden kann. Auf diese Weise wird für jeden Aromastoff, der im Gaschromatogramm auftritt ein Verdünnungsfaktor (flavor dilution factor, FD) erhalten (Belitz und Grosch, 1992). Fischer und Hammerschmidt (1992) konnten so nach Vakuumdestillation 3-(*Z*)-Hexenal,  $\gamma$ -Decalacton, 2-Methylbuttersäuremethylester, **1** und 4-Methoxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (**1a**) als potenteste Aromastoffe identifizieren.

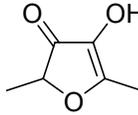
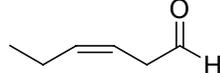
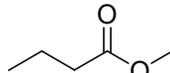
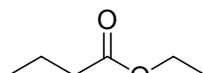
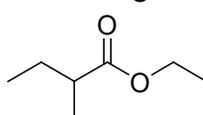
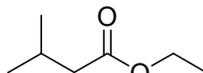
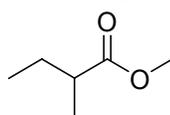
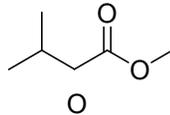
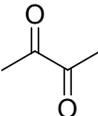
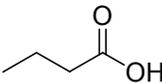
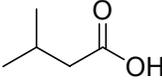
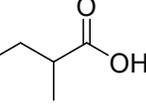
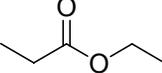
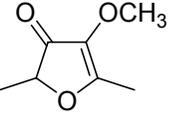
Einen ähnlichen Ansatz verwendeten Schieberle und Hofmann (1997). Sie bestimmten die FD Faktoren verschiedener flüchtiger Verbindungen eines frischen Erdbeersaftes einer unbekanntem Sorte (Tab. A-2).

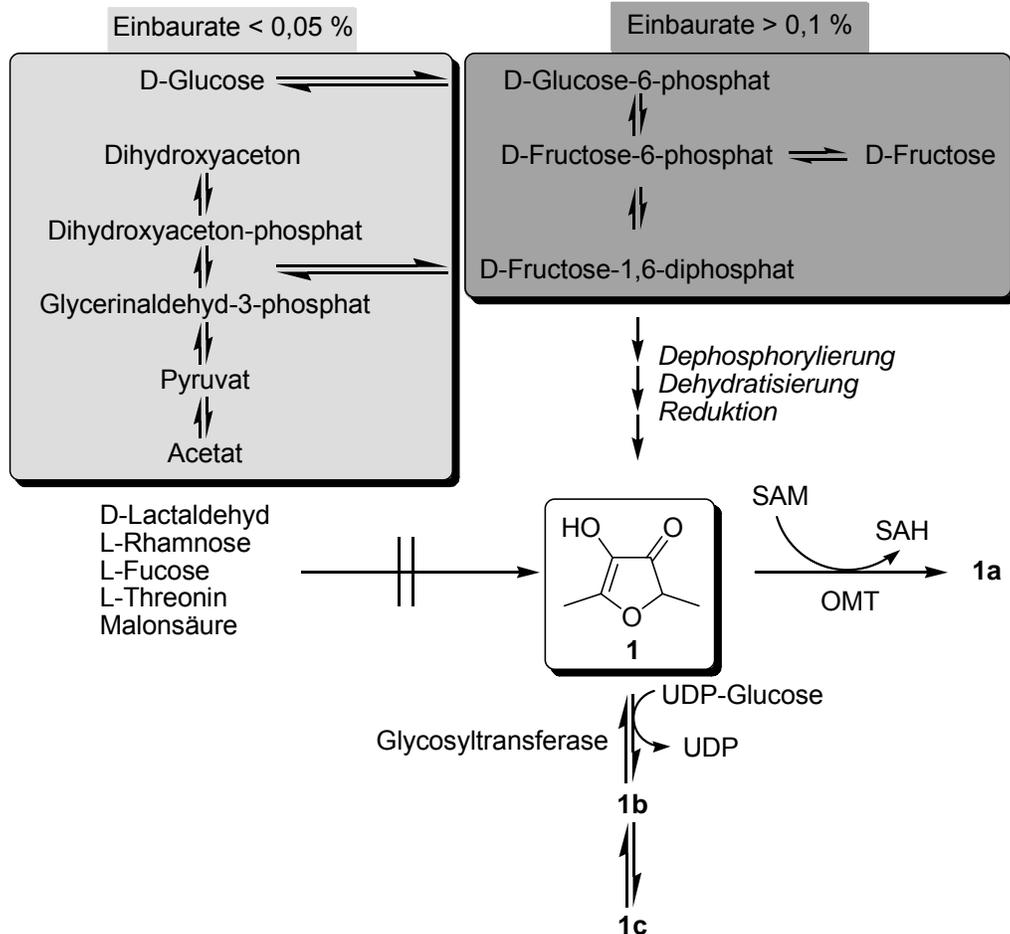
Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass neben verschiedenen Estern und Carbonylverbindungen vor allem **1** und zu einem geringeren Ausmaß auch dessen Methylderivat **1a** charakteristische Verbindungen für das Erdbeeraroma sind.

Die Untersuchung der Biosynthese dieser Verbindungen ist seit mehreren Jahren Gegenstand wissenschaftlichen Interesses. Neuere Arbeiten zeigten, dass nach der

Verstoffwechslung radioaktiv und stabil markierter C6-Zucker in Erdbeerfrüchten die markierten Kohlenstoffe in die Furanone eingebaut waren. Die besten Einbauraten erzielten die Autoren in steigender Reihenfolge mit D-Glucose, D-Glucose-6-phosphat, D-Fructose und D-Fructose-1,6-diphosphat (Roscher und Mitarbeiter, 1998; Schwab, 1998). Dabei wurden die Markierungen sowohl in **1**, als auch dessen methylierten glucosylierten Derivaten **1a** und **1b** (2,5-Dimethyl-4-O- $\beta$ -D-glucose-3(2*H*)-furanon) detektiert. Somit konnten ältere Hypothesen zur Biosynthese von **1**, die eine Bildung über eine aldolasekatalysierte Reaktion von Dihydroxyaceton-phosphat mit D-Lactaldehyd (Zabetakis und Holden, 1996; Zabetakis und Mitarbeiter, 1998), bzw. mittels einer Maillard-Reaktion aus Rhamnose, bzw. Fucose (Pisarnitskii und Mitarbeiter, 1992) widerlegt werden, da weder D-Lactaldehyd noch Rhamnose, bzw. Fucose in **1** oder deren Derivate transformiert wurden. Offensichtlich verläuft die Biosynthese von **1** ausgehend von D-Fructose-1,6-diphosphat mittels Dephosphorylierung, Dehydratisierung und Reduktion. Anschließend erfolgt die Metabolisierung von **1** zu den methylierten und glucosylierten Derivaten (Abb. A-4; Roscher und Mitarbeiter, 1998)

**Tab. A-2:** Aroma Verdünnungsfaktoren (FD) Faktoren von geruchsaktiven flüchtigen Verbindungen eines frischen Erdbeersaftes (Schieberle und Hofmann, 1997)

Verbindung	Geruchsqualität	FD-Faktor	Strukturformel
1	Karamell	4096	
(Z)-3-Hexenal	Grün	1024	
Buttersäuremethylester	Fruchtig	256	
Buttersäureethylester	Fruchtig	512	
2-Methylbuttersäureethylester	Fruchtig	128	
3-Methylbuttersäureethylester	Fruchtig	128	
2-Methylbuttersäuremethylester	Fruchtig	256	
3-Methylbuttersäuremethylester	Fruchtig	256	
Essigsäure	Sauer	1024	
2,3-Butandion	Butterig	256	
Buttersäure	Schweißig	2048	
3-Methylbuttersäure	Schweißig	256	
2-Methylbuttersäure	Schweißig	256	
2-Methylpropansäureethylester	Fruchtig	128	
1a	Karamell, Verbrannt	64	

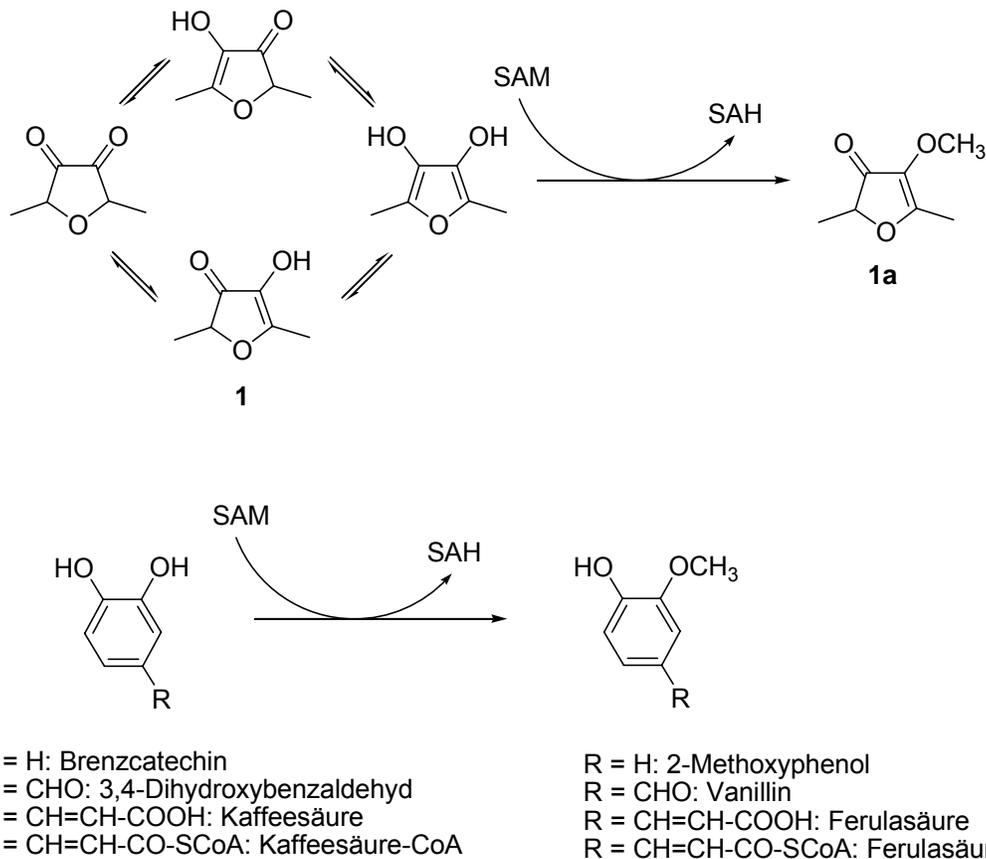


**Abb. A-4:** Postulierter Biosynthese- und Metabolismusweg von **1** und seinen natürlichen Derivaten **1a**, **1b** und **1c** (2,5-Dimethyl-4-O-(6'-O-malonyl)- $\beta$ -D-glucose-3(2H)-furanon) nach Roscher und Mitarbeiter (1998). Prozentangaben geben die Einbauraten radioaktiv markierter Vorläufer in **1** an.

Kürzlich gelang die Klonierung und heterologe Expression eines O-Methyltransferase-Gens aus reifenden Erdbeerfrüchten (Wein und Mitarbeiter, 2002). Das heterolog exprimierte Protein zeigte nicht nur enzymatische Aktivität gegenüber **1**, sondern setzte auch o-Diphenolverbindungen zu den entsprechenden O-Methylderivaten um. Die strukturelle Gemeinsamkeit der genannten Verbindungen mit **1** wird deutlich, wenn **1** in seiner tautomeren Grenzstruktur als Diendiol dargestellt wird (Abb. A-5).

Als Substrate wurden neben Brenzcatechin und 3,4-Dihydroxybenzaldehyd auch Substrate umgesetzt, die dem Ligninstoffwechsel von Pflanzen zuzuordnen sind, wie Kaffeesäure (**4**) und Kaffeesäure-CoA (**4b**). Das native Enzym konnte aus reifen

Erdbeerfrüchten isoliert und charakterisiert werden und zeigte die gleiche Substratspezifität wie das heterolog exprimierte Enzym (Lavid und Mitarbeiter, 2002a).



**Abb. A-5:** Umsetzung von 1 und o-Diphenolverbindungen zu den entsprechenden O-Methylderivaten

Abgesehen von den essentiellen Nahrungsfaktoren und dem Aroma enthalten Erdbeeren auch verschiedene Sekundärmetabolite, von denen einige als bioaktive Substanzen postuliert werden (Törrönen und Määttä, 2002). Darunter versteht man Verbindungen, die keinem direkten ernährungsphysiologischen Zweck dienen, jedoch mit einer erniedrigten Inzidenz an verschiedenen Krankheiten, wie z. B. Krebsarten und Herz-Kreislauferkrankungen, in Zusammenhang gebracht werden. Diese antinutritiven Inhaltsstoffe sind meist aus dem Sekundärstoffwechsel von Pflanzen abgeleitete chemische Substanzen, wie Anthocyane, Catechine, Flavonole, Tannine und

phenolische Säuren, z. B. Hydroxyzimtsäurederivate, Ellagsäure. Der Wirkmechanismus der phenolischen Säuren ist intensiv am Beispiel der Ellagsäure untersucht worden. Der Gehalt an Ellagsäure in Erdbeeren wird mit etwa 227 mg/kg (Radtke und Mitarbeiter, 1998) bis über 500 mg/kg angegeben (Törrönen und Määttä, 2002).

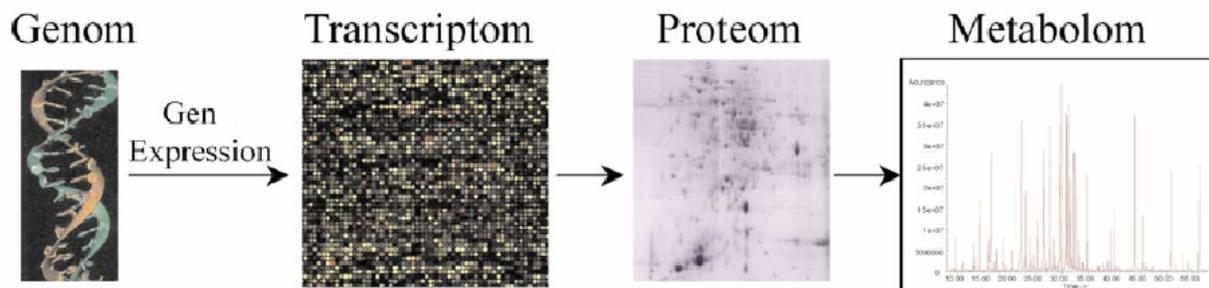
Über die Hemmung von Phase-I-Enzymen verhindern die phenolischen Säuren die Aktivierung von Prokanzerogenen. Beispielsweise vermögen Kaffee-, Chlorogen- und Gallussäure die durch Cytochrom-P<sub>450</sub>-abhängige Monooxygenasen verursachte Umwandlung von Aflatoxin B<sub>1</sub> in das aktive Kanzerogen zu verhindern. Die antikanzerogene Wirkung der phenolischen Verbindungen beruht vermutlich teilweise auch darauf, dass sie direkt mit dem aktivierten Kanzerogen in Wechselwirkung treten und eine kovalente Bindung eingehen, wodurch aus dem Kanzerogen biologisch inaktive Produkte entstehen können. Dabei treten Ferulasäure, Kaffeesäure, Chlorogensäure und Ellagsäure offenbar mit aktivierten polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in direkte Wechselwirkung und unterdrücken dadurch die Krebsentstehung. Als besonders effektiv hat sich dabei Ellagsäure erwiesen, die eine 80-300mal stärkere Hemmung der Kanzerogenese zeigte als andere phenolische Säuren (Watzl und Leitzmann, 1999). Weiterhin unterbindet Ellagsäure die Krebsentstehung in der Initiationsphase wahrscheinlich auch dadurch, dass sie die Bindung von aktivierten Kanzerogenen an die DNA verhindert. So wurde die kovalente Bindung der Ellagsäure an DNA nachgewiesen, wodurch die Bindungsstellen für die Kanzerogene maskiert waren. Daneben induzieren phenolische Säuren auch Phase-II-Enzyme. Dabei konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass Ellagsäure die Aktivität der Glutathion-S-Transferase stimuliert sowie die Neubildung des Enzymes in der Leber fördert. Auch die Aktivitäten der Chinonreduktase und der Glucuronyltransferase werden durch Ellagsäure hervorgerufen. Als weitere Eigenschaft der phenolischen Verbindungen werden oft die antioxidativen Eigenschaften genannt, wodurch sich eine Kanzerogenese hemmen lässt. So ließ sich die Tumorpromotion eines aktivierten Kanzerogens auf der Haut von Mäusen durch phenolische Verbindungen inhibieren. Fraglich ist jedoch, ob die durch den Verzehr erreichten Plasmakonzentrationen ausreichend sind, eine wesentliche antioxidative Wirkung auszuüben (Watzl und Rechkemmer, 2001; Watzl und Leitzmann, 1999; Clifford, 2000; Clifford, 1999).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Erdbeeren neben den Hauptbestandteilen Wasser, Zucker und Fruchtsäuren viele verschiedene andere Metabolite enthalten, wie z. B. Aromastoffe und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die zur Wertschätzung der Frucht nicht unerheblich beitragen.

### **1.3 Biochemische und molekularbiologische Sicht**

Während der Fruchtentwicklung und Reife sind Veränderungen physischer, physiologischer und morphologischer Art oft ein Resultat der Veränderung von Proteinkonzentrationen und Aktivitäten von Enzymen, welche ihre Ursache in Verschiebungen der mRNA-Häufigkeit haben. Die offensichtlichsten Veränderungen betreffen Fruchtform, Größe, Textur und Pigmentierung, welche einhergehen mit einem steigenden Gehalt an löslichen Verbindungen und der Produktion von Aromastoffen. In den letzten Jahren haben zahlreiche Arbeitsgruppen über die Klonierung und Charakterisierung von Genen berichtet, die mit verschiedenen Aspekten der Fruchtreifung von Erdbeeren assoziiert sind. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Identifizierung von Genen, die mit dem Zellwandmetabolismus in Zusammenhang stehen, da das Weichwerden von Früchten ein wichtiges Kriterium für die Auswahl bestimmter Sorten darstellt. Zumeist werden diese Gene vorzugsweise im Fruchtfleisch exprimiert, lediglich einige wenige konnten mit der Entwicklung der Nüsschen in Zusammenhang gebracht werden. Verschiedene Strategien wurden angewendet um reifekorrelierte Gene zu identifizieren, wie die direkte Amplifizierung von cDNA mittels Reverse Transkriptase-PCR (Kim und Chung, 1998; Llop-Tous und Mitarbeiter, 1999; Harrison und Mitarbeiter, 2001; Trainotti und Mitarbeiter, 2001), oder das Durchmustern einer cDNA Bibliothek (Harpster und Mitarbeiter, 1998). Andere Gruppen versuchten sich durch die Analyse der unterschiedlichen Genexpressionen zu verschiedenen Reifezeitpunkten ein Bild von der Bedeutung der Gene zu machen wobei die Anzahl der gleichzeitig analysierten mRNAs von 5 im Jahr 1995 bis 1 100 im Jahr 2002 anstieg (Wilkinson und Mitarbeiter, 1995; Medina-Escobar und Mitarbeiter, 1997; Manning, 1998; Nam und Mitarbeiter, 1999; Aharoni und O'Connell, 2002).

Neuere Ansätze gehen dahin, nicht nur mRNAs zu einem bestimmten Zeitpunkt zu untersuchen, bzw. Expressionsmuster von zwei Zeitpunkten zu vergleichen, sondern diese Daten mit der Proteinexpression (Proteomics) und den entstandenen Metaboliten (Metabolomics) zu korrelieren. Die daraus entstehende so genannte ‚Integrated functional genomics‘ (Abb. A-6) verspricht in Zukunft das Verständnis für besondere metabolische Zustände der Zelle zu erhöhen (Urbanczyk-Wochniak und Mitarbeiter, 2003; Sumner und Mitarbeiter, 2003; Trethewey, 2004).



**Abb. A-6:** ‚Integrated functional genomics‘ (Sumner und Mitarbeiter, 2003).

Pflanzen sind eine Quelle für unzählige Metabolite, deren Struktur, Funktion und Verwendung auch heute noch nur Ansatzweise bekannt ist. Über 100 000 Sekundärmetabolite wurden bereits identifiziert, die nach Schätzungen aber nur 10 % der tatsächlich in der Natur vorhandenen Anzahl ausmacht (Wink, 1988). Die hohe Anzahl an Sekundärverbindungen wird durch Modifizierungen einiger weniger Grundstrukturen abgeleitet, was Enzyme erfordert, die die entsprechenden Reaktionen katalysieren. Andererseits trägt z. B. das Genom von *Arabidopsis* nicht mehr als 25 500 Gene (Bevan und Mitarbeiter, 2001). Obwohl der direkte Vergleich nicht sinnvoll ist, wird doch offensichtlich, dass die Anzahl der Metabolite, die in einer bestimmten Spezies gefunden werden, die Anzahl der Gene, die an deren Biosynthese beteiligt sind, übersteigt. Das Konzept ein Gen - eine mRNA - ein Protein - ein Produkt ist deshalb nicht mehr haltbar. Es zeigt sich vielmehr, dass es viel mehr Proteine als Gene in einer Zelle gibt, was u. a. durch post-transkriptionelle Modifizierungen verursacht wird. Es existieren also verschiedene Mechanismen wonach mehrere mRNAs aus einem Gen, unterschiedliche Proteine aus einer mRNA und mannigfaltige Produkte mit einem

Protein gebildet werden können. Auf der Ebene der DNA können beispielsweise alternative Leserahmen zu verschiedenen mRNA Spezies führen. Auf mRNA Ebene kann alternatives Spleißen der prä-mRNA zu verschiedenen Proteinen führen, die aber alle auf demselben DNA Abschnitt kodiert werden. Proteine schließlich können durch post-translationale Modifikationen oder Bildung von Heterodimeren zu Enzymen führen, mit völlig anderen Eigenschaften wie das native Protein selbst. Enzyme schließlich, obwohl selektiv, akzeptieren mehrheitlich mehr als ein Substrat. So können, je nach Substratverfügbarkeit, von einem Enzym verschiedene Edukte umgesetzt werden (Schwab, 2003).

Im Allgemeinen zeigen Enzyme drei Arten von Spezifität: für das Substrat, für die Reaktion und für das Produkt. In Wirklichkeit aber sind auch Enzyme des Primärstoffwechsels nicht absolut spezifisch. Hexokinase z. B. akzeptiert D-Glucose, aber auch D-Fructose und formt die entsprechenden 6-Phosphate (Plaxton, 1996). Betreffend der Reaktionsspezifität ist zu sagen, dass Triose-Phosphat-Isomerase, das Enzym welches die reversible Isomerisierung von Dihydroxyaceton-phosphat in Glyceraldehyd-3-phosphat katalysiert, auch Methylglyoxal als Nebenreaktion im Sinne einer Elimination bilden kann (Richard, 1991). Schließlich gibt es eine Anzahl Enzyme, die neben einem Hauptprodukt, zahlreiche Nebenprodukte bilden können, wie die (+)-Bornyldiphosphatsynthase, die mindestens sieben verschiedene Produkte produziert (Wise und Mitarbeiter, 1998). Viele Enzyme zeigen die Fähigkeit mehr als ein Substrat umzusetzen, mehr als eine Reaktion zu katalysieren oder mehr als ein Produkt zu bilden. Diese Enzyme können als multifunktionell angesehen werden. Verschiedene funktionelle Rollen für multifunktionelle Proteine können entweder durch unabhängige funktionelle Domänen oder duale Aktivitäten innerhalb eines aktiven Zentrums entstehen. So zeigt das folgende Beispiel, dass geringe Spezifität des Enzymes zu mannigfaltigen Produkten führt, die durch die Substratverfügbarkeit begrenzt wird.

Mithilfe von DNA Microarrays wurde eine reifekorrelierte Alkohol Acyl-CoA Transferase aus Erdbeeren identifiziert (SAAT - strawberry alcohol acyl-CoA transferase). Studien zeigten nach Klonierung und funktioneller Expression in *E. coli*, dass SAAT die Bildung von flüchtigen Estern in Erdbeeren katalysiert (Aharoni und Mitarbeiter, 2000). Die Esterbildung in Erdbeerfrüchten ist somit das Resultat einer Transacylierung von Acyl-CoAs zu Alkoholen. Durch Vergleich der durch das Enzym gebildeten Produkte und der

tatsächlich in Erdbeerfrüchten vorhandenen Metabolite zeigte sich eine große Diskrepanz. Nur ein kleiner Teil der durch das klonierte Enzym gebildeten Ester lässt sich auch tatsächlich in der Erdbeerfrucht nachweisen. Beispielsweise zeigte das heterolog exprimierte Enzym Aktivität gegenüber den Substraten Acetyl-CoA, Pentyl-CoA und mittelkettige Alkohole, z. B. Octanol. Jedoch konnte Octylpentanoat in Erdbeeren bisher noch nicht identifiziert werden. Die beobachtete Selektivität des Enzymes liefert somit nur eine unzureichende Erklärung für das erhaltene Esterprofil. Daraus lässt sich folgern, dass die Bildung dieser Ester nicht nur von der Enzymspezifität, sondern auch von den zu Verfügung stehenden Substraten abhängt. Alles in allem ist festzustellen, dass die Vielfalt der in Pflanzen allgemein und in Erdbeeren im Besonderen gefundenen Verbindungen ein hochkomplexes Netzwerk aus Genfunktion, abgelesener Menge mRNA, Menge und Spezifität der beteiligten Proteine und Substratverfügbarkeit darstellt, dessen Komplexität durch Wachstum, Entwicklung und exogene Faktoren, z. B. Umwelteinflüsse, noch erhöht wird (Wang und Zheng, 2001).

## **2 Enzyme des Sekundärstoffwechsels**

Eine charakteristische Eigenschaft von Pflanzen ist ihre Fähigkeit eine enorme Vielfalt von niedermolekularen Substanzen, so genannte Sekundärmetabolite zu synthetisieren, welche auf den ersten Blick keine für das Überleben der Pflanze wichtige Funktion erfüllen. Unter Sekundärstoffwechsel werden daher diejenige Biosynthesewege verstanden, deren Produkte für das Überleben der Pflanzen nicht absolut notwendig sind, aber für den Organismus als Ganzes nützlich sein können, wie Blütenfarbstoffe, Duftstoffe, Festigungselemente und in ganz bestimmten, meist ausdifferenzierten Zellen vorkommen. Bei der Einteilung, ob eine Verbindung eher dem Primär- oder dem Sekundärstoffwechsel zuzuordnen ist, ist es wichtig den funktionellen Gesichtspunkt zu berücksichtigen. Beispielsweise verläuft die Bildung eines Alkaloids biochemisch gesehen sehr ähnlich der einer Aminosäure. Der Unterschied wird erst evident, wenn die Funktion der beiden Verbindungen im Stoffwechsel betrachtet wird (Richter, 1996). Unter funktionellen Gesichtspunkten ist daher die Produktion von pflanzlichen Aromastoffen dem Sekundärstoffwechsel zuzuordnen.

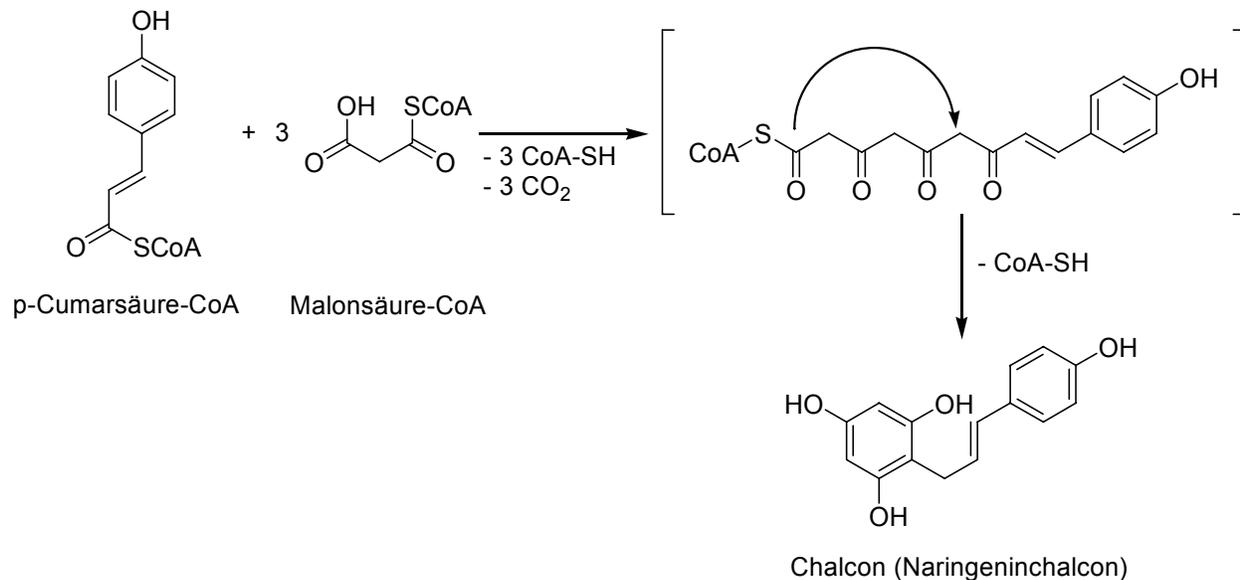
Trotz der enormen Anzahl der Sekundärmetabolite lassen sich diese aus einigen wenigen Biosynthesepfaden, wie z. B. Glykolyse, Krebszyklus oder Shikimat-Weg ableiten. Nur geringe chemische Modifikationen, wie Methylierungen, Hydroxylierungen, Glycosylierungen u. a. führen zu einem weiten Spektrum funktionell unterschiedlicher Substanzen (Wink, 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Enzyme Chalconsynthase, O-Methyltransferase und Glycosyltransferase aus dem Sekundärstoffwechsel von Erdbeeren hinsichtlich ihrer Expression und Funktion während der Fruchtreifung untersucht, weshalb diese Enzyme und ihre Stellung im Sekundärmetabolismus näher vorgestellt werden sollen.

### **2.1 Chalconsynthasen (CHS)**

Chalconsynthasen (CHS) [EC 2.3.1.74] katalysieren die Bildung von Chalconen, den Vorläufern der Flavonoide. Sie generieren aus einem Molekül p-Cumarsäure-CoA und

3 Molekülen Malonsäure-CoA ein Tetraketid, das unter Ringbildung ein Chalcon ausbildet (Abb. A-7).



**Abb. A-7:** Vorgeschlagenes Reaktionsschema für die Chalconsynthase-katalysierte Bildung von Chalcon (hier Naringenin-chalcon) aus einem Molekül p-Cumarsäure-CoA und drei Molekülen Malonsäure-CoA unter Freisetzung von je 3 Molekülen CoA-SH und CO<sub>2</sub>. Die Klammer umschließt das postulierte Intermediat Tetraketid. Das Intermediat wird anschließend zu einem neuen aromatischen Ringsystem gefaltet, wobei ein weiteres Molekül CoA-SH freigesetzt wird (Tropf und Mitarbeiter, 1995).

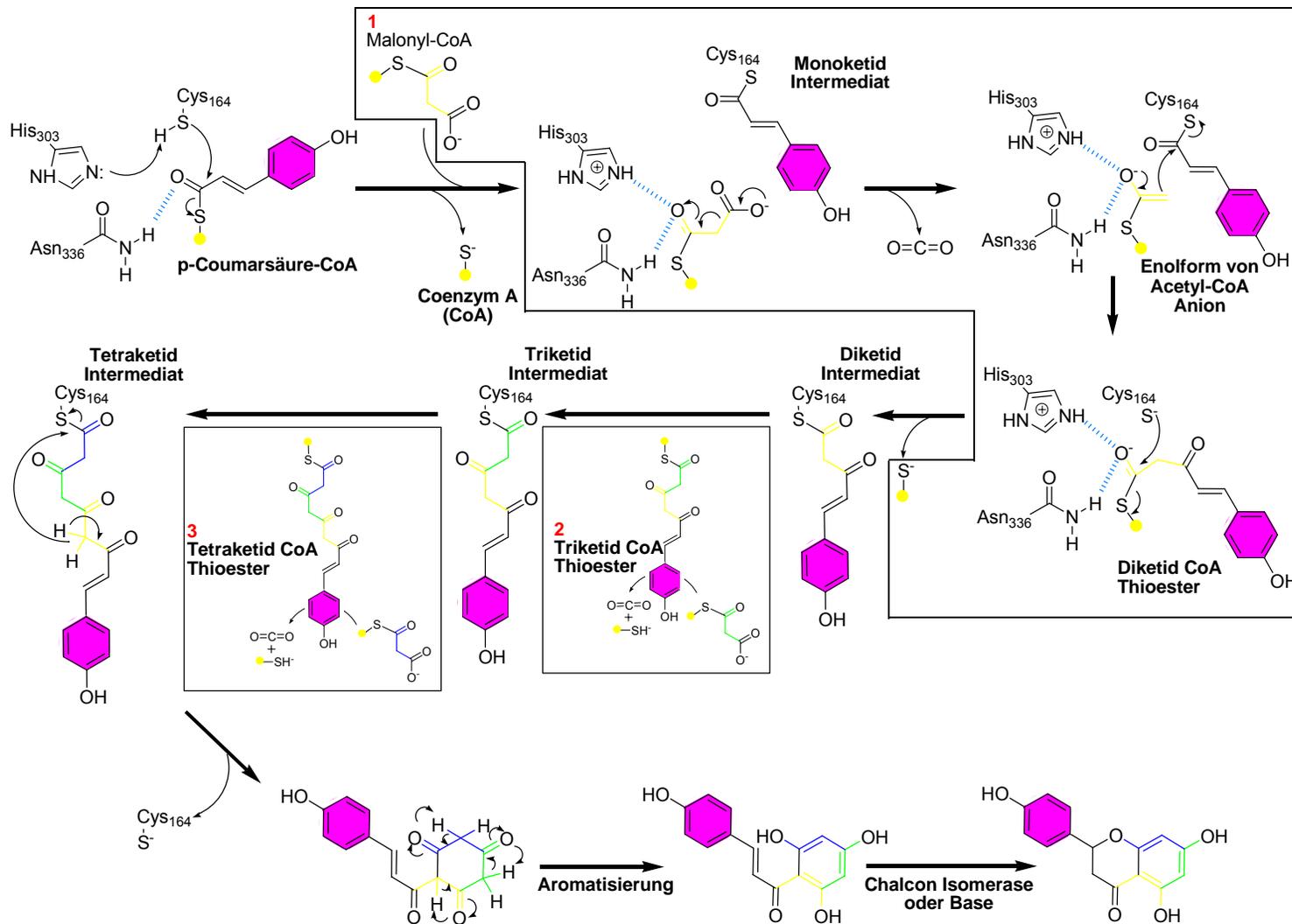
CHS gehören u. a. zusammen mit Stilbensynthase und Acridonsynthase in die Familie der Polyketidsynthasen (Tropf und Mitarbeiter, 1995). Es wird angenommen, dass die Kondensationsreaktion ähnlich der der Fettsäurebiosynthese abläuft, jedoch gibt es signifikante Unterschiede. Beispielsweise nutzen Chalconsynthasen die CoA-Ester direkt, während bei der Fettsäurebiosynthese Abkömmlinge von Acylcarrierproteinen die Substrate für die Kondensationsreaktionen bereitstellen (Schröder, 1997).

Das funktionelle Enzym ist ein Homodimer mit der Größe einer Untereinheit von 40 – 45 kDa. Chalconsynthasen tragen einen Cysteinrest (Cys) in ihrem aktiven Zentrum, der für die Katalyse essentiell ist. Der p-Cumarsäurerest wird dabei auf die SH-Gruppe des Cys übertragen. Der nun geformte Komplex reagiert mit einem enzymstabilisierten Acetyl-CoA Carbanion, das aus der Decarboxylierung von Malonsäure-CoA entstanden ist.

Das Kondensationsprodukt ist ein  $\beta$ -Keto-CoA-Ester, der zur Vereinfachung oft als Diketid bezeichnet wird. Die darauf folgenden Kondensationen folgen demselben Prinzip, nachdem der Diketid- (bzw. Triketid-) Rest auf das aktive Cys übertragen wurde. Der Reaktionsmechanismus konnte durch Kristallstrukturanalyse kürzlich aufgeklärt werden (Abb. A-8) wobei die Bedeutung weiterer Aminosäuren im Reaktionsmechanismus herausgestellt wurde (Jez und Mitarbeiter, 2000a; Jez und Mitarbeiter, 2000b; Ferrer und Mitarbeiter, 1999). Gene, die Chalconsynthasen kodieren gehören zu einer Multigenfamilie, wobei die Anzahl der Kopien zwischen den Pflanzenspezies variiert. Während bei Arabidopsis und Petersilie das *CHS*-Gen als Einzelkopie vorliegt, sind bei anderen Pflanzenspezies (Sojabohne, Kichererbse) Genfamilien mit 6 – 8 Mitgliedern ermittelt worden (Richter, 1996; Wingender und Mitarbeiter, 1989).

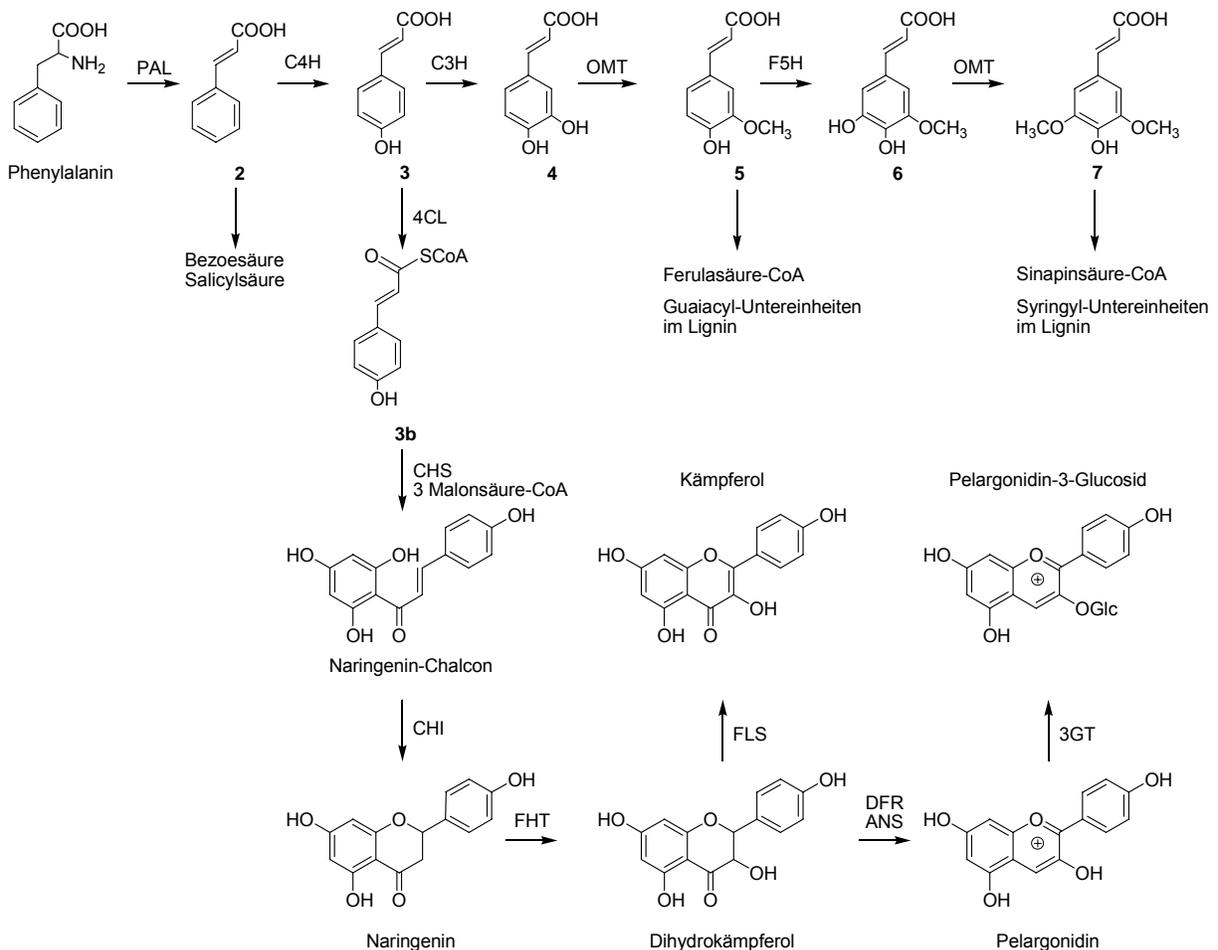
Die Expression der *CHS* Gene im Fruchtgewebe korreliert mit der Reife und Farbbildung, wie z. B. in Himbeeren (Kumar und Ellis, 2003), Apfel (Honda und Mitarbeiter, 2002) Heidelbeeren (Jaakola und Mitarbeiter, 2002), Weintrauben (Goto-Yamamoto und Mitarbeiter, 2002) und Erdbeeren (Aharoni und O'Connell, 2002; Manning, 1998) gezeigt wurde.

Das Substrat von CHS *p*-Cumarsäure-CoA wird im Phenylpropanoid Stoffwechsel gebildet, der vom Primärstoffwechsel durch das Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) abzweigt (Abb. A-9). Der Phenylpropanoid Stoffwechsel führt zu zahlreichen Verbindungen, von welchen einige auf bestimmte Pflanzenspezies beschränkt sind.



**Abb. A-8:** Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus von CHS, abgeleitet aus Kristallstrukturen von Luzernen CHS. Die drei umrahmten Regionen mit 1, 2 und 3 stellen die Addition von Acetat-Einheiten dar, welche aus Malonsäure-CoA während der Elongation der Polyketid-Intermediate abgeleitet wurden. Cyclisierung und Aromatisierung des enzymgebundenen Tetraketids führt zur Bildung von Chalcon; aus Ferrer und Mitarbeiter (1999).

Ein wichtiger Zweig der Phenylpropanoide führt zu den Flavonoiden, welche Flavonole, Anthocyane und Tannine beinhalten. Die Funktion von CHS wird dabei als regulatorischer Scheidepunkt des Substratflusses zwischen Flavonoidbiosynthese und andere Richtungen des Phenylpropanoid Pfades gesehen. Dieser führt zu vielen verschiedenen phenolischen Verbindungen, wie z. B. Lignin und Phytoalexine (Winkel-Shirley, 2001; Verhoeyen und Mitarbeiter, 2002). Phenylpropanoiden wird eine Reihe von wichtigen Funktionen in Pflanzen nachgesagt, von denen bei den Flavonoiden der UV-Schutz und die Signalwirkung auf potentielle Bestäuber belegt wurde (Winkel-Shirley, 2001).

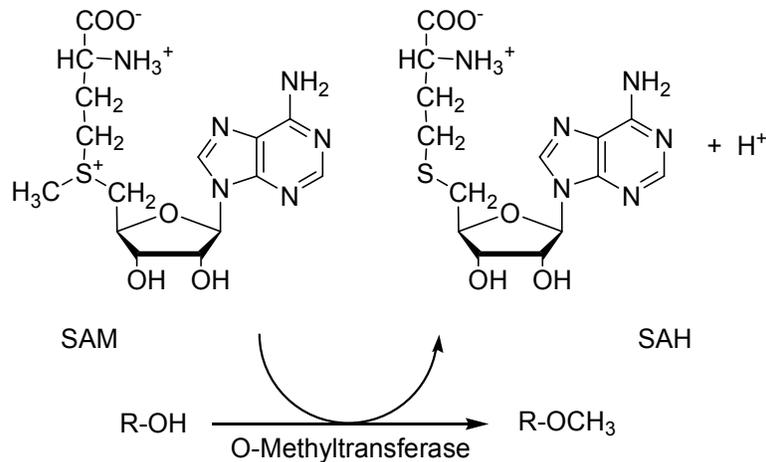


**Abb. A-9:** Ausschnitt aus dem Biosyntheseweg der Phenylpropanoide (Richter, 1996; Holton und Cornish, 1995; Wink, 1999). Die beteiligten Enzyme sind: PAL (Phenylalanin-Ammonium-Lyase), C4H (Zimtsäure-4-Hydroxylase), C3H (p-Cumarsäure-3-Hydroxylase), OMT (O-Methyltransferase), F5H (Ferulasäure-5-Hydroxylase), 4CL (p-Cumarsäure:CoA Ligase), CHS (Chalconsynthase), CHI (Chalcon-Isomerase), FHT (Flavanon 3 $\beta$ -Hydroxylase), FLS (Flavonolsynthase), DFR (Dihydroflavonol-4-Reduktase), ANS (Anthocyanidinsynthase), 3GT (Anthocyanidin-3-Glucosyltransferase).

Die Reduktion der CHS Funktion unter Zuhilfenahme der Antisensetechnologie führte zu Veränderungen in der Pigmentierung von Blüten (Deroles und Mitarbeiter, 1998; Que und Mitarbeiter, 1998). Es wurde auch eine Reduktion der Blütenöffnung und eine Veränderung in der Blütenform beobachtet (Deroles und Mitarbeiter, 1998). Transgene Gegensinn CHS Pflanzen zeigten eine abnormale Pollenentwicklung in Reis (Zheng und Mitarbeiter, 2000), erhöhte Bildung von Adventivwurzeln in transgenen Walnüssen (El Euch und Mitarbeiter, 1998) und erhöhte Tanninmengen in Glutathion-elizitierten Wurzelkulturen von *Lotus corniculatus* (Colliver und Mitarbeiter, 1997). Bisher gibt es jedoch noch keine Berichte über CHS Gegensinn Phänotypen von Früchten.

## 2.2 O-Methyltransferasen (OMT)

S-Adenosyl-L-methionin (SAM) abhängige Methyltransferasen [EC 2.1.1.N] katalysieren den Transfer einer Methylgruppe von SAM zu einem Akzeptormolekül, wodurch sich das korrespondierende methylierte Derivat bildet und S-Adenosyl-L-homocystein (SAH) freigesetzt wird (Abb. A-10). Methyltransferasen, die andere Methylendonatoren verwenden, wie z. B. verschiedene Formen von Folsäure, sind weitaus seltener (Fauman und Mitarbeiter, 1999). Die Verknüpfung der Methylgruppe kann nach der Übertragung am Kohlenstoff, meist aber an Heteroatomen, wie z. B. Stickstoff, Schwefel und Sauerstoff erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einer O-Methyltransferase (OMT), einer Transferase, die die Methylgruppe auf Sauerstoff überträgt, gearbeitet.



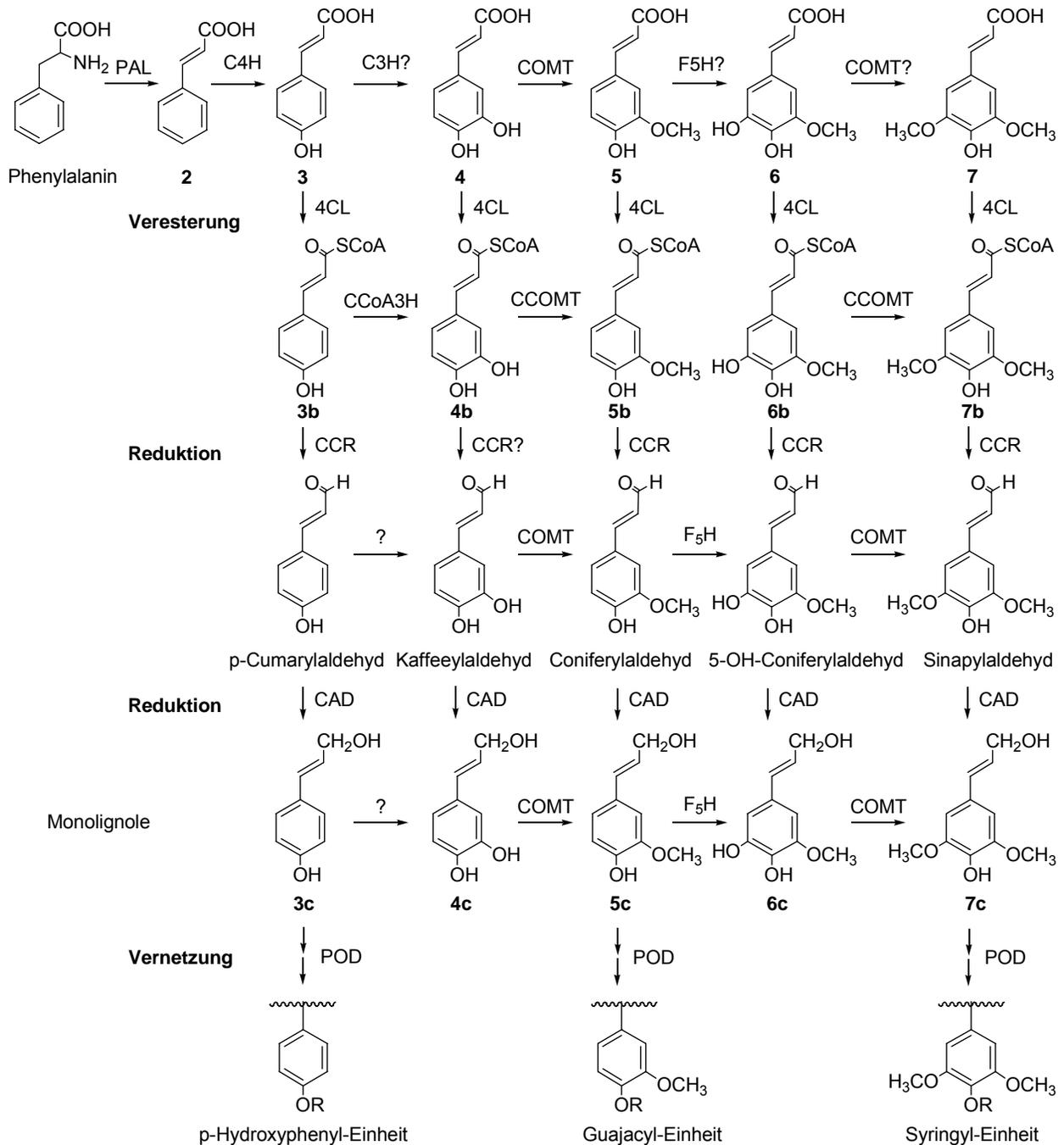
**Abb. A-10:** Reaktionsschema für O-Methyltransferasen. SAM (S-Adenosyl-L-methionin), SAH (S-Adenosyl-L-homocystein), R (organischer Rest). Ein Methylrest wird unter Ausbildung des entsprechenden O-Methylderivates und der Freisetzung von SAH von SAM auf einen Akzeptor übertragen.

Methyltransferasen spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der biologischen Aktivität aller Organismen. Allgemein inaktiviert die Methylierung pflanzlicher Metabolite die Reaktivität von Hydroxyl-, Thiol-, Amino- und/oder Carboxygruppen und ändert auf diese Weise die Löslichkeit, die Flüchtigkeit und gegebenenfalls die intrazelluläre Kompartimentierung. In Pflanzen sind Methyltransferasen bei einer Reihe von Naturstoff-Biosynthesewegen beteiligt. Diese schließen Phenylpropanoide, Lignin, Flavonoide, Alkaloide und Phytoalexine ein. Im Säugerorganismus andererseits spielen Methyltransferasen eine wichtige Rolle bei der Regulation der biologischen Aktivität von cholinergen und adrenergen Neurotransmittern, aber auch bei der Biosynthese von verschiedenen anderen Komponenten, wie z. B. Phosphatidylcholin, verschiedenen Chinonen, biogenen Aminen und Steroiden. Methyltransferasen sind auch beteiligt bei der Biosynthese einer Reihe von Polyketiden, wie Aflatoxinen und Antibiotika, welche von Bakterien und Pilzen produziert werden. Weiterhin ist die Methylierung von Kohlenhydraten bei Bakterien gut dokumentiert. Sie führt zur ubiquitären Akkumulation einer Anzahl methylierter Zucker, wie 2-Methylfucose, 2,4- und 3,4-Dimethylrhamnose, welche zur Stabilität der Mucosidfraktion bei verschiedenen Bakterien beitragen (Ibrahim und Muzac, 2000).

Nach einem Vorschlag von Ibrahim und Mitarbeiter (1998) sind die pflanzlichen OMTs hinsichtlich ihrer Substratspezifität in vier verschiedene Klassen einzuteilen. Klasse A

repräsentiert dabei die OMTs, die an der Methylierung von Phenylpropanoiden beteiligt sind, wie z. B. Kaffeesäure, 5-Hydroxyferulasäure und deren Abkömmlinge. OMTs, die die Methylierung von Flavonoiden katalysieren werden Gruppe B zugeordnet. In Gruppe C gehören die Enzyme, die Alkaloide und in Gruppe D die, die aliphatische Methylakzeptoren, wie z. B. Inositol umsetzen.

Bei den pflanzlichen OMTs nehmen die der Klasse A eine führende Stellung ein, da sie einerseits am Besten charakterisiert sind und andererseits bei der Biosynthese des Verholzungstoffes Lignin eine wichtige Rolle spielen. Lignin ist ein pflanzliches Biopolymer, das aus den Zimtsäure-Derivaten p-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol, den so genannten Monolignolen biosynthetisiert wird. Es bildet komplexe dreidimensionale Gerüste, deren native Struktur noch nicht beschrieben werden kann (Richter, 1996). Die Aufgabe der Methyltransferasen besteht darin, die unterschiedlichen hydroxylierten Zimtsäurederivate zu methylieren und damit verschiedene Untereinheiten des Lignins zu generieren (Abb. A-11). Die Biosynthese der Monolignole beginnt mit der Deaminierung von Phenylalanin, gefolgt von sukzessiven Hydroxylierungsreaktionen und ist damit in den ersten Schritten analog der Biosynthese der Flavonoide. Zunächst wurde angenommen, dass die Hydroxylierungen und Methylierungen auf der Stufe der Zimtsäure stattfinden, und dass p-Cumar-, Ferula- und Sinapinsäure in die entsprechenden Alkohole durch die Abfolge 4-Cumarsäure:CoA Ligase (4-CL), Reduktase und Dehydrogenase umgewandelt werden. Neuere Studien zeigen jedoch, dass vornehmlich die entsprechenden Intermediate in die hydroxylierten und methylierten Derivate transformiert werden (Humphreys und Chapple, 2002; Boerjan und Mitarbeiter, 2003). So weisen zum Teil die entsprechenden Enzyme gegenüber den Intermediaten höhere Affinitäten als zu den entsprechenden Säuren auf. Daher musste der lange für richtig geglaubte Biosynthesepfad neu gezeichnet werden.

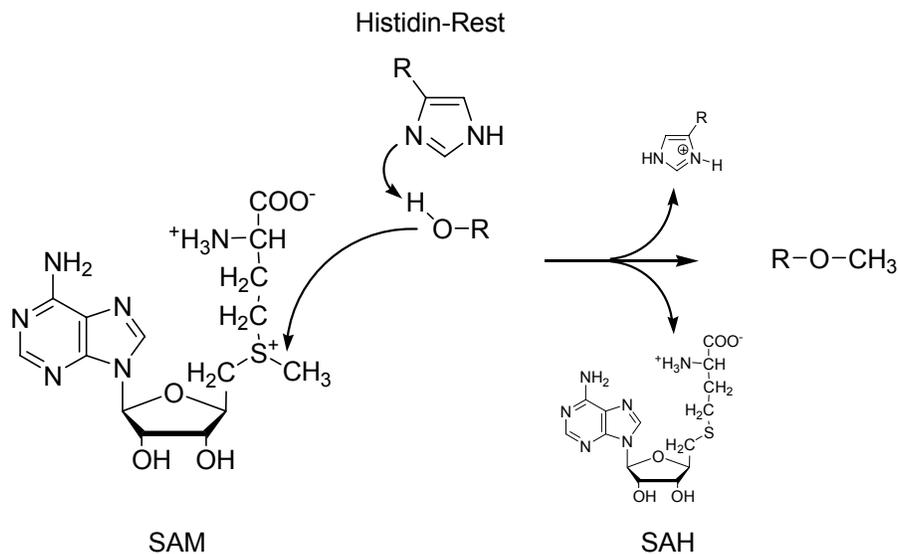


**Abb. A-11:** Schema der Ligninbiosynthese (Dixon und Mitarbeiter, 2001). PAL (Phenylalanin-Ammonium-Lyase), C4H (Zimtsäure-4-hydroxylase), C3H (p-Cumarsäure-3-hydroxylase), COMT (Kaffeesäure-O-Methyltransferase), CCOMT (Kaffeesäure-CoA-O-Methyltransferase), CCoA3H (p-Cumarsäure-CoA-3-Hydroxylase), F5H (Ferulasäure-5-hydroxylase), 4CL (p-Cumarsäure:CoA-Ligase), CCR (Zimtsäure-CoA-Reduktase), CAD (Zimtalkoholdehydrogenase), POD (Peroxidase).

Abgesehen von den O-Methyltransferasen, die an der Biosynthese der Ligninmonomere beteiligt sind, existieren noch weitere, die Funktionen im Sekundärstoffwechsel von Pflanzen übernehmen. So konnten Gang und Mitarbeiter (2002) zwei cDNA Sequenzen in *E. coli* funktionell exprimieren, die für die Methylierung von Chavicol (CVOMT1) bzw. Chavicol und Eugenol (EOMT1) zuständig sind. Durch ortsgerichtete Mutagenese („site-directed mutagenesis“) konnten die Autoren eine einzige Aminosäure ausmachen, die für die unterschiedliche Substratspezifität verantwortlich ist. Zwei weitere OMTs, die an der Produktion flüchtiger Verbindungen beteiligt sind, konnten aus Rosenblättern (*Rosa hybrida*) kloniert werden (Lavid und Mitarbeiter, 2002b). Dabei zeigten die beiden Orcinol-O-Methyltransferasen (OOMT1 und OOMT2) unterschiedliche katalytische Aktivitäten gegenüber der unmethylierten m-Diphenolverbindung Orcinol (3,5-Dihydroxytoluol) und dessen Monomethoxyderivat (Orcinolmonomethylether). Während OOMT1 eine zweifach höhere Aktivität gegenüber Orcinol als OOMT2 zeigte, konnte OOMT2 das monomethylierte Derivat mit 5-fach höherer Effektivität umsetzen als OOMT1. Auf Proteinebene zeigten beide eine Ähnlichkeit von 96 %. Auch aus reifen Erdbeerfrüchten konnte ein OMT-Gen kloniert werden. Das heterolog exprimierte Protein zeigte enzymatische Aktivität gegenüber o-Diphenolverbindungen und **1** (Wein und Mitarbeiter, 2002). Das aus Erdbeerfrüchten aufgereinigte Enzym wies dieselbe Substratspezifität wie das rekombinante Enzym auf (Lavid und Mitarbeiter, 2002a).

Nachdem die ersten pflanzliche OMTs kloniert worden waren (Schmitt und Mitarbeiter, 1991; Bugos und Mitarbeiter, 1991) nahm die Zahl der veröffentlichten Methyltransferase-Sequenzen kontinuierlich zu, da aufgrund von Sequenzvergleichen konservierte Regionen gefunden werden konnten. Die beträchtliche Diversität der akzeptierten Substrate erklärt die geringe Ähnlichkeit zwischen den verschiedenen O-, N-, S- und C-Methyltransferasen (Fauman und Mitarbeiter, 1999). Einzig das gemeinsame Co-Substrat SAM lässt auf strukturelle Übereinstimmungen schließen. So konnten Joshi und Chiang (1998) aus 56 verschiedenen pflanzlichen SAM-abhängigen Methyltransferasen drei konservierte Regionen ermitteln, die vermutlich als SAM-bindende Domänen anzusehen sind. Neue Einsicht in den katalytischen Mechanismus brachte kürzlich die Veröffentlichung über die Röntgenstrukturanalyse von pflanzlichen OMTs (Zubieta und Mitarbeiter, 2002; Zubieta und Mitarbeiter, 2001). Dabei wird die Hydroxylgruppe des Substrates von einem Histidinrest (His) im aktiven Zentrum des

Enzyms als Base deprotoniert, wodurch der Transfer der reaktiven Methylgruppe von SAM auf das neugeformte Phenolat-Anion ermöglicht wird (Abb. A-12). Mutationen des His zu Leucin, Asparagin oder Glutamin führten zu einem Verlust der katalytischen Aktivität, was die essentielle Rolle des His für die Aktivität untermauert.



**Abb. A-12:** Schema des Mechanismus von O-Methyltransferasen (OMT). Der Histidinrest im aktiven Zentrum der OMT deprotoniert die Hydroxylgruppe des Substrates. Dadurch wird der Angriff des Phenolat-Anions auf die aktivierte Methylgruppe von SAM (S-Adenosyl-L-methionin) ermöglicht und SAH (S-Adenosyl-L-homocystein) freigesetzt.

Einsicht in die Funktion der Methyltransferasen kann durch Herstellung und Analyse transgener Pflanzen erhalten werden, die eine reduzierte Menge an den Transkripten der Transferasen produzieren. Das Einbringen eines Konstruktes mit einer *OMT* Sequenz in Sinn bzw. Gegensinn Richtung veränderte in Tabak die Ligninzusammensetzung (Atanassova und Mitarbeiter, 1995). In Stängeln mit herabregulierter *OMT* Transkriptmenge konnte eine merkliche Abnahme von Syringyleinheiten und das Auftauchen von 5-Hydroxyguajacyleinheiten demonstriert werden. Transgene Pappeln (*Populus tremula* x *Populus alba*) mit herabregulierter Kaffeesäure *OMT*-Aktivität, wurden durch Gen Co-Suppression erhalten. In den 6

Monate alten transgenen Bäumen war der Ligningehalt um 17 % reduziert. Auch hier veränderte sich die Ligninzusammensetzung, hin zu einem nahezu kompletten Verlust der Syringyleinheiten und einem merklichen Einbau von 5-Hydroxyguajacyleinheiten (Jouanin und Mitarbeiter, 2000). Eine *Arabidopsis* Mutante, deren Kaffeesäure O-Methyltransferasegen vollständig ausgeschaltet war, zeigte neben den erwähnten Veränderungen in der Ligninzusammensetzung, erhöhte Gehalte an löslichen phenolischen Verbindungen, wie z. B. Sinapoylmalat, 5-Hydroxyferuloylmalat und 5-Hydroxyferulasäure-D-glucoseester (**6a**) (Goujon und Mitarbeiter, 2003).

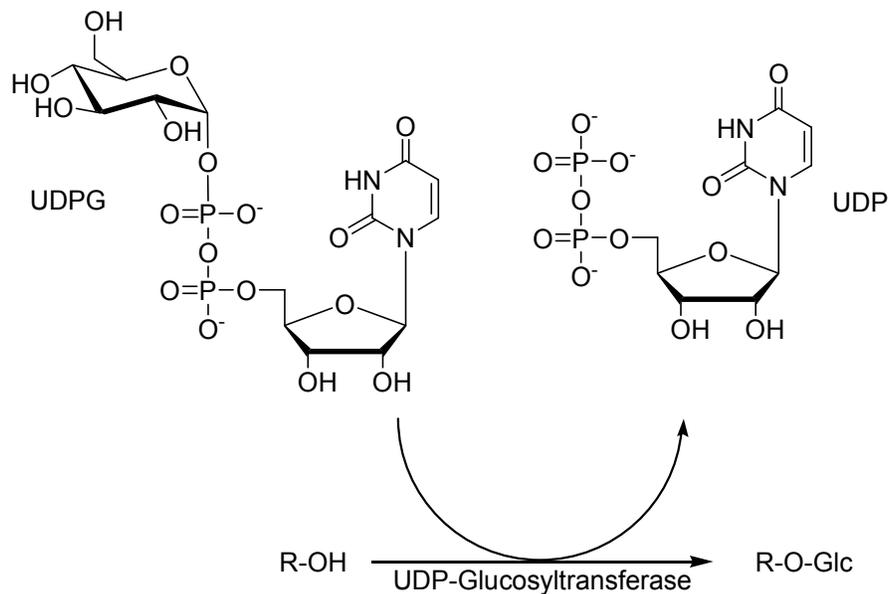
Entsprechende Berichte über eine veränderte OMT-Expression in Erdbeeren gibt es jedoch noch nicht.

### 2.3 Glycosyltransferasen (GT)

Die große Mehrzahl der zuckerübertragenden Enzyme benötigt aktivierte Kohlenhydratmoleküle als Cosubstrate, wobei die Aktivierung mittels Phosphat, Lipidphosphat oder Nucleotidphosphat erfolgen kann (Charnock und Mitarbeiter, 2001). Die NDP(Nucleotiddiphosphat)-Glycosyltransferasen [EC 2.4.N.N'] (NDP-GT) repräsentieren dabei eine Familie von Enzymen, die die Übertragung eines Zuckerrestes, aktiviert als Nucleotidphosphat, auf ein anderes Molekül (Aglykon) katalysieren. Der Nucleotidzucker ist sehr häufig Uridindiphosphat Glucuronsäure (UDP-GlcA), Galactose (UDP-Gal), Glucose (UDP-Glc, UDPG) oder Xylose (UDP-Xyl). Das Akzeptormolekül kann ein Protein (Glycoprotein), ein Lipid (Glycolipid) oder ein Zucker (Oligo-, Polysaccharid) sein (Paulson und Colley, 1989). Es werden jedoch auch kleine, hydrophobe Moleküle glycosyliert (Abb. A-13).

Die am besten charakterisierten Enzyme der Uridinphosphat-Glycosyltransferase Familie sind die UDP-Glucuronosyltransferasen (EC 2.4.1.17) der Säugerzellen, welche einen Glucuronsäurerest auf ein kleines, hydrophobes Molekül übertragen. Sie sind im Endoplasmatischen Retikulum gebundene Enzyme, die die Glucuronidierung von zahllosen endogenen Substraten katalysieren, einschließlich Bilirubin, Gallensäuren, Steroiden, Thyroxin, biogenen Aminen und fettlöslichen Vitaminen. Zusätzlich fungieren

sie als Phase II-Enzyme bei der Konjugation von Fremdstoffen, einschließlich hydroxylierter polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe, Heterocyclen, Karzinogenen, Pflanzenmetaboliten und vielen Medikamenten mit Glucuronsäure. Sie sind in der Membran mittels eines C-terminalen ‚Halt‘-Signals verankert (Mackenzie und Mitarbeiter, 1997).



**Abb. A-13:** Allgemeines Schema der Übertragung eines Zuckerrestes (hier: D-Glucose) auf ein Aglykon mittels UDP-Glucosyltransferase. R (beliebiger organischer Rest), UDPG (Uridindiphosphat-D-Glucose), UDP (Uridindiphosphat).

Bei Pflanzen ist die Glycosylierung eine der häufigsten finalen Reaktionen bei der Biosynthese von Sekundärmetaboliten. Glycoside aller großer Gruppen von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, z. B. Phenylpropanoide, Terpene, Alkaloide, Glucosinolate, cyanogene Glucoside und Steroide konnten identifiziert werden (Vogt, 2000). Dabei werden durch die Glycosylierung reaktive und für die Pflanze potentiell toxische Aglykone in stabile und wenig-reaktive Speicherformen umgewandelt, wodurch ihre Interaktion mit anderen zellulären Komponenten limitiert wird. Im Allgemeinen reduziert die kovalente Verknüpfung von Zuckerresten an nucleophile Moleküle die Wahrscheinlichkeit eines Elektronentransfers des unglycosylierten Moleküls zu anderen Zellbestandteilen, vermindert dadurch deren Reaktivität und erhöht die Stabilität der

Moleküle. Die Addition eines Zuckerrestes an ein hydrophobes Molekül erhöht zudem die Wasserlöslichkeit des Gesamtmoleküls. Daher sind die hauptsächlichen Effekte, die ein Molekül durch Glycosylierung erfährt: Stabilisierung, Detoxifizierung (reduzierte Reaktivität) und Erhöhung der Wasserlöslichkeit (Jones und Vogt, 2001).

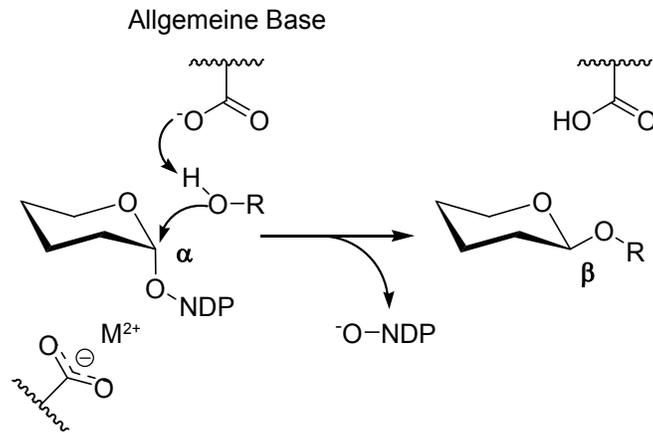
Glycosyltransferasen, die im pflanzlichen Sekundärmetabolismus eine Rolle spielen sind, von einigen Ausnahmen abgesehen, lösliche Enzyme mit einer Molekularmasse von 45 bis 60 kDa unter *in vitro* Bedingungen (Vogt und Jones, 2000) und einem neutralen bis leicht basischen pH-Optimum (Vogt, 2000). Mit der Verfügbarkeit einiger Glycosyltransferasen aus Maniok (*Manihot esculenta*) und nach Vergleich mit GTs weiterer Pflanzen, die vornehmlich in der Flavonoidbiosynthese beteiligt sind, postulierten Hughes und Hughes (1994) die Existenz einer PSPG-Box (**P**lant **S**ecundary **P**roduct **G**lycosyltransferases), deren Konsensussequenz typisch für GTs ist, die im Sekundärmetabolismus eine Rolle spielen. Die PSPG-Box ist ähnlich zu einer bereits früher publizierten Sequenz, die aber auch Säugerzellen-GT und virale Glycosyltransferasen beinhaltet (Bairoch, 1991). Die PSPG-Box besteht aus einem kurzen Abschnitt von etwa 40 Aminosäuren in der Nähe des C-Terminus (Abb. A-14). Mit einer generellen Sequenzähnlichkeit von 60 – 80% ist die Box sehr charakteristisch und repräsentiert GTs, die in der Produktion von Naturprodukten beteiligt sind. Die Box besitzt N-terminal ein hochkonserviertes „WXPQ“ Motiv. Die Aminosäuresequenz im Zentrum der Box „HCGWNS“ ist in 95% aller Glucosyltransferasen des pflanzlichen Sekundärmetabolismus vorhanden. Zusätzlich stellt die Box auch das aktive Zentrum für die Bindung des Nucleotiddiphosphat-Zuckers dar (Vogt, 2000). Das Glutamin am C-terminalen Ende scheint für Glucosyltransferasen spezifisch zu sein, da durch ortsgerechte Mutagenese der Ersatz des Glutamins durch Histidin zu einem erheblichen Verlust der Glucosyltransferase-Aktivität führt (Kubo und Mitarbeiter, 2004).

V
V  
 N-Terminus → WAPQVEVLAHPAVGCFVTHCGWNSTLESISAGVPMVAWPFFADQ → C-Terminus

**Abb. A-14:** PSPG-Box Konsensussequenz der Glycosyltransferasen des pflanzlichen Sekundärmetabolismus. Konservierte Aminosäuren sind einfach (Identität > 50%) oder doppelt (Identität > 80%) unterstrichen. Die N-terminal „WXPQ“ und zentral „HCGWNS“ hochkonservierten Aminosäuren sind jeweils fettgedruckt (Vogt und Jones, 2000)

Zwei große Klassen von Glycosyltransferasen werden unterschieden: Glycosyltransferasen, bei denen die Konfiguration am anomeren C-Atom des Zuckers nach Konjugation mit dem Aglycon erhalten bleibt (Retention), und invertierende Glycosyltransferasen, bei denen sich durch den Transfer die Konfiguration an C1 des Zuckers umdreht. Eine konservierte Domäne der invertierenden Glycosyltransferasen ist verantwortlich für die Erkennung des Pyrimidin Nukleotids, der Bestandteil des UDP Anteils des Donor Zucker-Nukleotids ist. Diese Domäne wird NRD1 $\beta$  (Nucleotide Recognition Domain 1 $\beta$ ) genannt, da die Art des Nukleotids die einzige gemeinsame Struktur ist. NRD1 $\alpha$  bezeichnet die GTs mit Retention am anomeren C-Atom des Zuckers und NRD2 enthält eine konservierte Domäne von membrangebundenen Glycosyltransferasen. Die NRD1 $\beta$  Glycosyltransferasen können basierend auf dem Grad ihrer Sequenzähnlichkeit wiederum in fünf Klassen eingeteilt werden. Pflanzliche Glycosyltransferasen bilden dabei Klasse IV und benutzen  $\alpha$ -verknüpfte UDP-Zucker um die entsprechenden  $\beta$ -glykosidischen Produkte zu bilden (Kapitonov und Yu, 1999; Charnock und Mitarbeiter, 2001).

Der Mechanismus der Katalyse konnte für einige bakterielle GTs und Säuger-GTs mittels Kristallstrukturanalyse ermittelt werden (Unligil und Rini, 2000). Für pflanzliche GTs existieren einige Modelle, nach denen eine allgemeine Base ein Proton des entsprechenden Aglykons abstrahiert, und der entstehende Alkoholat-Rest auf den Zucker übertragen wird, unter Umkehrung der Konfiguration am anomeren C-Atom ähnlich eines S<sub>N</sub>2-Mechanismus (Abb. A-15; Davies und Mitarbeiter, 2001). Das zweiwertige Metallkation scheint nicht essentiell für die katalytische Aktivität zu sein, obwohl geringe Konzentrationen an Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> die Aktivität einiger partiell aufgereinigter Glycosyltransferasen erhöhen konnten (Cheng und Mitarbeiter, 1994; Stich und Mitarbeiter, 1997). Kristallstrukturen von pflanzlichen Glycosyltransferasen wurden bislang noch nicht aufgeklärt.



**Abb. A-15:** Vorgeschlagerener Mechanismus der invertierenden Glycosyltransferasen (Davies und Mitarbeiter, 2001)

Nach einem von Mackenzie und Mitarbeiter (1997) entwickelten Nomenklatorsystem für UDP-Glycosyltransferasen, das auf divergenter Evolution basiert, sollen Enzyme, die die charakteristische ‚Signatur Sequenz‘ tragen, auf folgende Art benannt werden: für die Benennung jedes Genes wird empfohlen das Symbol ‚*UGT*‘ (*Ugt* für Maus und *Drosophila*) für UDP Glycosyltransferase zu verwenden, gefolgt von einer arabischen Zahl, die die Familie repräsentiert, einen Buchstaben, der die Subfamilie bezeichnet und wieder einer arabischen Zahl, die das einzelne Gen benennt. Beispielsweise erhält so die Anthocyanidine und Flavonole umsetzende Glycosyltransferase mit der GenBank<sup>®</sup> Accession Number D85186 aus *Gentiana triflora* die Bezeichnung ‚*UGT78B1*‘.

Ein davon unabhängiges Klassifizierungssystem benutzt Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz der GTs und bezieht alle NDP-Zucker Hexosyltransferasen ein (Coutinho und Mitarbeiter, 2003; Campbell und Mitarbeiter, 1997). Die Einteilung erfolgt hier nach Faltung, Superfamilie (Klan), Familie und Subfamilie. Aus den bisher publizierten 3-D Strukturen von GTs wurden zwei verschiedene Topologien in Faltung GT-A und GT-B unterteilt.

Innerhalb der Superfamilie wird hier nach invertierenden und retentierenden Glycosyltransferasen unterschieden, wonach die Einteilung in Familien (bezeichnet mit GT1 bis GT65) erfolgt. In den Subfamilien schließlich werden einzelne Enzyme zugeordnet. Alle der im pflanzlichen Sekundärmetabolismus beteiligten und von den Autoren eingeordneten Glycosyltransferasen werden in diesem System der Familie GT1

zugeordnet, also der Faltung GT-B und dem Klan der invertierenden Glycosyltransferasen. Für die bearbeiteten Glycosyltransferasen aus *Fragaria x ananassa* wird das System von Mackenzie und Mitarbeiter (1987) verwendet. Von den Glycosyltransferasen des pflanzlichen Sekundärmetabolismus sind diejenigen, die an der Biosynthese der Flavonoide beteiligt sind, am besten charakterisiert. Als Beispiel seien hier zwei Flavonoid Glucosyltransferasen aus *Petunia hybrida* angeführt (Yamazaki und Mitarbeiter, 2002). Die cDNAs, die für eine 3-O-Glucosyltransferase (3-GT) und eine 5-O-Glucosyltransferase (5-GT) kodieren wurden aus *P. hybrida* isoliert und die rekombinanten Proteine in Hefe exprimiert. Die 3-GT kann nicht nur Anthocyanidine, sondern auch Flavonole in die entsprechenden 3-O-Glucoside umwandeln, während die 5-GT eine strikte Substratspezifität für Anthocyanidin-3-acylrutinoside zeigt. Die mRNA Gehalte für beide GTs steigen während der frühen Entwicklung der Blüte an und erreichen ein Maximum kurz vor Öffnung der Blüten.

Auch eine *Vitis vinifera* UDP-Glucose:Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase (UFGT) katalysiert sowohl die Bildung von Flavonol 3-O-Glucosiden als auch von Anthocyanidin 3-O-Glucosiden, wobei Cyanidin mit der 48-fachen Geschwindigkeit umgesetzt wird wie Quercetin (Ford und Mitarbeiter, 1998). Teile der cDNA wurden benutzt um die entwicklungsabhängige Expression der UFGT zu verfolgen (Boss und Mitarbeiter, 1996). Dabei zeigte UFGT ein reifekorreliertes, aber von den anderen Transkripten des Anthocyan-Pfades, wie PAL, CHS, CHI, F3H und DFR, unabhängiges Bild. Die Transkripte von UFGT waren nur in der Beerenhaut nachweisbar und wurden erst ca. 10 Wochen nach der Blüte detektiert, während Transkripte der anderen beteiligten Enzyme bereits im Blütenstadium gefunden wurden.

Eine Arbutin Synthase aus *Rauvolfia serpentina* zeigte enzymatische Aktivität gegenüber 45 natürlichen Substraten und Xenobiotika (Hefner und Mitarbeiter, 2002). Damit ist das Enzym, das zur Klasse der NRD1 $\beta$  Glycosyltransferasen zählt, in der Lage nicht nur endogene Substrate zu glucosylieren, sondern auch vorhandene Fremdstoffe. Die Transferase zeigt damit die breiteste Substratakzeptanz aller bisher bekannten GTs. Durch die Glycosylierung von Alkoholen entstehen O-Glycoside, chemisch gesehen Vollacetale. Es ist aber auch von Glycosyltransferasen berichtet worden, die Carboxygruppen glucosylieren. So katalysiert eine UDP-Glucose:Sinapinsäure Glucosyltransferase die Glucosylierung von Sinapinsäure an der Carboxygruppe

(Milkowski und Mitarbeiter, 2000). Solche Glucose-Ester werden aufgrund des hohen Gruppenübertragungspotentials als Zwischenstufen bei der Biosynthese weiterer Sekundärmetabolite gesehen (Mock und Strack, 1993). So ist der Zimtsäure- $\beta$ -D-glucoseester (**2b**, 1-O-*trans*-Zimtsäure- $\beta$ -D-glucopyranose) als Substrat für eine 1-O-*trans*-Zimtsäure- $\beta$ -D-glucopyranose:Alkohol Zimtsäuretransferase in der Kapstachelbeere (*Physalis peruviana*) nachgewiesen worden (Latzka und Berger, 1997). Dieses Enzym bildet aus **2b** den entsprechen Methyl-, Ethyl- und 1-Propylester der Zimtsäure. Diese wurden auch bereits in Erdbeeren detektiert (Silva und Neves, 1999; Schreier, 1980). Ein entsprechendes Enzym jedoch, das die Bildung von **2a** bzw. **2b** aus Zimtsäure und UDP-Glucose katalysiert wurde bis dato in Erdbeeren noch nicht gefunden. Weiterhin kann Sinapinsäure- $\beta$ -D-glucoseester als Substrat für die Bildung von Sinapinsäurecholin und Sinapinsäuremalat dienen (Milkowski und Mitarbeiter, 2004), welche als UV-Schutz-Sustanzen in Arabidopsis nachgewiesen wurden (Booij-James und Mitarbeiter, 2000).

Kürzlich ist die Konsensussequenz für Glycosyltransferasen benutzt worden, um eine genomische Datenbank von *Arabidopsis thaliana* zu durchmustern und die Anzahl der vermuteten Glycosyltransferasen in einer einzelnen Pflanzenspezies festzustellen (Li und Mitarbeiter, 2001). Eine Multigenfamilie mit 107 Sequenzen wurde entdeckt. Neunzig dieser Sequenzen wurden als rekombinante Proteine in *E. coli* exprimiert, um ihre *in vitro* Aktivität festzustellen. Unter Verwendung von Benzoesäure und ihrer verschiedenen Derivate wurden 14 Enzyme identifiziert, die katalytische Aktivität gegenüber einem oder mehreren Substraten aufwiesen (Lim und Mitarbeiter, 2002). Weiterhin wurden Enzyme charakterisiert, die (Hydroxy)Zimtsäuren sowohl an der Hydroxy-, als auch der Carboxygruppe glucosylierten (Lim und Mitarbeiter, 2001), als auch solche die Indolessigsäure (Jackson und Mitarbeiter, 2001) an der Carboxygruppe und Kaffeesäure an der 3-Hydroxygruppe derivatisierten (Lim und Mitarbeiter, 2003).

Durch Herabregulierung der Menge und Aktivität der Glycosyltransferasen ist es möglich Einsicht in die Funktion der Genprodukte zu erlangen. In Petunien (*Petunia hybrida*) verursachte die Herabregulierung einer Rhamnosyltransferase bei einigen Blüten eine veränderte Pigmentierung und eine Verschiebung der Anthocyane von Petunidin zu einer Mischung von Petunidin und Delphinidin (Kroon und Mitarbeiter, 1994). Die Ausschaltung einer UDP-Glucuronosyltransferase aus Erbsen (*Pisum sativum*), mit

unbekanntem Akzeptor verursachte in transgenen Erbsen und Luzernen verzögertes Wachstum und Entwicklung, sowie die verminderte Ausbildung haariger Wurzeln (Woo und Mitarbeiter, 1999). In transgenen Tabak (*Nicotiana tabacum*) bewirkte die Unterdrückung der UDP-Glucose:Phenylpropanoid Glucosyltransferasen (TOGT), welche spezifisch für Hydroxyzimtsäuren und Scopoletin sind, eine Schwächung der Resistenz gegenüber dem Tabak Mosaik Virus und führte zu einer Anhäufung reaktiver Sauerstoffspezies (Fraissinet-Tachet und Mitarbeiter, 1998; Chong und Mitarbeiter, 2002). Weiterhin berichteten die Autoren davon, dass durch die Herabregulierung nicht nur das direkte Produkt der GT, nämlich Scopolin, in geringerer Menge detektiert wurde, sondern auch der Vorläufer Scopoletin in vermindertem Ausmaß gebildet wird. Andere phenolische Verbindungen, die durch die entsprechende Enzymaktivität umgesetzt werden, waren in ihrer Menge nicht beeinflusst, wie z. B. Salicylsäureglucosid und – glucoseester, Chlorogensäure, Ferulasäure- und p-Cumarsäure-D-glucoseester. In Blättern von Roter Bete (*Beta vulgaris*) verursachte die vorübergehende Expression eines BvGT (*Beta vulgaris* Glucosyltransferase) Konstruktes die Reduktion von BvGT Transkripten durch Cosuppression und der Betanin-Menge, weshalb dieser GT eine Rolle in der Glucosylierung von Betacyanin zugesprochen wird (Sepulveda-Jimenez und Mitarbeiter, 2005).

### **3 Problemstellungen**

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse zur Expression und Funktion von reifekorrelierten Enzymen des Sekundärstoffwechsels von Erdbeeren zu gewinnen. Im Mittelpunkt standen dabei die Enzyme Chalconsynthase (CHS), O-Methyltransferase (OMT) und Glycosyltransferase (GT).

Wie für die Chalconsynthase in Kap. A 2.1 dargelegt, gibt es bislang noch keine Berichte über CHS Gegensinn Phänotypen in Früchten. Von unseren Kooperationspartnern, dem Plant Research International, Wageningen, Niederlande wurden Erdbeerpflanzen bereitgestellt, die mit CHS Gegensinn-Konstrukten transformiert worden waren. Im Rahmen dieser Studie sollten nun mittels instrumentell-analytischer Methoden diejenigen pflanzlichen Sekundärmetabolite bestimmt werden, deren Gehalte durch die Herabregulation der CHS verändert waren.

Aufbauend auf den Ergebnissen von Wein und Mitarbeiter (2002), die eine multifunktionelle O-Methyltransferase (OMT) aus Erdbeeren kloniert hatten, wurden die OMT-Transkripte und die Furanone **1** und **1a** während der Fruchtreifung quantifiziert. Des Weiteren wurden Erdbeerpflanzen mit Sinn- und Gegensinnkonstrukten der OMT hergestellt und die gebildeten Früchte detailliert untersucht. Hierbei sind sowohl die OMT-Transkriptmengen als auch die Substrate und Produkte der OMT bestimmt worden.

Den Schwerpunkt der durchgeführten Studien bildeten die Glycosyltransferasen. Aus einer Vielzahl von Arbeiten ist die Anwesenheit von glycosidisch gebundenen Sekundärmetaboliten in der Erdbeerfrucht bekannt. So sind Glucoseester von Benzoesäure, Zimtsäure und deren Derivate (Schuster und Herrmann, 1985), glycosidisch gebundene niedermolekulare Verbindungen (Wintoch und Mitarbeiter, 1991; Groyne und Mitarbeiter, 1999), Flavonolglycoside (Häkkinen und Auriola, 1998), Anthocyane (Nyman und Kumpulainen, 2001), sowie 1-O-*trans*-Zimtsäure- $\beta$ -D-glucopyranose (**2b**) (Latza und Mitarbeiter, 1996) nachgewiesen worden. Bisher wurde

jedoch nur eine Glycosyltransferase aus Erdbeeren aufgereinigt, die den Autoren zufolge Spezifität für die 7-Hydroxygruppe von Quercetin zeigt (Cheng und Mitarbeiter, 1994). Aufgrund der Vielzahl der Glycoside in Erdbeeren müssen jedoch weitere Glycosyltransferasen existieren. Basierend auf Arbeiten von Aharoni und Mitarbeiter (2000) und Aharoni und O'Connell (2002) wurden durch zufälliges Sequenzieren verschiedener cDNAs aus reifen Erdbeerfrüchten mehrere mutmaßliche Glycosyltransferase Gene identifiziert. Es galt nun die entsprechenden Vollängen cDNAs zu klonieren, die Gene in einen Wirtsorganismus zu transferieren, die Proteine heterolog zu exprimieren und die Funktion der Enzyme zu charakterisieren. Weiterhin sollte für eine charakteristische GT deren Bedeutung für den Sekundärstoffwechsel in transgenen Erdbeerpflanzen, die jeweils Sinn- als auch Gegensinn Konstrukte des Gens enthielten, nachgewiesen werden.

## B Ergebnisse und Diskussion

### **1 Untersuchungen eines CHS Gegensinn Phänotyps hinsichtlich der Sekundärmetabolite**

#### **1.1 Vorarbeiten der Kooperationspartner**

Mehrere partielle cDNA Klone (PRI Klone C78, G110, G157 und G137) mit Ähnlichkeit zu Chalconsynthasen wurden in einer cDNA Bibliothek von reifen Erdbeerfrüchten identifiziert (Aharoni und O'Connell, 2002). Eine *CHS* von *Rosa hybrida* (gi: 29420432; 90% Identität) und *CHS6* von *Rubus idaeus* (gi: 22086371; 88% Identität) wiesen die höchste Homologie auf. Auf Aminosäureebene waren die Sequenzen mit denen von *Rosa hybrida* (BAC66467) und *Rubus idaeus* (AAM90652) zu jeweils 96% identisch. Octaploide Erdbeeren (*Fragaria x ananassa* cv. Calypso) sind mit einem Gegensinn Konstrukt der *CHS* unter Kontrolle des CaMV 35S Promoters und des Tnos Terminators transformiert worden. Eine Southern Blot Analyse, die mit ausgewählten kanamycinresistenten Linien durchgeführt wurde zeigte, dass in den transgenen Linien 1, 4, 12, 17, 18 und 20 jeweils 3, 1, 4, 4, 3 und 3 Kopien der AS *CHS* (*antisense* (Gegensinn) Chalconsynthase) in das Genom integriert worden waren. Um festzustellen, ob auf Transkriptionsebene das Niveau an *CHS*-mRNA verändert war, wurde eine Northern-Blot Analyse durchgeführt. Diese zeigte für 8 von 20 Linien (Nr. 1, 2, 10, 11, 16, 17, 18, 19 und 20) eine Reduktion der *CHS* Transkripte um mehr als 60% verglichen mit Kontrollen. Die Pigmentierung in den Früchten wurde jedoch nur beeinflusst, wenn das *CHS* Expressionsniveau auf weniger als 25% fiel. Reife Früchte mit pinker Farbe wurden bei den Linien Nr. 17 und 20 erhalten. In diesen Früchten blieben nur etwa 4%, bzw. 2% der *CHS* mRNA erhalten, verglichen mit Kontrollfrüchten. Die Früchte der Linie 18 zeigten einen chimären Phänotyp, mit einem *CHS* mRNA Niveau von 21% im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. B-1). Der Effekt auf die Pigmentierung war bei allen Früchten der jeweiligen Pflanze sichtbar. In Linie 17 verschwand der Effekt der *CHS* Gegensinn Hemmung nach einem Jahr. In Linie 20 ist der Phänotyp bereits über eine Periode von vier Jahren stabil.

Die Reduktion der *CHS* mRNA Menge in Linie 20 resultierte in einer ungefähren Halbierung des Kämpferolgehaltes, dem Hauptflavonol in Erdbeerfrüchten. Die Anthocyane waren durch die Reduktion der *CHS* Transkripte stärker betroffen. Der verbleibende Anthocyangehalt der stabilen Linie 20 konnte zu 8% in Vergleich zu Kontrollen bestimmt werden. Die pinke Farbe ist ein Indiz für die *CHS* Restaktivität (Abb. B-1).

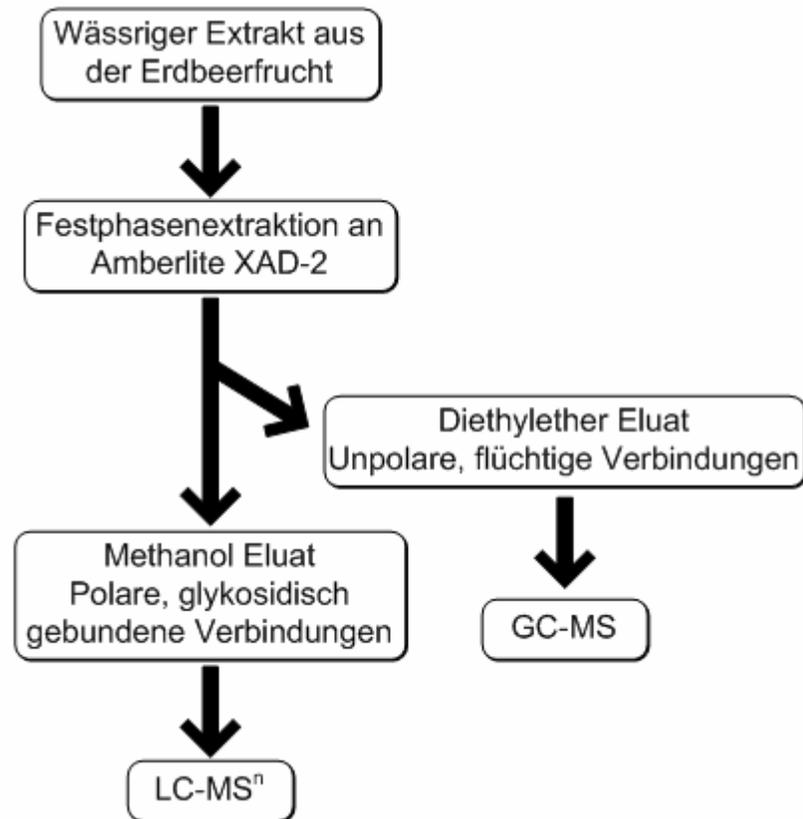


**Abb. B-1:** Reife Früchte von CHS Gegensinn Früchten der Linie 18 (A) und 20 (B), im Vergleich mit Kontrollfrüchten (C).

In weitergehenden Arbeiten sollte nun untersucht werden, inwieweit sich die Herabregulierung der *CHS* mRNA der transgenen Linie 20 auf weitere Metabolite des Phenylpropanoidstoffwechsels auswirkte.

## 1.2 Vergleichende Analyse der CHS AS Linie 20 und von Kontrollfrüchten

Zur Untersuchung des unpolaren, flüchtigen und glycosidisch gebundenen, nichtflüchtigen Anteils wurden Kontrollfrüchte und Erdbeeren der transgenen Linie 20 einer Festphasenextraktion an XAD<sup>®</sup> unterworfen (Abb. B-2). Die jeweiligen Extrakte sind instrumentell-analytisch mittels GC-MS und LC-UV-ESI-MS<sup>n</sup> untersucht worden.

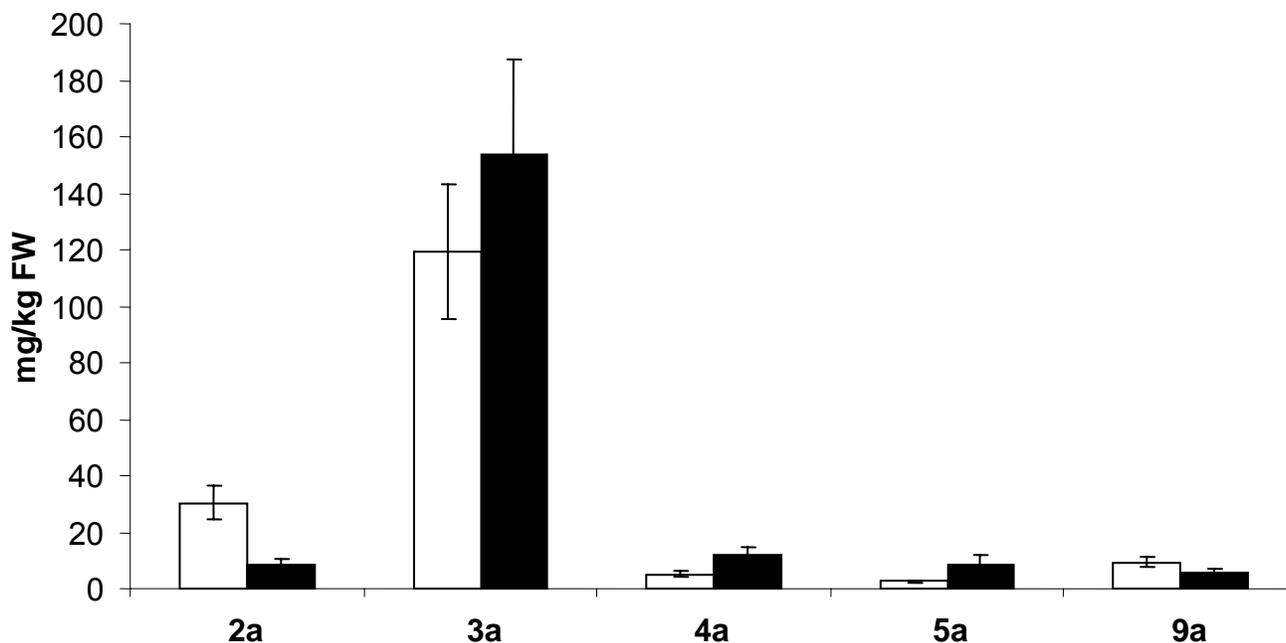


**Abb. B-2:** Aufarbeitungsschema für flüchtige und glykosidisch gebundene Verbindungen in der Erdbeerfrucht.

### 1.2.1 Untersuchung der glykosidisch gebundenen Formen mittels LC-UV-ESI-MS<sup>n</sup>

In eigenen Experimenten (Kap. B 3) und von anderen Gruppen (Häkkinen und Mitarbeiter, 1999; Kosar und Mitarbeiter, 2004; Määttä-Riihinen und Mitarbeiter, 2004) konnte gezeigt werden, dass der größte Anteil der phenolischen Säuren in Erdbeerfrüchten als Konjugate vorliegen, und nur ein geringer Teil als freie Säure. So erschien es als wahrscheinlich, dass sich Veränderungen der Gehalte an phenolischen Säuren auch auf die Gehalte der Konjugate auswirken. Es wurden deshalb die Glucoseester der Zimtsäure (**2a**), p-Cumarsäure (**3a**), Kaffeesäure (**4a**), Ferulasäure (**5a**) und p-Hydroxybenzoesäure (**9a**) in Gegensinn- und Kontrollfrüchten mittels LC-UV-ESI-MS<sup>n</sup> quantifiziert. Neben einem signifikant ( $p < 0,5$ ) erniedrigten Gehalt an **2a** ist auch eine leichte Zunahme der Konzentration von **3a**, **4a** und **5a** in den

Gegensinnfrüchten festgestellt worden (Abb. B-3). Die Menge an **9a** war in den transgenen Früchten leicht erniedrigt.

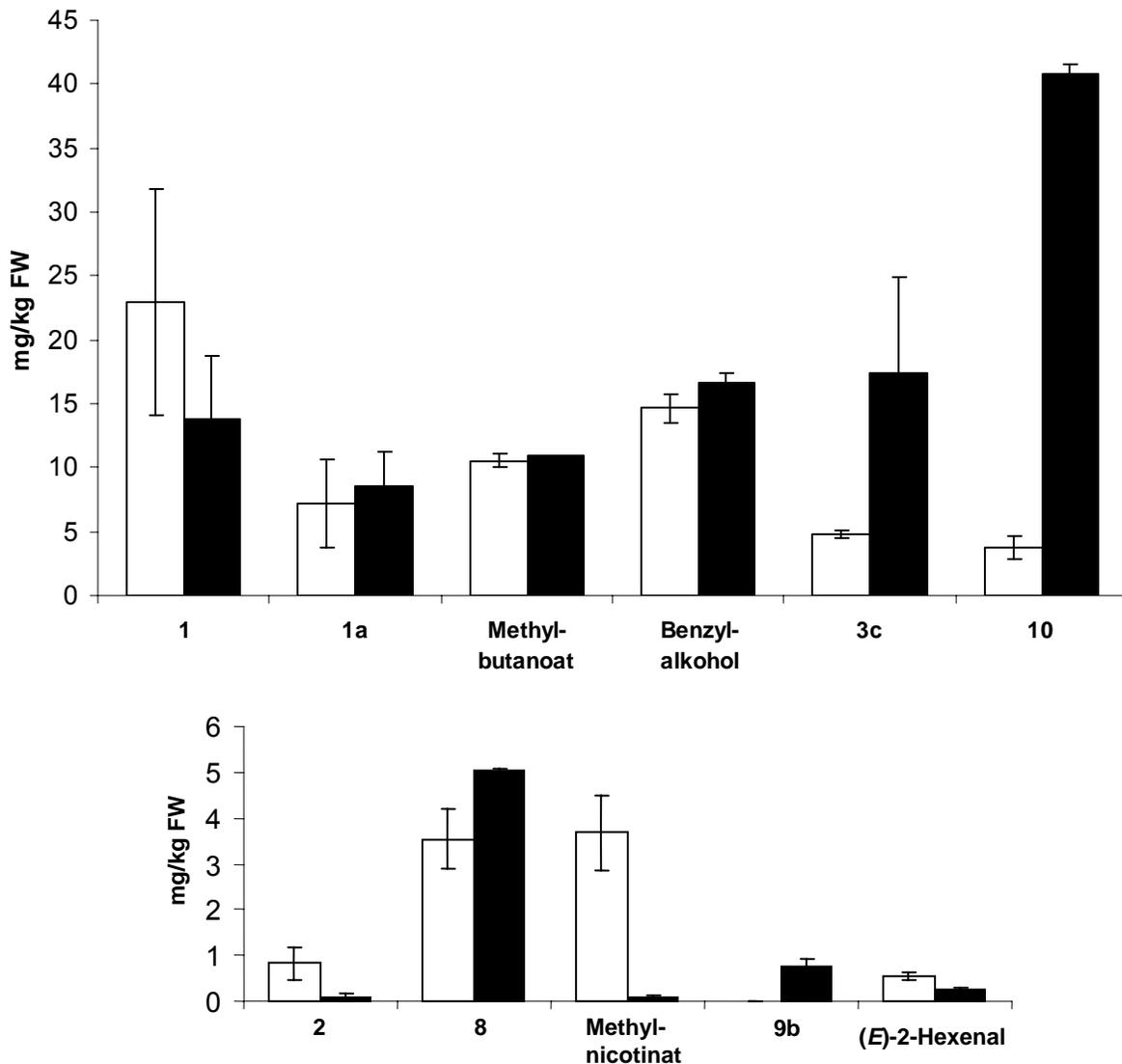


**Abb. B-3:** Quantifizierung von Zimtsäure-D-glucoseester (**2a**), p-Cumarsäure-D-glucoseester (**3a**), Kaffeesäure-D-glucoseester (**4a**), Ferulasäure-D-glucoseester (**5a**) und p-Hydroxybenzoesäure-D-glucoseester (**9a**) in Kontroll- [□] und CHS Gegensinn [■] Früchten. FW = Frischgewicht.

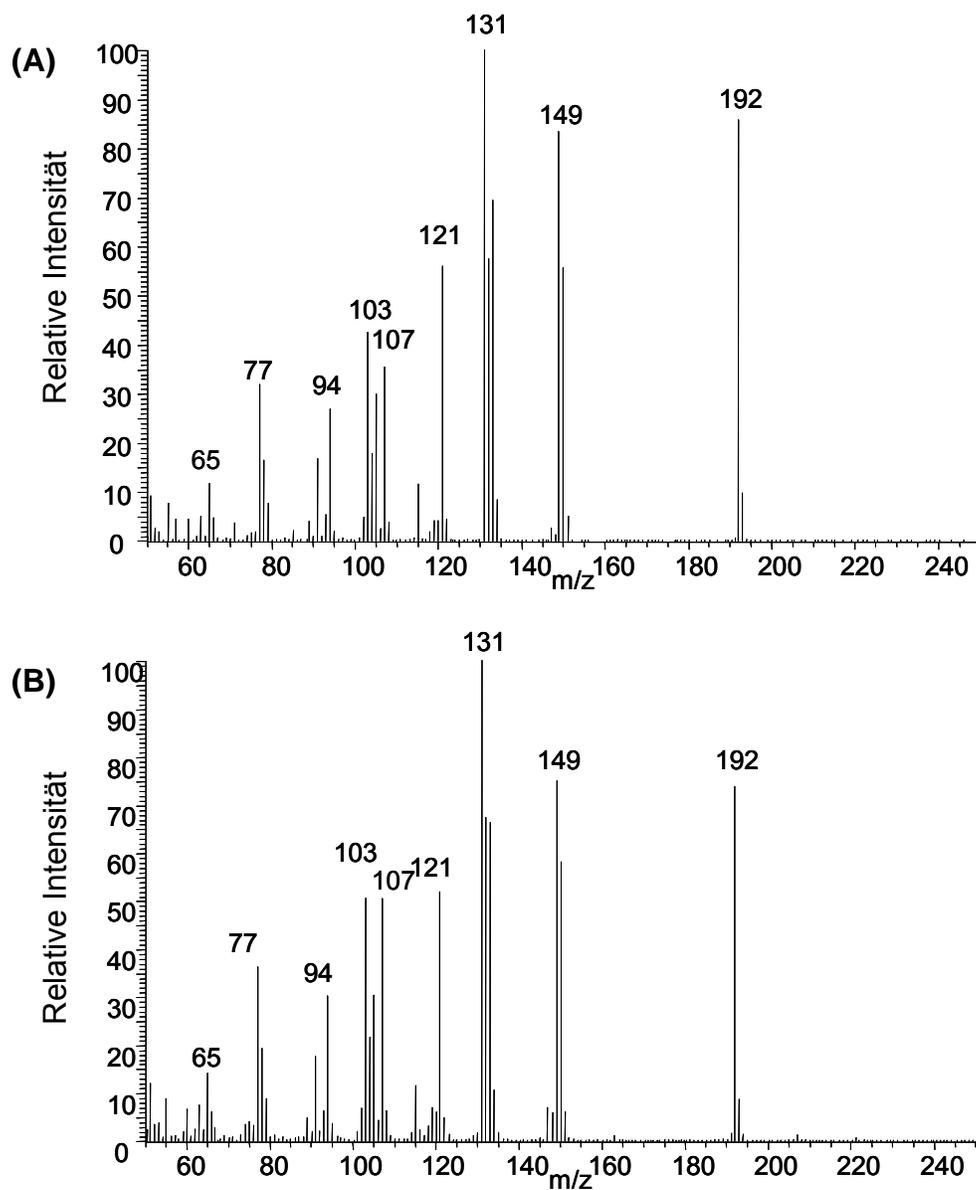
### 1.2.2 Untersuchung der flüchtigen Verbindungen mittels GC-MS

Die GC-MS Analyse des Diethyletherextraktes zeigte, dass die Konzentrationen einer Anzahl von flüchtigen Verbindungen in den transgenen Früchten im Vergleich zu den Kontrollfrüchten nicht signifikant verändert waren (Abb. B-4). Jedoch wurden signifikant niedrigere Gehalte an Zimtsäure (**2**) und Methylnicotinat, sowie höhere Level von p-Cumarylalkohol (**3c**), Benzoesäure (**8**) und p-Hydroxybenzaldehyd in den Früchten der transgenen Linie 20 im Vergleich zu den Kontrollen detektiert. Eine Verbindung war in etwa zehnfach höherer Konzentration in den transgenen Früchten im Vergleich zu den Kontrollen vorhanden. Auf Grundlage des Fragmentierungsmusters im

Massenspektrum wurde die Verbindung als p-Cumaryl-1-acetat (**10**) angenommen. Nach Synthese der Referenzverbindung und Vergleich der chromatographischen und massenspektrometrischen Daten mit der unbekanntem Verbindung konnte die Struktur bestätigt werden (Abb. B-5).



**Abb. B-4:** Vergleichende Quantifizierung von flüchtigen Verbindungen von CHS Gegeninn [■] und Kontrollfrüchten [□]. **1** (4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon), **1a** (4-Methoxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon), **3c** (p-Cumarylalkohol), **10** (p-Cumaryl-1-acetat), **2** (Zimtsäure), **8** (Benzoessäure), **9b** (p-Hydroxybenzaldehyd). FW = Frischgewicht.



**Abb. B-5:** Elektronenstoß-Massenspektren der unbekanntes Verbindung (A) und der synthetisierten Referenzverbindung p-Cumaryl-1-acetat (**10**) (B)

### 1.3 Zusammenfassung und Diskussion

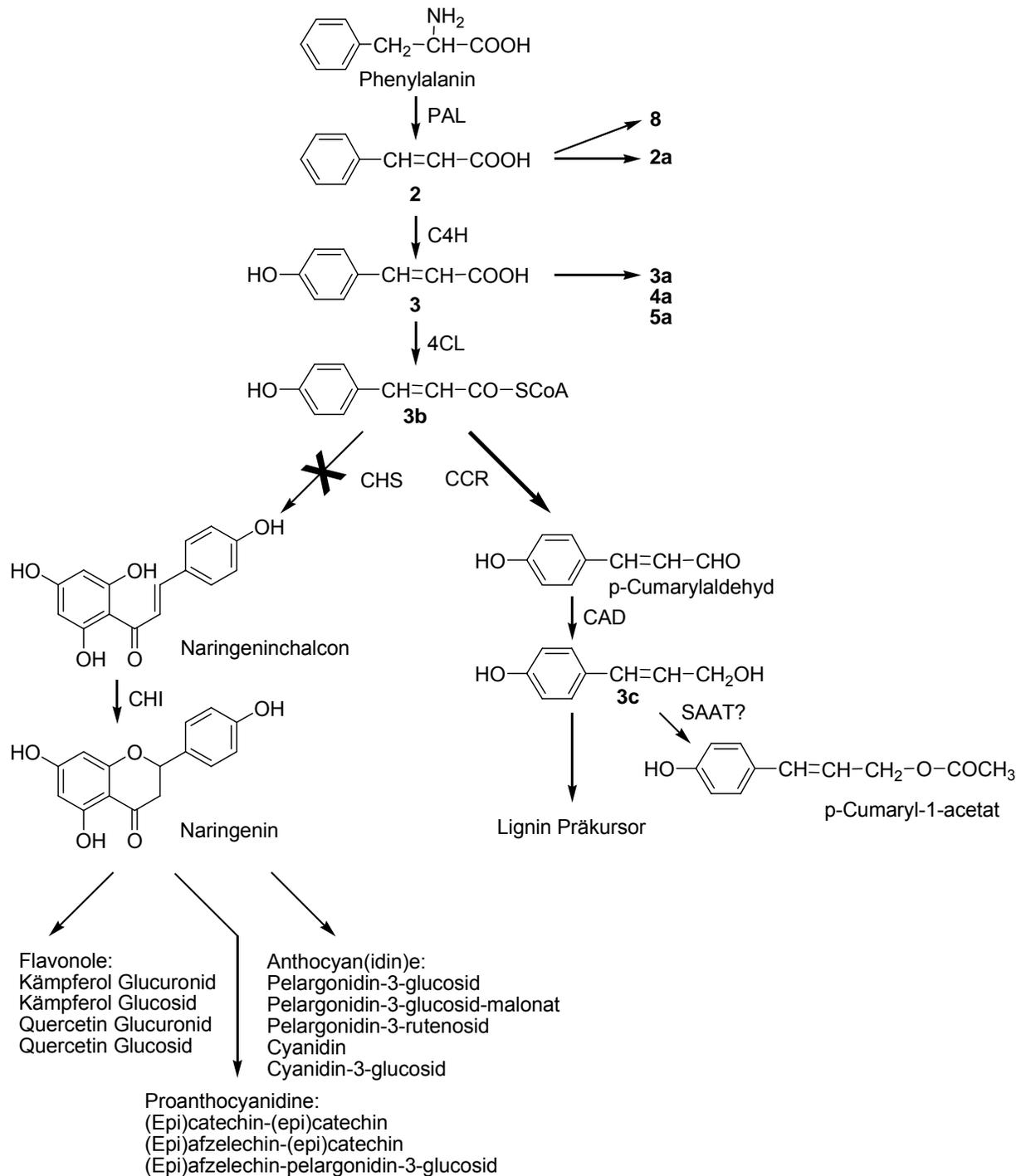
Die Charakterisierung der Sekundärmetabolite der stabilen transgenen Linie Nr. 20 zeigte, dass zusammen mit der verminderten Produktion der Flavonoide eine Akkumulation der Metabolite des Phenylpropanoidstoffwechsels, und hier speziell

p-Cumarylalkohol (**3c**) um einen Faktor von 3,6 und p-Cumaryl-1-acetat (**10**) um einen Faktor von 10,6 stattfand (Abb. B-4). Beide Komponenten sind vermutlich Präkursoren der Ligninbiosynthese (Amthor, 2003). Durch Reduktion der CHS-Aktivität reduziert sich der Fluss in Richtung der Flavonoide, gleichzeitig erhöhen sich die Gehalte der Intermediate, die für den Phenylpropanoidstoffwechsel verfügbar sind (Abb. B-6). Kürzlich wurde ein ähnliches Resultat erhalten, bei dem eine Flavanon-3-Hydroxylase (*f3h*) in *Dianthus caryophyllus* herabreguliert wurde (Zucker und Mitarbeiter, 2002). Das Ergebnis war, dass neben den Blüten, welche erheblich weniger Anthocyane enthielten, die anti-*f3h* Blüten signifikant stärker dufteten als Kontrollen. Die Analyse der flüchtigen Verbindungen erbrachte eine fünf- bis siebenfach höhere Menge an Phenylpropanoiden, Methylbenzoat und 2-Hydroxymethylbenzoat, verglichen mit den Kontrollen.

Bei unseren Experimenten zeigte sich, dass die Mengen an p-Cumarsäure-, Kaffeesäure- und Ferulasäure-D-glucoseester (**3a**, **4a** und **5a**), mögliche Vorläufer der Chlorogensäure, durch die Blockade des *CHS* Gens ebenfalls erhöht waren. In Mais (*Zea mays*) korreliert die Aktivität einer funktionellen CHS mit Resistenz gegenüber dem Getreideohrwurm (*Helicoverpa zea* Boddie), wogegen ein Mangel an CHS die Menge an Chlorogensäure, welche ein Produkt des Phenylpropanoidstoffwechsels darstellt, erhöht (Szalma und Mitarbeiter, 2002).

In den vorliegenden transgenen Pflanzen war die Konzentration von Zimtsäure (**2**) und **2a** im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigt. Möglicherweise induzieren die erhöhten Mengen der Intermediate eine Art Rückkopplungshemmung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), bei gleichzeitig unveränderter Aktivität der nachfolgenden Enzyme (Blount und Mitarbeiter, 2000).

Eine Zimtsäure-CoA Reduktase (CCR) und eine Zimtalkohol Dehydrogenase (CAD) aus Erdbeeren wurden kürzlich beschrieben (Aharoni und Mitarbeiter, 2002; Blanco-Portales und Mitarbeiter, 2002). Die entsprechenden Enzyme sind an der Biosynthese von **3c** beteiligt. Die anschließende Konjugation des Alkohols mit Acetyl-CoA zu **10** benötigt die Aktivität einer Alkohol Acyl-CoA Transferase. Über eine solche Transferase aus Erdbeeren wurde vor kurzem berichtet (Aharoni und Mitarbeiter, 2000), jedoch ohne die angesprochene Reaktion untersucht zu haben. Das heterolog exprimierte Protein zeigte aber gegenüber dem aromatischen Alkohol Benzylalkohol und Acetyl-CoA als Acyl-Donor enzymatische Aktivität.



**Abb. B-6:** Auswirkungen der Herunterregulierung von *CHS* in der transgenen Linie 20 auf verschiedene Sekundärmetabolite des Phenylpropanoidstoffwechsels. PAL (Phenylalanin-Ammonium-Lyase), C4H (Zimtsäure-4-Hydroxylase), 4-CL (p-Cumarsäure:CoA Ligase), SAAT (Erdbeere Acyl-CoA:Alkohol Transferase), CHS (Chalconsynthase), CCR (Zimtsäure-CoA Reduktase), CHI (Chalconisomerase). Kreuz: (partielle) Inhibierung oder Co-Inhibierung

Der signifikant erniedrigte Gehalt an Methylnicotinat in der transgenen Linie 20, welches ein bekanntes flüchtiges Produkt in wilden Erdbeeren (*Fragaria vesca*) darstellt (Zabetakis und Holden, 1997), bleibt unklar, deutet aber auf einen Zusammenhang mit dem Phenylpropanoidstoffwechsel hin.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass durch die Herabregulierung des *CHS* Gens nicht nur Komponenten stromabwärts des Phenylpropanoidpfades beeinflusst wurden, sondern auch Metabolite und Derivate des unmittelbaren Vorläufers der Flavonoide, nämlich p-Cumarsäure-CoA (**3b**). So lässt sich der Mangel an funktioneller CHS mit einem Anwachsen von p-Cumarylalkohol (**3c**) und acetyliertem p-Cumarylalkohol (**10**) durch eine Umlenkung der Intermediate erklären, welche ursprünglich für die Anthocyan- und Flavonolbiosynthese bestimmt waren.

## **2 Multifunktionelle O-Methyltransferase aus Erdbeeren – Expression und Funktion**

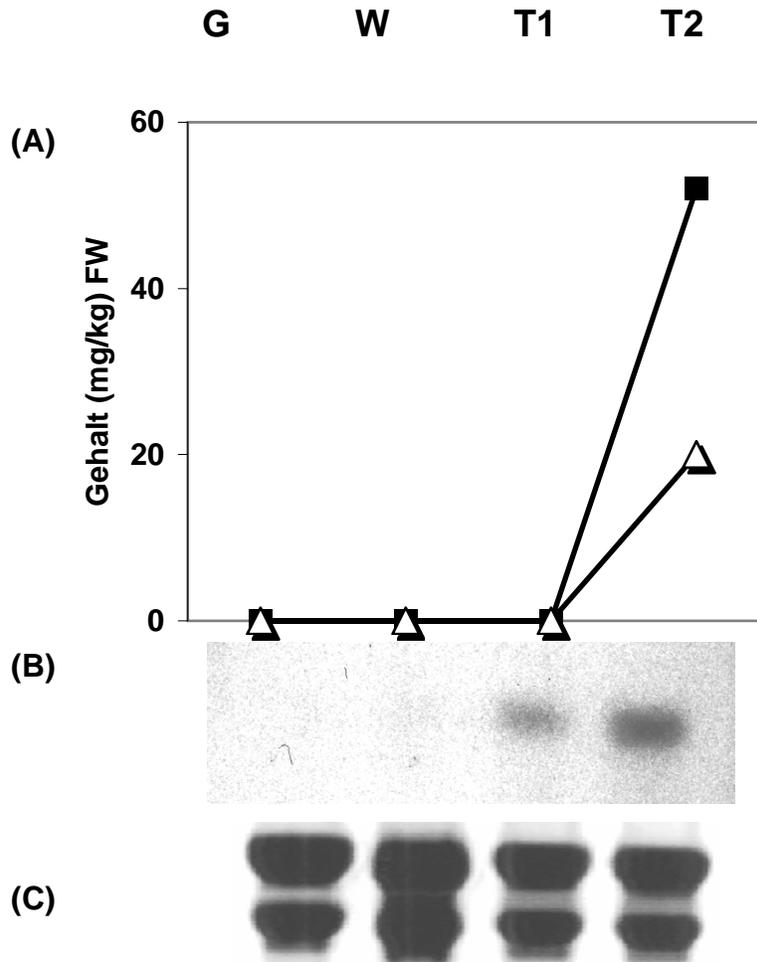
Erdbeerfrüchte enthalten eine ungewöhnliche Gruppe von Aromastoffen, die eine 2,5-Dimethyl-3(2*H*)-furanon Struktur aufweisen. Kürzlich konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass eine multifunktionelle O-Methyltransferase (FaOMT) u. a. für die Methylierung von 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (**1**) zuständig ist (Abb. A-5) (Wein und Mitarbeiter, 2002). In weiterführenden Arbeiten sollte nun die reifekorrelierte Bildung des Methoxyderivates (**1a**) aus **1** im Vergleich zu der Transkriptakkumulation untersucht werden. Weiterhin wurden transgene Sinn- und Gegensinnpflanzen, die das *FaOMT* Gen in sinngemäßer und umgekehrter Richtung enthielten, hergestellt um die Auswirkungen einer Hoch- bzw. Herabregulierung von FaOMT zu studieren und damit die *in vivo* Funktion zu klären.

### **2.1 Korrelationsanalyse *FaOMT* mRNA zu 2,5-Dimethyl-3(2*H*)-furanonen**

Für die Untersuchung der reifekorrelierten Bildung von *FaOMT* Transkripten ist eine Northern-Analyse, mit einer <sup>32</sup>P-markierten *OMT*-Sonde durchgeführt worden. Dazu wurde aus Erdbeeren verschiedener Reifegrade RNA isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet, mit der Sonde markiert und nach mehreren Waschschritten mittels Auflegens eines Röntgenfilms detektiert. Parallel zur Analyse der Transkriptmengen sind in demselben Erdbeermaterial die Gehalte der Furanon-Derivate nach XAD Festphasenextraktion bestimmt worden (Abb. B-7).

Ein Vergleich der *FaOMT* Expression und Bildung von **1a** zeigte, dass *FaOMT* Transkripte erst ab der Reifungsstufe der rot werdenden Früchte (T1, Abb. A-3) gebildet werden. Kurz nach dem Auftauchen von *FaOMT* mRNA wurde **1a** in den Früchten gebildet. Dies belegt eindeutig den zeitlichen Zusammenhang zwischen *FaOMT* Expression und der Bildung von **1a** in reifenden Erdbeeren. Durch *in vitro* Experimente konnte weiterhin gezeigt werden, dass FaOMT in der Lage ist **1**, aber auch Kaffeesäure

(4) zu methylieren (Wein und Mitarbeiter, 2002). Die Herab- und Hochregulation der FaOMT in transgenen Pflanzen sollte nun Aufschluss darüber geben, ob FaOMT auch *in planta* in der Lage ist, **1** zu **1a** zu methylieren.

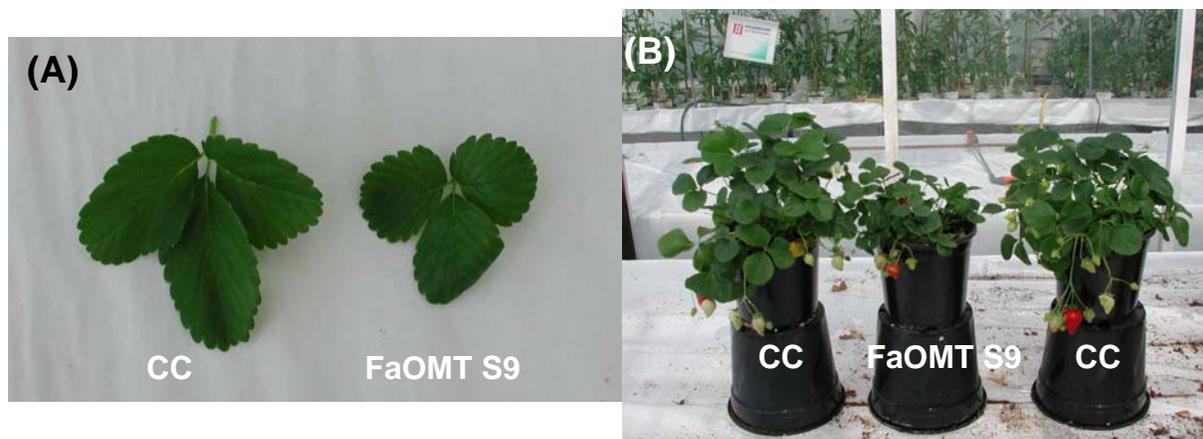


**Abb. B-7:** Vergleich der Furanonbildung und FaOMT Expressionsmusters in verschiedenen Erdbeerfrucht-Reifungsstadien: Grüne Frucht (G), Weiße Frucht (W), Rot werdende Frucht, frühes Stadium (T1), rot werdende Frucht, spätes Stadium (T2). Konzentration von **1** (■) und **1a** (△) während der Reifung (A). Northern Blot Analyse von Erdbeerfrucht RNA, hybridisiert mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten Sonde (B). Gleiche Mengen an RNA wurden in jeder Spur aufgetragen, wie die Intensitäten der rRNA Banden vor dem Transfer zeigen (C). FW = Frischgewicht.

## 2.2 Auswirkungen der Hoch- und Herabregulierung einer *Fragaria x ananassa* O-Methyltransferase (FaOMT) auf Sekundärmetabolite

### 2.2.1 Herstellung transgener Pflanzen mit veränderter Expression von FaOMT

Die Volllänge-Sequenz von *FaOMT* wurde in Sinn (*sense*) und Gegensinn (*antisense*) Richtung unter der Kontrolle des CaMV 35S Promoters in ein Derivat des binären Vektors pBinplus (Van Engelen und Mitarbeiter, 1995) ligiert. Die Konstrukte sind in *Fragaria x ananassa* cv. Calypso mittels *Agrobacterium*-(Stamm AGL0)vermittelter Transformation von Blattscheiben eingebracht worden. Anschließend erfolgte die Regeneration der Pflanzen mittels somatischer Embryogenese. Transgene kanamycinresistente Pflanzen (12 *FaOMT antisense* (AS) Linien und 11 *FaOMT sense* (S) Linien) wurden in das Gewächshaus verbracht. In mehreren transgenen Linien sind phänotypische Veränderungen beobachtet worden, wie z. B. reduzierter Wuchs (AS2, AS4, AS11, S8, und S9 (Abb. B-8)), verspätete Blüte (S2) und leicht veränderte Farbe der Früchte (S1). Die Expression von *FaOMT* wurde mittels quantitativer Echtzeit PCR (QRT-PCR) auf Transkriptionsniveau verfolgt.



**Abb. B-8:** Blätter (A) und ganze Pflanzen (B) von Kontrollen (CC) und FaOMT S9 transgene Pflanzen. Die Blätter von FaOMT S9 sind kleiner als die der Kontrollpflanze, welche unter gleichen Bedingungen aufgezogen wurden; weiterhin zeigt die transgene Pflanze einen reduzierten Wuchs.

## 2.2.2 Quantitative mRNA Analyse von transgenen Erdbeerpflanzen

Der relativen Gehalte an *FaOMT* mRNA in roten Früchten und Blattgewebe von transgenen Pflanzen und Kontroll-Pflanzen wurden mittels TaqMan<sup>®</sup> QRT-PCR bestimmt (Tab. B-1 (A) und (B)).

**Tab. B-1:** Relative Quantifizierung von *FaOMT* Transkripten in Blattgewebe von *Fragaria x ananassa* cv. Calypso Pflanzen, die mit einem Sinn Konstrukt von *FaOMT* (A) und in Fruchtgewebe von Pflanzen, die mit einem Gegensinn Konstrukt (B) transformiert wurden, unter Benutzung der vergleichenden  $C_T$ -Methode. Jeder  $C_T$ -Wert wurde in drei separaten QRT-PCR Reaktionen bestimmt. Der Expressionslevel von *dbp* diente als interne Kontrolle.

### (A)

	FaOMT <i>sense</i> durchschnittlicher $C_T$ (n=3)	<i>dbp</i> durchschnittlicher $C_T$ (n=3)	FaOMT relativ zu cv. Calypso Blattgewebe
Blattgewebe			
FaOMT S1	21,38±0,07	24,45±0,11	4,03
FaOMT S2	22,18±0,06	24,22±0,02	1,97
FaOMT S4	21,69±0,03	25,27±0,03	5,78
FaOMT S8	19,93±0,10	22,99±0,11	4,00
FaOMT S9	16,76±0,41	15,80±0,15	0,24
FaOMT S11	20,27±0,04	23,55±0,09	4,66

### (B)

	FaOMT <i>antisense</i> durchschnittlicher $C_T$ (n=3)	<i>dbp</i> durchschnittlicher $C_T$ (n=3)	FaOMT relativ zu cv. Calypso Fruchtgewebe
Fruchtgewebe			
FaOMT AS2	23,73±0,05	22,68±0,04	0,04
FaOMT AS3	19,06±0,18	22,18±0,05	0,74
FaOMT AS4	23,03±0,02	21,65±0,17	0,03
FaOMT AS9	20,80±0,06	23,21±0,03	0,45
FaOMT AS11	23,09±0,05	23,03±0,03	0,08

Fünf der sechs *FaOMT* S-Linien die für die TaqMan<sup>®</sup>-Analyse ausgewählt wurden enthielten höhere Gehalte an *FaOMT* Transkripten in den Blattgeweben als die Kontrollen. Eine Sinnpflanze (*FaOMT* S9) zeigte jedoch ein niedrigeres Expressionsniveau, und war auch phänotypisch verändert. Die Sensepflanze war kleiner als die Kontrollen und bildete kleinere Blätter (Abb. B-8). Diese Beobachtung ist wahrscheinlich auf das bekannte Phänomen der Co-Suppression zurückzuführen (Napoli und Mitarbeiter, 1990; Van der Krol und Mitarbeiter, 1990). Fünf Pflanzen, die

mit dem Gegensinn Konstrukt transformiert wurden, enthielten niedrigere Gehalte an *FaOMT* Transkripten (Tab. B-1 (B)).

### 2.2.3 Quantifizierung von Metaboliten in transgenen und Kontroll-Pflanzen

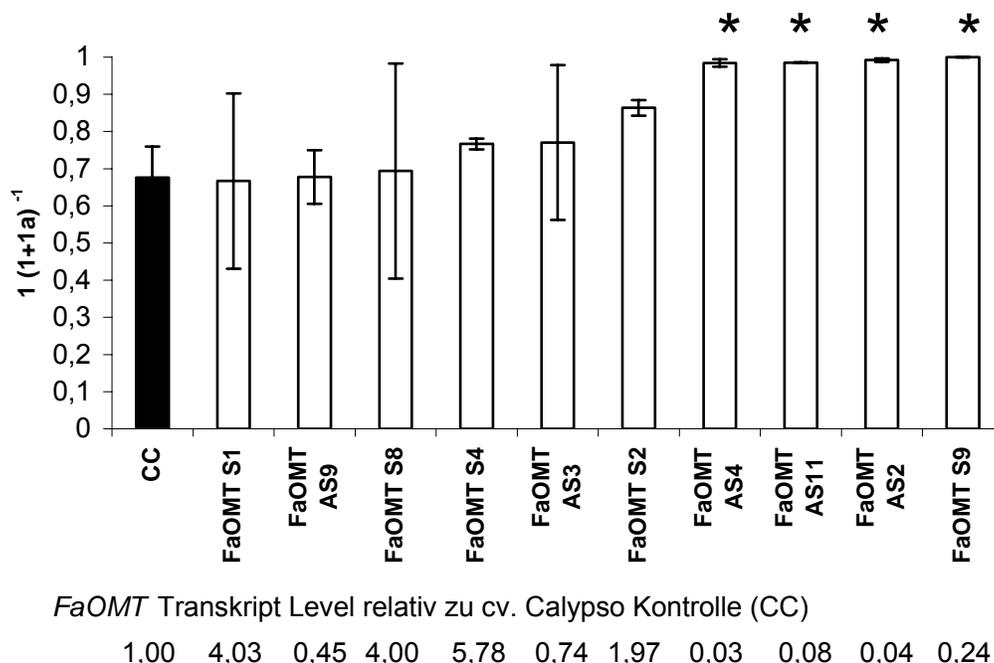
Enzymassays, die mit der rekombinanten *FaOMT* durchgeführt wurden zeigten bereits, dass das Protein *in vitro* den Methyltransfer von SAM zu **1** und **4** katalysiert (Abb. A-5; Wein und Mitarbeiter, 2002). Um die nativen Substrate von *FaOMT* in der Pflanze zu bestimmen wurden die vermeintlichen Substrate und deren Produkte mittels Festphasenextraktion aus reifen Erdbeerfrüchten der Kontroll- und transgenen Pflanzen isoliert. Die Konzentrationen von **1** und **1a** sowie von Kaffeesäure-D-glucoseester (**4a**) und Ferulasäure-D-glucoseester (**5a**) sind mittels GC-MS bzw. LC-ESI-UV-MS<sup>n</sup> bestimmt worden. Eigene Studien und Untersuchungen anderer Gruppen hatten bereits gezeigt, dass Zimtsäure und deren hydroxylierte Derivate hauptsächlich als konjugierte Formen in der Erdbeerfrucht vorkommen (Määttä-Riihinen und Mitarbeiter, 2004) weshalb **4** und **5** (Ferulasäure) als Glucoseester **4a** und **5a** quantifiziert wurden. Vanillin ist ein weiteres Produkt der Methylierungsreaktion von *FaOMT*. Die mittels GC-MS detektierten Mengen waren aber zu niedrig um eine einwandfreie Quantifizierung durchführen zu können.

Wir beobachteten starke Frucht-zu-Frucht und Ernte-zu-Ernte Variabilität der absoluten Mengen der Metabolite. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem einer anderen Gruppe (Watson und Mitarbeiter, 2002). Wenn jedoch die Konzentration an **1** zu der Konzentration an Furanonen (**1** und **1a**) in Relation gesetzt wurde, war die Variation innerhalb der Kontroll-Pflanzengruppe sehr gering (Tab. B-2). Ähnlich verhielt es sich mit den Konzentrationen an **4a** im Verhältnis zur Summe **4a** und **5a**. Daher wurden die normalisierten Werte verglichen. Die Resultate sind in den Abb. B-9 und Abb. B-10 angegeben, wobei Werte nahe 1 das ausschließliche Vorliegen des jeweiligen Edukts (**1**, **4a**) anzeigt, während Werte gegen Null auf hohe relative Gehalte der Methylierungsprodukte (**1a**, **5a**) hindeuten.

**Tab. B-2:** Absolute Konzentration von **1** (4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon) und **1a** (4-Methoxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon) in Kontrollfrüchten von *F. x ananassa* und das normalisierte Verhältnis von **1**

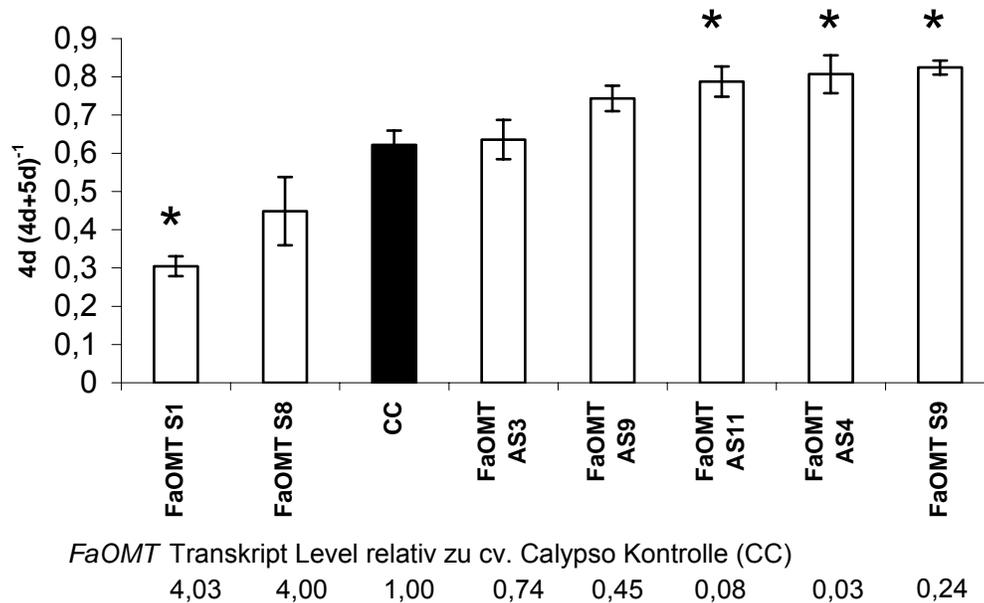
Proben	<b>1</b> (mg kg <sup>-1</sup> )	<b>1a</b> (mg kg <sup>-1</sup> )	<b>1</b> (1+ <b>1a</b> ) <sup>-1</sup>
1	3,3	1,9	0,63
2	4,6	1,6	0,73
3	4,6	1,6	0,73
4	4,9	2,8	0,63
5	7,6	3,4	0,69
6	7,6	6,9	0,52
7	7,9	7,1	0,52
8	10,2	6,2	0,62
9	15,4	3,7	0,81
10	20,2	13,2	0,61
11	29,1	5,7	0,84
12	33,1	13,6	0,71
13	66,3	24,8	0,73
14	69,5	21,3	0,76
15	74,2	35,3	0,68
16	76,6	36,8	0,68
17	85,7	53,5	0,62
18	92,9	52,6	0,64

Vier der elf transgenen Pflanzen produzierten signifikant niedrigere relative Mengen des methylierten Produktes **1a** in ihren Früchten im Vergleich zu den Kontroll-Pflanzen (Abb. B-9). Das Verhältnis **1** zu **1a** von 68:22 (0,68) in den Kontrollfrüchten wuchs auf 99:1 (0,99) in den transgenen Früchten der Gegensinnpflanzen FaOMT AS4, FaOMT AS11, FaOMT AS2 und der durch Co-Suppression gehemmten Sinnpflanze FaOMT S9, was einem nahezu vollständigen Verlust von **1a** gleichkommt. Die normalisierten Mengen an **1** in den Früchten der anderen transgenen Pflanzen waren nicht signifikant unterschiedlich von den Kontrollen, und keine der Pflanzen, die ein Sinn Konstrukt enthielten, zeigte einen erhöhten relativen Gehalt an **1a** im Vergleich zu den Kontrollen.



**Abb. B-9:** Normalisierte Konzentration von **1** (4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon) und **1a** (4-Methoxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon) ausgedrückt als das Verhältnis von **1** zu der Gesamtmenge von **1** und **1a** ( $1 + 1a$ ) in Kontrollfrüchten (CC) und Früchten von Pflanzen, die mit dem Sinn- (FaOMT S) bzw. Gegensinn- (FaOMT AS)konstrukt transformiert wurden. Sternchen (\*) oberhalb der Säulen deuten auf signifikant ( $p < 0,01$ ) veränderte Mengen in Vergleich zu Kontrollen hin. Zum Vergleich sind die Transkriptmengen relativ zu den Kontrollen angegeben.

Transgene Früchte, die unbedeutende Mengen an **1a** bilden enthielten auch die geringsten Gehalte an Transkripten (Abb. B-9). Andererseits war in den Pflanzen FaOMT AS9 und FaOMT AS3 in denen die Transkriptmenge leicht reduziert war (auf 45 bzw. 74% der Menge, die in den Kontrollen detektiert wurde), der Effekt auf das Furanonverhältnis nicht detektierbar. Fünf der sechs Pflanzen, die ein *FaOMT* Sinn Konstrukt enthielten zeigten eine Überexpression der Transkripte in Blättern, aber diese Zunahme beeinflusste nicht das Verhältnis von **1** zu **1a** im Fruchtgewebe.



**Abb. B-10:** Normalisierte Konzentration von Kaffeesäure-D-glucoseester (**4a**) und Ferulasäure-D-glucoseester (**5a**) ausgedrückt als das Verhältnis von **4a** zu der Gesamtmenge von **4a** und **5a** in Kontrollfrüchten (CC) und Früchten von Pflanzen, die mit dem Sinn- (FaOMT S) bzw. Gegensinn- (FaOMT AS)konstrukt transformiert wurden. Sternchen (\*) oberhalb der Säulen deuten auf signifikant ( $p < 0,01$ ) veränderte Mengen in Vergleich zu Kontrollen hin. Zum Vergleich sind die Transkriptmengen relativ zu den Kontrollen angegeben.

Das Verhältnis des FaOMT Substrates Kaffeesäure, ausgedrückt als **4a**, zu der kombinierten Menge der Glucoseester **4a** und **5a** ist für die transgenen Früchte in Abb. B-10 dargestellt. Für die Analysen wurden Pflanzen mit hoher (FaOMT S1, S8), mittlerer (FaOMT AS3, AS9) und niedriger (FaOMT AS 11, AS4, S9) Expression von *FaOMT* mRNA ausgewählt. Ähnlich wie bei den Furanonen, enthielten auch transgene Pflanzen mit stark reduzierten Mengen an *FaOMT* mRNA (FaOMT AS4, FaOMT AS11 und FaOMT S9) die niedrigsten relativen Mengen des FaOMT Produktes Ferulasäure verglichen mit dem Substrat von FaOMT (Kaffeesäure), quantifiziert als Glucoseester. Jedoch zeigte keine der transgenen Pflanzen, die aufgrund der Reduktion der Transkripte einen nahezu vollständigen Verlust von DMMF aufwiesen, diesen vollständigen Verlust auch für **5a**. In den Früchten der Pflanzen FaOMT S1 und FaOMT S8 wurden höhere nominale Konzentrationen des methylierten Produktes **5a** gefunden, die auf eine Hochregulierung der Genexpression hindeuten, welche auch mittels QRT-PCR für die *FaOMT* Transkripte im Blattgewebe bestätigt werden konnte. Die Mengen

von *FaOMT* mRNA korrelierten sehr gut mit den Verhältnissen der Glucoseester in den Blattgeweben.

### 2.3 Zusammenfassung und Diskussion

Kürzlich gelang die Isolierung, Klonierung und heterologe Expression einer O-Methyltransferase aus reifen Erdbeerfrüchten (*FaOMT*) in *E. coli* (Wein und Mitarbeiter, 2002; Lavid und Mitarbeiter, 2002a). Das klonierte Enzym katalysiert die Methylierung einer Vielzahl von Substraten, die eine ortho-Diphenol Struktur tragen, wie **4**, Kaffeesäure-CoA (**4b**), 3,4-Dihydroxybenzaldehyd und Brenzcatechin (Abb. A-5). Zusätzlich wird **1** als Substrat akzeptiert, vermutlich wegen des ortho-Dihydroxyfuran Systems einer seiner tautomeren Grenzstrukturen. Expressionsstudien zeigten, dass *FaOMT* in der späten Reifungsphase der Früchte gebildet wird, weswegen es möglich erscheint, dass *FaOMT* durch Methylierung von Phenylpropanoiden an der Lignifizierung der Nüsschen und Leitbündel beteiligt ist (Suutarinen und Mitarbeiter, 1998). Ebenso erscheint eine Beteiligung an der Biosynthese von **1a** und Vanillin wahrscheinlich.

Für die Aufklärung der Funktion von *FaOMT in planta* wurden transgene Sinn und Gegensinnpflanzen generiert, die erhöhte bzw. erniedrigte Gehalte an *FaOMT* Transkripten aufwiesen. Obwohl von jeder Linie etwa 20 Pflanzen in das Gewächshaus gebracht wurden, konnten nur etwa 5 bis 10 zu voll entwickelten Pflanzen regeneriert werden. Einige Pflanzen starben, bevor sie Früchte trugen und andere produzierten zu wenige Früchte. Die verbliebenen Pflanzen wurden mittels quantitativer Echtzeit PCR (QRT-PCR) auf Veränderungen in der Menge an *FaOMT* Transkripten geprüft. Wie erwartet produzierten Pflanzen, die ein Konstrukt mit dem *FaOMT* Gen in Sinn Orientierung enthielten eine größere Anzahl von Transkripten, mit der Ausnahme von Linie *FaOMT* S9 (Tab. B-1). Dieser als Co-Suppression bezeichnete Effekt wurde bereits bei anderen Sinn Transformationen beobachtet (Van der Krol und Mitarbeiter, 1990; Napoli und Mitarbeiter, 1990; Tsai und Mitarbeiter, 1998). Co-Suppression kommt durch Hybridisierung der im Überschuss produzierten mRNA mit der DNA-Sequenz des

entsprechenden endogenen Gens zustande (Matzke und Matzke, 1995). Im Gegensatz dazu zeigten alle Pflanzen, die mit einem Gegensinn Konstrukt transformiert worden waren, eine reduzierte Menge an *FaOMT* mRNA im Vergleich zu Kontrollen (Tab. B-1). Mittels GC-MS und LC-ESI-UV-MS<sup>n</sup> wurden Profile der potentiellen *FaOMT* Substrate und Produkte erstellt. **1**, **1a** und Spuren von Vanillin sind in Kontrollfrüchten, ebenso wie **4a** und **5a** detektiert worden (Määttä-Riihinen und Mitarbeiter, 2004). Wegen der starken von „Frucht zu Frucht“ und von „Ernte zu Ernte“ Variationen der Konzentrationen der flüchtigen Verbindungen wurden die normalisierten Gehalte der Furanone (Tab. B-2) und Glucoseester berechnet, da hier die biologische Variabilität wesentlich geringer war. Kaffee- und Ferulasäure lagen um den Faktor  $10^3$  niedrigeren Konzentrationen in den Früchten vor als ihre korrespondierenden Glucoseester. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass Kaffee- und Ferulasäure nahezu vollständig zu den Glucoseestern metabolisiert werden und die relativen Gehalte dieser Ester diejenigen der Präkursor säuren widerspiegeln.

Ein Vergleich der Transkriptmengen und Metabolitenverhältnisse zeigt klar, dass transgene Pflanzen mit erheblich reduzierten Gehalten an *FaOMT* mRNA auch die geringsten relativen Mengen der methylierten Produkte **1a** und **5a** (Abb. B-9, Abb. B-10) enthalten. Daher ist *FaOMT* an beiden Pfaden des Sekundärstoffwechsels beteiligt. Änderungen in den *FaOMT* mRNA Mengen beeinflussen aber das Substrat/Produkt-Verhältnis der katalysierten Reaktion unterschiedlich. Obwohl die Reduktion von *FaOMT* mRNA zu einem nahezu vollständigen Verlust an **1a** führte, war dieser Effekt nicht bei **5a** zu beobachten. Die Expression einer zusätzlichen O-Methyltransferase, die selektiv nur Hydroxyzimtsäuren methyliert, oder in einem anderen Zellkompartiment als **1** auftritt, könnte diese Beobachtung erklären. In Walderdbeeren (*Fragaria vesca* L.) sind eine Anzahl von mRNAs charakterisiert worden, die während der Reifung exprimiert werden (Nam und Mitarbeiter, 1999). Eine dieser kodiert vermutlich für eine Kaffeesäure-CoA 3-O-Methyltransferase (CCOMT). Ein Sequenzvergleich zeigte keine hohe Identität zwischen *FaOMT* und CCOMT. Eine weitere Möglichkeit wäre der Transport von **5a** aus anderen Teilen der Pflanze in die Früchte, was den basalen Level dieses Esters erklären würde.

Obwohl die Hochregulation der *FaOMT* Transkription, bei den Linien *FaOMT* S1 und *FaOMT* S8 zu einer erhöhten relativen Menge an **5a** führte, war das normalisierte

Verhältnis der Furanone gegenüber den Kontrollen nicht verändert (Abb. B-9, Abb. B-10). Dieses Resultat ist zunächst überraschend, da der Gehalt der Glucoseester während der Fruchtreifung relativ konstant ist, während die Konzentrationen der Furanone stark ansteigen (Perez und Mitarbeiter, 1996). Eine mögliche Erklärung für das unbeeinflusste Furanonverhältnis wäre, dass **1** und **5** in verschiedenen Zellkompartimenten gebildet werden. Jedoch besitzt FaOMT keine bekannte Signalsequenz. Eine Kompensation von erhöhter FaOMT Aktivität durch stärkere Bildung von **1** ist unwahrscheinlich, da die Linien FaOMT S1 und FaOMT S8 relativ geringe absolute Mengen an Furanonen enthielten. Eine weitere mögliche Option wäre die Feedback Inhibierung von FaOMT durch **1a**. Die wahrscheinlichste Erklärung für den unerwarteten Effekt ist aber, dass **4** das bevorzugte Substrat von FaOMT ist. Dadurch würden erhöhte Mengen an FaOMT den Ferulasäuregehalt stärker betreffen, wenn **1** und **4** gleichzeitig als Substrate bereitstehen. Im Gegenzug wird die Bildung von **1a** stärker reduziert als die von Ferulasäure, wenn die FaOMT Aktivität abnimmt und **4** neben **1** als Substrat verfügbar ist.

In den Linien FaOMT AS9 und FaOMT AS3 waren die *FaOMT* mRNA-Konzentrationen um 45% bzw. 74% gegenüber den Kontrollen vermindert. Diese Reduktion reicht offensichtlich nicht aus, um eine signifikante Änderung der relevanten Metabolite herbeizuführen.

### **3 Glycosyltransferasen des Sekundärstoffwechsels von Erdbeeren – Expression und Funktion**

In Vorarbeiten wurde eine EST-Bibliothek von reifen Erdbeerfrüchten erstellt. Dafür sind aus einer cDNA Bibliothek von *Fragaria x ananassa* cv. Elsanta 1100 Klone partiell ansequenziert worden (Aharoni und Mitarbeiter, 2000; Aharoni und O'Connell, 2002). Beim Durchmustern dieser EST-Bibliothek wurden durch Abgleich der Sequenzinformationen mit den öffentlich zugänglichen Datenbanken (BLAST<sup>1</sup>; Altschul und Mitarbeiter, 1990; Altschul und Mitarbeiter, 1997) vier Klone identifiziert, die eine hohe Identität mit Glycosyltransferasen (GT) zeigten. In weitergehenden Arbeiten sollte nun versucht werden, diese Vollängenklone in Expressionsvektoren zu integrieren, die Proteine in geeigneten Expressionswirten funktionell zu exprimieren und das Substratspektrum der Enzyme zu ermitteln.

#### **3.1 Isolierung und Analyse der GT-Sequenzen**

Die vier potentiellen Glycosyltransferase cDNAs wurden mittels Primerwalking in 5'- und 3'-Richtung vollständig sequenziert und aufgrund der Ergebnisse der Datenbankabfrage mit Namen versehen (Tab. B-3). FaGT1 (*Fragaria x ananassa* Glucosyltransferase 1) zeigte höchste Identität mit mehreren UDP-Glucose:Flavonoid 3-O-Glucosyltransferasen aus *Vitis vinifera* (GenBank<sup>®</sup> Accession Numbers AF000371, AF000372, AB047090, AB047091, AB047093 und AB047097; Identität auf Aminosäurelevel 57,9 bis 59,0%). Die FaGT2-Sequenz ähnelte sehr stark einer Limonoid Glucosyltransferase aus *Citrus unshiu* (68,3 % Identität; AB033758) einer *Brassica napus* UDP-glucose:Sinapinsäure Glucosyltransferase (50,3% Identität; AF287143) und mehreren *Arabidopsis* Glucosyltransferasen (AB019232, Z97339; Identität: 49,6 bis 55,0 %). Die korrespondierenden Enzyme bilden, mit Ausnahme der Limonoid Glucosyltransferase, Glucoseester ihrer Substrate. FaGT3 zeigte höchste Identität zu drei *Nicotiana tabacum* Glucosyltransferasen und einer *Stevia rebaudiana* Glucosyltransferase (AB072918,

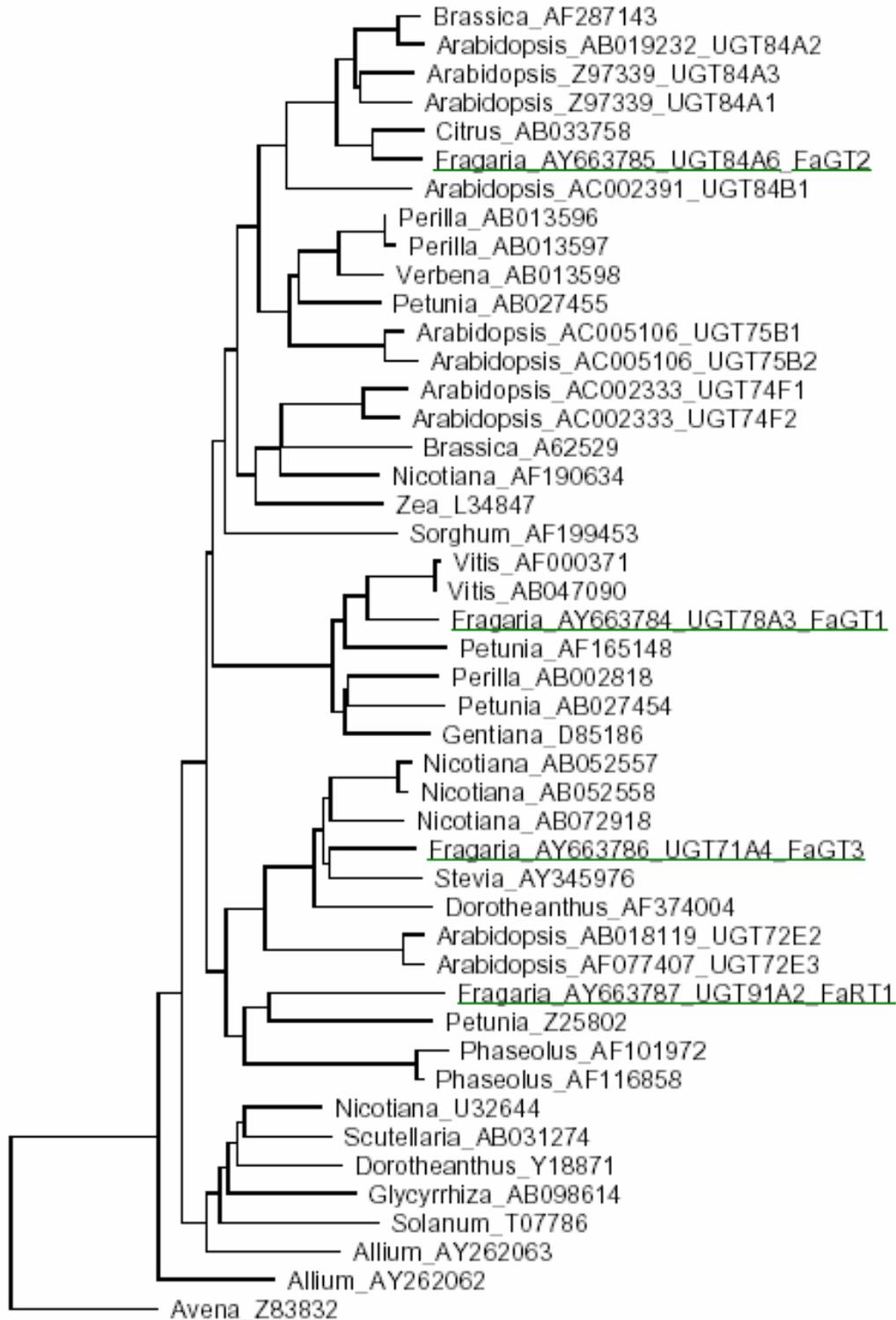
---

<sup>1</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

AB052558, AB052557, AY345976; Identität 49,4 bis 49,9%), wobei die *N. tabacum* GTs vor allem Cumarine und Flavonoide als Substrate akzeptieren. Da die FaRT1-Sequenz der einer *Petunia hybrida* Rhamnosyltransferase (Z25802; 29,5% Identität) sehr ähnelte, wurde sie als Rhamnosyltransferase bezeichnet. Untereinander wiesen die vier Glycosyltransferasen auf Aminosäureebene eine Identität von 19,0 bis 21,9 % auf. GenBank® Accession Numbers wurden den GTs zugeteilt und die Glycosyltransferasen in das Nomenklatorsystem von Mackenzie und Mitarbeiter (1997) wie in Tab. B-3 angegeben eingegliedert.

**Tab. B-3:** Interne Nomenklatur, GenBank® Accession Numbers, Nomenklatur nach Mackenzie und Mitarbeiter (1997) und Gene, die die höchsten Identitäten mit den vier klonierten Glycosyltransferasen aus *Fragaria x ananassa* aufweisen

Interne Nomenklatur	GenBank® Nucleotide Accession Number	Nomenklatur nach Mackenzie und Mitarbeiter (1997)	Identitäten
FaGT1	AY663784	UGT78A3	<i>Vitis vinifera</i> UDP-Glucose:Flavonoid 3-O-Glucosyltransferasen (Ford und Mitarbeiter, 1998)
FaGT2	AY663785	UGT84A6	Limonoid Glucosyltransferase aus <i>Citrus unshiu</i> (Kita und Mitarbeiter, 2000) <i>Brassica napus</i> UDP-glucose:Sinapinsäure Glucosyltransferase (Milkowski und Mitarbeiter, 2000) <i>Arabidopsis</i> Glucosyltransferasen (Lim und Mitarbeiter, 2001)
FaGT3	AY663786	UGT71A4	<i>Nicotiana tabacum</i> Cumarin und Flavonoid Glucosyltransferasen (Taguchi und Mitarbeiter, 2001) <i>Stevia rebaudiana</i> Glucosyltransferase (Richman und Mitarbeiter, 2005)
FaRT1	AY663787	UGT91A2	<i>Petunia hybrida</i> Rhamnosyltransferase (Brugliera und Mitarbeiter, 1994)



**Abb. B-11:** Phylogenetischer Baum der vier Glycosyltransferasen aus *Fragaria x ananassa* mit 42 charakterisierten GTs. Angegeben ist der Familienname, die GenBank® Accession Number, sowie – wenn vorhanden – die Nomenklatur nach Mackenzie und Mitarbeiter (1997) und – bei *Fragaria* – die interne Benennung.

Durch Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft und Beachtung der Identitäten der vier Glycosyltransferasen mit 42 bereits charakterisierten GTs (Abb. B-11) lässt sich eine gewisse Vorhersage bezüglich der vermuteten Substratakzeptanz der Enzyme treffen. So wird vermutet, dass FaGT1 Aktivität gegenüber Flavonoiden zeigt, FaGT2 phenolische Säuren als Substrate akzeptiert und FaGT3 entweder Flavonoide und/oder Cumarine glycosyliert. Schließlich liegt die Vermutung nahe, dass FaRT1 UDP-Rhamnose als Zuckersubstrat verwendet. Diese Vorhersagen sind aber immer fehlerhaft, so dass es notwendig ist, die entsprechenden Proteine heterolog zu exprimieren und deren Substratspezifität einzeln zu testen.

Die Größe der kodierenden Regionen der jeweiligen GTs und das abgeleitete Molekulargewicht der entsprechenden Proteine sind in Tab. B-4 angegeben. Die jeweiligen Aminosäuresequenzen mit den PSPG-Boxen und den konservierten Aminosäuren sind in Abb. B-12, Abb. B-13, Abb. B-14 und Abb. B-15 zu erkennen. FaGT2 ist dahingehend etwas ungewöhnlich, da sie zusätzliche Aminosäurereste am C-Terminus aufweist und dadurch auch etwas größer ist, als für Glycosyltransferasen üblich.

**Tab. B-4:** Offener Leserahmen (ORF), Anzahl der Aminosäuren und errechnetes Molekulargewicht der klonierten Glycosyltransferasen

Name	ORF [bp]	Aminosäuren	errechnetes Molekulargewicht [kDa]
FaGT1	1401	466	50,455
FaGT2	1668	555	61,387
FaGT3	1437	478	52,795
FaRT1	1437	478	54,270

1	MAPVSNQVGG	HVAVLAFPPS	THAAPLLNIV	CRLAAAAPST	LFSFFNTKQS	NSSILAGNTS
61	VLRYSNVSV	EVADGVPEGY	VFVGKQEDI	ELFMKAAPDN	FRRCLEASVA	ESGREVSCLV
121	TDAFFWFGVH	MADDMGGVPW	VPFWTAGPAS	LSAHVHTDLI	RSTTSGGCHD	EKETITVIAG
181	MSKVRPQDL	EGIIIFGNLES	LFSRMLHQMG	QMPPLATAVF	INSFEELDPV	ITNDLKSKFK
241	RFLNVGPLDL	LEPPASAATT	TPQTAAEAVA	GDGCLSWLDE	QKVASVVYVS	FGSVTRPSPE
301	ELMALAEALE	ASRVPFWLSL	RDNLKNRQLD	EFLSKGKLNG	MVVP <u>WAPQPQ</u>	<u>VLAHGSVGA</u>
361	<u>VT<u>HCGWNS</u>V</u> L	ESVAGGVPLI	CRPFFGD <u>Q</u> KL	NARMVEDVWK	IGLRLEGGVF	TKNGMLKSLD
421	MLLSQDKGTK	MKNKINTLKQ	FAKQAVEPKG	SSARNFESLL	EMTTTN	

**Abb. B-12:** Aminosäuresequenz von FaGT1. Hervorgehoben ist die PSPG-Box nach Hughes und Hughes (1994) mit den hochkonservierten Aminosäuren (fett) in der Box.

```

1 MGSESLVHVF LVSFIGQGHV NPLLRLGKRL AAKGLLVTFC TAECVKGEMR KSNGITDEPK
61 PVGDGFIRFE FFKDRWAEDE PMRQDLDLYL PQLELVGKEV IPEMIKKNAE QGRPVSCLIN
121 NPFIPWVCDV AESLGLPSAM LWVQSAACLA AYYHYYHGLV PFPSESDMFC DVQIPSMPLL
181 KYDEVPSFLY PTSPYPFLRR AILGQYGNLE KPFCILMDTF QELESEIEIEY MARLCPIKAV
241 GPLFKNPKAQ NAVRGDFMEA DDSIIGWLDT KPKSSVVYIS FGSVVYLKQE QVDEIAHGLL
301 SSGVSFIWVM KPPHPDSGFE LLVLPEGFLE KAGDRGKVVO WSPQEKILEH PSTACFVTHC
361 GWNSTMESLT SGMPVVAFPQ WGDQVTDAKY LVDEFKVGVR MCRGEAEDRV IPRDEVKCL
421 LEATSGSKAA EMKQNALKWK AAAEAAFSEG GSSDRNLQAF VDEVRRISAS LNSKSSAVGY
481 VKSKINGVVE YVDSKLNKKA APVEEANTRT NGIAKVEQPK AANGKVEIAE LTPINGKVEI
541 AELKPINGKV ELVES

```

**Abb. B-13:** Aminosäuresequenz von FaGT2. Hervorgehoben ist die PSPG-Box nach Hughes und Hughes (1994) mit den hochkonservierten Aminosäuren (fett) in der Box.

```

1 MEKPAELVLI PSPGIGHLVS TLEIAKLLVS RDDKLFITVL IMHFFAVSKG TDAYVQSLAD
61 SSSPISQRIN FINLPHTNMD HTEGSRVNSL VGFVESQQPH VKDAVANLRD SKTTRLAGFV
121 VDMFCTTMIN VANQLGVPSY VFFTSGAATL GLLFHLQELR DQYNKDCTEF KDSDAELIIP
181 SFFNPLPAKV LPGRMLVKDS AEPFLNVIKR FRETKGILVN TFTDLESHAL HALSSDAEIP
241 PVYFVGPLLN LNSNESRVDS DEVKKKNDIL KWLDDQPPLS VVFLCFGSMG SFDESQVREI
301 ANALEHAGHR FLWSLRRSPP TGKVAFPSDY DDHTGVLPEG FLDRTGGIGK VIGWAPQVAV
361 LAHPSVGGFV SHCGWNSTLE SLWHGVPVAT WPLYAEQQLN AFQPVKELEL AVEIDMSYRS
421 KSPVLVSAKE IERGIREVME LDSSDIRKRV KEMSEKGGKA LMDGGSSYTS LGHFIDQI

```

**Abb. B-14:** Aminosäuresequenz von FaGT3. Hervorgehoben ist die PSPG-Box nach Hughes und Hughes (1994) mit den hochkonservierten Aminosäuren (fett) in der Box.

```

1 MSSSSATKRK KLHIALFPWL AFGHIIPFLE VAKHIARKGH KVSFISTPRN IQRLPKIPET
61 LTPLINLVQI PLPHVENLPE NAEATMDVPH DVIPYLKIAH DGLEQGISEF LQAQSPDWII
121 HDFAPHWLPP IATKLGISNA HFSIFNASSM CFFGSTSPNR VSRYPARKKL EQFTSPPEWI
181 PFPSKIYHRP FEAKRLMDGT LTPNASGVTD RFRLESTIQG CQVYFIRSCR EIEGEWLDLL
241 EDLHEKPIVL PTGLLPPLSL RSDDEDGGKDS NWSKIAVWLD KQEKGKVVYA AFGSELNLSQ
301 EVFNELALGL ELSGLPFFWV LRPKSHGSGD GDSVKLPDGF EDRVKGRGLV WTTWAPQLKI
361 LSHESVGGFL THCGWSSIIE SLQYGCPLIM LPFMYDQGLI ARFWDNKIGA EVPRDEETGW
421 FTRNELANSL KLIVVDEEGK QYRDGANEYS KLFRDKELHD RYMDECVEYL ETHAHHEV

```

**Abb. B-15:** Aminosäuresequenz von FaRT1. Hervorgehoben ist die PSPG-Box nach Hughes und Hughes (1994) mit den hochkonservierten Aminosäuren (fett) in der Box.

### 3.2 Herstellung rekombinanter Fusionsproteine

Alle vier offenen Leseraster (ORF) wurden nach dem vollständigen Sequenzieren *in frame* in den Expressionsvektor pRSET B (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) kloniert. Dafür mussten jeweils nach dem Start- und vor dem Stopcodon verschiedene Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen inseriert werden, um die internen Start- und Stoppsignale zu entfernen. Es waren dies für FaGT1 (BamH I/Sal I), FaGT2 (BamH I/Hind III), FaGT3 (BamH I/Xho I) und FaRT1 (BamH I/Sal I). Nach einer Zwischenklonierung in den Arbeitsvektor pGEM T und dem Ausschneiden der Sequenzen mit den entsprechenden Restriktionsenzymen wurden die kompletten ORF jeweils in den linearisierten Expressionsvektor pRSET B kloniert. Dieser besitzt am 5'-terminalen Ende, nach dem Startcodon sechs Histidinreste (HisTag<sup>®</sup>). Weiter in 3'-Richtung gelegen schließt sich der ORF der entsprechenden Glycosyltransferase an. Somit wurde gewährleistet, dass nach der Expression ein Fusionsprotein, bestehend aus der jeweiligen Glycosyltransferase und dem HisTag<sup>®</sup> entsteht. Nach Transformation der entsprechenden Konstrukte in kompetente *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen (Invitrogen) wurde der Leserahmen der Sequenz überprüft. *E. coli* BL21-Zellen eignen sich besonders gut für die heterologe Expression, da sie sich aufgrund verminderter Proteaseaktivität rekombinante Proteine nur in geringem Maße abbauen. Die Expression des Fusionsproteins wurde durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG) bei 16-19 °C induziert, nachdem eine Mindestmenge an Zellen herangewachsen war. Die niedrige Expressionstemperatur war höheren Temperaturen (30 °C und 37 °C) vorzuziehen, da dadurch die Menge an aktivem Protein gesteigert werden konnte. Bedingt durch die langsamere Proteinsynthese lagen größere Mengen des Enzyms in nativer und somit funktionell aktiver Konformation vor (Ford und Mitarbeiter, 1998). Die Zellen wurden abzentrifugiert, mechanisch aufgeschlossen und der Rohextrakt mittels Affinitätschromatographie an Talon<sup>™</sup> Cobalt-Harz aufgereinigt. Die Reinheit der Proteine ist durch Auftrennung mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung bzw. Western-Blot überprüft worden.

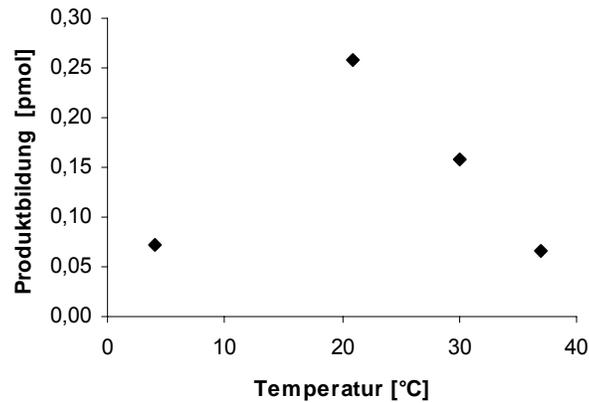
Erste, vorläufige Untersuchungen der enzymatischen Aktivität der vier potentiellen Glycosyltransferasen bewiesen das Vorliegen von aktivem FaGT2-Protein. Daher wurde dieses Enzym näher charakterisiert.

### 3.3 Biochemische Charakterisierung von FaGT2

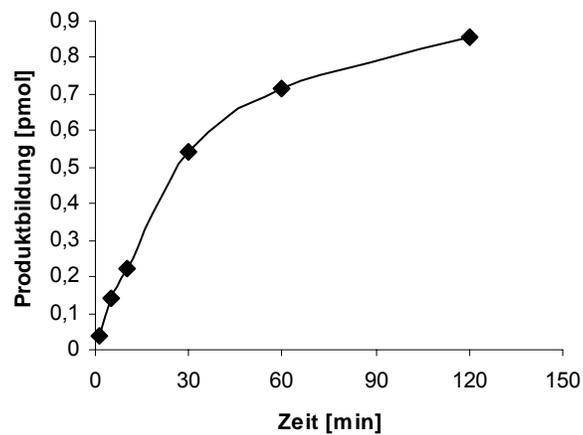
#### 3.3.1 Temperaturoptimum, Reaktionszeit, pH-Optimum

Für die biochemische Charakterisierung von FaGT2 wurde der aufgereinigte Proteinextrakt mit Substraten umgesetzt, deren korrespondierende Glycoside oder Glucoseester entweder bereits in Erdbeerfrüchten detektiert worden waren, oder die aufgrund der Ergebnisse des phylogenetischen Baumes und der BLAST-Abfrage ein positives Ergebnis erwarten ließen.

Zur Bestimmung der Glucosyltransferaseaktivität ist ein Radioaktivitätstest unter Verwendung von UDP-[6-<sup>3</sup>H]-Glucose (UDPG\*) eingesetzt worden. Potentielle Substrate wurden der gepufferten Proteinlösung zugesetzt und zusammen mit UDPG\* inkubiert. Gebildete radioaktiv markierte Glucoside oder Glucoseester konnten mittels Butanol extrahiert und durch Szintillationsmessung quantifiziert werden. Vorläufige Ergebnisse zeigten, dass Zimtsäure ein gutes Substrat für FaGT2 darstellt, weswegen diese Säure zur Ermittlung des Temperaturoptimums der enzymatischen Reaktion verwendet wurde. Die höchste Produktbildung wurde bei 21 °C erzielt, wogegen bei höheren und niedrigeren Temperaturen eine partielle Inaktivierung des Enzymes erfolgte (Abb. B-16). Weiterhin ist eine Zeitstudie durchgeführt worden, um den linearen Bereich der Produktbildung und damit konstanten Reaktionsgeschwindigkeit zu ermitteln. Enzymatische Reaktionen verlaufen anfänglich linear, nach einiger Zeit ist jedoch eine Abnahme der Umsetzungsgeschwindigkeit zu beobachten. Die Produktbildung verlief für FaGT2 bis 30 Minuten linear, wonach ein deutliches Abflachen des Graphen zu erkennen war (Abb. B-17). Daher wurde für alle folgenden Untersuchungen eine Inkubationszeit von 30 Minuten gewählt, um eine ausreichend große Menge an Produkt bei konstanter Reaktionsgeschwindigkeit zu gewährleisten. Durch Verwendung verschiedener Puffersysteme konnte ein pH-Optimum von pH 8,0 ermittelt werden.



**Abb. B-16:** Produktbildung nach Inkubation von 40  $\mu\text{M}$  Zimtsäure mit 83 nCi ( $1,389 \cdot 10^{-3}$  nmol) UDPG\* pro Ansatz bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten.



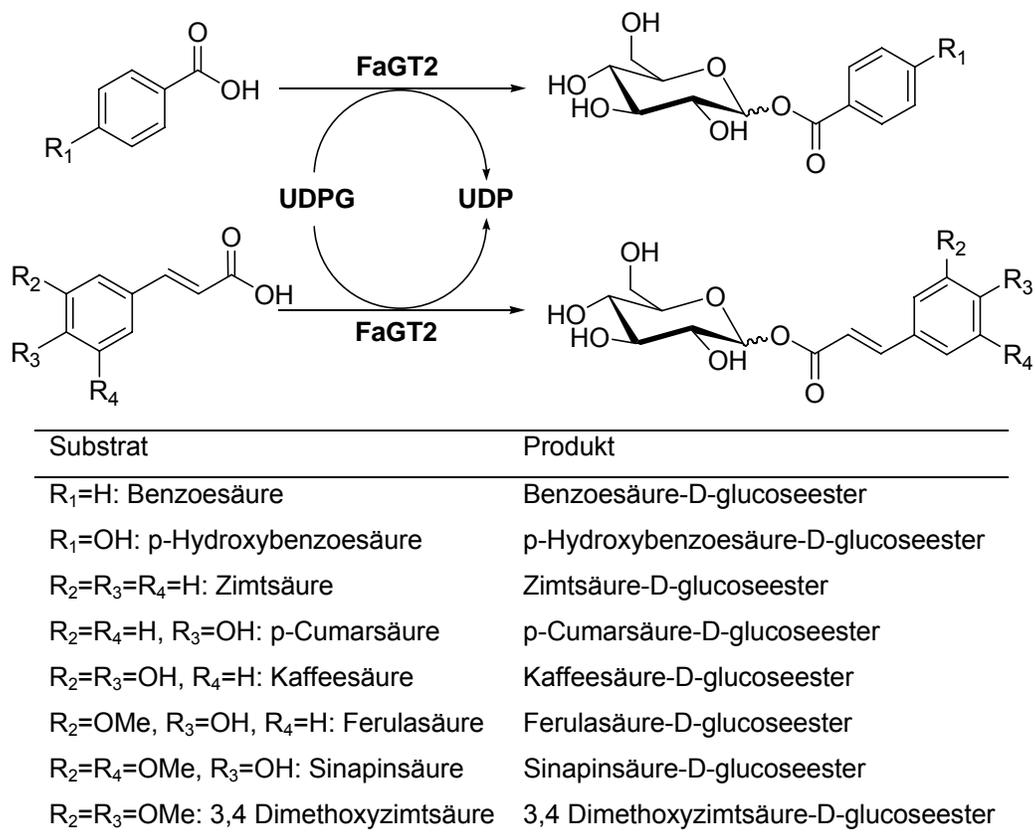
**Abb. B-17:** Produktbildung nach Inkubation von 400  $\mu\text{M}$  Zimtsäure mit 83 nCi ( $1,389 \cdot 10^{-3}$  nmol) UDPG\* pro Ansatz bei einer Inkubationstemperatur von 21 °C

### 3.3.2 Substrate zur Bestimmung der Substratspezifität

Zur Bestimmung der Substratspezifität von FaGT2 ist das rekombinante Enzym bei optimalen Reaktionsbedingungen mit 35 verschiedenen Verbindungen umgesetzt worden. Von den getesteten Substraten wurden 15 akzeptiert, einschließlich Benzoe- und Zimtsäure und deren Derivate (Abb. B-18), wogegen 20 nicht umgesetzt wurden,

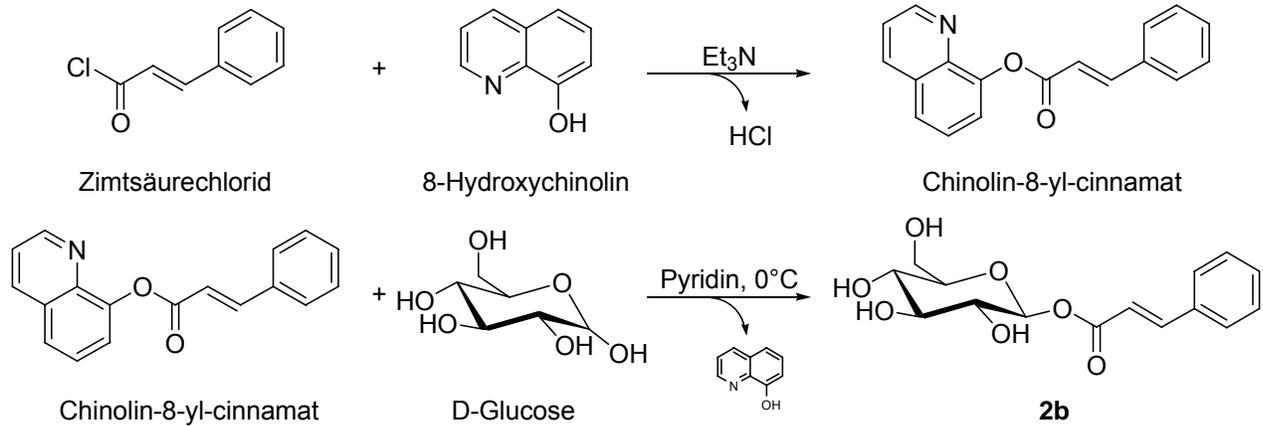
wie verschiedene Flavonoide (Quercetin, Kämpferol, Pelargonidin), Alkohole (Benzylalkohol, 2-Phenylethanol), aliphatische Säuren (2-Methylbuttersäure, Hexansäure, Abscisinsäure), aromatische Säuren (Indolessigsäure, Naphthylelessigsäure, o-Cumarsäure, Salicylsäure, 2-Aminobenzoessäure, Gallussäure, Gentsinsäure, Phenylelessigsäure), Phenol und **1**. Limonin zeigte nur äußerst geringe Aktivität mit FaGT2. Lediglich Verbindungen, die sowohl eine Carboxygruppe als auch ein aromatisches Ringsystem tragen, wurden von FaGT2 umgesetzt. Substituenten am Aromaten wurden nur toleriert, wenn sie nicht in ortho-Position stehen. So stellten 3- und 4-Hydroxy-, sowie 3- und 4-Aminobenzoessäure und p-Cumarsäure gute Substrate dar, während 2-Hydroxy- und 2-Aminobenzoessäure und o-Cumarsäure nicht glucosyliert wurden. FaGT2 wies eine strikte Regioselektivität auf, wie bereits für andere Glucosyltransferasen beobachtet wurde (Lim und Mitarbeiter, 2002). Proteinextrakte aus *E. coli*, die den leeren pRSET B Vektor enthielten zeigten keine Aktivität gegenüber den getesteten Substraten. Wenn UDPG oder der Akzeptor weggelassen wurden konnte keine Produktbildung beobachtet werden. Die Enzymaktivität ließ sich durch 5-minütige Erhitzung komplett inhibieren.

Zur Identifizierung der Produkte wurde das vermutete Produkt Zimtsäure- $\beta$ -D-glucoseester **2b** synthetisiert (Plusquellec und Mitarbeiter, 1986). Für die Synthese ist Zimtsäurechlorid mit 8-Hydroxychinolin zum Chinolin-8-yl-cinnamat umgesetzt worden. Nach Abtrennung von Nebenprodukten mittels Säulenchromatographie wurde mit D-Glucose **2b** gebildet (Abb. B-19). Nach Aufreinigung an einer C-18 Säule und Charakterisierung des Syntheseproduktes mittels  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR sind die mittels LC-UV-ESI-MS<sup>n</sup> ermittelten chromatographischen und massenspektrometrischen Charakteristika mit denen des Enzymprodukts verglichen worden. Die Daten waren identisch.



**Abb. B-18:** Chemische Struktur einiger Substrate und Produkte von FaGT2. FaGT2 kann unter Verwendung von UDP-aktivierter Glucose Benzoe- und Zimtsäure, sowie deren Derivate zu den entsprechenden Glucoseestern umsetzen. UDP (Uridindiphosphat), UDPG (Uridindiphosphatglucose).

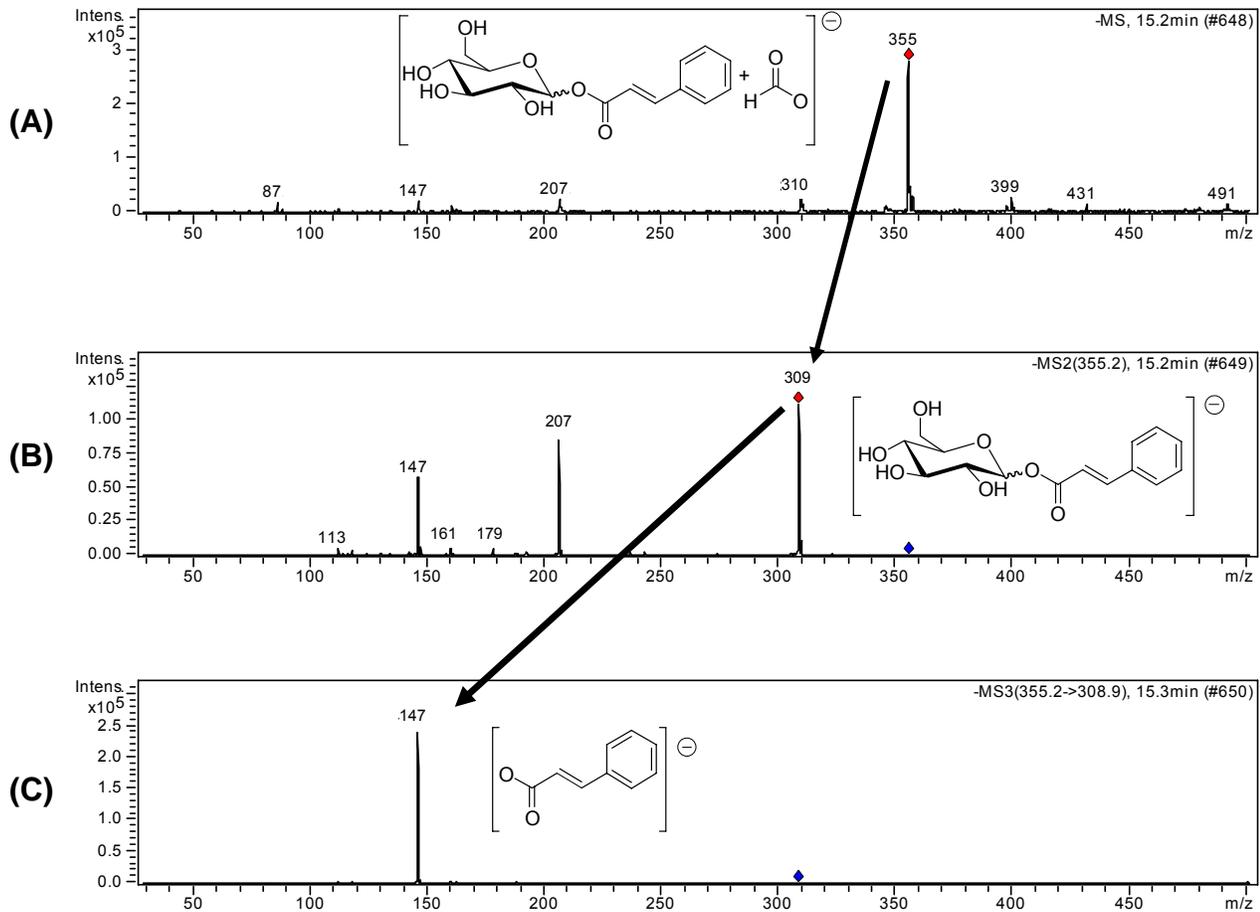
Die massenspektrometrische Analyse zeigte, dass **2a** bzw. **2b** ein Addukt mit Ameisensäure  $[M + HCOO]^-$  mit  $m/z$  355 bildet, welches im  $MS^2$  gespalten wird (Abb. B-20). Produkte sind dabei das Pseudomolekülion  $[M - H]^-$  von **2a** (bzw. **2b**) mit  $m/z$  309 und das Anion von Zimtsäure  $[M - Glucose]^-$  mit  $m/z$  147. Die Fragmentierung des Pseudomolekülions in einem  $MS^3$  Experiment ergab nur das Anion von Zimtsäure  $[M - Glucose]^-$  mit  $m/z$  147. Die Fragmentierungsmuster der weiteren Substrate sind der Tab. B-5 zu entnehmen. Verbindungen, die keine phenolische Hydroxyfunktion tragen bilden im MS-Experiment das Ameisensäureaddukt, während Phenolderivate vermutlich als Phenolate vorliegen.



**Abb. B-19:** Zweistufige Synthese von Zimtsäure- $\beta$ -D-glucoseester (**2b**) nach Plusquellec und Mitarbeiter (1986).

Zum Beweis der Esterbindung wurden die Produkte der enzymatischen Umsetzung jeweils vor und nach alkalischer Hydrolyse mittels Radio-HPLC untersucht. Nach Alkalibehandlung sind die Produkte nicht mehr nachzuweisen, was auf die Anwesenheit von Esterbindungen hindeutet (Abb. B-21). Offensichtlich wird aber von FaGT2 nicht nur ein Glucoseester gebildet, sondern mehrere verschiedene, wie dies die drei Signale um 20 Minuten im Chromatogramm anzeigen. Es handelt sich hierbei vermutlich um Positionsisomere von **2a**, deren Bildung auch von einer anderen Gruppe beobachtet wurde (Jackson und Mitarbeiter, 2001).

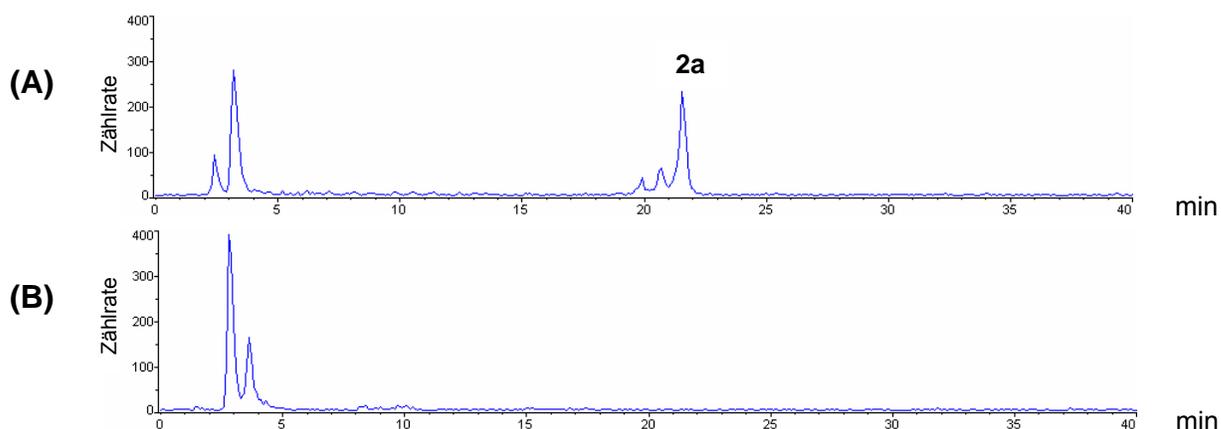
Die Umsetzungsraten sind für alle positiv getesteten Substrate bei verschiedenen Konzentrationen ermittelt und die daraus resultierenden kinetischen Parameter bestimmt worden. Da bei allen Experimenten UDPG\* in konstanter Konzentration eingesetzt wurde, konnte die Michaelis-Menten Gleichung herangezogen werden. Sie liefert nach Linearisierung gemäß der Methode von Hanes die substratspezifischen Konstanten  $K_m$  und  $V_{max}$ . Von allen positiv getesteten Substraten wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Konzentrationen gemessen und die spezifischen Parameter ermittelt.



**Abb. B-20:** LC-UV-ESI-MS<sup>n</sup> Untersuchung des FaGT2 Enzymproduktes aus Zimtsäure und UDP-Glucose. Massenspektrum (MS) von Zimtsäure-D-glucoseester als Ameisensäureaddukt mit  $m/z$  355 (A). Fragmentierung von  $m/z$  355 im MS<sup>2</sup> zum Zimtsäure-D-glucoseester-Anion (B) sowie Fragmentierung von  $m/z$  309 im MS<sup>3</sup> zum Zimtsäureanion mit  $m/z$  147 (C). Das Massenspektrum des Syntheseproduktes **2b** (Abb. B-19) ist identisch.

**Tab. B-5:** Fragmentierungsmuster von Glucoseestern und den entsprechenden aromatischen Säuren. Angegeben sind die Namen der Verbindungen, die Retentionszeiten ( $T_R$ ) unter LC-Bedingungen, wie im Experimententeil beschrieben, und die Fragmentionen mit den Intensitäten in Prozent, die bei den MS, MS<sup>2</sup> und MS<sup>3</sup>-Experimenten erhalten wurden.

Verbindung	$T_R$ [min]	MS	MS <sup>2</sup>	MS <sup>3</sup>
Zimtsäure-D-glucoseester	15,2	355, 100% [M+HCOO] <sup>-</sup>	309, 100% [M-H] <sup>-</sup> 207, 70% 147, 60% [Aglykon] <sup>-</sup>	147, 100%, [Aglykon] <sup>-</sup>
p-Cumarsäure-D-glucoseester	12,4	325, 100% [M-H] <sup>-</sup>	163, 100%, [Aglykon] <sup>-</sup> 145, 90% 187, 85%	119, 100% [Aglykon-COO] <sup>-</sup>
Kaffeesäure-D-glucoseester	11,4	341, 100% [M-H] <sup>-</sup>	179, 100% [Aglykon] <sup>-</sup> 161, 30% 203, 15%	135, 100% [Aglykon-COO] <sup>-</sup>
Ferulasäure-D-glucoseester	12,8	355, 100% [M-H] <sup>-</sup>	193, 100% [Aglykon] <sup>-</sup> 217, 75% 175, 25%	149, 100% [Aglykon-COO] <sup>-</sup>
Sinapinsäure-D-glucoseester	12,9	385, 100% [M-H] <sup>-</sup>	223, 100% [Aglykon] <sup>-</sup> 247, 90% 205, 50%	205, 100% 179, 98%, [Aglykon-COO] <sup>-</sup> 126, 20%
Benzoessäure-D-glucoseester	10,0	329, 100% [M+HCOO] <sup>-</sup>	121, 100% [Aglykon] <sup>-</sup>	
4-Hydroxybenzoessäure-D-glucoseester	10,2	299, 100% [M-H] <sup>-</sup>	137, 100% [Aglykon] <sup>-</sup> 179, 45% 239, 40%	93, 100% [Aglykon-COO] <sup>-</sup>
Zimtsäure	19,1	147, 100% [M-H] <sup>-</sup>	103, 100% [M-COO] <sup>-</sup>	-
p-Cumarsäure	15,2	163, 100% [M-H] <sup>-</sup>	119, 100% [M-COO] <sup>-</sup>	-
Kaffeesäure	13,6	179, 100% [M-H] <sup>-</sup>	135, 100% [M-COO] <sup>-</sup>	-
Ferulasäure	15,7	193, 100% [M-H] <sup>-</sup>	149, 100% [M-COO] <sup>-</sup> 134, 75% 178, 60%	-
Sinapinsäure	15,6	223, 100% [M-H] <sup>-</sup>	163, 100% 208, 90% 179, 50% [M-COO] <sup>-</sup>	-
Benzoessäure	16,2	121, 100% [M-H] <sup>-</sup>	-	-
4-Hydroxybenzoessäure	12,2	137, 100% [M-H] <sup>-</sup>	93, 100% [M-COO] <sup>-</sup>	-



**Abb. B-21:** Radio-HPLC Chromatogramm eines Enzymassays vor (A) und nach (B) alkalischer Hydrolyse. Zimtsäure-D-glucoseester (**2a**) wird nach einstündiger Behandlung mit 0,1 M NaOH komplett gespalten. Die weiteren Signale repräsentieren vermutlich Isomere von **2a**, was bereits von einer anderen Arbeitsgruppe beobachtet wurde (Jackson und Mitarbeiter, 2001).

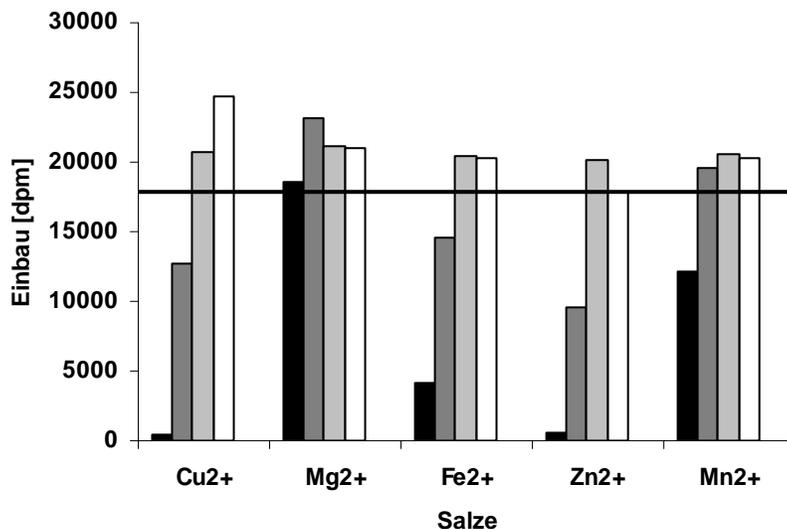
m

**Tab. B-6:** Kinetische Parameter  $K_m$  (Michaelis-Konstante),  $V_{max}$  (max. Umsatzgeschwindigkeit) und  $K_{cat}/K_m$  (Wechselzahl/Michaelis-Konstante) der rekombinanten FaGT2.

Substrat	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{max}$ [nkat $\text{mg}^{-1}$ ]	$K_{cat}/K_m$ [ $\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ]	Produkt
Zimtsäure	356,9±82,1	2,34±0,53	0,42	Zimtsäure-D-glucoseester
p-Cumarsäure	603,5±120,7	2,69±0,54	0,29	p-Cumarsäure-D-glucoseester
Kaffeesäure	707,7±127,3	2,59±0,46	0,24	Kaffeesäure-D-glucoseester
Ferulasäure	358,5±71,0	1,65±0,31	0,30	Ferulasäure-D-glucoseester
5-Hydroxyferulasäure	315,7±37,8	2,24±0,33	0,05	5-Hydroxyferulasäure-D-glucoseester
Sinapinsäure	300,2±42,1	1,21±0,17	0,26	Sinapinsäure-D-glucoseester
Benzoessäure	502,6±55,2	1,08±0,12	0,14	Benzoessäure-D-glucoseester
3-Hydroxybenzoessäure	464,4±55,7	1,05±0,13	0,15	3-Hydroxybenzoessäure-D-glucoseester
4-Hydroxybenzoessäure	642,4±89,5	0,77±0,11	0,07	4-Hydroxybenzoessäure-D-glucoseester
Vanillinsäure	515,3±97,4	1,69±0,30	0,21	Vanillinsäure-D-glucoseester
3,4-Dimethoxyzimtsäure	108,0±14,0	0,68±0,09	0,41	3,4-Dimethoxyzimtsäure-D-glucoseester
Phenylpropionsäure	411,2±45,2	0,17±0,02	0,03	Phenylpropionsäure-D-glucoseester
Phenylbuttersäure	431,0±56,0	0,22±0,03	0,03	Phenylbuttersäure-D-glucoseester
3-Aminobenzoessäure	488,2±61,1	0,75±0,09	0,09	3-Aminobenzoessäure-D-glucoseester
4-Aminobenzoessäure	437,1±78,7	1,73±0,32	0,25	4-Aminobenzoessäure-D-glucoseester
UDPG (mit Zimtsäure)	80,8±9,7	4,88±0,57	3,89	Zimtsäure-D-glucoseester

Wie aus Tab. B-6 hervorgeht, bewegen sich die Michaelis-Konstanten im Bereich von 108 bis 708  $\mu\text{M}$ . Dabei weist 3,4-Dimethoxyzimtsäure die höchste Affinität zum Enzym auf (niedrigster  $K_m$ -Wert), während p-Cumarsäure und Kaffeesäure mit  $V_{\text{max}}$ -Werten von 2,69 bzw. 2,59 nkat/mg Protein am schnellsten umgesetzt werden. Im Allgemeinen sind die Umsetzungsraten für die Säuren der Phenylpropanoide am höchsten.

Die Zugabe von Salzen im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,1 mM zum gepufferten Standardassay hatte nur einen leichten Effekt auf die Glucosylierung von Zimtsäure. Die Zugabe von 1 mM  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  führte zu einem Verlust von 30 – 50 % der Aktivität. Der Zusatz von 10 mM  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  verursachte einen Aktivitätsverlust von mehr als 90%,  $\text{Fe}^{2+}$  einen Verlust von 60 % und  $\text{Mn}^{2+}$  einen Verlust von 30%. Kein Effekt konnte bei der Zugabe von 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  zu dem Assay (Abb. B-22) beobachtet werden.



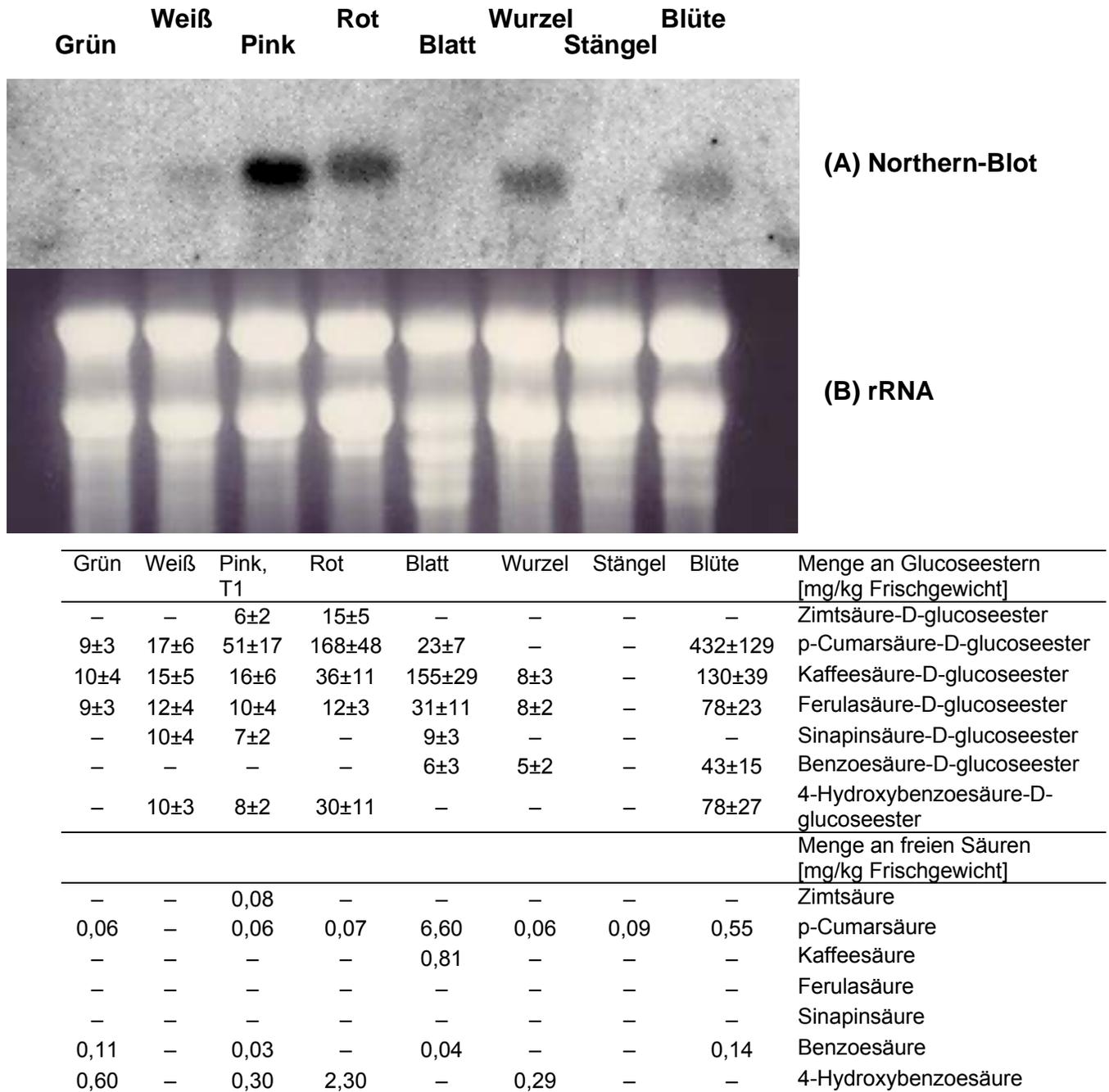
**Abb. B-22:** Einbau von Radioaktivität in die Produkte in Standardassays bei Salzkonzentrationen von 10 mM (■) 1 mM (■) 0,1 mM (■) und 0,01 mM (□). Die schwarze Linie repräsentiert den Einbau von Radioaktivität in Standardassays ohne zusätzliche Salzzugabe.

### 3.4 *FaGT2* Expression und Korrelation der entsprechenden Metabolite

Um die gewebespezifische und zeitliche Expression von *FaGT2* zu untersuchen ist eine Northern-Analyse an acht verschiedenen Erdbeergeweben durchgeführt worden. Dafür wurde RNA aus Wurzeln, Stängeln, Blättern, Blüten, grünen Früchten, weißen Früchten, rot werdenden Früchten und reifen, roten Früchten isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit einer für *FaGT2* spezifischen, radioaktiv markierten Sonde analysiert.

Abb. B-23 zeigt, dass die Transkripte in Blättern und Stängeln kaum, aber in Früchten, Wurzeln und Blüten merklich exprimiert wurden. Die Expression stieg während der Fruchtentwicklung an, mit einem Maximum bei den rot werdenden (Pink, T1) Früchten.

Um die Ergebnisse der Northern-Analyse mit der Menge an freier und glucosidisch gebundener Zimt- und Benzoessäure und deren Derivaten zu vergleichen, wurden methanolische Extrakte von allen Pflanzenteilen hergestellt und die Metabolite mittels LC-UV-ESI-MS<sup>n</sup> quantifiziert. Die Identität der Verbindungen ist anhand der enzymatisch hergestellten Glucoseester der verschiedenen Säuren bestätigt worden. Die Abb. B-23 verdeutlicht, dass die Konzentration der aromatischen Säuren, welche als Glucoseester gebunden vorliegen, diejenige der freien Säuren um den Faktor 100 übersteigt. Die Gehalte an Zimtsäure-, p-Cumarsäure-, Kaffeesäure- und p-Hydroxybenzoessäure-D-glucoseester steigen während der Fruchtreifung an, was auf eine reifungskorrelierte Bildung schließen lässt. Blätter und speziell Blüten enthalten die höchsten Mengen an Glucoseestern, geringere Mengen wurden in Wurzeln und Stängeln detektiert.



**Abb. B-23:** Northern-Analyse von Erdbeerfrüchten (Elsanta) in verschiedenen Reifungsstadien, Wurzeln, Stängeln, Blättern und Blüten (A). Gleiche Mengen an RNA wurden aufgetragen, was durch die Intensität der rRNA Banden vor dem Blotten bestätigt wird (B). Die Ergebnisse der Northern-Analyse wurden mit den Resultaten der Quantifizierung der freien und glucosylierten Zimt- und Benzoessäuren verglichen (– = nicht nachweisbar)

### 3.5 Transgene Erdbeeren zur Funktionsanalyse von FaGT2

Um die Funktion von FaGT2 *in planta* zu untersuchen wurden transgene Erdbeerpflanzen hergestellt, die das *FaGT2* Gen in Sinn- oder Gegensinn-Richtung enthielten. Die Auswirkungen einer Hoch- bzw. Herabregulierung von *FaGT2* sind mittels LC-UV-ESI-MS<sup>n</sup> ermittelt worden.

#### 3.5.1 Herstellung der transgenen Erdbeeren und Quantifizierung der Transkripte

Erdbeeren (*Fragaria x ananassa*) cv. Calypso wurden mittels *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 Zellen transformiert, welche einen Abkömmling des pBINPLUS Vektors enthielten (Van Engelen und Mitarbeiter, 1995). Dieser Vektor trug das *FaGT2* Gen entweder in Sinn- oder Gegensinn-Orientierung unter der Kontrolle des CaMV 35S Promoters. Ungefähr 100 Blattscheiben wurden pro Konstrukt transformiert. Aus diesen konnten etwa jeweils 20 Pflanzen regeneriert werden, welche auf ihre *FaGT2* Transkript-Gehalte hin untersucht wurden. Die relativen *FaGT2* mRNA Mengen in roten Früchten und Blättern sind mittels TaqMan<sup>®</sup> Real Time PCR quantifiziert worden. Um die Menge an Proben-mRNA zu standardisieren wurde eine endogene cDNA als Kontrolle amplifiziert. Dieses Gen kodiert ein DNA-Bindungsprotein, das in verschiedenen Erdbeergeweben und Reifungsstadien annähernd konstant exprimiert wird (Schaart und Mitarbeiter, 2002). Die *FaGT2* mRNA Mengen wurden in Früchten von Linien bestimmt, die das Gegensinn-Konstrukt enthielten und gegenüber der Menge der *dbp* mRNA standardisiert wurden. Für die Sinn-Linien wurden Blätter zur Analyse der Transkriptmengen herangezogen, da die Expressionsdaten von *FaGT2* bereits zeigten, dass *FaGT2* nur in reifenden Früchten, Wurzeln und Blüten exprimiert wird. Ein Anstieg der *FaGT2* mRNA in den Blättern von Sinn-Linien kann deshalb einfach detektiert werden. Anschließend wurden die relativen Gehalte gegenüber Kontrollfrüchten und Blättern ermittelt (Tab. B-7). Die relativen Mengen der Sinn *FaGT2* mRNA in Blättern transgener Pflanzen variierten von 855 bis 17 318. Drei der vier Linien, die mit dem Gegensinnkonstrukt transformiert waren zeigten geringere Gehalte an *FaGT2* Transkripten in den Früchten als die Kontrollen. Eine Gegensinn-Linie enthielt

höhere Gehalte an *FaGT2* mRNA. Die Ursache dieser Erhöhung bleibt unklar. Alle Pflanzen zeigten normalen Wuchs, mit durchschnittlich großen Früchten.

**Tab. B-7:** Relative Quantifizierung von *FaGT2* Transkripten in Sinn- (A) und Gegensinn-Linien (B). Bestimmung in transgenen Erdbeerblättern bzw. -früchten unter Verwendung der vergleichenden  $C_T$ -Methode. Jeder  $C_T$ -Wert wurde in drei separaten QRT-PCR Reaktionen bestimmt. Der Expressionslevel von *dbp* diente als interne Kontrolle.

**(A)**

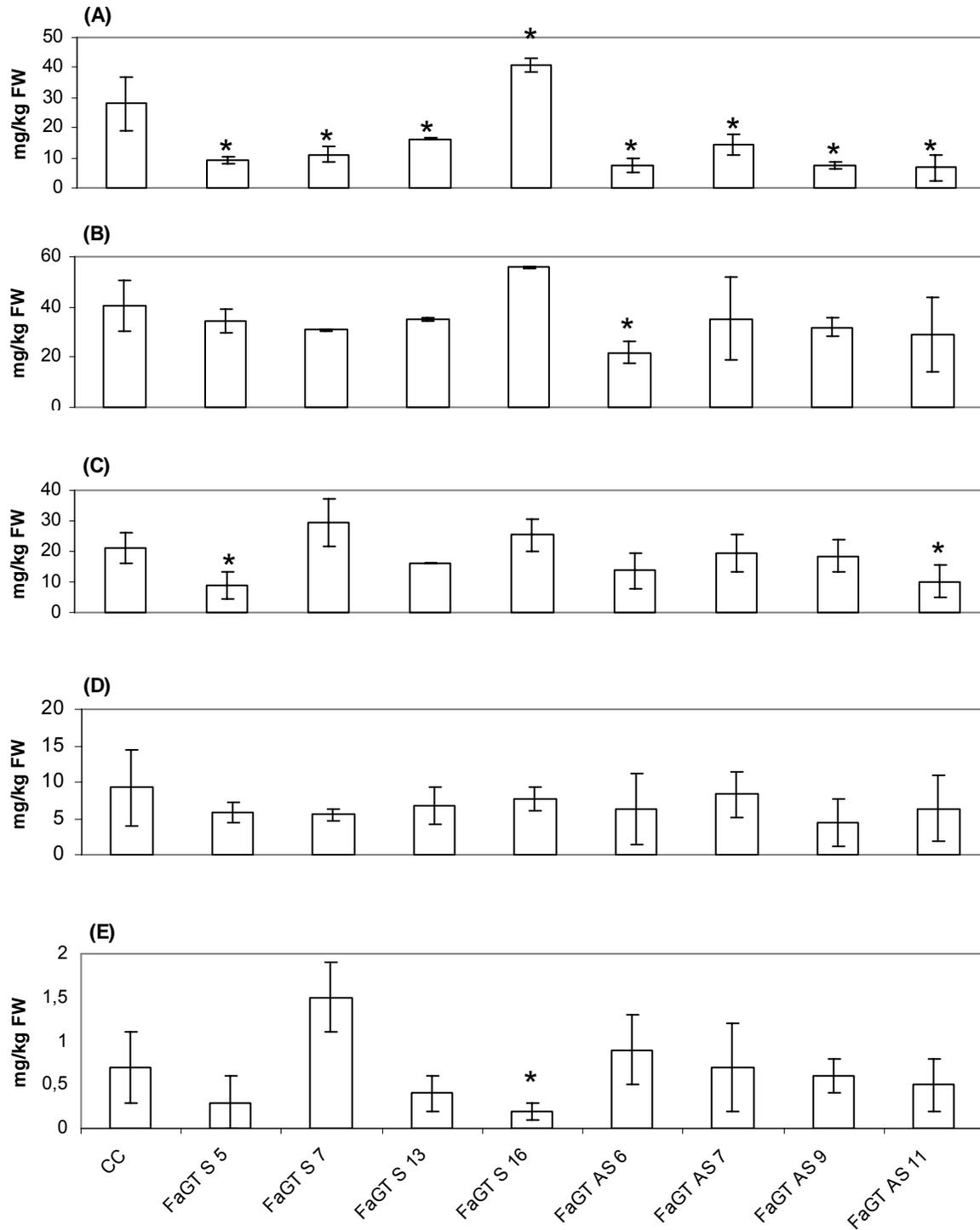
Blattgewebe	FaGT2 Sinn durchschnittlicher $C_T$ (n=3)	dbp durchschnittlicher $C_T$ (n=3)	$\Delta C_T$ (FaGT2 Sinn-dbp)	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
Calypso control (CC)	32,23±1,32	23,48±0,06	8,75	
FaGT2 Sinn #5	18,72±0,08	22,39±0,07	-3,67	5480,2
FaGT2 Sinn #7	19,88±0,20	22,72±0,09	-2,84	3082,7
FaGT2 Sinn #8	17,23±0,06	18,22±0,29	-0,99	855,1
FaGT2 Sinn #13	18,12±0,02	22,13±0,09	-4,01	6936,5
FaGT2 Sinn #16	17,96±0,12	21,74±0,05	-3,78	5914,3
FaGT2 Sinn #19	18,48±0,03	22,28±0,22	-3,80	5996,9
FaGT2 Sinn #20	17,37±0,09	22,70±0,10	-5,33	17318,2

**(B)**

Fruchtgewebe	FaGT2 Gegensinn durchschnittlicher $C_T$ (n=3)	dbp durchschnittlicher $C_T$ (n=3)	$\Delta C_T$ (FaGT2 Gegensinn-dbp)	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
Calypso control (CC)	17,94±0,18	19,01±0,38	-1,07	
FaGT2 Gegensinn #6	19,02±0,17	18,52±0,02	0,50	0,34
FaGT2 Gegensinn #7	19,16±0,06	21,15±0,04	-1,99	1,89
FaGT2 Gegensinn #9	17,89±0,87	18,06±0,15	-0,16	0,53
FaGT2 Gegensinn #11	19,85±0,04	20,88±0,03	-1,03	0,97

### 3.5.2 Quantifizierung der Metabolite in transgenen und Kontroll-Pflanzen

Zimtsäure-, p-Cumarsäure-, Kaffeesäure-, Ferulasäure- und p-Hydroxybenzoesäure-D-glucoseester wurden in transgenen und Kontroll-Pflanzen in Früchten, Blättern, Blüten und Wurzeln quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. B-24 und Tab. B-8 dargestellt. Die transgenen Pflanzen FaGT S8, S19 und S20 konnten nicht analysiert werden, da an den Pflanzen zu wenige Früchte waren, um statistisch signifikante Aussagen machen zu können.



**Abb. B-24:** Quantifizierung von Zimtsäure-D-glucoseester (A), p-Cumarsäure-D-glucoseester (B), Kaffeesäure-D-glucoseester (C), Ferulasäure-D-glucoseester (D) und p-Hydroxybenzoesäure-D-glucoseester (E) in Kontrollfrüchten (CC), Sinn- (FaGT S) und Gegensinn-(FaGT AS)früchten. Angezeigt werden die absoluten Mengen von wenigstens drei unabhängigen Aufreinigungen in mg/kg Frischgewicht (FW) und die zugehörige Standardabweichung. \* = Signifikante ( $p < 0,05$ ) Abweichung von den Kontrollen.

**Tab. B-8:** Quantifizierung von Zimtsäure-, p-Cumarsäure-, Kaffeesäure-, Ferulasäure- und p-Hydroxybenzoesäure-D-glucoseester in verschiedenen Pflanzenteilen (Wurzel, Blatt, Blüte) von Kontroll- und FaGT2 Gegensinnpflanzen FaGT AS6 und FaGT AS9 mittels LC-UV-ESI-MS<sup>n</sup>. - = nicht nachweisbar (< 0,1mg/kg); + = nachgewiesen, aber nicht quantifiziert (< 1mg/kg)

Zimtsäure-D-glucoseester ( <b>2a</b> ) [mg/kg]	CC	FaGT AS6	FaGT AS9
Wurzel	-	-	-
Blatt	-	-	-
Blüte	-	-	-
<b>p-Cumarsäure-D-glucoseester (3a) [mg/kg]</b>			
Wurzel	+	+	+
Blatt	+	+	+
Blüte	+	+	+
<b>Kaffeesäure-D-glucoseester (4a) [mg/kg]</b>			
Wurzel	-	-	-
Blatt	72±20	45±12	5±3
Blüte	576±108	163±28	286±88
<b>Ferulasäure-D-glucoseester (5a) [mg/kg]</b>			
Wurzel	2±1	-	4±2
Blatt	29±10	-	-
Blüte	160±29	44±12	151±17
<b>p-Hydroxybenzoesäure-D-glucoseester (9a) [mg/kg]</b>			
Wurzel	-	-	-
Blatt	-	-	-
Blüte	2±1	3±2	7±3

Die Gehalte an **2a** in den Früchten der Sinn- und Gegensinn-Linien unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ) von den Konzentrationen in den Kontrolllinien. Ein detaillierter Vergleich zeigte, dass alle Gegensinn-Linien geringere Mengen an **2a** enthielten, als die Kontrollen, während der Gehalt dieses Esters auch in den Sinn-Linien FaGT S5, FaGT S7 und FaGT S13 signifikant reduziert war. Nur FaGT S16 enthielt höhere Mengen an **2a** im Vergleich zu den Kontrollen. Obwohl das Muster der Gehalte von **3a** in den verschiedenen transgenen Linien ähnlich dem von **2a** war, zeigte die Varianzanalyse, dass sich nur die Menge an **3a** in der Linie FaGT AS6 signifikant zu denen in Kontrollpflanzen unterschied. Die transgenen Pflanzen differierten hinsichtlich **4a**, **5a** und **9a** nicht signifikant von den Kontrollen. Die absoluten Mengen in Abb. B-24 weichen leicht

von denen in Abb. B-23 ab, was durch die Analyse verschiedener Erdbeersorten (Elsanta bzw. Calypso) in den Experimenten erklärt werden kann.

Zusätzlich sind die Glucoseestermengen auch in anderen Pflanzenteilen ausgewählter transgener Pflanzen quantifiziert worden (Tab. B-8). Lediglich FaGT AS6 und AS9 wurden analysiert, da sie signifikant reduzierte Mengen an Transkripten und **2a** in den Früchten enthielten. In den Wurzeln, Blättern und Blüten von *Fragaria x ananassa* cv. Calypso fanden wir nur geringe Mengen an **2a** und **3a**. Blätter und Blüten hingegen bildeten erhebliche Mengen an **4a** und **5a**. Im Gegensatz dazu ist **2a** das Hauptprodukt in Blüten der Sorte Elsantra (Abb. B-23). Der Glucoseester von p-Hydroxybenzoesäure wurde nur in Blüten gefunden (Abb. B-23, Tab. B-8). Die Menge an **4a** war in Blättern und Blüten der transgenen Pflanzen FaGT AS6 und AS9 signifikant reduziert (Tab. B-8), obwohl FaGT2 Transkripte in Blättern von Kontroll-Pflanzen der Sorte Elsantra nicht detektiert wurden. Die Gehalte an **5a** waren nur in den Blättern und Blüten von FaGT AS6 signifikant erniedrigt. Die Konzentration an **9a** in den Blüten transgener Pflanzen wich nicht signifikant von den Kontrollen ab.

### 3.6 Zusammenfassung und Diskussion

Das Durchmustern einer EST-Bibliothek aus reifen Erdbeerfrüchten lieferte vier cDNAs, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit konservierten Bereichen bekannter Gene vermutlich für Glycosyltransferasen kodieren. Die heterologe Expression der vollständigen offenen Leserahmen (ORF) in *E. coli* erbrachte ein aktives Protein (*Fragaria x ananassa* Glucosyltransferase **2**, FaGT2), welches größte Übereinstimmung mit einer kürzlich isolierten Glucosyltransferase aus *Citrus unshiu* zeigte, die Limonin-17- $\beta$ -D-glucopyranosid bildet (Kita und Mitarbeiter, 2000). Limonoat A-Ring Lacton (LARL) erwies sich in einem Enzymassay mit der heterolog exprimierten FaGT2 aber als schlechtes Substrat. Daher wurde eine Reihe von Verbindungen als Substrate getestet, u. a. verschiedene Säuren und Alkohole, welche bereits als Aglykone verschiedener Glycoside der Erdbeerfrucht identifiziert werden konnten (Wintoch und Mitarbeiter,

1991). Es zeigte sich, dass das Enzym den Transfer eines UDP-aktivierten Glucoserestes auf verschiedene aromatische Säuren katalysierte, wodurch die entsprechenden Glucoseester entstanden.

Eine phylogenetische Analyse bewies, dass die vier Glycosyltransferasen aus der Erdbeerfrucht untereinander keine hohe Identität aufwiesen, was darauf hindeutet, dass sie in der Pflanze verschiedene Funktionen ausüben. FaGT2 zeigt eine enge genetische Verwandtschaft zu vier funktionell verwandten Glucosyltransferasen aus *Arabidopsis thaliana* (*UGT84A1*, *UGT84A2*, *UGT84A3*, *UGT84B1*) (Jackson und Mitarbeiter, 2001; Lim und Mitarbeiter, 2001), einer aus *Citrus unshiu* (AB033758) (Kita und Mitarbeiter, 2000) und einer aus *Brassica napus* (AF287143) (Milkowski und Mitarbeiter, 2000). Mit Ausnahme des Enzymes aus *C. unshiu* katalysieren sie die Bildung von Glucoseestern aus den jeweiligen Substraten. FaGT2 kann der Gruppe L im phylogenetischen Baum der *Arabidopsis* GT Multigen Familie zugeordnet werden (Li und Mitarbeiter, 2001; Ross und Mitarbeiter, 2001), welche aus 107 *Arabidopsis* GT Sequenzen besteht, wovon einige bereits biochemisch charakterisiert sind. Zur Gruppe L werden auch die oben genannten Sequenzen von *C. unshiu* und *B. napus* und verschiedene andere Klone gerechnet, von denen einige der korrespondierenden Proteine Glucoseester und andere O-Glucoside bilden können.

Die Substratspezifität und kinetischen Daten ( $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte) von FaGT2 sind vergleichbar mit denen von *UGT84A1-A3* aus *A. thaliana*, obwohl FaGT2 Zimtsäure als Substrat etwas bevorzugt (Lim und Mitarbeiter, 2001; Milkowski und Mitarbeiter, 2000; Lim und Mitarbeiter, 2003). Alle der positiv getesteten Substrate enthielten sowohl eine Carboxygruppe als auch ein aromatisches Ringsystem, was eine Funktion im Phenylpropanoidmetabolismus impliziert.

Der Vergleich der Gehalte an Glucoseestern in den verschiedenen Teilen der Erdbeerpflanze mit der Menge an *FaGT2* mRNA ergab eine positive Korrelation der Akkumulation von *FaGT2* Transkripten und zunehmenden Mengen an Zimtsäure-, *p*-Cumarsäure- und Kaffeesäure-D-glucoseester (**2a**, **3a** und **4a**) während der Fruchtentwicklung. Aber **2a** und **4a** waren auch in Blättern zu finden, in denen *FaGT2* nicht exprimiert wurde. Vermutlich liegt eine unterschiedliche Glycosyltransferase in Blättern vor, oder der Glucoseester wird in die Blätter transportiert. Gegen letzteres spricht die Abwesenheit der Glucoseester in den Stängeln. In *Arabidopsis* sind

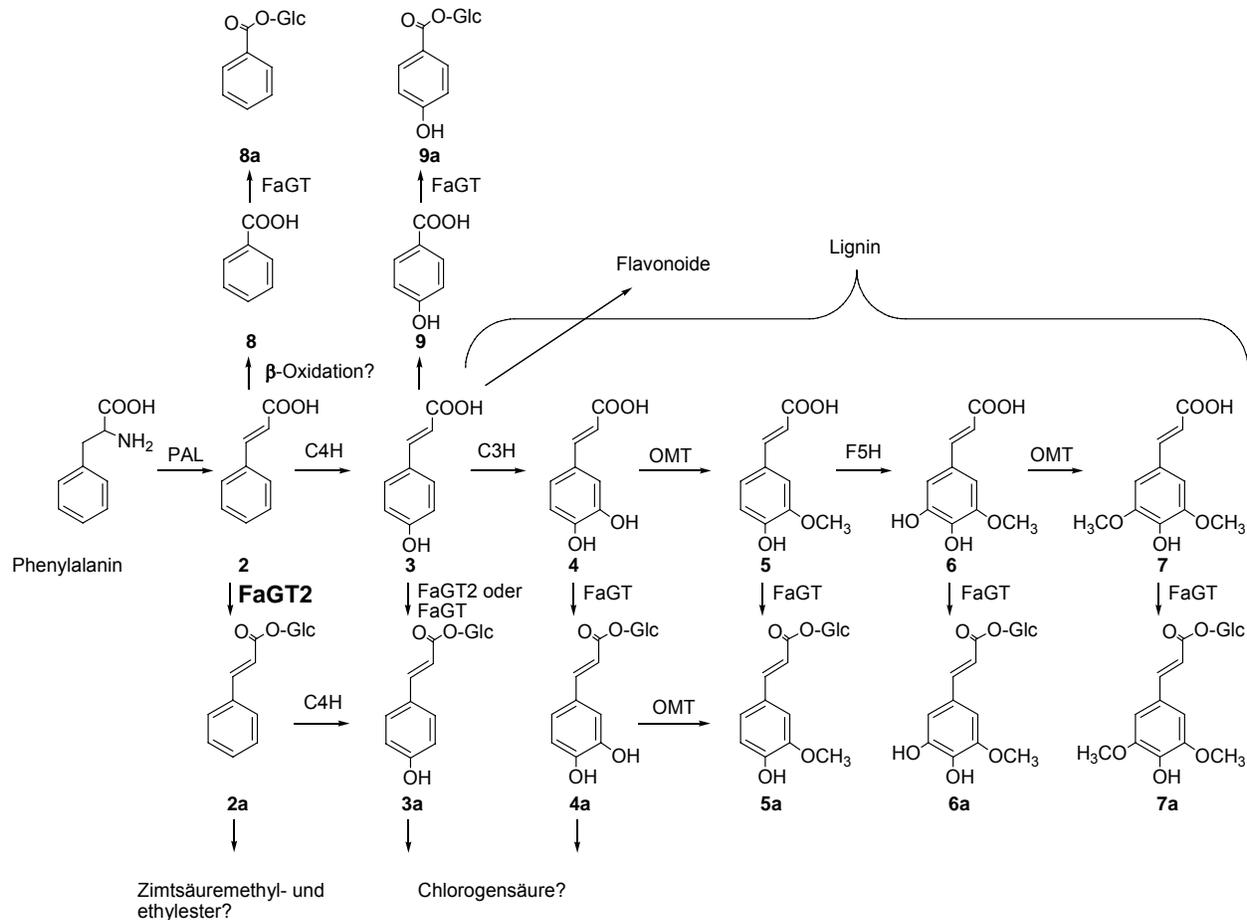
wenigstens vier der über 100 Gene, die für GTs kodieren für die Bildung von Glucoseestern verantwortlich. Es erscheint daher als sehr wahrscheinlich, dass zusätzliche Glucosyltransferasen in Erdbeeren vorhanden sind (Lim und Mitarbeiter, 2001; Ross und Mitarbeiter, 2001). Die verbleibenden Glucoseester zeigten kein klares reifungskorreliertes Profil. Entweder lagen sie während der Fruchtentwicklung in konstanter Konzentration vor (**5a**), oder zeigten, wie im Fall von **9a** ein biphasisches Akkumulationsmuster. Verglichen mit den Glucoseestern wurden um den Faktor 100 geringere Mengen an freien aromatischen Säuren in Erdbeerfrüchten nachgewiesen (Schuster und Herrmann, 1985; Kosar und Mitarbeiter, 2004; Häkkinen und Törrönen, 2000; Olsson und Mitarbeiter, 2004). Keine Korrelation konnte aus den Mengen an freien aromatischen Säuren und Glucoseester abgeleitet werden. Diese Daten belegen, dass die aromatischen Säuren in der Erdbeerpflanze sofort glycosyliert werden, um so den Gehalt der reaktiven Säuren zu erniedrigen und sie für weitere Biosyntheseschritte bereit zu stellen.

Die Veränderung der mRNA-Gehalte durch Hoch- bzw. Herabregulation der Genexpression und anschließende Analyse der metabolischen Konsequenzen bietet die Möglichkeit die Rolle von *FaGT2 in planta* zu studieren. Es wurden mehrere Linien transgener Pflanzen hergestellt, die *FaGT2* mRNA überexprimierten oder einen verminderten Gehalt an *FaGT2* mRNA aufwiesen. Ein Problem bei der Herstellung transgener Pflanzen aus einer Kalluskultur ist die Bildung chimärer Nachkommen, d. h. regenerierte Pflanzen, bzw. Früchte können sowohl das Transgen enthalten, als auch nichttransformierte Zellen. Es wurden verschiedene Methoden entwickelt um Chimären zu eliminieren (Mathews und Mitarbeiter, 1998; Houde und Mitarbeiter, 2004). Wir benutzten bei unseren Transformationen die immertragende Sorte Calypso, die bis zu acht Ernten unter Gewächshausbedingungen in einem Jahr erlaubt. Dies eröffnete die Möglichkeit, Chimären zu erkennen, da Ernte-zu-Ernte Verschiebungen in den *FaGT2* Transkriptmengen oder Metabolitenkonzentrationen überwacht werden konnten. Auf diese Weise wurden chimäre Pflanzen und Pflanzen mit einer instabilen Gegensinnexpression aussortiert und in den folgenden Analysen nur die Pflanzen verwendet, die nicht chimär waren.

Diese Pflanzen sind mittels quantitativer Echtzeit PCR (QRT-PCR) und LC-UV-ESI-MS<sup>n</sup> analysiert worden (Tab. B-7, Abb. B-24). Alle Früchte, die von Pflanzen stammten, die

mit dem Gegensinnkonstrukt transformiert waren, zeigten signifikant niedrigere Gehalte an **2a** als Früchte von Kontroll-Pflanzen. Die Konzentrationen von **3a** und **4a** waren nur leicht verändert. Lediglich FaGT AS6, FaGT AS11 und FaGT S5 enthielten niedrigere Mengen an **3a** bzw. **4a** (Abb. B-24). Früchte von Kontroll- und transgenen Pflanzen enthielten ähnliche Mengen an **5a** und **9a**. Lediglich eine der Sinnpflanzen (FaGT S16) produzierte höhere Gehalte an **2a** und **3a** in den Früchten verglichen mit Kontrollen, obwohl alle Sinnlinien ein erhöhtes Niveau an FaGT2 Transkripten in den Blättern aufwiesen (Abb. B-24, Tab. B-7). In den meisten Fällen bildeten Sinnlinien niedrigere Gehalte an Glucoseester in den Früchten als die Kontrollen und zeigten damit den Co-Suppressionseffekt, welcher zuerst in Petunien beobachtet wurde (Napoli und Mitarbeiter, 1990; Van der Krol und Mitarbeiter, 1990). Interessanterweise enthielt FaGT S16 signifikant weniger **9a** in den Früchten als die Kontrollen (Abb. B-24). Eine Erklärung könnte die geringere Menge an Zimt- und p-Cumarsäure sein, welche durch die erhöhte FaGT2 Aktivität in FaGT S16 verursacht sein könnte (Abb. B-25).

Die Daten zeigen eindeutig, dass **2** das primäre Substrat *in vivo* für FaGT2 ist. Da die Muster der Konzentrationen von **3a** in den transgenen Früchten ähnlich dem von **2a** sind, kann angenommen werden, dass FaGT2 auch zu einem geringem Teil zu der Bildung dieses Esters beiträgt, welcher primär entweder von einer zweiten Glucosyltransferase gebildet oder mittels Transportmechanismen aus anderen Pflanzenteilen in die Früchte gebracht werden. Die Annahme einer zweiten Glucoseester bildenden Transferase kann auch aus dem Vergleich der FaGT2 Transkripte und FaGT2 Metabolite während der Fruchtreifung abgeleitet werden (Abb. B-23). In grünen Früchten sind **3a**, **4a** und **5a** bereits anwesend, aber FaGT2 wird noch nicht exprimiert. Während der Reifung steigen nur die Mengen an **3a** und **4a** an, während die Konzentration an **5a** konstant bleibt und **2a** neu gebildet wird. So wird die zusätzliche Beteiligung von FaGT2 an der Bildung von **3a** bestätigt. Andere Metabolite stromabwärts des Phenylpropanoidpfades, wie z. B. **5a** und **9a** waren, außer für FaGT S16, nicht betroffen (Abb. B-25).



**Abb. B-25:** Vermutete Beteiligung von FaGT2 am Phenylpropanoid-Stoffwechsel, modifiziert aus Dixon und Mitarbeiter (2001). PAL (Phenylalanin-Ammonium-Lyase), C4H (Zimtsäure-4-Hydroxylase), C3H (p-Cumarsäure-3-Hydroxylase), OMT (O-Methyltransferase), F5H (Ferulasäure-5-Hydroxylase), FaGT(2) (*Fragaria x ananassa* Glucosyltransferase (2))

Ein Vergleich von Abb. B-23 und Tab. B-8 zeigt, dass es signifikante Unterschiede in den Gehalten von **3a** und **4a** in Blüten und Wurzeln von Kontroll-Pflanzen verschiedener Erdbeersorten (hier Elsanta und Calypso) gibt. Beispielsweise enthalten Blüten von Elsanta hauptsächlich **3a**, während Blüten von Calypso-Erdbeeren vor allem **4a** bilden, was auf eine unterschiedliche Menge an hydroxylierenden Enzymen hindeutet. In den Wurzeln von transgenen und Kontroll-Pflanzen waren die Glucoseester kaum nachweisbar, obgleich *FaGT2* dort gering exprimiert wird. Es liegen entweder die Präkursoren nicht vor oder *FaGT2* erfüllt eine unbekannte Funktion in den Wurzeln. In Blättern transgener Pflanzen wurden geringere Mengen an **4a** und **5a** als in den Kontrollen detektiert, obwohl dort kein Signal für *FaGT2* mRNA bei der Northern

Analyse beobachtet wurde. Die Erklärung hierfür könnte die Herabregulierung einer unbekanntes Glucosyltransferase durch *FaGT2* Transkripte in Erdbeerblättern sein. Blüten von transformierten Pflanzen enthielten geringere Konzentrationen an **4a** und **5a**, aber leicht erhöhte Mengen an **9a** als Kontroll-Pflanzen. Dies impliziert die Beteiligung von *FaGT2* an der Bildung der Glucoseester in Blüten und bestätigt die Konkurrenz von Phenylpropanoid- und Benzoessäurepfad um die Verfügbarkeit der Substrate (Abb. B-25).

Die wichtigsten Naturstoffe, die aus den Phenylpropanoiden gebildet werden sind die Flavonoide, Benzoessäurederivate und Ligninpolymere (Abb. A-11, nach Dixon und Mitarbeiter (2001)). Verschiedene andere Pfade sind quantitativ weniger bedeutend, aber möglicherweise wichtig für das Überleben der Pflanze, z. B. Stilbene und Chlorogensäuren, oder entscheidend für die Wertschätzung des Konsumenten bezüglich der Qualität einer bestimmten Frucht, wie z. B. flüchtige, aromatische Ester. Glucoseester von Zimtsäuren werden als energiereiche Substrate betrachtet, die in verschiedenen Biosynthesewegen als Präkursoren dienen (Mock und Strack, 1993). Eine 1-*O-trans*-Zimtsäure- $\beta$ -D-glucopyranose:Alkohol Zimtsäuretransferase wurde in Früchten der Kapstachelbeere (*Physalis peruviana* L.) gefunden (Latta und Berger, 1997). Das Enzym katalysiert die Übertragung von Zimtsäure, welche als Glucoseester aktiviert ist, auf verschiedene kurzkettige Alkohole, wie Methanol und Ethanol. Hierbei werden die flüchtigen Methyl- und Ethylester der Zimtsäure gebildet, welche als Aromakomponenten geschätzt werden. Diese Verbindungen wurden bereits von verschiedenen Autoren mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie in Erdbeeren nachgewiesen (Schreier, 1980; Hirvi und Honkanen, 1982; Silva und Neves, 1999). Bisher ist aber weder ein Gen kloniert noch ein Enzym in Erdbeeren gefunden worden, das den Transfer von Glucose-aktivierter Zimtsäure auf C<sub>1</sub>- und C<sub>2</sub>-Alkohole katalysiert. Das kürzlich klonierte SAAT-(Strawberry Acyl-CoA Alcohol Transferase)Gen (Aharoni und Mitarbeiter, 2000), welches hauptsächlich kurz- bis mittelkettige CoA-aktivierte Säuren (bis C<sub>10</sub>) auf kurz- bis mittelkettige Alkohole überträgt, katalysiert als Nebenaktivität lediglich den Transfer von aromatischen Acyl-CoAs auf 1-Propanol und 1-Butanol. Daher kann es nicht ausgeschlossen werden, dass 1-*O-trans*-Zimtsäure- $\beta$ -D-glucopyranose eine andere aktivierte Form von Säuren darstellt, welche in späteren Biosyntheseschritten zu einer flüchtigen, aromawirksamen Verbindung prozessiert wird.

Villegas und Kojima (1986) reinigten eine Hydroxyzimtsäure-D-glucose:Chinasäure Hydroxyzimtsäure Transferase auf, welche **4a** und D-Chinasäure als Substrate verwendete, um Chlorogensäure zu bilden. Chlorogensäure wurde bereits in Brombeeren, Schwarzen Johannisbeeren, Stachelbeeren, Heidelbeeren, Roten Johannisbeeren und auch in Erdbeeren detektiert (Olsson und Mitarbeiter, 2004; Mattila und Kumpulainen, 2002). Chlorogensäure stellt ein Antioxidans dar, das als Antwort auf umweltbedingten Stress gebildet wird und eine wichtige Rolle bei der Bildung von Phenylpropanoidprodukten stromabwärts des Pfades wie z. B. Lignin und Phytoalexine, sowie bei der Zellwand-Quervernetzung spielt. Die Biosynthese in Erdbeerfrüchten ist bis dato nicht geklärt.

In *Arabidopsis* wurde ein Gen identifiziert, dessen korrespondierendes Protein für die Transesterifizierung von Sinapinsäure-D-glucoseester (**7a**) auf Äpfelsäure oder Cholin verantwortlich ist, wodurch Sinapinsäuremalat oder Sinapinsäurecholin gebildet wird (Lehfeldt und Mitarbeiter, 2000). Sinapinsäuremalat wird als UV-Schutzstoff diskutiert, der in der Epidermis von pflanzlichen Blättern eingelagert ist. Es scheint aber, dass diese Transesterifizierung auf *Brassicaceen* beschränkt ist und in Erdbeeren keine Rolle spielt.

Vor kurzem wurde **5a** als Präkursor von mit Ferulasäure derivatisierten Arabinoxylanen in Weizen (*Triticum aestivum* L.) entdeckt (Obel und Mitarbeiter, 2003). Von Arabinoxylanen wird angenommen, dass sie an der Quervernetzung von Cellulose-Mikrofibrillen beteiligt sind und so die Zellvergrößerung und Zellwandstärke in Gräsern günstig beeinflussen (Carpita, 1996). Die Rolle dieser Quervernetzung in Erdbeeren ist jedoch nicht geklärt.

Zusammenfassend konnte demonstriert werden, dass in Erdbeerfrüchten die aromatischen Säuren gebunden, hauptsächlich als Glucoseester, vorliegen. Dies scheint eine Art von Entgiftungsreaktion zu sein, um die Reaktivität der Verbindungen niedrig zu halten, aber auch um Intermediate für weitere Biosynthesewege bereit zu stellen. Es wurde gezeigt, dass das Erdbeerenzym FaGT2, obwohl es eine Vielzahl von Substraten *in vitro* umsetzt, *in vivo* hauptsächlich für die Bildung von **2a** verantwortlich ist und nur zu einem geringeren Anteil an der Generierung von **3a** teilnimmt. **2a** dient vermutlich als biogenetischer Vorläufer für die Bildung der Erdbeeraromastoffe Zimtsäuremethyl- oder Zimtsäureethylester. Zusätzlich implizieren die Daten die

Existenz weiterer, für die Konjugation von phenolischen Säuren spezifische Glycosyltransferasen, wie für *Arabidopsis* gezeigt wurde (Lim und Mitarbeiter, 2001). Die Beteiligung von FaGT2 bei der Glucosylierung aromatischer Säuren in Blüten ist ziemlich wahrscheinlich. Daher erniedrigt das Enzym die Menge v. a. an freier Zimt-, p-Cumar- und Kaffeesäure, bewahrt die Energie, die für die Bildung dieser Verbindungen gebraucht wurde und bereitet sie für weitere biochemische Umsetzungen vor.

## C Material und Methoden

### 1 Material

#### 1.1 Chemikalien und Arbeitsmaterialien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in p.a.-Qualität von den Firmen Sigma, Fluka, Aldrich (alle Deisenhofen, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und ICN (Eschwege, Deutschland) bezogen. Lösungsmittel wurden über Füllkörperkolonnen bzw. mittels Vigreux-Destillation zusätzlich rektifiziert. Die Identifizierung von Verbindungen erfolgte mittels Referenzverbindungen. Hier wurden, neben den eigens synthetisierten Substanzen, die Chemikalien der Referenzsammlung der Arbeitskreise (Würzburg und Freising) verwendet.

Radioaktiv markierte UDP-Glucose (UDP-[6-<sup>3</sup>H]-Glucose) wurde von Biotrend Chemikalien GmbH (Köln, Deutschland) erworben. Die Konzentration war mit 1 mCi/ml bei 60 µCi/nmol angegeben.

Zum Aufschluss der Zellen wurden Sigma Glass Beads 106 µm und feiner (G8893, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) verwendet. Sie wurden vor Verwendung 24 Stunden mit 10 N HNO<sub>3</sub> behandelt und anschließend neutral gewaschen

Talon<sup>™</sup>-Harz wurde von BD Bioscience (Clontech, Mountain View, CA, USA) bezogen.

#### 1.2 Enzyme

Restriktionsendonucleasen:

*Bam*H I, 10 U/µl, 4000 U (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)

*Xho* I, 10 U/µl, 2000 U (MBI Fermentas)

*Hind* III, 10 U/µl, 5000 U (MBI Fermentas)

*Sa*I, 10 U/µl, 2000 U (MBI Fermentas)

T4 DNA Ligase 1 U/µl (MBI Fermentas)

*Taq* DNA Polymerase, Biotherm, 1000 U (Diagonal, Münster, Deutschland)

*Pfu* DNA Polymerase, Biotherm, 1000 U (Diagonal)

### 1.3 Pflanzenmaterial

Für die Untersuchungen und Transformationen wurden Erdbeerpflanzen (*Fragaria x ananassa*) der Sorten Elsanta und Calypso verwendet. Diese stammten entweder von einem lokalen Züchter (Wöllriederhof bei Würzburg, Deutschland) oder von PRI, Wageningen, Niederlande. Die Früchte wurden in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -18 °C gelagert.

### 1.4 Medien und Pufferlösungen

LB-Nährmedium:	1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1 % NaCl pH 7
LB <sub>Amp</sub> :	LB-Nährmedium 50 µg/ml Ampicillin
LB <sub>Chlp</sub> :	LB-Nährmedium 34 µg/ml Chloramphenicol
LB-Agar:	LB-Nährmedium 1,5 % Agar
10 x SSC:	1,5 M NaCl 0,15 M Na-Citrat pH 7
10 x PBS:	40 g NaCl 82,3 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 23,5 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,3 bis 7,4
PBS/Tween:	1 l 1 × PBS + 1 ml Tween 20
10 x TBS:	1,5 M NaCl 0,5 M Tris pH 7,5

- SOC-Medium: 20 g Trypton  
5 g Hefeextrakt  
0,5 g NaCl  
10 ml 250 mM KCl  
5 ml 2 M MgCl<sub>2</sub>  
Mit Wasser auf 980 ml auffüllen, autoklavieren und  
20 ml 1 M Glucose (steril filtriert) zugeben
- ZN102-Medium: 2,2 g MS (Salze und Vitamine)  
2,0 g Phytigel  
in 450 ml Wasser lösen  
0,1 ml NAA (Naphthyllessigsäure)-Stammlösung (1 mg/ml)  
Endkonzentration 0,2 mg/l  
2,25 ml TDZ (Thidiazuron)-Stammlösung (0,22 mg/ml)  
(Endkonzentration = 1 mg/l); auf pH 5,8 einstellen mit 0,1 N  
KOH  
Nach dem Autoklavieren 50 ml filtersterilisierte Glucose-  
Stammlösung (15 g /50 ml) zugeben.
- ZN102 + AcS (Cokultivierungs-Medium):  
ZN102 (nach Autoklavieren)  
500 µl Acetosyringon (AcS)-Stammlösung zugeben (100 mM)  
Endkonzentration 100 µM
- ZN102SEL (Selektionsmedium; 500 ml):  
ZN102 (nach Autoklavieren):  
500 µl Kanamycin-Stammlösung (100 mg/ml)  
(Endkonzentration = 100 mg/l)  
1000 µl Cefotaxim-Stammlösung (125 mg/ml)  
(Endkonzentration = 250 mg/l)
- Flüssiges MS-Medium mit AcS  
2,2 g MS-Salze + Vitamine  
15,0 g Glucose  
in 500 ml Wasser autoklavieren

---

	500 µl AcS (Acetosyringon)-Stammlösung (100 mM)
	Auf pH 5,2 einstellen mit 0,1 N KOH
	Filtersterilisieren und bei 4 °C lagern
CTAB-Puffer:	1,4 M NaCl
	2 % CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)
	20 mM EDTA (pH 8)
	100 mM TRIS (pH 8)
	2 % PVP40
TBE-Puffer:	200 mM Borsäure
	200 mM Tris/HCl (pH 7,6)
	10 mM Na <sub>2</sub> EDTA
Extraktionspuffer:	96 ml TBE-Puffer
	2 ml β-Mercaptoethanol
	2 ml 25 % SDS
Phenol-Chloroform:	250 ml Phenol-Lösung; gesättigtes Phenol Typ I, pH 6,6/7,9 (Biometra, Göttingen)
	200 ml TBE-Puffer
	250 ml Chloroform (enthält 10 ml Amylalkohol)
	gut mischen und Phasen über Nacht trennen lassen. Zum Extrahieren wird nur die untere Phase verwendet.
10 × MEN-Puffer:	0,2 M Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)
	0,01 M EDTA
	0,05 M Natriumacetat (pH 7)
MEN-Agarosegel:	0,35 g Agarose
	3,5 ml 10 × MEN-Puffer
	30 ml Wasser, bidest.
	in der Mikrowelle lösen, auf 50 °C abkühlen lassen
	1,9 ml 37 % Formaldehyd
RNA-Ladungspuffer:	720 µl Formamid
	160 µl 10 × MEN
	260 µl 37 % Formaldehyd
	180 µl Wasser, bidest.

	100 µl 80 % Glycerin
	80 µl 2 % Bromphenolblaulösung
	3 µl 1 % Ethidiumbromidlösung
10 × SSC-Puffer:	1,5 M NaCl
	0,15 M Na <sub>3</sub> -Citrat (pH 7,0)
50 × Denhardt:	10 g Ficoll 400
	10 g Polyvinylpyrrolidon
	10 g BSA, Fraktion V
	ad 1000 ml mit H <sub>2</sub> O dest.
50 × TAE-Puffer:	2 M Tris/Essigsäure (pH 8,0)
	0,05 M EDTA (pH 8,0)
Ladungspuffer 1 (5 ×):	2,0 % Ficoll
	0,5 % SDS
	0,05 M EDTA
	0,2 % Orange G
	10 % Glycerin
	mischen und steril filtrieren
Ladungspuffer 2 (6 ×):	50 % Glycerin
	7,5 mM EDTA
	0,4 % Xylencyanol
	0,4 % Bromphenolblau

## 1.5 Säulenchromatographie, Festphasenextraktion

Umkehrphasen-Säulenchromatographie:

Lichroprep<sup>®</sup> RP 18, Korngröße 43 - 47 µm (Merck, Darmstadt, Deutschland), Glassäule Ø 3 cm, 30 cm.

Das RP-18 Material wird mit ca. 100 ml Methanol gereinigt und mit 150 ml Wasser konditioniert.

**Festphasenextraktion:**

Amberlite® XAD-2, Korngröße 0,3 - 1 mm (Serva, Heidelberg, Deutschland), Glassäule Ø 1,8 cm, 15 cm

Vor Gebrauch wird das Material zunächst mit 200 ml Diethylether und anschließend mit 400 ml Methanol erschöpfend extrahiert. In einer Methanol-Suspension wird das Material auf die Chromatographie-Säulen aufgegeben und mit 100 ml Wasser konditioniert.

## 2 Geräte

### 2.1 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS)

#### System 1

GC:	Fisons Instruments GC 8060 (Fisons Instruments, Egelsbach, Deutschland)
Autosampler:	Fisons AS 800
Injektor:	Split-Splitless-Injektor (1:20), Temperatur: 250 °C
Trennsäule:	J&W DB-Wax 20M (30 m × 0,25 mm i.D.; df = 0,25 µm) (J&W, Folsom, CA, USA)
Temperaturprogramm:	50 °C (3 min isotherm), dann 4 °C/min bis 220 °C (10 min isotherm)
Trärgas:	Helium 5.0; 1,5 ml/min bei 50 °C
MS:	Fisons Instruments MD 800 (ThermoQuest, Egelsbach, Deutschland)
Massenbereich:	41 - 250 u
Scandauer:	0,45 s + 0,05 s delay
Temperaturen:	Ionenquelle: 220 °C, Transferline: 250 °C
Ionisation:	Elektronenstoßionisierung (EI <sup>+</sup> ), 70 eV
Quellendruck:	10 nbar
Photomultiplier:	350 V
Datenaufnahme und -auswertung:	Xcalibur für Windows (Fisons Instruments), Vers. 1.4

#### System 2

GC:	Thermo Finnigan Trace GC 2000 ultra (Thermo Finnigan, Egelsbach, Deutschland)
Injektor:	Split/Splitless-Injektor (1:10), Temperatur 250 °C
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID), Temperatur 220 °C
Trennsäule:	BPX5 (30 m × 0,25 mm i.D.; df = 0,25 µm)

Temperaturprogramm:	40 °C (3 min isotherm); dann 5 °C/min bis 300 °C (10 min isotherm)
Trägergas:	Helium 100 kPa
MS:	Thermo Finnigan Trace DQS (Thermo Finnigan)
Ionisation:	Elektronenstoßionisation (EI <sup>+</sup> ), 70 eV
Temperatur:	Ionenquelle 200 °C, Interface 280 °C
Quellendruck:	1 mPa
Photomultiplier:	350 V
Massenbereich:	50–650 u
Datenaufnahme und -auswertung	Xcalibur für Windows (Fisons Instruments, Egelsbach, Deutschland), Vers. 1.4

## 2.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

### System 1

HPLC:	Analytische HPLC von Gilson Abimed (Abimed, Langenfeld, Deutschland)
Pumpen:	2 x Gilson Abimed Pumpe Modell 303 mit analytischem Pumpenkopf
Injektor:	Gilson Abimed Sample Injector Modell 231, Probenschleife 200 µl
Trennsäule:	Eurospher 100 C-18 (250 mm × 4,6 mm i.D.; 5 µm) (Knauer, Berlin, Deutschland)
Fließmittel:	A: 0,05 % Ameisensäure in Wasser B: Acetonitril
Fluss:	0,7 ml/min
Gradient:	0 - 15 min: 5 - 20 % B; 15 - 35 min: 20 - 100 % B, 5 min isokratisch, in 15 min zurück auf 5 % B
Detektor:	Knauer-UV-Spektralphotometer mit analytischer Meßzelle (10 mm)

**Steuerung/**

Datenverarbeitung: Gilson 712 HPLC Controller, Version 1.02

**System 2**

HPLC: Analytische HPLC Maxi-Star (Knauer, Berlin, Deutschland)

Pumpensystem: HPLC Maxi Star Niederdruckpumpe mit analytischem Pumpenkopf, und Dynamic Mixing Chamber (Knauer)

Degasser: 4-Wege-Degasser (Knauer)

Mischkammer: dynamische Mischkammer (Knauer)

Autosampler: Basic Marathon (Spark, Emmen, Niederlande)

Injektor: Vier-Wege-Ventil Nr. 7125 (Rheodyne), Probenschleife 200 µl

Trennsäule : Eurospher 100 C-18 (250 mm × 4,6 mm i.D.; 5 µm) (Knauer)

Fließmittel : A: 0,05 % Ameisensäure in Wasser

B: Acetonitril

Fluss: 1 ml/min

Gradient : 0 - 10 min: 5 - 20 % B; 10 - 30 min: 20 - 100 % B, 5 min isokratisch, in 5 min zurück auf 5 % B

Detektoren: UV-Detektor Nr. 29815 mit variabler Wellenlänge (Knauer)  
Verdampfungs-Lichtstreu-Detektor (ELSD, Evaporative Light Scattering Detector), Modell Sedex 55 (Sedere, Alfortville, Frankreich)

ELSD-Parameter 40 °C, Druck 2,4 atm, Luft als Evaporationsgas

Datenaufnahme

und -auswertung: Eurochrom 2000 (Knauer)

**System 3**

HPLC: Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Serie

Pumpen: Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruckgradienten, 1100 Serie

Injektor: Rheodyne 7125 Probenventil, Probenschleife 100 µl

Trennsäule:	Eurospher 100 C-18 (250 mm × 4,6 mm i.D.; 5 µm) (Knauer, Berlin, Deutschland)
Fließmittel:	A: 0,05 % Ameisensäure in Wasser B: Acetonitril
Fluss:	1 ml/min
Gradient:	0 - 10 min: 5 - 20 % B; 10 - 30 min: 20 - 100 % B, 5 min isokratisch, in 5 min zurück auf 5 % B
Detektor:	Hewlett Packard Photodiodenarray 1100 Serie
Aufnahme- und Auswertesoftware	Hewlett Packard Software

#### **System 4**

HPLC	Analytische HPLC von Waters (Waters, Milford, USA)
Pumpen:	2 × Waters-Pumpe Modell 510 mit analytischem Pumpenkopf
Injektor:	Rheodyne 7125 Probenventil, Probenschleife 100 µl
Trennsäule:	Eurospher 100 C-18 (250 mm × 4,6 mm i.D.; 5 µm) (Knauer, Berlin, Deutschland)
Fließmittel:	A: 0,05 % Ameisensäure in Wasser B: Acetonitril
Fluss:	1 ml/min
Gradient:	0 - 35 min: 0 - 100 % B; 5 min isokratisch, in 5 min zurück auf 0 % B
Detektoren:	Multiwavelength-UV-Spektralphotometer S-3702 (Soma-Kogaku, Tokyo, Japan) Online Flüssigszintillationsdetektor Flo-one (Canberra Packard, Schwadorf, Österreich)
Ausgabe:	Integrator CR-6-A (Shimadzu, Duisburg, Deutschland)

### 2.3 Flüssigchromatographie-Ultraviolett-Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (LC-UV-ESI-MS<sup>n</sup>)

<b>LC-System:</b>	Agilent 1100 HPLC System
Pumpe:	Agilent 1100 Quarternäre Pumpe
Autosampler:	Agilent Autosampler
Trennsäule:	Eurospher C18 Säule (100 mm × 2 mm i.D.; 5 µm) (Grom Analytik, Rottenburg, Deutschland)
Fließmittel:	A: 0,05 % Ameisensäure in Wasser B: Acetonitril
Fluss:	0,2 ml/min
Gradient:	0 – 35 min: 0 – 50 % B; 35 – 37,5 min 100 % B, 2,5 min isokratisch, in 5 min zurück auf 0 % B
UV-Detektor :	Agilent UV Variable Wavelength Detector (Agilent, Waldbronn, Deutschland)

#### **Ionenfalle-Massenspektrometer:**

Massenspektrometer:	Bruker Esquire 3000 <sup>plus</sup> Massenspektrometer (Bruker, Bremen, Deutschland)
Ionisierungsspannung:	3074 V
Endplatte:	500 V
Kapillarausgang:	-109,8 V
Octopol-RF-Amplitude:	120 Vpp
Dry Gas:	Stickstoff: 300 °C, 10 l/min
Full Scan Mass Spectra:	von $m/z$ 50 bis $m/z$ 500; ICC 20000 oder 200 ms
Kollisionsgas:	Helium, $3,56 \times 10^{-6}$ bar
Kollisionsenergie:	1,0 V
Datenaufnahme und –auswertung:	Bruker DataAnalysis, Version 3.1

## 2.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Gerät:	Bruker WM 400 (400 MHz bzw. 100 MHz)
Standard:	3-(Trimethylsilyl)-2,2,3,3-d <sub>4</sub> -propionsäure (TPS) $\delta = 0,00$ ppm oder das jeweilige NMR-Lösungsmittel
Lösungsmittel:	CDCl <sub>3</sub> , MeOD
Auswertung:	WINNMR (Bruker, Rheinstetten, Deutschland)

## 2.5 Flüssigszintillationszähler (LSC)

LSC:	LKB Rackbeta 1214 (Pharmacia, Freiburg, Deutschland)
Messzeit:	10 min
Vials:	15 ml (Zinsser, Frankfurt, Deutschland)
Szintillationscocktail:	Emulsifier-Safe (Packard BioScience, Groningen, Niederlande)

## 2.6 Schüttelinkubator

Gerät:	GFL 3032 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland)
Schüttelgeschwindigkeit:	150 upm
Umlaufkühler:	LAUDA Typ RM6S (Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen, Deutschland)

## 2.7 UV-Vis-Spektralphotometer

UV 1:	GeneQuant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)
UV 2:	V 2101 PC UV-Vis Scanning Spektralphotometer (Shimadzu, Duisburg, Deutschland)

UV3: Eppendorf Biophotometer 6131 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

## 2.8 Sonstige Geräte – Software

Ultra-Turrax: T18 basic (IKA® Works Inc., Wilmington, NC, USA)

Kühlzentrifugen: Centrikon T-124, (Kontron Instruments, Italien); Rotor: A 8.24 und A 6.14

Mikrozentrifuge: Eppendorf Zentrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Lyophilisator: Christ Alpha 1-4; 0,1 mbar (Christ, Osterode, Deutschland)

pH-Meter: pH-Meter CG 820 (Schott Geräte, Hofheim, Deutschland)

Waagen: Mettler PL 300 (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland)  
Sartorius BP 210 S (Sartorius, Göttingen, Deutschland)

Ultraschallbad: Branson 1210 (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, USA)  
Bandelin Sonorex TK 52 (Schalltec, Mörfelden, Deutschland)

Rotavapor: Büchi Rotavapor und Büchi Vakuum System B-173 und Büchi Vakuum Controller B-720 (Büchi, Konstanz, Deutschland)

Sequenziergerät: Applied Biosystems 373 und 370A DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

BioRobot: Zur Aufreinigung von Plasmid DNA: BioROBOT 9600 (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Thermocycler: Primus 25 (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland)  
Robocycler 40 (Stratagene, West Cedar Creek, TX, USA)  
T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland))

TaqMan®-RT-PCR ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Software:

- DNASTar (DNASTAR, Madison, WI, USA)
- Statistische Auswertung: SigmaPlot, Version 8.0 (SPSS Science Software, Erkarth, Deutschland). Signifikante Unterschiede zwischen den Messwerten wurden mit dem

T-TEST (Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$ )  
bestimmt und durch entsprechende Markierungen in den  
Diagrammen kenntlich gemacht.

- SDSC Biology Workbench (<http://workbench.sdsc.edu>).

### 3 Methoden

#### 3.1 Darstellung von Metaboliten

##### 3.1.1 Zimtsäure- $\beta$ -D-glucoseester

Zu 2,6 g 8-Hydroxychinolin gelöst in 50 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran (THF) werden 2 g Triethylamin und 3,32 g Zimtsäurechlorid gegeben (Plusquellec und Mitarbeiter, 1986). Die Lösung wird bei 0 °C 1 Stunde gerührt, anschließend das Lösungsmittel abgezogen und der Rückstand in 40 ml Chloroform aufgenommen. Die organische Phase wird sukzessive mit 5 % NaHCO<sub>3</sub>, Wasser und gesättigter Magnesiumsulfatlösung gewaschen und der Rückstand des Chinolin-8-yl-cinnamats in Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: ca. 2,0 g

HPLC 1: T<sub>R</sub>: 26,7 min

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 6,85 und 7,93 (2 d; J=17,5 Hz; -HC=CH-); 7,10-7,80 (m, arom. H); 8,16 (d, H7); 8,89 (d, H2)

Wasserfreie  $\beta$ -D-Glucose (2,18 g) wird in 100 ml wasserfreiem Pyridin eine Stunde bei 100 °C gehalten, danach auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend 583 mg Chinolin-8-yl-cinnamat, als 60 %ige Lösung in Ethylacetat/Chloroform (3/2) zugegeben. Die Lösung wird bei 0 – 4 °C für 4 Tage gerührt, das Pyridin abgezogen und der Rückstand mit 40 ml 0,1 N NaOH und 40 ml n-Butanol gewaschen. An einer mit Lichroprep<sup>®</sup> C18-Material gefüllten Säule wird aufgereinigt. Die Elution erfolgt stufenweise von 100 % Wasser und 0 % Acetonitril auf 60 % Acetonitril in 5 % Schritten bei einem Volumen von je 100 ml. Die Fraktionen werden mittels HPLC-UV auf Reinheit getestet, Fraktionen mit dem Produkt werden vereinigt, das Lösungsmittel abgezogen und das Produkt lyophilisiert.

Ausbeute: ca. 500 mg

HPLC 1: T<sub>R</sub>: 12,5 min

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) 3,2 bis 3,9 (m, CH-OH und CH<sub>2</sub>OH), 4,8 (OH), 6,63 und 7,43 (2d, CH=CH, J = 16Hz); 7,3 bis 7,7 (m, arom. H)

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm): 60,69 (C6); 69,62 (C4); 72,58 (C2); 76,56 (C5); 77,87 (C3); 94,57 (C1); 117,68, 128,46, 129,04, 130,74 (aromat. C); 133,95 und 145,79 (C=C); 165,07 (C=O)

### 3.1.2 5-Hydroxyferulasäure

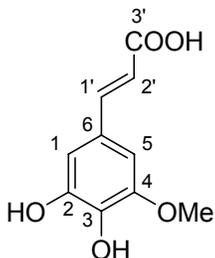
Zu einer Lösung aus 4,5-Dihydroxy-3-methoxybenzaldehyd (2,6 g) und Malonsäure (4,7 g) werden 15 ml trockenes Pyridin und 500  $\mu\text{l}$  Piperidin zugefügt (Lam und Mitarbeiter, 1996). Die Mischung wird für 3 Wochen in der Dunkelheit, bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Feuchtigkeit gerührt, anschließend auf Eiswasser gegeben (50 ml) und im Vakuum das Pyridin entfernt. Weitere 50 ml Wasser werden zugefügt und die Lösung erneut ankonzentriert um Pyridin vollständig zu entfernen. Schließlich wird die wässrige Lösung auf 50 ml aufgefüllt und mit 6 M HCl auf pH 1,0 angesäuert. Das Produkt wird mit Diethylether extrahiert, die organische Phase über  $\text{NaSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel vollständig entfernt. Nach Umkristallisation in Wasser erfolgt die Reinigung an einer mit Lichroprep<sup>®</sup> C18-Material gefüllten Säule. Eluiert wird stufenweise von 100 % Wasser und 0 % Acetonitril auf 100 % Acetonitril in 10 % Schritten bei einem Volumen von je 100 ml. Die Fraktionen werden mittels HPLC-UV auf Reinheit getestet, Fraktionen mit dem Produkt werden vereinigt, das Lösungsmittel abgezogen und das Produkt lyophilisiert.

Ausbeute: ca. 1 g

HPLC 1:  $T_R$ : 11,98 min

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) 2,95 (CH3); 6,23 (d, H an C2'); 7,54 (d, H an C1'); 6,73 (2 x s; H an C2, H an C6)

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) 57,13 (CH3 an C5); 105,39 (aromat. C2 oder C6); 110,66 (aromat. C2 oder C6); 116,46 (Ethylen C1' oder C2'); 127,15 (C1); 147,21 (aromat. C3 und C5); 147,65 (Ethylen C1' oder C2'); 150,20 (aromat. C3-C5 oder C1); 171,41 (COOH)



**Abb. C-1:** Atomnummerierung für 5-Hydroxyferulasäure

### 3.1.3 p-Cumaryl-1-acetat

Der p-Cumarylalkohol (Chempur, Karlsruhe, Deutschland) (0,01 mmol) wird mit 1 mg Acetanhydrid und 50 mg trockenem Pyridin für 24 Stunden bei Raumtemperatur peracetyliert. Nach Zugabe von 2 ml Wasser und 1 ml Diethylether wird das Pyridin mittels dreifacher Extraktion mit gesättigter Kupfersulfatlösung (1 ml) aus der organischen Phase entfernt und anschließend das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Hydrolyse des Diacetats erfolgt nach der Methode von Allevi und Mitarbeiter (1998). Dabei wird das Diacetat (0,01 mmol) in 40  $\mu$ l Aceton gelöst, zu 200  $\mu$ l Phosphatpuffer (pH 7) gegeben und mit einem Lipasepräparat von *Pseudomonas cepacia* versetzt. Die Lösung wird bei 25 °C geschüttelt und die Produktbildung mittels GC-MS kontrolliert. Nach Verbrauch des Diacetats wird die Reaktion durch die Zugabe von Ethylacetat gestoppt und der Ansatz durch Silicagel filtriert. Die organische Phase wird im Vakuum ankonzentriert.

## 3.2 Gewinnung der Erdbeerextrakte

Die frischen oder gefrorenen Erdbeeren (ca. 2 g) werden mit einem Ultra-Turrax und 10 - 15 ml Wasser homogenisiert, 15 Minuten bei 2000  $\times$  g zentrifugiert und der Überstand nach Filtration durch Glaswolle auf eine konditionierte XAD<sup>®</sup>-Festphasensäule gegeben. Der Rückstand wird noch zweimal mit 20 ml Wasser extrahiert, zentrifugiert, filtriert und der Überstand auf die Festphasensäule gespült. Die beladene Säule wird mit 50 ml Wasser gewaschen, im Stickstoff-Strom getrocknet und

anschließend mit 50 ml Diethylether (Aromaextrakt) und 80 ml Methanol (Glycosidextrakt) eluiert. Die methanolische Phase wird am Rotationsverdampfer auf ca. 0,5 ml eingengt, in HPLC-Gläschen gespült und bei -20 °C gelagert. Der Aromaextrakt wird an einer Vigreuxkolonne (Wasserbad, 40 °C) vorsichtig auf ca. 0,4 ml konzentriert, in GC-Gläschen überführt und sofort mittels HRGC-MS (System 1 und 2) vermessen. Der Glycosidextrakt wird am LC-UV-ESI-MS<sup>n</sup> analysiert.

### **3.3 Verfahren mit Ribonukleinsäuren (RNA)**

#### **3.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA für Northern-Analyse**

Die RNA-Isolierung aus Erdbeeren erfolgt über eine differentielle Butoxyethanol-Fällung (2-BE), wobei zunächst selektiv Polysaccharide ausfallen und anschließend durch steigende 2-BE Konzentrationen auch die Nukleinsäuren präzipitieren (Manning, 1991). Die Abtrennung von DNA wird durch Lithiumchloridfällung erreicht.

Gefrorenes Erdbeergewebe (2 - 10 g) wird in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser fein gemahlen und das Pulver wird in zwei Zentrifugenröhrchen überführt, in denen jeweils 10 ml Extraktionspuffer und 10 ml Phenol-Chloroform vorliegen. Die Gefäße werden im Wasserbad erwärmt, mehrmals geschüttelt und nach Zentrifugation bei 20000 × g (10 Minuten, RT) wird die obere wässrige Phase abgetrennt sowie die verbleibende untere und Interphase nochmals mit 10 ml Extraktionspuffer extrahiert. Die wässrigen Phasen der ersten und zweiten Extraktion werden vereinigt und mit dem gleichen Volumen an Phenol-Chloroform wiederum extrahiert. Die wässrige Phase wird mit Wasser auf das 2,5 fache Volumen verdünnt und durch Zugabe von 1 M Natriumacetat (pH 4,5) wird die Natriumkonzentration auf 80 mM eingestellt. Die Lösung wird erneut mit 0,4 Volumen 2-BE versetzt, für mind. 30 Minuten auf Eis inkubiert, die ausgefallten Polysaccharide bei 20000 × g sedimentiert (0 – 4 °C, 15 Minuten) und das Zentrifugat mit weiteren 0,6 Volumen 2-BE (gekühlt) versetzt. Die Lösung wird mind. 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend wie zuvor zentrifugiert. Das durchsichtige Nukleinsäurepräzipitat wird sukzessive mit Extraktionspuffer/2- BE (1:1, v/v), Ethanol/0,1 M Kaliumacetat (pH 6,0) (70:30, v/v) und Ethanol gewaschen und kurz

getrocknet. Die Nukleinsäuren werden in max. 4 ml Wasser gelöst (Konz. > 1 mg/ml) und mit 12 M Lithiumchloridlösung eine LiCl-Konzentration von 3 M eingestellt. Nach einigen Stunden auf Eis - besser über Nacht - wird die präzipitierte RNA durch Zentrifugation ( $11600 \times g$ , 0-4 °C, 10 Minuten) abgetrennt. Das RNA-Pellet wird anschließend zwei Mal mit 1 ml 3 M LiCl und je einmal mit Ethanol/0,1 M Kaliumacetat (pH 6,0) (70:30, v/v) und Ethanol gewaschen. Nach kurzem Trocknen wird die RNA in 100 µl Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert. Konzentration und Reinheit der isolierten RNA werden durch photometrische Messungen bei 230, 260 und 280 nm bestimmt. Die Berechnung der Konzentration ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$\text{RNA } [\mu\text{g} / \mu\text{l}] = \frac{E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40}{1000}$$

Aus dem Verhältnis von  $E_{260}/E_{230}$  und  $E_{260}/E_{280}$  lässt sich eine Aussage über die Verunreinigung mit Polysacchariden bzw. Proteinen treffen. Ausreichend reine RNA-Präparationen weisen Werte von 1,8 bis 2,0 auf (Lottspeich und Zorbas, 1998).

### 3.3.2 Elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel

Zur qualitativen und quantitativen Überprüfung der RNA-Präparationen und zur Durchführung von Expressionsstudien wird die gewonnene RNA im Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt.

Zur Überprüfung der RNA-Isolierung werden jeweils 1 µg, für Northern Blots jeweils 10 µg Gesamt-RNA in gleichen Volumina Wasser gelöst (20 oder 40 µl), mit 1/5 Volumen RNA-Ladungspuffer versetzt und 5 Minuten bei 65 °C denaturiert. Nach 2 Minuten auf Eis werden die Proben im denaturierenden 1 × MEN-Agarosegel bei einer Spannung von 70 - 80 V aufgetrennt. Gegebenenfalls wird zusätzlich zu den untersuchenden Proben ein RNA-Größenstandard (RNA Ladder, New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland) aufgetragen. Die Visualisierung der RNA erfolgt durch Fluoreszenz des eingelagerten Ethidiumbromids unter UV-Licht.

### 3.3.3 Transferverfahren für RNA

Der Transfer von RNA-Molekülen aus einem Agarosegel auf eine Membran erfolgt über Kapillarkräfte.

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wird das Gel mit den offenen Taschen nach oben orientiert, luftblasenfrei auf eine mit Transferpuffer (10 × SSC) getränkte Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Life Science, Freiburg, Deutschland) gelegt. Diese befindet sich auf einem Stapel (10 - 15 cm) aus saugfähigem Zellstoffpapier, der von zwei Lagen getränktem Filterpapier (Whatman 3MM; Whatman, Brentford, Großbritannien) bedeckt wird. Sowohl die Membran als auch das Filter- und Zellstoffpapier werden vorher in der Größe des Gels ausgeschnitten. Auf das Gel wird ein etwa 20 cm langer Filterpapierstreifen (Whatman 3MM) gelegt, der auf einer Seite in ein Reservoir aus 10 × SSC Puffer taucht. Der Transfer erfolgt über Nacht vertikal von oben nach unten. Durch abschließendes Bestrahlen mit UV-Licht (120 000 µJ) wird die RNA kovalent auf der Membran fixiert.

### 3.3.4 Radioaktive Markierung von RNA

Zur Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde wird das „Ready-To-Go™“-DNA Labelling System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) eingesetzt, dem die Methode des „Oligolabelling“ zugrunde liegt (Feinberg und Vogelstein, 1983; Feinberg und Vogelstein, 1984). Eine Mischung aus Oligonukleotiden, die alle statistisch möglichen Nukleotidsequenzen abdecken, dient als Primer für eine DNA-Polymerase („Klenow-Fragment“). Durch Zusatz eines markierten Nukleotids (3000 Ci/mmol) ist die Synthese einer RNA mit hoher spezifischen Aktivität (>109 dpm/µg) möglich. Das System stellt ein Lyophilisat aus dATP, dGTP, dTTP, Puffersalzen, Klenow Fragment FPLCpure™ (7-12 Units) und Zufallsprimern zur Verfügung.

25-50 ng RNA werden in 45 µl Wasser gelöst, 2-3 Minuten bei 95-100 °C denaturiert und auf Eis inkubiert. Das Lyophilisat wird in der RNA-Lösung aufgelöst, mit 5 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP gemischt und 15-30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide werden anschließend über eine Sephadex G-50 Säule (ProbeQuant™ G-50; Amersham

Pharmacia Biotech) abgetrennt. 1 µl der markierten RNA-Lösung wird zur Bestimmung der eingebauten Radioaktivität im Szintillationszähler (LSC) vermessen. Die RNA wird bei 95-100 °C für 2 Minuten denaturiert und auf Eis inkubiert.

### 3.3.5 Hybridisierung von Nukleinsäuren

#### **Methode 1**

Die Membran mit der fixierten RNA wird in eine Hybridisierungsröhre gelegt, mit etwa 10 ml Hybridisierungslösung (Roti-Hybri-Quick; Roth, Karlsruhe, Deutschland) bedeckt und mindestens 30 Minuten in einem Hybridisierungsinkubator bei 68 °C vorhybridisiert. Nach Zugabe der denaturierten Sonde erfolgt die Hybridisierung bei 68 °C über Nacht. Um die unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen, wird die Membran in zwei Schritten mit steigender Stringenz (Waschlösung 1: 1 × SSC, 0,1 % SDS; Waschlösung 2: 0,1 × SSC, 0,1 % SDS) bei 68 °C gewaschen. Die Membran wird kurz an der Luft angetrocknet, in Folie eingeschweißt und in eine lichtdichte Kassette auf einen Röntgenfilm (X-Ray Retina; Fotochemische Werke, Berlin, Deutschland) gelegt. Der Film wird bei -80 °C belichtet und anschließend mit speziellen Entwicklungs- und Fixierlösungen entwickelt. Dafür wird der belichtete Film in der Dunkelkammer eine angemessene Zeit (etwa fünf Minuten) in das Entwicklungsbad eingelegt, anschließend mit Wasser gewaschen etwa fünf Minuten im Fixierbad fixiert.

#### **Methode 2**

Die Membran mit der fixierten RNA wird 30 Minuten bei 50 °C in 2 × SSC und 0,5% SDS gewaschen. Mindestens eine Stunde bei 42 °C wird vorhybridisiert in 50% Formamid, 5 × Denhardt, 5 × SSC, 1% SDS, 200 µg Lachssperma-DNA.

Nach Zugabe der Sonde wird über Nacht (mind. 16 Stunden) bei 42 °C hybridisiert und anschließend sukzessive mit folgenden Lösungen gewaschen:

- 1 × in 2 × SSC, RT, 5 min
- 1 × in 2 × SSC mit 1 % SDS, 60 °C, 30 min
- 1 × in 2 × SSC mit 1 % SDS, 60 °C, 15 min
- 2 × in 0,1 × SSC mit 0,5 % SDS, 60 °C, 15 min
- 2 × in 0,1 × SSC

Das Filmauflegen und die Entwicklung erfolgt wie bei Methode 1.

### **3.4 Verfahren mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA)**

#### **3.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli***

Bakterielle Plasmid-DNA wird durch alkalische Lyse der Zellen, Adsorption der DNA an eine Membran und Elution der Plasmid DNA aufgereinigt.

Zum Einsatz kommt dabei der BioROBOT 9600 als auch das QIAprep Spin Miniprep Kit (beide Qiagen, Hilden, Deutschland) unter Verwendung einer Mikrozentrifuge.

Die Bakterien werden über Nacht in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 37 °C und 150 upm angezogen. Am nächsten Tag werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und der Überstand verworfen. Nach Zugabe der alkalischen Lösung (enthält NaOH und SDS, Zusammensetzung darüber hinaus vom Hersteller nicht angegeben) werden die lysierten Zellen entweder per Hand oder vom BioROBOT auf die Membranen aufgebracht. Nach Filtration wird das Partikel-freie Filtrat auf eine Silica-Gel Membran appliziert, welche selektiv Plasmid-DNA in High-Salt Puffer bindet. Die Elution erfolgt in einem Low-Salt Puffer. Die optimierten Puffer in Verbindung mit der Silica-Gel Membran sorgen dafür, dass nur DNA an der Membran adsorbiert wird, während RNA, zelluläre Proteine und Metabolite nicht zurückgehalten werden und im Durchlauf gefunden werden.

Die Plasmid DNA wird in dem Hersteller mitgelieferten Puffer oder dest. Wasser bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.4.2 Spaltung der DNA durch Restriktionsendonucleasen

Um weitere Veränderungen oder Charakterisierungen an der DNA vornehmen zu können, muss die Plasmid-DNA mit Hilfe von spezifischen Restriktionsendonucleasen gespalten werden. Die DNA wird in Puffer oder Wasser in einem Endvolumen von 0,1 µg/µl gelöst und mit mindestens einer Unit Restriktionsenzym je Mikrogramm DNA versetzt. Die Zusammensetzung des Reaktionspuffers wird entsprechend den Vorgaben der Herstellerfirma (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) variiert. Der enzymatische Verdau erfolgt in der Regel bei 37 °C innerhalb von 60 bis 120 Minuten. Die erfolgreiche Restriktion wird anschließend mittels Gelelektrophorese überprüft.

### 3.4.3 Auftrennung und Wiedergewinnung von DNA Fragmenten

Durch Elektrophorese können DNA-Fragmente in einem Agarosegel aufgrund ihrer Größe aufgetrennt werden. Je nach Fragmentgröße werden 0,7 %ige bis 2 %ige Agarosegele eingesetzt. Die DNA wandert wegen ihrer negativen Ladung dabei zur Anode.

Die notwendige Menge an Agarose wird abgewogen, in 1 × TAE-Puffer aufgekocht und nach kurzem Abkühlen wird Ethidiumbromid (ad 0,5 µg/ml) versetzt. Die DNA-Lösungen werden mit dem gewählten Ladungspuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Parallel dazu wird ein Größenstandard (z. B. 1 kb Leiter, Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland) aufgetragen. Die Elektrophorese findet in 1 × TAE-Puffer, bei einer konstanten Spannung von 5 – 10 V/cm statt.

Die unter UV-Licht sichtbaren Banden können unter Verwendung eines Extraktions-Kits (QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraction Kit; Qiagen, Hilden, Deutschland) aus dem Agarose-Gel wiedergewonnen werden. Das ausgeschnittene Agarosegel-Stück wird dabei in der Wärme in dem mitgelieferten Puffer (enthält chaotrope Salze, Zusammensetzung darüber hinaus vom Hersteller nicht angegeben) aufgelöst und an QIAEX II Partikel adsorbiert. Andere störende Bestandteile werden mit Waschschrinen entfernt und die nunmehr reine DNA aus den Partikeln mit Wasser eluiert.

### 3.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA Fragmente werden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und den Einsatz spezifischer Primer amplifiziert. Ein 100 µl Ansatz besteht aus:

- 10 µl 10 × Reaktionspuffer
- 2 µl dNTPs (10 mM)
- 2,5 µl Primer 1 (100 ng/µl)
- 2,5 µl Primer 2 (100 ng/µl)
- N µl Polymerase
- N' µl steriles Wasser
- 1 µl DNA Matrize (ca. 10 ng)

Abhängig davon, wie viele Units welcher DNA-Polymerase (*Taq*- oder *Pfu*-Polymerase) nach Herstellerangaben verwendet werden, wird die Menge an sterilem Wasser modifiziert. Die Reaktion wird in einem Thermocycler bei folgenden Bedingungen durchgeführt.

**Tab. C-1:** PCR Bedingungen der verschiedenen Anwendungsbereiche

	Sequenzierung/Klonierung	Herstellung der Kassetten für transgene Pflanzen
Primer	Aus vorhergehender Sequenz bestimmt, bzw. Teil des Vektors	Aus Sequenzen von FaGT2 und OMT abgeleitet
DNA-Vorlage	Aus cDNA Bibliothek	Aus klonierten Genen
Vordenaturierung	94 °C/45 sek	96 °C/30 sek
Denaturierung	94 °C/45 sek	96 °C/30 sek
Annealing	27 × 55 °C/45 sek	35 × 48 °C/30 sek
Amplifikation	72 °C/4 min	72 °C/1 min
Verlängerung	72 °C/10 min	72 °C/10 min

Nach beendeter PCR wird das Reaktionsgemisch in einem Agarosegel aufgetrennt, unter UV-Licht analysiert und dokumentiert.

### 3.4.5 Ligation und Transformation

Die Effektivität einer Ligationsreaktion kann durch den Einsatz eines molaren Verhältnisses von 3:1 cDNA:Vektor positiv beeinflusst werden. Die Konzentration kann

dabei vor der Ligation durch Auftrennung der DNA in einem Agarosegel abgeschätzt werden. Dabei repräsentiert eine Bande die gerade noch sichtbar ist eine Menge von etwa 10 ng DNA (E. Salentijn, pers. Mitteilung). Der Ligationsansatz enthält folgende Komponenten:

1  $\mu$ l 10  $\times$  Ligase Puffer

N  $\mu$ l cDNA (entsprechend drei Molanteilen)

N'  $\mu$ l Vektor (entsprechend einem Molanteil)

N''  $\mu$ l Wasser (ergänzen zu 10  $\mu$ l Gesamtvolumen)

1  $\mu$ l Ligase (T4 DNA Ligase, 1 U/ $\mu$ l; MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)

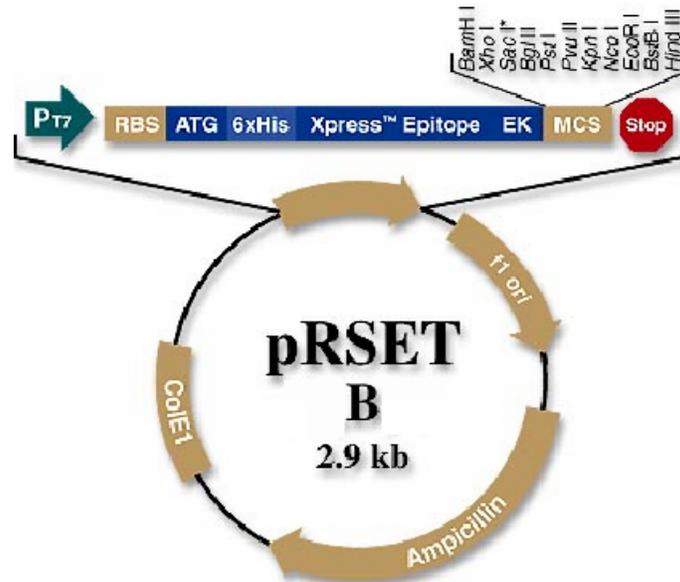
Die Reaktion wird über Nacht bei 16 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgt die Transformation in kompetente *E. coli* (BL21 Zellen zur Expression, ansonsten XL1-Blue Zellen) mittels Hitzeschocktransformation.

Für die Hitzeschocktransformation werden die Bakterien auf Eis aufgetaut. Eine Lösung aus 5 bis 10 ng DNA in einem Volumen von 1 bis 5  $\mu$ l wird zugefügt. Die Suspension wird auf Eis 30 Minuten inkubiert. Die Transformation findet bei genau 42 °C für exakt 30 Sekunden statt. Danach wird für 2 Minuten auf Eis gekühlt. Nach dem Abkühlen werden 250  $\mu$ l vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und die Zellen für eine Stunde bei 37 °C und 225 upm geschüttelt. Ein Teil der Suspension wird auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum (abhängig von dem Vektor und den *E. coli* Zellen) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.4.6 Konstruktion der *FaGT* und *FaRT* Expressionsplasmide

Die Konstruktion der cDNA Bibliothek erfolgte durch das Partnerinstitut in den Niederlanden (Dr. Asaph Aharoni; PRI, Wageningen, Niederlande; Aharoni und Mitarbeiter, 2000). Die Klone wurden unter Verwendung des Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit und des 310 DNA Sequenzers vollständig sequenziert. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mittels des Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) am National Center for Biotechnological Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Der Expressionsvektor pRSET B (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wurde verwendet um rekombinante Fusionsproteine zu

exprimieren. Beispielhaft wird die Vorgehensweise bei *FaGT2* beschrieben. Die entsprechenden Arbeitsschritte bei den anderen Erdbeer-Glycosyltransferasen waren analog.



**Abb. C-2:** Expressionsvektor pRSET B (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), der zur Expression der Glycosyltransferasen benutzt wurde. Wichtiges Merkmal ist das His-Tag<sup>®</sup> (6xHis), der sowohl zur Aufreinigung als auch zur Detektion im Western-Blot Verwendung fand. Ribosomale Bindungsstelle (RBS), Startcodon, Methionin (ATG), Schnittstelle für Enterokinase (EK), Multiple Klonierungsstelle (MCS).

Der komplette offene Leserahmen (ORF) des *FaGT2* Gens wird mittels RACE-PCR (Rapid amplification of cDNA ends) amplifiziert, in den Vektor pGEM T (Promega, Madison, WI, USA) subkloniert und in 5' und 3' Richtung mittels Primerwalking sequenziert. Um den ORF von *FaGT2* im Leserahmen in den Expressionsvektor zu klonieren werden die *Bam*H I und *Hind* III Restriktionsschnittstellen des pRSET B Vektors verwendet. Unter Einsatz des Vorwärtsprimers und des Rückwärtsprimers wird die kodierende Region von *FaGT2* amplifiziert. Diese Primer fügen dem ORF von *FaGT2* eine *Bam*H I und *Hind* III Schnittstelle am 5' bzw. 3' Ende hinzu, so dass das PCR Fragment in den pRSET B Vektor ligiert werden kann. Der Vorwärtsprimer eliminiert das native Startcodon von *FaGT2*. Für die Klonierung wird sowohl der ORF,

nunmehr mit *Bam*H I und *Hind* III Schnittstellen, als auch der pRSET B Vektor (Invitrogen) mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und ligiert. Es bildet sich ein Fusionsprotein, mit einem Peptid am N-Terminus, das das translatierte ATG Initiationscodon (Methionin), sechs Histidireste (His-Tag<sup>®</sup>), anti Xpress Epitop und einer Schnittstelle für Enterokinase besteht, gefolgt vom translatierten ORF von *FaGT2* (Abb. C-2).

Die entsprechenden Primer mit den verwendeten Restriktionsschnittstellen der vier Glycosyltransferasen sind in der folgenden Tab. C-2 aufgeführt.

**Tab. C-2:** Primer und verwendete Restriktionsschnittstellen der vier *Fragaria x ananassa* Glycosyltransferasen

Name	Vorwärtsprimer Rückwärtsprimer	Restriktions- schnittstellen	pRSET B Restriktions- schnittstellen
FaGT1	5'-AAA AAG GGA TCC GCA CCA GTA TCA AAC CAG G-3'	<i>Bam</i> H I	<i>Bam</i> H I
	5'-AAA AAG GTC GAC GCT CTC TTG TTC AAT CAA CTG-3'	<i>Sal</i> I	<i>Xho</i> I ( <i>Sal</i> I und <i>Xho</i> I können ligiert werden)
FaGT2	5'-AAA AAG GAT CCG GGT TCC GAA TCA TTG GTT CA-3'	<i>Bam</i> H I	<i>Bam</i> H I
	5'-AAA AAA AGC TTC CTT ACG ACT CGA CTA GTT CA-3'	<i>Hind</i> III	<i>Hind</i> III
FaGT3	5'-AAT AAC GGA TCC GGA GAA ACC TGC AGA GCT CG-3'	<i>Bam</i> H I	<i>Bam</i> H I
	5'-AAT AAC CTC GAG GGA CAA GAT GAT CAA TCC AAG C-3'	<i>Xho</i> I	<i>Xho</i> I
FaRT1	5'-ATA AAC GGA TCC GAG CTC TTC CTC TGC AAC TA-3'	<i>Bam</i> H I	<i>Bam</i> H I
	5'-ATA AAC GTC GAC GTG AAC TTC TGA AGG CGC TG-3'	<i>Sal</i> I	<i>Xho</i> I ( <i>Sal</i> I und <i>Xho</i> I können ligiert werden)

Zur Bestätigung des Einbaus der ORF wurden die Konstrukte im Expressionsvektor mit den Restriktionsenzymen verdaut und mittels Gelelektrophorese analysiert, sowie ein weiteres Mal vollständig sequenziert. Dabei wurden die erwarteten Fragmente detektiert, bzw. die Vollängen-Sequenzen *in frame* verifiziert.

### 3.5 Heterologe Expression

*Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS Zellen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), die den Vektor pRSET B (Invitrogen) mit der cDNA der jeweiligen Glycosyltransferase tragen, werden in 50 ml LB Medium mit 50 µl Ampicillin (100 mg/ml) und 30 µl Chloramphenicol (34 mg/ml) über Nacht bei 37 °C und 200 upm angezogen. Am nächsten Tag lässt man 2,5 ml dieses Expressionsansatzes in 100 ml LB Medium mit den Antibiotika auf eine OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 wachsen. Die Expression wird durch Zugabe von 1 M IPTG ad 1 mM induziert und erfolgt über Nacht bei 16-18 °C und 200 upm. Die Aufarbeitung wird bei 4 °C, bzw. auf Eis durchgeführt. Die Zellen werden bei 3000 × g 10 Minuten zentrifugiert, der Niederschlag in einen gekühlten Mörser gegeben, mit der doppelten Menge an gewaschenen Glass-Beads versetzt und mit dem Pistill bearbeitet bis eine homogene Masse entsteht. Diese wird mit 8 ml gekühltem 1 × Wasch/Extraktionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 7) aufgenommen, bei 2000 × g zentrifugiert und der Überstand auf 500 mg mit Wasch/Extraktionspuffer äquilibrierten Talon<sup>®</sup>-Harz (Clontech, Mountain View, CA, USA) aufgebracht. Nach einstündiger Adsorption auf Eis und drei Waschschritten mit je 25 ml Wasch/Extraktionspuffer auf Eis wird mit Imidazol-Puffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol, pH 7) in der Kälte (4 °C) eluiert. Qualität und Quantität der Aufreinigung kann mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft werden.

### 3.6 Verfahren mit Proteinen

#### 3.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur qualitativen und quantitativen Abschätzung des durch Affinitätschromatographie aufgereinigten Proteinextraktes wird eine Auftrennung in einem 10%igen Polyacrylamidgel durchgeführt (Neville, 1971).

Trenngel:                    424 mM Tris/HCl (pH 9,18), 10 % Polyacrylamid, 0,1 % SDS, 0,045 % TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin), 0,06 % APS (Ammoniumpersulfat)

Sammelgel:	54 mM Tris/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH 6,10), 6 % Polyacrylamid, 0,1 % SDS, 0,1 % TEMED, 0,1 % APS
Unterpuffer:	424 mM Tris/HCl (pH 9,18)
Oberpuffer:	41 mM Tris/Borsäure (pH 8,64), 0,1 % SDS

100 µl der Bakterienlösung oder Proteinlösung werden zentrifugiert (10000 × g, 1 Minute), mit 120 µl 4 % SDS und 40 µl Auftragspuffer (Roti<sup>®</sup>-Load 1; Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Nach kurzem Abkühlen werden die Proben zentrifugiert (10000 × g, 1 Minute) und die Taschen des Gels gefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei konstanter Stromstärke (30 mA) im Polyacrylamid-Gel. Als Molekulargewichtsmarker dienen Roti<sup>®</sup>-Mark 10-100 (Roth) oder SDS-Protein-Standard (Sigma, Deisenhofen, Deutschland).

Die Detektion erfolgt durch Coomassiefärbung.

Coomassie-Färbung (Sambrook und Mitarbeiter, 1989)

Lösung 1:	120 ml Methanol
	124 ml Essigsäure
	0,33 g Coomassie Blau
	120 ml Wasser
Lösung 2:	10 % Methanol
	7 % Essigsäure

Das Gel wird ca. eine Stunde in Lösung 1 gefärbt, mehrmals mit Wasser gewaschen (u.U. kurz in der Mikrowelle mit Wasser aufgeköcht) und über Nacht in Lösung 2 entfärbt.

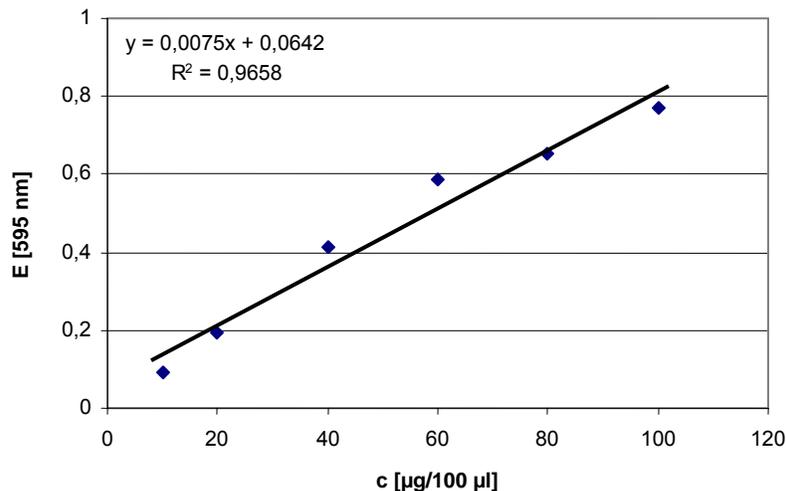
### 3.6.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgt nach der von Bradford (1976) entwickelten Methode.

Bradford-Lösung: 100 mg Coomassie Brilliantblau G-250 in  
50 ml 95% Ethanol auflösen.  
100 ml 85% (w/v) Phosphorsäure zugeben und mit Wasser  
auf 1 Liter auffüllen.

Die Proteinlösung, die 10 bis 100 µg Protein enthält wird mit dem jeweiligen Puffer auf 100 µl verdünnt. 5 ml der Bradfordlösung werden zugegeben. Nach gutem Durchmischen wird nach frühestens 2 Minuten und spätestens 1 Stunde die Extinktion bei 595 nm gegen den Puffer als Leerwert bestimmt.

Zur Aufnahme der Kalibriergeraden werden 10 bis 100 µg BSA (Rinderserumalbumin, Fraktion V; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in 100 µl Extraktionspuffer gelöst und wie oben beschrieben vermessen.



**Abb. D-1:** Kalibriergerade zur Proteinbestimmung nach Bradford (1976). Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet

### 3.6.3 Western-Blot

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen mit His-Tag<sup>®</sup> wird ein Western-Blot durchgeführt. Dafür werden 100 µl der pelletierten Bakterienlösung (10000 × g, 1 Minute) mit 120 µl 4% SDS, bzw. 60 µl Zell-Lysat oder 60 µl aufgereinigtes Zell-Lysat mit 60 µl 4 % SDS, und 40 µl Auftragspuffer 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Nach

elektrophoretischer Trennung werden die Proteine aus dem Gel auf Nitrocellulose geblottet.

Anodenpuffer 1: 0,3 M Tris, 20% MeOH

Anodenpuffer 2: 0,025 M Tris, 20% MeOH

Kathodenpuffer: 0,04 M 6-Aminohexansäure, 20% MeOH

Anordnung für den Blot:

Anode

3 x Whatmanpapier in Anodenpuffer 1

3 x Whatmanpapier in Anodenpuffer 2

Nitrocellulose in Anodenpuffer 2

SDS-Gel mit den Proteinen

3 x Whatmanpapier in Kathodenpuffer

Kathode

Der einstündige Transfer erfolgt bei einer konstanten Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$ .

Die Nitrocellulose wird mind. 20 Minuten in eine Blocklösung (5% Milchpulver, fettfrei, in  $1 \times \text{PBS/Tween}$ ) gelegt, anschließend mit  $500 \mu\text{l}$  Blocklösung und  $\frac{1}{2} \mu\text{l}$  Anti-His Antikörper eine Stunde inkubiert und dreimal je 5 Minuten mit PBS/Tween gewaschen. Die zweite Antikörperinkubation erfolgt mit Anti-Maus Antikörper (10 ml Block mit  $1 \mu\text{l}$  Anti-Maus Antikörper, eine Stunde). Danach wird dreimal je 5 Minuten mit PBS/Tween und zweimal in  $1 \times \text{TBS}$  gewaschen. Die Detektion erfolgt mit NBT/BCIP-Lösung. Dafür werden  $66 \mu\text{l}$  NBT (Nitroblau Tetrazolium;  $18,75 \text{ mg/ml}$ ) mit 10 ml Puffer (100 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM Tris, pH 7) und  $33 \mu\text{l}$  BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat p-Toluidinsalz;  $9,4 \text{ mg/ml}$  in 67% DMSO) gemischt, über die vorbereitete Nitrocellulose gegeben und in der Dunkelheit entwickelt. Die Auswertung erfolgt optisch nach Waschen der Nitrocellulose mit Leitungswasser.

### 3.6.4 Aktivitätsassay

Die Standard Assay Mixtur besteht aus:

182,5  $\mu$ l Puffer (100 mM TrisHCl, 10 % Glycerin, 5 mM Na-Disulfit,  
5 mM 2-Mercaptoethanol, pH 8,5)

5  $\mu$ l Substratlösung (Stammlösung 0,1 bis 100 mM)

50  $\mu$ l Enzymlösung

12,5  $\mu$ l UDPG\*/UDPG-Lösung

$\Sigma$  = 250  $\mu$ l

Für die UDPG\*/UDPG-Lösung werden 1  $\mu$ l markierte UDPG\* ( $c = 16,667 \mu\text{M}$ ) und 99  $\mu$ l unmarkierte 101 mM UDPG-Lösung gemischt (100  $\mu$ l UDPG\*/UDPG  $\approx$  100 mM). Die Inkubationsdauer beträgt 30 Minuten. Die Produkte werden durch Zugabe von wassergesättigtem n-Butanol extrahiert und 800  $\mu$ l des Extraktes mit 10 ml Szintillationscocktail im Flüssigszintillationszähler (LSC) vermessen.

Zur Bestätigung der Struktur der Säureglucoside wird eine alkalische Hydrolyse durchgeführt, da hierbei nur Esterbindungen angegriffen werden, nicht jedoch O-Glucoside. Dafür wird der Standardassay angesetzt, inkubiert, anschließend jeweils vor und nach alkalischer Hydrolyse mittels Radio-HPLC (HPLC 4) analysiert. Zur Hydrolyse wurden 90  $\mu$ l des Assays mit 10  $\mu$ l 1 M NaOH eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen, und danach mit 10  $\mu$ l 1 M HCl wieder angesäuert und mittels HPLC mit Radiodetektion (HPLC 4) vermessen.

## 3.7 Herstellung transgener Pflanzen

### 3.7.1 Herstellung der Konstrukte und Transformation der Pflanzen

Für die Herstellung der Sinn- und Gegensinnkonstrukte werden die jeweiligen offenen Leseraster (ORF), bzw. Teile daraus unter der Kontrolle des CaMV 35S Promoters in den Vektor pGD121, welcher ein Derivat des Vektor pBINPLUS darstellt, ligiert (Van Engelen und Mitarbeiter, 1995; Abb. C-3). Die Entscheidung, ob der vollständige ORF

(für Sinnkonstrukte zwingend) oder nur ein Teil daraus (für Gegensinnkonstrukte möglich) verwendet wird, wird durch die An- bzw. Abwesenheit der Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme in den jeweiligen ORF determiniert. Tab. C-3 zeigt die Konstrukte, die für die Sinn und Gegensinn Transformationen verwendet werden. Nach Ligation der Fragmente werden die Vektoren in *E. coli* vermehrt und der Einbau der Fragmente mittels Restriktionsverdau mit den angegebenen Restriktionsenzymen überprüft.

**Tab. C-3:** Strategie für die Herstellung von *Sense*- und *Antisense*konstrukten für anschließende Pflanzentransformationen. Außer im Falle des *Antisense*konstruktes bei FaGT2 wurden in allen Fällen der vollständige offene Leserahmen (ORF) zur Transformation verwendet.

	Sinnkonstrukte	Gegensinnkonstrukte
OMT	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Restriktionsverdau des ORF von <i>OMT</i> mit <i>BamH</i> I und <i>Xho</i> I<sup>2</sup></li> <li>• Restriktionsverdau des Vektors pGD121 mit <i>BamH</i> I und <i>Xho</i> I</li> <li>• Ligation beider Fragmente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Restriktionsverdau des ORF von <i>OMT</i> mit <i>BamH</i> I und <i>Xho</i> I<sup>1</sup></li> <li>• Restriktionsverdau des Vektors pGD121 mit <i>BamH</i> I und <i>Sal</i> I</li> <li>• Ligation beider Fragmente</li> </ul>
FaGT2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Addition zusätzlicher <i>Hind</i> III und <i>BamH</i> I Restriktionsschnittstellen zum ORF von <i>FaGT</i><sup>3</sup></li> <li>• Restriktionsverdau des Vektors pGD121 mit <i>Hind</i> III und <i>BamH</i> I</li> <li>• Ligation beider Fragmente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Restriktionsverdau eines Teils des ORF von <i>FaGT</i> mit <i>BamH</i> I und <i>Sal</i> I<sup>4</sup></li> <li>• Restriktionsverdau des Vektors pGD121 mit <i>BamH</i> I und <i>Sal</i> I</li> <li>• Ligation beider Fragmente</li> </ul>

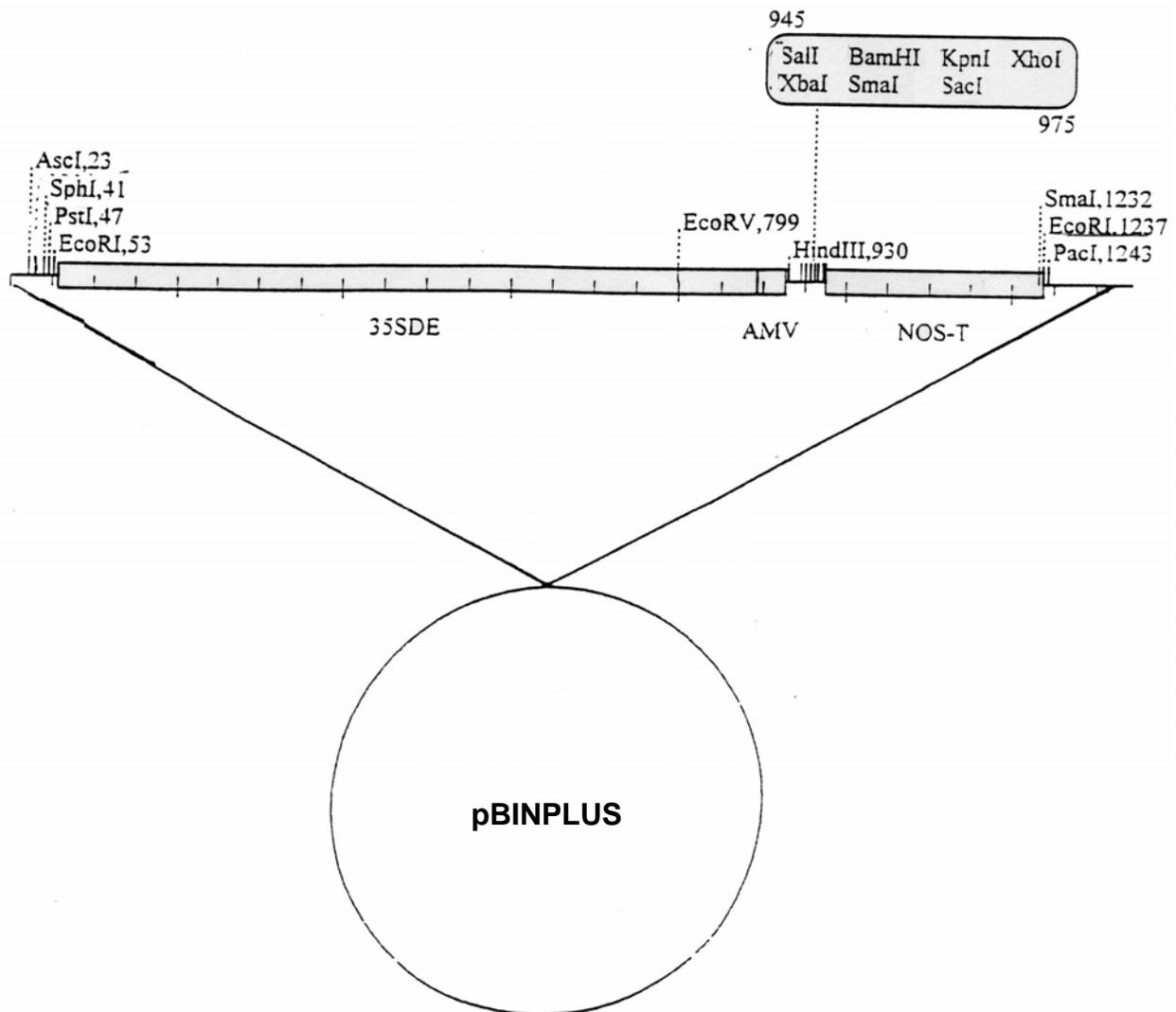
Für die anschließende Transformation werden 40 µl elektrokompetente Ag10 (*Agrobacterium tumefaciens*) zusammen mit etwa 40 ng (enthalten in 1 – 4 µl) DNA in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben. Es wird einmal gepulst (2,5 kV; 25 rF; R = 200 Ω; Reaktionszeit 4 – 5 ms). Unmittelbar darauf werden 800 µl kaltes SOC Medium

<sup>2</sup> Restriktionsschnittstellen bereits vorhanden

<sup>3</sup> Primer FaGT-sense-HindIII: 5'-AAA AAG CTT ATG GGT TCC GAA TCA TTG GT-3'; FaGT-sense-BamHI: 5'-TTT GGA TCC TTA CGA CTC GAC TAG TTC AA-3'

<sup>4</sup> Primer FaGT-antisense-SalI: 5'-AAA GTC GAC GGT TCC GAA TCA TTG GT-3'; FaGT-antisense-BamHI: 5'-TTT TGG ATC CCA CAA ACG AGC CAT GTA-3'

zugegeben und für eine Stunde bei 28 °C geschüttelt. 100 µl des Ansatzes sowie das Pellet (500 upm, 10 s) werden auf eine Agarplatte mit 50 µg/ml Kanamycin und 50 µg/ml Rifamicin ausplattiert. Die Platten werden zwei Tage bei 28 °C bebrütet. Eine einzelne Kolonie wird auf einer zweiten LB-Platte mit denselben Antibiotika ausgestrichen und erneut zwei Tage bei 28 °C bebrütet. Hiervon wird eine einzelne Kolonie in flüssigem LB-Medium mit den Antibiotika über Nacht bei 28 °C angezogen. Am nächsten Tag wird bei 2900 upm 10 Minuten zentrifugiert, das Pellet in 1 ml flüssigem MS-Medium mit AcS (Acetosyringon) suspendiert und auf 20 ml mit flüssigem MS mit AcS aufgefüllt (OD<sub>600</sub> = 0,2 bis 0,9).



**Abb. C-3:** Transformationsvektor pGD121, ein Derivat des Vektors pBINPLUS (Van Engelen und Mitarbeiter, 1995). Ausgehend von pBINPLUS wurde zwischen den PacI und AscI Klonierungsstellen der doppelt verstärkte CaMV 35 S Promotor (35SDE) sowie der Nos Terminator (NOS-T) und eine multiple Klonierungsstelle (nach Base 945) eingesetzt. Im

pBINPLUS Vektor sind bereits die für Pflanzentransformationen wichtige rechte und linke Grenze der T-DNA enthalten.

Von vier bis sechs Wochen alten Erdbeerpflanzen, welche in MS30 Medium mit 0,1 mg/l Indolbuttersäure und 0,1 mg/l Benzylaminopyrin herangezogen worden waren, werden die kleinen grünen Blätter abgeschnitten. Aus diesen werden pro Konstrukt etwa 100 Blattscheiben ausgestanzt ( $\varnothing$  1 cm), mit der Oberseite nach unten auf Kokultivierungsmedium (ZN102 mit AcS) aufgelegt und mit einer 20 ml Kultur der transformierten Agrobakterien übergossen. Nach 20 Minuten werden die Blattscheiben auf steriles Filterpapier gelegt, das sich auf einer Platte mit ZN102 Medium mit AcS befindet. Die Platten werden mit Parafilm<sup>®</sup> verschlossen und 72 Stunden bei 21 °C im Dunkeln gehalten. Danach werden die Blattscheiben auf Selektionsmedium ZN102 + Sel gelegt und zwei bis drei Wochen angezogen (T = 18 °C, 12 Stunden Licht). Danach werden sie auf frisches Selektionsmedium ZN102 + Sel wiederum für zwei bis drei Wochen gelegt. Nach vier bis sechs Wochen werden die regenerierten Pflanzen in Erde gesetzt und in das Gewächshaus gebracht (26 ± 2 °C, 16 Stunden Licht).

### **3.7.2. Quantitative RNA-Analyse transgener Erdbeerpflanzen mittels quantitativer Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (QRT-PCR)**

Für die quantitative Bestimmung der RNA-Menge wird zunächst Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels Echtzeit-PCR bestimmt.

#### **3.7.2.1 Isolation von Gesamt-RNA aus Erdbeeren**

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgt mit folgendem Miniprep Protokoll unter Verwendung von CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid). Zu 4 ml CTAB-Puffer werden 40 µl  $\beta$ -Mercaptoethanol und ein kleiner Löffel des in flüssigem Stickstoff homogenisierten Pflanzenmaterials (ca. 50 mg Blätter, bzw. Frucht) gegeben, mit 4 ml Chloroform versetzt, gut geschüttelt (zwei Minuten Vortex) und für vier Minuten bei 2000 upm zentrifugiert. Die obere Phase (3,5 ml) wird mit dem gleichen Volumen Chloroform gemischt, geschüttelt und zentrifugiert. Zur oberen Phase wird nun ein identischer

Volumenanteil Isopropanol gegeben um die DNA und RNA auszufällen. Es wird für 15 Minuten bei 2000 upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das nahezu unsichtbare Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen und für 5 Minuten bei 2000 upm zentrifugiert. Das Pellet wird in 200 µl 65 °C warmen Wasser gelöst und mit 67,6 µl 8 M LiCl versetzt um DNA von RNA zu trennen. Die Ausfällung der RNA findet bei -20 °C für mind. 20 Minuten statt. Danach wird bei 10000 × g 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird nach einem letzten Waschschrift mit 70% Ethanol getrocknet und in 20 µl Wasser aufgenommen. Die Kontrolle der Aufarbeitung erfolgt qualitativ mittels Gelelektrophorese in einem 1,4-%igen Agarosegel und quantitativ mittels UV-Photometrie.

### 3.7.2.2 Rücktranskription von RNA in cDNA

Vor der eigentlichen Echtzeit PCR muss die RNA in cDNA zurückübersetzt werden, da RNA nicht als Template in der PCR dienen kann. Für den Echtzeit Assay wird Erststrang cDNA mit DNaseI-behandelter (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) RNA hergestellt. Dafür wird das TaqMan<sup>®</sup> Reverse Transcription Reagent (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) verwendet.

In einem ersten Schritt wird die RNA mittels Behandlung mit DNase von DNA befreit.

Für die DNaseI Behandlung wurde folgendes Protokoll verwendet:

	N µl	entsprechend 1 µg RNA (Quantifiziert mittels UV)
	1 µl	10 × DNase Puffer
	1 µl	DNaseI (2000 U/ml)
	N' µl	Wasser
Σ =	10 µl	

Der Ansatz wird 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit 1 µl EDTA versetzt und 10 Minuten auf 65 °C erhitzt.

Für die Reverse Transkriptase Behandlung findet folgendes Protokoll Verwendung:

10 × Rt Puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	11 µl
dNTP	10 µl
Random hexamer Primer	2,5 µl
RNase Inhibitor	1 µl
Wasser	8,25 µl
	Σ = 37,75 µl
1 µg DNA-freie RNA	11 µl
Multiscribe Reverse Transcriptase	1,25 µl
(In der Kontrolle wird hier Wasser verwendet)	
	Σ Volumen = 50 µl

Die Reverse Transkriptase Bedingungen sind folgende:

Rt-Reaktion	Inkubation	Reverse Transkription	Reverse Transkriptase Inaktivierung
Zeit	10 min	30 min	5 min
Temperatur	25 °C	48 °C	95 °C

### 3.7.2.3 Quantitative Echtzeit PCR (QRT-PCR)

Die quantitative TaqMan<sup>®</sup> PCR enthält in einem Volumen von 20 µl neben der Erststrang cDNA (aus 10 µg RNA), 10 × TaqMan Puffer A, 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP, 400 µM dUTP, 0,01 U/µl AmpErase Uracil-n-Glycosylase, 0,025 U/µl AmpliTaq Gold DNA Polymerase (alle von Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sowie folgende Primer in den angegebenen Konzentrationen:

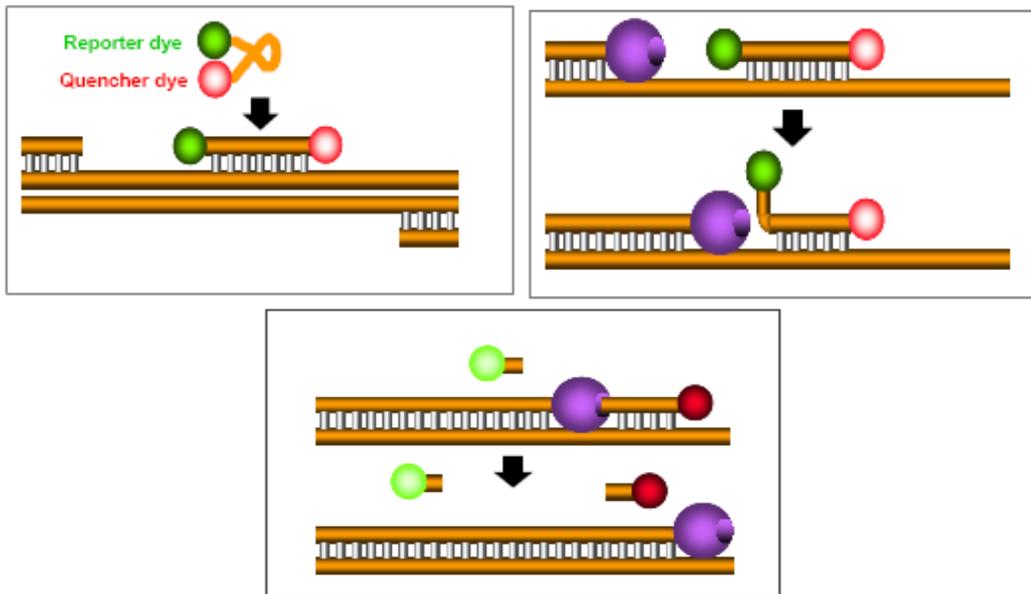
Sinn FaGT-F	(800 nM):	5'-AGA TGA AGC AAA ACG CCT TGA-3'
Sinn FaGT-R	(100 nM):	5'-ACC CTC CCT CGG AAA AAG C-3'
Sinn OMT-F	(800 nM):	5'-AGT TGG ATT TTG GAT GCT GTC AT-3'
Sinn OMT-R	(800 nM):	5'-AGA TCA GCA CAG CAT CTC AAA AAC-3'

Gegensinn FaGT-F (800 nM):	5'-GAG GGT CGT CGG ACA GGA A-3'
Gegensinn FaGT-R (200 nM):	5'-TGA TCC TCC TAA CCT CGT CCA-3'
Gegensinn OMT-F (800 nM):	5'-TTT TGA GAT GCT GTG CTG ATC TAT C-3'
Gegensinn OMT-R (800 nM):	5'-TAT GGT GCA AAT TCC ACA TGC T-3'

Alle Reaktionen werden dreifach ausgeführt. Die Parameter für die PCR-Reaktion sind 50 °C für 2 Minuten, 95 °C für 10 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen von 95 °C für 15 s und 60 °C für 1 Minute. Als endogene Kontrolle dient eine cDNA aus Erdbeeren, von welcher das Expressionsmuster in verschiedenen Erdbeeregeweben mittels Northern-Hybridisierung gezeigt wurde (Daten nicht gezeigt, freundlicherweise überlassen von Dr. A. Aharoni, PRI). Diese cDNA zeigte Ähnlichkeit zu einem Gen eines vermuteten DNA-Bindungsproteins aus *Arabidopsis thaliana* (*dbp*). Um den *dbp* cDNA Level zu bestimmen wird ein Vorwärts *dbp*-Primer (5'-TTG GCA GCG GGA CTT TAC C-3') und ein Rückwärts *dbp*-Primer (5'-CGG TTG TGT GAC GCT GTC AT-3') in dem TaqMan<sup>®</sup> Assay eingesetzt. Alle PCR Reaktionen werden im ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Perkin Elmer, Applied Biosystems) durchgeführt. Für die Echtzeit Analyse werden die PCR Produkte direkt detektiert indem die zunehmende Fluoreszenz gemessen wird.

Das TaqMan<sup>®</sup>-System beinhaltet eine Sonde, die sich zwischen den Annealingstellen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer anlagert. Diese Sonde enthält einen fluoreszierenden Farbstoff am 5'-Ende und einen Quencher am 3'-Ende (Abb. C-4). Im intakten Zustand ist durch die räumliche Nähe von Reporterfarbstoff und Quencher die Fluoreszenz, die von dem Reporterfarbstoff emittiert wird stark reduziert. Die Sonde lagert sich während des PCR-Prozesses an die Zielsequenz stromabwärts von einer der Primerbindungsstellen an und wird durch die 5'-Nucleaseaktivität der *Taq*-Polymerase gespalten. Durch die Spaltung der Sonde wird der Reporterfarbstoff vom Quencher getrennt (Abb. C-4), wodurch das Reporterfarbstoff-Signal emittiert werden kann. Weiterhin wird durch die Spaltung der Sonde diese vom Zielstrang getrennt, weswegen die Extension bis zum Ende des Template-Stranges stattfindet. Daher ist die Zugabe der Sonde ohne Einfluss auf den generellen PCR-Prozess. Durch den fortschreitenden PCR-Prozess werden immer mehr Reporterfarbstoff-Moleküle freigesetzt, die zu einem

Anstieg der Fluoreszenz führen, welche proportional zur Menge an amplifiziertem Material ist.



**Abb. C-4:** Mechanismus des TaqMan<sup>®</sup> Real Time PCR Systems. Eine Sonde lagert sich zwischen den PCR-Primer Bindungsstellen an (links oben). Diese Sonde enthält einen Reporterfarbstoff (Reporter dye), dessen Fluoreszenz von einem Quencherfarbstoff (Quencher dye) reduziert wird. Durch den fortschreitenden PCR-Prozess gelangt das Amplikon schließlich zu der Sonde (rechts oben). Durch die 5'-Nucleaseaktivität der *Taq*-Polymerase in der fortschreitenden PCR-Reaktion wird die Sonde gespalten (unten). Die räumliche Nähe von Reporter- und Quencherfarbstoff wird aufgehoben, und das Reporterfarbstoff-Signal kann emittiert werden. Durch die Entfernung der Sonde wird der Fortgang der PCR-Reaktion nicht behindert.

Die Amplifizierung wird als normalisiertes Reportersignal gegen die Zahl der PCR Zyklen aufgetragen. Das normalisierte Reportersignal,  $\Delta R_n$ , wird zu einem internen Referenzfarbstoff normalisiert und um den Basislinien-Wert korrigiert. Für jede Reaktion wird der Schwellenwert-Zyklus ( $C_T$ ) bestimmt, welcher definiert ist als der PCR Zyklus bei welchem ein statistisch signifikanter Anstieg von  $\Delta R_n$  zuerst detektiert wird. Die abschließende relative Quantifizierung wird unter Verwendung der vergleichenden  $C_T$ -Methode (User bulletin no. 2, ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, December 1997; Perkin-Elmer, Applied Biosystems) durchgeführt, in welchem die Unterschiede in den  $C_T$ -Werten für die endogene Kontrolle *dbp* und für das jeweilige zu untersuchende Amplikon als Differenz  $\Delta C_T$  berechnet wurden. Für den Vergleich zweier Proben werden

die  $\Delta C_T$ -Werte voneinander abgezogen, was den  $\Delta\Delta C_T$ -Wert liefert. Schließlich wird die relative Menge an Ausgangs-mRNA Kopien durch  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  berechnet.

## D Zusammenfassung

Fruchtentwicklung und Fruchtreifung beruhen auf einer komplexen Abfolge von Zellteilungs-, Zellwachstums- und Differenzierungsprozessen. Störungen innerhalb dieser Reaktionsabläufe können einen entscheidenden Einfluss sowohl auf die Qualität als auch den Ertrag von Früchten haben. Neben klassischer Züchtung wird hier in der Zukunft die gezielte Modifizierung einzelner Merkmale durch die Expression eingeführter Gene eine wesentliche Rolle spielen.

Die Veränderungen der Größe, Textur, Farbe und Aroma, die im Verlauf der Fruchtreifung stattfinden gehen mit Veränderungen der Aktivität und Menge der beteiligten Enzyme, Transkripte und Gene einher. Untersuchungen über die *in-vitro*-Funktion von Enzymen liefern immer nur ein fragmentarisches Bild von der Rolle, die diese Biokatalysatoren *in planta* spielen. Studien, die die Bedeutung von Enzymen bei der Genese von reifekorrelierten Komponenten in Früchten klären sollen, beinhalten daher neben der Charakterisierung nach heterologer Expression auch immer die Klärung der *in-vivo*-Funktion durch Generierung transgener Pflanzen.

Die vorliegende Arbeit präsentiert neue Erkenntnisse zur Expression und Funktion einer Chalconsynthase, O-Methyltransferase und Glucosyltransferase, die im Fruchtreifungsprozess bei der Biosynthese von Sekundärmetaboliten in Erdbeeren (*Fragaria* spp.) eine Rolle spielen.

Chalconsynthasen (CHS) katalysieren die Bildung von Chalcon, dem Vorläufer der Flavonoide, aus einem Molekül p-Cumaroyl-CoA und drei Molekülen Malonyl-CoA. Durch *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation von Erdbeerblättern (*Fragaria x ananassa* cv. Calypso) mit einem Chalconsynthase Gegensinn Genkonstrukt einer reifekorrelierten CHS cDNA von *Fragaria x ananassa* cv. Elsanta (*FaCHS*) wurden transgene Pflanzen erhalten, die einen stabilen Phänotyp mit rosa Früchten im reifen Zustand aufwiesen. Die untersuchte transgene Linie zeigte ein CHS mRNA Niveau das auf 2% im Vergleich zu Kontrollen gesunken war. Die Mengen an p-Cumar-, Kaffee- und

Ferulasäure-D-glucoseester waren gegenüber den Kontrollfrüchten erhöht, während p-Hydroxybenzoesäure-D-glucoseester in geringerer Konzentration detektiert wurde. Bei den analysierten flüchtigen Verbindungen konnte p-Cumaryl-1-acetat nach Synthese der Referenzverbindung eindeutig als Hauptkomponente identifiziert werden, die in zehnfach höherer Menge in den transgenen Früchten als in den Kontrollen vorhanden war. Durch die Transformation der Erdbeerpflanzen mit dem *CHS*-Konstrukt werden die Konzentrationen der Verbindungen in Richtung der Flavonoide und Anthocyane herabreguliert während Substanzen stromaufwärts des Phenylpropanoidpfades akkumulieren. Diese Veränderung des Stoffwechsels bewirkt, dass Minorkomponenten der Wildtyppflanzen in hohen Konzentrationen in transgenen Pflanzen nachgewiesen werden können.

O-Methyltransferasen (OMT) katalysieren die Methylgruppen Übertragung von S-Adenosyl-L-methionin auf Hydroxyfunktionen verschiedener Naturstoffe unter Ausbildung der entsprechenden Methylether. Kürzlich wurde eine OMT aus reifen Erdbeerfrüchten (*FaOMT*) kloniert, heterolog exprimiert und charakterisiert. Diese setzte sowohl o-Diphenolverbindungen als auch das für das Erdbeeraroma wichtige 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (HDMF) um. Die Transkripte wurden reifekorreliert exprimiert. Für die weitere Charakterisierung sind Erdbeerpflanzen mit Konstrukten transformiert worden, die das *FaOMT* Gen jeweils in Sinn- und Gegensinnrichtung unter Kontrolle des CaMV 35S Promoters enthielten. Pflanzen mit veränderter *FaOMT*-Expression wurden mittels quantitativer Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (QRT-PCR) selektiert und instrumentell-analytisch untersucht. In den Gegensinnpflanzen, die weniger als 25 % der *FaOMT* mRNA der Kontrollpflanzen besaßen führte die Einführung des Konstruktes zu einem nahezu vollständigen Verschwinden von 4-Methoxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon, dem Methylierungsprodukt von HDMF. Die Gehalte der anderen flüchtigen Verbindungen blieben unbeeinflusst. Weiterhin bewirkte die Repression des *FaOMT* Gens eine Änderung des Mengenverhältnisses von Kaffeesäure-D-glucoseester und dessen methyliertem Derivat Ferulasäure-D-glucoseester hin zum nichtmethylierten Derivat. Früchte, die mit dem Sinnkonstrukt transformiert worden waren zeigten keine signifikanten Veränderungen in den Furanonverhältnissen gegenüber den Kontrollen, mit Ausnahme einer Pflanze, die eine

geringere Menge an Transkripten enthielt (Co-Suppression) und Metabolitenverhältnisse wie die Gegensinnpflanzen aufwies. FaOMT ist daher sowohl an der Bildung von 4-Methoxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon als auch Ferulasäurederivaten in der Erdbeerpflanze beteiligt.

Ein großer Teil der pflanzlichen Sekundärmetabolite liegt glycosidisch gebunden vor. Für die Derivatisierung der Präkursoren sind Glycosyltransferasen (GT) verantwortlich. Die Vielzahl der glycosylierten Strukturen impliziert eine gewisse Vielzahl der Glycosyltransferasen bei der entsprechenden Pflanzenspezies. So konnten aus einer EST („expressed sequence tags“)-Datenbank von Erdbeerfrüchten vier verschiedene cDNAs identifiziert werden, die große Ähnlichkeit zu Glycosyltransferasen zeigten. Nach vollständiger Sequenzierung, Klonierung und heterologer Expression der entsprechenden Proteine wurden die Substratspezifitäten getestet. *Fragaria x ananassa* Glucosyltransferase 2 (FaGT2, 555 Aminosäuren, 61,4 kDa) zeigte Aktivität gegenüber Zimtsäure, Benzoessäure und deren Derivate unter Ausbildung einer Glucoseesterbindung. Die Expression von *FaGT2* in den Früchten ist reifekorreliert, mit einem Maximum bei rot werdenden Früchten. Geringe Gehalte der Transkripte wurden auch in Wurzeln und Blüten gefunden. Eine Untersuchung der Glucoseester in den Früchten und weiteren Pflanzenteilen ergab, dass die Gehalte an Zimtsäure-, p-Cumarsäure-, Kaffeesäure- und p-Hydroxybenzoessäure-D-glucoseester während der Fruchtreifung ansteigen, was auf eine reifungskorrelierte Bildung schließen lässt. Blätter und speziell Blüten enthalten die höchsten Mengen an Glucoseestern, geringere Mengen wurden in Wurzeln und Stängeln detektiert. Um die Funktion von *FaGT2 in planta* zu untersuchen wurden transgene Erdbeerpflanzen hergestellt, die das *FaGT2* Gen in Sinn- oder Gegensinn-Richtung enthielten. Obwohl *FaGT2 in vitro* eine Anzahl aromatischer Säuren glucosylieren kann, zeigten die quantitativen Daten der Glucoseester in den transgenen Linien, dass das Enzym primär für die Bildung von Zimtsäure-D-glucoseester und in geringerem Ausmaß auch für die Biosynthese von p-Cumarsäure-D-glucoseester während der Reifung verantwortlich ist. Sowohl die Gehalte der Glucoseester, die in den verschiedenen Fruchtreifungsstadien quantifiziert wurden als auch deren Konzentrationen in den verschiedenen transgenen Linien beweisen das

Vorliegen mindestens einer weiteren Glucoseester-bildenden Glucosyltransferase in Erdbeerfrüchten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Bedeutung dreier Gene und ihrer entsprechenden Produkte für die Biosynthese von ernährungsphysiologisch wichtigen Naturstoffen in der Erdbeerfrucht aufgezeigt werden. So kontrolliert FaCHS die Stoffflüsse über den Flavonoid und Phenylpropanoidweg wodurch dieses Enzym die Farbbildung primär beeinflusst. Weiterhin wurde erstmals die Doppelfunktion von FaOMT als auch FaGT2 im Stoffwechsel der Früchte demonstriert. Die Ergebnisse liefern somit wichtige Erkenntnisse für spätere genetische Manipulationen zur Qualitätsverbesserung von Früchten.

## E Summary

Development and ripening of fruit is the result of a complex series of cell division, growth and differentiation processes. Quality and yield of fruit can be vigorously and decisively influenced by disturbances in these processes. In addition to classical breeding, in the future, targeted modification of individual characteristics through the expression of inserted genes will play a crucial role.

Changes in size, texture, color and aroma associated with fruit ripening occur simultaneously with alterations of activity and quantity of involved enzymes, transcripts and genes. Thus, investigations into the *in vitro* functions of enzymes often give only a fragmentary picture of the role these biocatalysts play *in planta*. For this reason, in studies concerned with elucidating the significance of certain ripening-related enzymes, characterization following heterologous expression often includes the clarification of the biocatalyst's *in-vivo*-function using transgenic plants.

This work presents novel insights into the expression and function of a chalconsynthase, an O-methyltransferase and a glucosyltransferase, all of which play a role in the biosynthesis of secondary metabolites in strawberry (*Fragaria* spp.) during fruit ripening.

Chalconsynthases (CHS) catalyze the formation of chalcon, a flavonoid precursor, using one molecule of p-coumaroyl-CoA and three molecules of malonyl-CoA. Through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Calypso) leaves using a gene construct containing the antisense chalconsynthase cDNA of a ripening-related *CHS* from *Fragaria x ananassa* cv. Elsanta (*FaCHS*), transgenic plants were produced whose stable phenotype has pink, rather than red, fruit in the ripe stage. In the examined transgenic line, the *CHS* mRNA content was reduced to 2% of that of the controls. Amounts of p-coumaroyl, caffeoyl and feruloyl D-glucose were elevated compared to control fruit while p-hydroxybenzoyl D-glucose levels were lower. The analysis of volatile compounds in the fruit revealed one substance whose level had increased tenfold in transgenic fruit compared to controls, and which was

identified to be *p*-coumaroyl-1-acetate following synthesis of the reference compound. Due to the transformation of the strawberry plants with the *CHS* construct, concentrations of compounds on the flavonoid and anthocyanin end of the phenylpropanoid pathway were downregulated while substances upstream accumulated. As a result of these metabolic changes, what are normally minor compounds in wildtype plants could be detected at high concentrations in transgenic plants.

O-methyltransferases (OMT) catalyze the transfer of methyl groups from S-adenosyl-L-methionine to hydroxyl groups of various natural compounds, thus generating the corresponding methyl ethers. Recently, an OMT from ripe strawberry fruit (*FaOMT*) was cloned, heterologously expressed and characterized. This OMT converted both *o*-diphenol compounds and 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone (HDMF), an important flavour compound in strawberries. Transcript expression was ripening-related. For further investigations, strawberry plants were generated using two constructs, each containing *FaOMT* in the sense or antisense direction controlled by a CaMV 35S promoter. Plants with altered *FaOMT* expression were selected using quantitative real time polymerase chain reaction (QRT-PCR) and investigated using analytical methods. In antisense plants containing less than 25% of control *FaOMT*, the integration of the construct led to a nearly complete loss of the methylation product of HDMF 4-methoxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone. Other volatile compounds were not influenced. In addition, the repression of the *FaOMT* gene caused a change in the ratio of caffeoyl D-glucose and the methylated derivative feruloyl D-glucose to the non-methylated derivative. Fruit transformed with the sense construct showed no significant change in the ratio of the furanones compared to controls, except for one plant, which contained lower amounts of transcripts (co-suppression) and metabolite-ratios similar to those of the antisense plants. *FaOMT* is therefore involved in formation of both 4-methoxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon and ferulic acid derivatives in strawberry plants.

Most of the secondary metabolites in plants are present in their glycosidically-bound form. Glycosyltransferases (GT) are responsible for the derivatisation of the precursors. The high number of glycosidic structures suggests that glycosyltransferases in the

corresponding plant species are also numerous. From an EST (expressed sequence tags) library, four different cDNAs could be identified having high homology to glycosyltransferases. After complete sequencing, cloning and heterologous expression of the corresponding proteins, substrate specificity was tested. *Fragaria x ananassa* glucosyltransferase 2 (FaGT2, 555 amino acids, 61.4 kDa) showed activity with cinnamic acid, benzoic acid and derivatives, and produced the corresponding glucose esters of the various substrates. *FaGT2* expression is ripening-related, peaking in pink fruit. Minor amounts of the transcripts were also detected in roots and flowers. An investigation of glucose esters in fruit and other parts of the plant showed a ripening-correlated increase of cinnamoyl, p-coumaroyl, caffeoyl and p-hydroxybenzoyl D-glucose in fruit, implying a ripening-related formation of these compounds. Leaves, and especially flowers, contained the highest amounts of glucose esters, while lower amounts were detected in roots and stems. In order to investigate the function of FaGT2 *in planta*, transgenic strawberry plants were produced, containing *FaGT2* in either the sense or antisense direction. Although FaGT2 can glucosylate a vast number of aromatic acids *in vitro*, quantitative data from the transgenic lines show that the enzyme is primarily responsible for the formation of cinnamoyl D-glucose and, to a lesser extent, also for the biosynthesis of p-coumaroyl D-glucose. Both the amounts of glucose esters during different ripening stages of wildtype fruit, and their concentration in the different transgenic lines suggested the presence of at least one additional glucosyltransferase responsible for forming glucose esters in strawberry fruit.

This work demonstrates the significance of three genes and their products for the biosynthesis of nutritionally important natural compounds. FaCHS has been shown to control the flux of precursors into the flavonoid and phenylpropanoid pathways, thereby influencing the formation of color, and FaOMT and FaGT2 have been shown to perform a dual function in strawberry fruit metabolism. These results give new insight into further genetic manipulations that may result in the improvement of strawberry fruit quality.

## F Literaturverzeichnis

- Aharoni, A., Keizer, L. C. P., Bouwmeester, H. J., Sun, Z. K., Alvarez-Huerta, M., Verhoeven, H. A., Blaas, J., van Houwelingen, A. M. M. L., De Vos, R. C. H., van der Voet, H., Jansen, R. C., Guis, M., Mol, J., Davis, R. W., Schena, M., van Tunen, A. J., und O'Connell, A. P. (2000) Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays *Plant Cell*, **12**, 647-661
- Aharoni, A., Keizer Leopold, C. P., Van Den Broeck Hetty, C., Blanco-Portales, R., Munoz-Blanco, J., Bois, G., Smit, P., De Vos Ric, C. H., und O'Connell Ann, P. (2002) Novel insight into vascular, stress, and auxin-dependent and -independent gene expression programs in strawberry, a non-climacteric fruit *Plant Physiol.*, **129**, 1019-31
- Aharoni, A. und O'Connell, A. P. (2002) Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays *J. Exp. Bot.*, **53**, 2073-2087
- Allevi, P., Ciuffreda, P., Longo, A., und Anastasia, M. (1998) Lipase-catalysed chemoselective monoacetylation of hydroxyalkylphenols and chemoselective removal of a single acetyl group from their diacetates *Tetrahedron-Asymmetry*, **9**, 2915-2924
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., und Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-10
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, 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 Res.*, **25**, 3389-3402
- Amthor, J. S. (2003) Efficiency of lignin biosynthesis: a quantitative analysis *Ann. Bot.*, **91**, 673-695
- Atanassova, R., Favet, N., Martz, F., Chabbert, B., Tollier, M.-T., Monties, B., Fritig, B., und Legrand, M. (1995) Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequences in sense and antisense orientation *Plant J.*, **8**, 465-77
- Bairoch, A. (1991) Prosite - A dictionary of sites and patterns in proteins *Nucleic Acids Res.*, **19**, 2241-2245
- Belitz, H.-D. und Grosch, W. (1992) Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer, Berlin, Heidelberg

- Bevan, M., Mayer, K., White, O., Eisen, J. A., Preuss, D., Bureau, T., Salzberg, S. L., und Mewes, H. W.** (2001) Sequence and analysis of the *Arabidopsis* genome *Curr. Opin. Plant Biol.*, **4**, 105-110
- Blanco-Portales, R., Medina-Escobar, N., Lopez-Raez, J. A., Gonzalez-Reyes, J. A., Villalba, J. M., Moyano, E., Caballero, J. L., und Munoz-Blanco, J.** (2002) Cloning, expression and immunolocalization pattern of a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) *J. Exp. Bot.*, **53**, 1723-1734
- Blount, J. W., Korth, K. L., Masoud, S. A., Rasmussen, S., Lamb, C., und Dixon, R. A.** (2000) Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway *Plant Physiol.*, **122**, 107-116
- Boerjan, W., Ralph, J., und Baucher, M.** (2003) Lignin biosynthesis *Ann. Rev. Plant Biol.*, **54**, 519-546
- Booij-James, I. S., Dube, S. K., Jansen, M. A. K., Edelman, M., und Mattoo, A. K.** (2000) Ultraviolet-B radiation impacts light-mediated turnover of the photosystem II reaction center heterodimer in *Arabidopsis* mutants altered in phenolic metabolism *Plant Physiol.*, **124**, 1275-1283
- Boss, P. K., Davies, C., und Robinson, S. P.** (1996) Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation *Plant Physiol.*, **111**, 1059-1066
- Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254
- Brugliera, F., Holton, T. A., Stevenson, T. W., Farcy, E., Lu, C. Y., und Cornish, E. C.** (1994) Isolation and characterization of a cDNA clone corresponding to the Rt locus of *Petunia hybrida* *Plant J.*, **5**, 81-92
- Bugos, R. C., Chiang, V. L. C., und Campbell, W. H.** (1991) cDNA cloning, sequence-analysis and seasonal expression of lignin-bispecific caffeic acid 5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase of *Aspen* *Plant Mol. Biol.*, **17**, 1203-1215
- Campbell, J. A., Davies, G. J., Bulone, V., und Henrissat, B.** (1997) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities *Biochem. J.*, **326**, 929-939
- Carpita, N. C.** (1996) Structure and biogenesis of the cell walls of grasses *Annu. Rev. Plant. Phys. Plant Mol. Biol.*, **47**, 445-476
- Charnock, S. J., Henrissat, B., und Davies, G. J.** (2001) Three-dimensional structures of UDP-sugar glycosyltransferases illuminate the biosynthesis of plant polysaccharides *Plant Physiol.*, **125**, 527-531

- Cheng, G. W., Malencik, D. A., und Breen, P. J.** (1994) UDP-glucose:flavonoid O-glucosyltransferase from strawberry fruit *Phytochemistry*, **35**, 1435-9
- Chong, J., Baltz, R., Schmitt, C., Beffa, R., Fritig, B., und Saindrenan, P.** (2002) Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc:phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance *Plant Cell*, **14**, 1093-1107
- Clifford, M. N.** (1999) Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 362-372
- Clifford, M. N.** (2000) Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 1033-1043
- Colliver, S. P., Morris, P., und Robbins, M. P.** (1997) Differential modification of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis with an antisense chalcone synthase construct in transgenic *Lotus corniculatus* *Plant Mol. Biol.*, **35**, 509-522
- Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G. J., und Henrissat, B.** (2003) An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases *J. Mol. Biol.*, **328**, 307-317
- Davies, G. J., Charnock, S. J., und Henrissat, B.** (2001) The enzymatic synthesis of glycosidic bonds: glycosynthases and glycosyltransferases *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **13**, 105-120
- Deroles, S. C., Bradley, J. M., Schwinn, K. E., Markham, K. R., Bloor, S., Manson, D. G., und Davies, K. M.** (1998) An antisense chalcone synthase cDNA leads to novel colour patterns in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) flowers *Mol. Breed.*, **4**, 59-66
- Dixon, R. A., Chen, F., Guo, D. J., und Parvathi, K.** (2001) The biosynthesis of monolignols: a "metabolic grid", or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? *Phytochemistry*, **57**, 1069-1084
- El Euch, C., Jay-Allemand, C., Pastuglia, M., Dumas, P., Charpentier, J. P., Capelli, P., und Jouanin, L.** (1998) Expression of antisense chalcone synthase RNA in transgenic hybrid walnut microcuttings. Effect on flavonoid content and rooting ability *Plant Mol. Biol.*, **38**, 467-479
- Fauman E. B., Blumenthal R. M., und Cheng X. D.** (1999) Structure and evolution of AdoMet-dependent methyltransferases in S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structure and Functions. World Scientific Publishing, Singapore
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B.** (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13

- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B.** (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum *Anal. Biochem.*, **137**, 266-7
- Ferrer, J. L., Jez, J. M., Bowman, M. E., Dixon, R. A., und Noel, J. P.** (1999) Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis *Nature Struc. Biol.*, **6**, 775-784
- Fischer, N. und Hammerschmidt, F. J.** (1992) A contribution to the analysis of fresh strawberry flavor *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, **14**, 141-148
- Ford, C. M., Boss, P. K., und Hoj, P. B.** (1998) Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homolog of the enzyme encoded by the maize bronze-1 locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins in vivo *J. Biol. Chem.*, **273**, 9224-9233
- Fraissinet-Tachet, L., Baltz, R., Chong, J., Kauffmann, S., Fritig, B., und Saindrenan, P.** (1998) Two tobacco genes induced by infection, elicitor and salicylic acid encode glucosyltransferases acting on phenylpropanoids and benzoic acid derivatives, including salicylic acid *FEBS Lett.*, **437**, 319-323
- Franke, W.** (1997) Nutzpflanzenkunde. Thieme, Stuttgart
- Gang, D. R., Lavid, N., Zubieta, C., Chen, F., Beuerle, T., Lewinsohn, E., Noel, J. P., und Pichersky, E.** (2002) Characterization of phenylpropene O-methyltransferases from sweet basil: facile change of substrate specificity and convergent evolution within a plant O-methyltransferase family *Plant Cell*, **14**, 505-519
- Goto-Yamamoto, N., Wan, G. H., Masaki, K., und Kobayashi, S.** (2002) Structure and transcription of three chalcone synthase genes of grapevine (*Vitis vinifera*) *Plant Sci.*, **162**, 867-872
- Goujon, T., Sibout, R., Pollet, B., Maba, B., Nussaume, L., Bechtold, N., Lu, F. C., Ralph, J., Mila, I., Barriere, Y., Lapierre, C., und Jouanin, L.** (2003) A new *Arabidopsis thaliana* mutant deficient in the expression of O-methyltransferase impacts lignins and sinapoyl esters *Plant Mol. Biol.*, **51**, 973-989
- Groyne, J., Lognay, G., und Marlier, M.** (1999) Accumulation of glycosidically bound compounds in *Fragaria x ananassa* cv. Elsanta fruits at various developmental stages *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **3**, 5-9
- Häkkinen, S. H. und Auriola, S.** (1998) High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycons and glycosides in berries *J. Chromatogr. A*, **829**, 91-100

- Häkkinen, S. H., Heinonen, M., Kärenlampi, S. O., Mykkänen, H., Ruuskanen, J., und Törrönen, A. R.** (1999) Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries *Food Res. Int.*, **32**, 345-353
- Häkkinen, S. H. und Törrönen, A. R.** (2000) Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique *Food Res. Int.*, **33**, 517-524
- Hancock, J. F.** (1999) Strawberries. CABI Publishing, New York, USA
- Harpster, M. H., Brummell, D. A., und Dunsmuir, P.** (1998) Expression analysis of a ripening-specific, auxin-repressed endo-1,4- $\beta$ -glucanase gene in strawberry *Plant Physiol.*, **118**, 1307-1316
- Harrison, E. P., McQueen-Mason, S. J., und Manning, K.** (2001) Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit *J. Exp. Bot.*, **52**, 1437-1446
- Hefner, T., Arend, J., Warzecha, H., Siems, K., und Stockigt, J.** (2002) Arbutin synthase, a novel member of the NRD1 $\beta$  glycosyltransferase family, is a unique multifunctional enzyme converting various natural products and xenobiotics *Bioorgan. Med. Chem.*, **10**, 1731-1741
- 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*, Ruegen and *Fragaria virginiana* *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **175**, 113-16
- Holton, T. A. und Cornish, E. C.** (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis *Plant Cell*, **7**, 1071-83
- Honda, C., Kotoda, N., Wada, M., Kondo, S., Kobayashi, S., Soejima, J., Zhang, Z. L., Tsuda, T., und Moriguchi, T.** (2002) Anthocyanin biosynthetic genes are coordinately expressed during red coloration in apple skin *Plant Physiol. Biochem.*, **40**, 955-962
- Houde, M., Dallaire, S., N'Dong, D., und Sarhan, F.** (2004) Overexpression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves *Plant Biotech. J.*, **2**, 381-387
- Hughes, J. und Hughes, M. A.** (1994) Multiple secondary plant product UDP-glucose glucosyltransferase genes expressed in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cotyledons *DNA Seq.*, **5**, 41-49
- Humphreys, J. M. und Chapple, C.** (2002) Rewriting the lignin roadmap *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**, 224-229
- Ibrahim, R. K., Bruneau, A., und Bantignies, B.** (1998) Plant O-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification *Plant Mol. Biol.*, **36**, 1-10

- Ibrahim R. K. und Muzac I.** (2000) The methyltransferase gene superfamily: a tree with multiple branches in Recent advances in phytochemistry (Evolution of metabolic pathways). Elsevier Science, London, Amsterdam, New York
- Jaakola, L., Määttä, K., Pirttilä, A. M., Törrönen, R., Kärenlampi, S. O., und Hohtola, A.** (2002) Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development *Plant Physiol.*, **130**, 729-739
- Jackson, R. G., Lim, E. K., Li, Y., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Hoggett, J., Ashford, D. A., und Bowles, D. J.** (2001) Identification and biochemical characterization of an *Arabidopsis* indole-3-acetic acid glucosyltransferase *J. Biol. Chem.*, **276**, 4350-4356
- Jez, J. M., Austin, M. B., Ferrer, J. L., Bowman, M. E., Schroder, J., und Noel, J. P.** (2000a) Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases *Chem. & Bio.*, **7**, 919-930
- Jez, J. M., Ferrer, J. L., Bowman, M. E., Dixon, R. A., und Noel, J. P.** (2000b) Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase *Biochem.*, **39**, 890-902
- Jones, P. und Vogt, T.** (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta*, **213**, 164-174
- Joshi, C. P. und Chiang, V. L.** (1998) Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases *Plant Mol. Biol.*, **37**, 663-674
- Jouanin, L., Goujon, T., de Nadai, V., Martin, M. T., Mila, I., Vallet, C., Pollet, B., Yoshinaga, A., Chabbert, B., Petit-Conil, M., und Lapierre, C.** (2000) Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity *Plant Physiol.*, **123**, 1363-1373
- Kapitonov, D. und Yu, R. K.** (1999) Conserved domains of glycosyltransferases *Glycobiology*, **9**, 961-978
- Kim, I. J. und Chung, W. I.** (1998) Isolation of genomic DNA containing a cytosolic ascorbate peroxidase gene (ApxSC) from the strawberry (*Fragaria x ananassa*) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1358-1363
- Kita, M., Hirata, Y., Moriguchi, T., Endo-Inagaki, T., Matsumoto, R., Hasegawa, S., Suhayda, C. G., und Omura, M.** (2000) Molecular cloning and characterization of a novel gene encoding limonoid UDP-glucosyltransferase in *Citrus* *FEBS Lett.*, **469**, 173-178
- Kosar, M., Kafkas, E., Paydas, S., und Baser, K. H. C.** (2004) Phenolic composition of strawberry genotypes at different maturation stages *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 1586-1589

- Kroon, J., Souer, E., de Graaff, A., Xue, Y., Mol, J., und Koes, R.** (1994) Cloning and structural analysis of the anthocyanin pigmentation locus *Rt* of *Petunia hybrida*: characterization of insertion sequences in two mutant alleles *Plant J.*, **5**, 69-80
- Kubo, A., Arai, Y., Nagashima, S., und Yoshikawa, T.** (2004) Alteration of sugar donor specificities of plant glycosyltransferases by a single point mutation *Arch. Biochem. Biophys.*, **429**, 198-203
- Kumar, A. und Ellis, B. E.** (2003) A family of polyketide synthase genes expressed in ripening *Rubus* fruits *Phytochemistry*, **62**, 513-526
- Lam, T. B. T., Iiyama, K., und Stone, B. A.** (1996) Caffeic acid: O-methyltransferases and the biosynthesis of ferulic acid in primary cell walls of wheat seedlings *Phytochemistry*, **41**, 1507-1510
- Larsen, M. und Poll, L.** (1992) Odor thresholds of some important aroma compounds in strawberries *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **195**, 120-3
- Latrasse A.** (1991) Fruits III in Volatile Compounds in Foods and Beverages. Marcel-Dekker, New York
- Latza, S. und Berger, R. G.** (1997) 1-*O-trans*-cinnamoyl- $\beta$ -D-glucopyranose:alcohol cinnamoyltransferase activity in fruits of cape gooseberry (*Physalis peruviana*) *Z. Naturforsch.*, **52**, 747-755
- Latza, S., Gansser, D., und Berger, R. G.** (1996) Identification and accumulation of 1-*O-trans*-cinnamoyl- $\beta$ -D-glucopyranose in developing strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch. Cv. Kent) *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1367-1370
- Lavid, N., Schwab, W., Kafkas, E., Koch-Dean, M., Bar, E., Larkov, O., Ravid, U., und Lewinsohn, E.** (2002a) Aroma biosynthesis in strawberry: S-adenosylmethionine:Furaneol O-methyltransferase activity in ripening fruits *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4025-4030
- Lavid, N., Wang, J., Shalit, M., Guterman, I., Bar, E., Beuerle, T., Menda, N., Shafir, S., Zamir, D., Adam, Z., Vainstein, A., Weiss, D., Pichersky, E., und Lewinsohn, E.** (2002b) O-methyltransferases involved in the biosynthesis of volatile phenolic derivatives in rose petals *Plant Physiol.*, **129**, 1899-1907
- Lehfeldt, C., Shirley, A. M., Meyer, K., Ruegger, M. O., Cusumano, J. C., Viitanen, P. V., Strack, D., und Chapple, C.** (2000) Cloning of the SNG1 gene of *Arabidopsis* reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism *Plant Cell*, **12**, 1295-1306
- Li, Y., Baldauf, S., Lim, E. K., und Bowles, D. J.** (2001) Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana* *J. Biol. Chem.*, **276**, 4338-4343

- Lim, E. K., Higgins, G. S., Li, Y., und Bowles, D. J.** (2003) Regioselectivity of glucosylation of caffeic acid by a UDP-glucose : glucosyltransferase is maintained in planta *Biochem. J.*, **373**, 987-992
- Lim, E. K., Li, Y., Parr, A., Jackson, R., Ashford, D. A., und Bowles, D. J.** (2001) Identification of glucosyltransferase genes involved in sinapate metabolism and lignin synthesis in *Arabidopsis* *J. Biol. Chem.*, **276**, 4344-4349
- Lim, E.-K., Doucet, C. J., Li, Y., Elias, L., Worrall, D., Spencer, S. P., Ross, J., und Bowles, D. J.** (2002) The activity of *Arabidopsis* glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and other benzoates *J. Biol. Chem.*, **277**, 586-592
- Llop-Tous, I., Dominguez-Puigjaner, E., Palomer, X., und Vendrell, M.** (1999) Characterization of two divergent endo- $\beta$ -1,4-glucanase cDNA clones highly expressed in the nonclimacteric strawberry fruit *Plant Physiol.*, **119**, 1415-1421
- Lottspeich, F. und Zorbas, H.** (1998) Bioanalytik. Spektrum, Heidelberg, Berlin
- Määttä-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., und Törrönen, A. R.** (2004) Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (Family rosaceae) *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6178-6187
- Mackenzie, P. I., Owens, I. S., Burchell, B., Bock, K. W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D. W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Chowdhury, J. R., Ritter, J. K., Schachter, H., Tephly, T. R., Tipton, K. F., und Nebert, D. W.** (1997) The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence *Pharmacogenetics*, **7**, 255-269
- Manning, K.** (1998) Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits *Planta*, **205**, 622-31
- Manning, K.** (1991) Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation *Anal. Biochem.*, **195**, 45-50
- Mathews, H., Dewey, V., Wagoner, W., und Bestwick, R. K.** (1998) Molecular and cellular evidence of chimaeric tissues in primary transgenics and elimination of chimaerism through improved selection protocols *Transgen. Res.*, **7**, 123-129
- Mattila, P. und Kumpulainen, J.** (2002) Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3660-3667
- Matzke, M. A. und Matzke, A.** (1995) How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? *Plant Physiol.*, **107**, 679-685
- Medina-Escobar, N., Cardenas, J., Valpuesta, V., Munoz-Blanco, J., und Caballero, J. L.** (1997) Cloning and characterization of cDNAs from genes differentially

- expressed during the strawberry fruit ripening process by a MAST-PCR-SBDS method *Anal. Biochem.*, **248**, 288-296
- Milkowski, C., Baumert, A., Schmidt, D., Nehlin, L., und Strack, D.** (2004) Molecular regulation of sinapate ester metabolism in *Brassica napus*: expression of genes, properties of the encoded proteins and correlation of enzyme activities with metabolite accumulation *Plant J.*, **38**, 80-92
- Milkowski, C., Baumert, A., und Strack, D.** (2000) Cloning and heterologous expression of a rape cDNA encoding UDP-glucose:sinapate glucosyltransferase *Planta*, **211**, 883-886
- Mock, H. P. und Strack, D.** (1993) Energetics of the uridine 5'-diphosphoglucose:hydroxycinnamic acid acyl-glucosyltransferase reaction *Phytochemistry*, **32**, 575-9
- Nam, Y.-W., Tichit, L., Leperlier, M., Cuerq, B., Marty, I., und Lelievre, J.-M.** (1999) Isolation and characterization of mRNAs differentially expressed during ripening of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) fruits *Plant Mol. Biol.*, **39**, 629-636
- Napoli, C., Lemieux, C., und Jorgensen, R.** (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans *Plant Cell*, **2**, 279-289
- Neville, D. M.** (1971) Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system *J. Biol. Chem.*, **246**, 6328-8
- Nyman, N. A. und Kumpulainen, J. T.** (2001) Determination of anthocyanidins in berries and red wine by high-performance liquid chromatography *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4183-4187
- Obel, N., Porchia, A. C., und Scheller, H. V.** (2003) Intracellular feruloylation of arabinoxylan in wheat: evidence for feruloyl-glucose as precursor *Planta*, **216**, 620-629
- Olsson, M. E., Ekvall, J., Gustavsson, K. E., Nilsson, J., Pillai, D., Sjöholm, I., Svensson, U., Akesson, B., und Nyman, M. G. L.** (2004) Antioxidants, low molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberries (*Fragaria x ananassa*): Effects of cultivar, ripening, and storage *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 2490-2498
- Paulson, J. C. und Colley, K. J.** (1989) Glycosyltransferases - structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation *J. Biol. Chem.*, **264**, 17615-17618
- Perez, A. G., Olias, R., Sanz, C., und Olias, J. M.** (1996) Furanones in strawberries: evolution during ripening and postharvest shelf life *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3620-3624

- Perkins-Veazie, P.** (1995) Growth and ripening of strawberry fruit *Horticult. reviews*, **17**, 267-297
- Pisarnitskii, A. F., Demechenko, A. G., Egorov, I. A., und Gvelesiani, R. K.** (1992) Methylpentoses are possible precursors of furanones in fruits *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, **28**, 123-7
- Plaxton, W. C.** (1996) The organization and regulation of plant glycolysis *Annu. Rev. Plant. Phys. Plant Mol. Biol.*, **47**, 185-214
- Plusquellec, D., Roulleau, F., Bertho, F., Lefeuvre, M., und Brown, E.** (1986) Sugar chemistry without protective groupings.1. Regioselective esterification of anomeric hydroxyl of lactose, maltose and glucose *Tetrahedron*, **42**, 2457-2467
- Que, Q. D., Wang, H. Y., und Jorgensen, R. A.** (1998) Distinct patterns of pigment suppression are produced by allelic sense and antisense chalcone synthase transgenes in petunia flowers *Plant J.*, **13**, 401-409
- Radtko, J., Linseisen, J., und Wolfram, G.** (1998) Phenolic acid intake of adults in a Bavarian subgroup of the National Food Consumption Survey *Z. Ernährungswiss.*, **37**, 190-197
- Richard, J. P.** (1991) Kinetic parameters for the elimination-reaction catalyzed by triosephosphate isomerase and an estimation of the reactions physiological significance *Biochem.*, **30**, 4581-4585
- Richman, A., Swanson, A., Humphrey, T., Chapman, R., McGarvey, B., Pocs, R., und Brandle, J.** (2005) Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana* *Plant J.*, **41**, 56-67
- Richter, G.** (1996) *Biochemie der Pflanzen*. Thieme, Stuttgart, New York
- 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 *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1488-1493
- Ross, J., Li, Y., Lim, E., und Bowles, D. J.** (2001) Higher plant glycosyltransferases *Genome Biol.*, **2**, 3004.1-3004.6
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Schaart, J. G., Salentijn, E. M. J., und Krens, F. A.** (2002) Tissue-specific expression of the  $\beta$ -glucuronidase reporter gene in transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa*) plants *Plant Cell Rep.*, **21**, 313-319

- 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 *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 227-232
- Schmitt, D., Pakusch, A. E., und Matern, U.** (1991) Molecular cloning, induction, and taxonomic distribution of caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, an enzyme involved in disease resistance *J. Biol. Chem.*, **266**, 17416-17423
- Schreier, P.** (1980) Quantitative composition of volatile constituents in cultivated strawberries, *Fragaria x ananassa* cv. Senga Sengana, Senga Litessa, and Senga Gourmella *J. Sci. Food Agric.*, **31**, 487-94
- Schröder, J.** (1997) A family of plant-specific polyketide synthases: Facts and predictions *Trends Plant Sci.*, **2**, 373-378
- Schuster, B. und Herrmann, K.** (1985) Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits *Phytochemistry*, **24**, 2761-4
- 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 *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 2266-2269
- Schwab, W.** (2003) Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites? *Phytochemistry*, **62**, 837-849
- Sepulveda-Jimenez, G., Rueda-Benitez, P., Porta, H., und Rocha-Sosa, M.** (2005) A red beet (*Beta vulgaris*) UDP-glucosyltransferase gene induced by wounding, bacterial infiltration and oxidative stress *J. Exp. Bot.*, **56**, 605-611
- Silva, M. D. R. G. d. und Neves, H. J. C. d.** (1999) Complementary use of hyphenated purge-and-trap gas chromatography techniques and sensory analysis in the aroma profiling of strawberries (*Fragaria x ananassa*) *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4568-4573
- Souci, S. W., Fachmann, W., und Kraut, H.** (2000) Die Zusammensetzung der Lebensmittel - Nährwert-Tabellen. Medpharm Scientific Publication, Stuttgart
- Stich, K., Halbwirth, H., Wurst, F., und Forkmann, G.** (1997) UDP-glucose:flavonol-7-O-glucosyltransferase activity in flower extracts of *Chrysanthemum segetum* Z. *Naturforsch. C: Biosci.*, **52**, 153-158
- Sumner, L. W., Mendes, P., und Dixon, R. A.** (2003) Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era *Phytochemistry*, **62**, 817-836
- Suutarinen, J., Anakainen, 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 *Food Sci. Technol.*, **31**, 595-601

- Szalma, S. J., Snook, M. E., Bushman, B. S., Houchins, K. E., und McMullen, M. D.** (2002) Duplicate loci as QTL: the role of chalcone synthase loci in flavone and phenylpropanoid biosynthesis in maize *Crop Sci*, **42**, 1679-1687
- Taguchi, G., Yazawa, T., Hayashida, N., und Okazaki, M.** (2001) Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin *Eur. J. Biochem.*, **268**, 4086-4094
- Törrönen, A. R. und Määttä, K.** (2002) Bioactive substances and health benefits of strawberries *Acta Hortic.*, **567**, 797-803
- Trainotti, L., Spinello, R., Piovan, A., Spolaore, S., und Casadoro, G.** (2001)  $\beta$ -galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry *J. Exp. Bot.*, **52**, 1635-1645
- Trethewey, R. N.** (2004) Metabolite profiling as an aid to metabolic engineering in plants *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**, 196-201
- Tropf, S., Karcher, B., Schroder, G., und Schroder, J.** (1995) Reaction mechanisms of homodimeric plant polyketide synthase (stilbenes and chalcone synthase). A single active site for the condensing reaction is sufficient for synthesis of stilbenes, chalcones, and 6'-deoxychalcones *J. Biol. Chem.*, **270**, 7922-7928
- Tsai, C.-J., Popko, J. L., Mielke, M. R., Hu, W.-J., Podila, G. K., und Chiang, V. L.** (1998) Suppression of O-methyltransferase gene by homologous sense transgene in quaking aspen causes red-brown wood phenotypes *Plant Physiol.*, **117**, 101-112
- Unligil, U. M. und Rini, J. M.** (2000) Glycosyltransferase structure and mechanism *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 510-517
- Urbanczyk-Wochniak, E., Luedemann, A., Kopka, J., Selbig, J., Roessner-Tunali, U., Willmitzer, L., und Fernie, A. R.** (2003) Parallel analysis of transcript and metabolic profiles: a new approach in systems biology *Embo Reports*, **4**, 989-993
- Van der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N. M., und Stuitje, A. R.** (1990) Flavonoid genes in *Petunia* - addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene-expression *Plant Cell*, **2**, 291-299
- Van Engelen, F. A., Molthoff, J. W., Conner, A. J., Nap, J.-P., Pereira, A., und Stiekema, W. J.** (1995) pBINPLUS: an improved plant transformation vector based on pBIN19 *Transgen. Res.*, **4**, 288-90
- Verhoeyen, M. E., Bovy, A., Collins, G., Muir, S., Robinson, S., De Vos, C. H. R., und Colliver, S.** (2002) Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway *J. Exp. Bot.*, **53**, 2099-2106

- Villegas, R. J. A. und Kojima, M.** (1986) Purification and characterization of hydroxycinnamoyl D-glucose. Quinate hydroxycinnamoyl transferase in the root of sweet potato, *Ipomoea batatas* Lam *J. Biol. Chem.*, **261**, 8729-33
- Vogt T.** (2000) Glycosyltransferases involved in plant secondary metabolism. in Recent advances in phytochemistry (Evolution of metabolic pathways). Elsevier Science, London, Amsterdam, New York
- Vogt, T. und Jones, P.** (2000) Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci.*, **5**, 380-386
- Wang, S. Y. und Zheng, W.** (2001) Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4977-4982
- Watson, R., Wright, C. J., McBurney, T., Taylor, A. J., und Linforth, R. S. T.** (2002) Influence of harvest date and light integral on the development of strawberry flavour compounds *J. Exp. Bot.*, **53**, 2121-2129
- Watzl, B. und Leitzmann, C.** (1999) Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart
- Watzl, B. und Rechkemmer, G.** (2001) Phenolsäuren *Ernährungs-Umschau*, **48**, 413-416
- 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 J.*, **31**, 755-65
- Wilkinson, J. Q., Lanahan, M. B., Conner, T. W., und Klee, H. J.** (1995) Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display *Plant Mol. Biol.*, **27**, 1097-108
- Wingender, R., Rohrig, H., Horicke, C., Wing, D., und Schell, J.** (1989) Differential regulation of soybean chalcone synthase genes in plant defense, symbiosis and upon environmental stimuli *Mol. Gen. Genet.*, **218**, 315-322
- Wink, M.** (1988) Plant breeding - Importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores *Theor. Appl. Genet.*, **75**, 225-233
- Wink, M.** (1999) Biochemistry of plant secondary metabolism - Annual plant reviews, part 2. CRC Press, London
- Winkel-Shirley, B.** (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology *Plant Physiol.*, **126**, 485-493
- Wintoch, H., Krammer, G., und Schreier, P.** (1991) Glycosidically bound aroma compounds from two strawberry fruit species, *Fragaria vesca* f. *semperflorens* and *Fragaria x ananassa*, cv. *Korona Flavour Fragrance J.*, **6**, 209-15

- Wise, M. L., Savage, T. J., Katahira, E., und Croteau, R.** (1998) Monoterpene synthases from common sage (*Salvia officinalis*) - cDNA isolation, characterization, and functional expression of (+)-sabinene synthase, 1,8-cineole synthase, and (+)-bornyl diphosphate synthase *J. Biol. Chem.*, **273**, 14891-14899
- Woo, H.-H., Orbach, M. J., Hirsch, A. M., und Hawes, M. C.** (1999) Meristem-localized inducible expression of a UDP-glycosyltransferase gene is essential for growth and development in pea and alfalfa *Plant Cell*, **11**, 2303-2315
- Yamazaki, M., Yamagishi, E., Gong, Z., Fukuchi-Mizutani, M., Fukui, Y., Tanaka, Y., Kusumi, T., Yamaguchi, M., und Saito, K.** (2002) Two flavonoid glucosyltransferases from *Petunia hybrida*: molecular cloning, biochemical properties and developmentally regulated expression *Plant Mol. Biol.*, **48**, 401-411
- Zabetakis, I., Moutevelis-Minakakis, P., und Gramshaw, J. W.** (1998) 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 Chem.*, **64**, 311-314
- Zabetakis, I. und Holden, M. A.** (1996) The effect of 6-deoxy-D-fructose on flavor bioformation from strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Elsanta) callus cultures *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, **45**, 25-29
- Zabetakis, I. und Holden, M. A.** (1997) Strawberry flavor: analysis and biosynthesis *J. Sci. Food Agric.*, **74**, 421-434
- Zheng, H. H., Qu, L. J., Liu, M. H., Zhang, Y., Shen, Y. P., Wei, J. M., Pan, N. S., Gu, H. Y., und Chen, Z. L.** (2000) An anther-specific chalcone synthase-like gene D5 related to rice pollen development *Chinese Sci. Bulletin*, **45**, 1921-1926
- Zubieta, C., He, X. Z., Dixon, R. A., und Noel, J. P.** (2001) Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant O-methyltransferases *Nature Struc. Biol.*, **8**, 271-279
- Zubieta, C., Kota, P., Ferrer, J.-L., Dixon, R. A., und Noel, J. P.** (2002) Structural basis for the modulation of lignin monomer methylation by caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase *Plant Cell*, **14**, 1265-1277
- Zuker, A., Tzfira, T., Ben Meir, H., Ovadis, M., Shklarman, E., Itzhaki, H., Forkmann, G., Martens, S., Neta-Sharir, I., Weiss, D., und Vainstein, A.** (2002) Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene *Mol. Breed.*, **9**, 33-41



# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

---

Name	Stefan Lunkenbein
Anschrift	Bahnhofstraße 25 96 250 Ebensfeld
Geboren	15.11.1972 in Lichtenfels/Oberfranken

## Hochschulausbildung

---

WS 1996-WS 2000	Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Würzburg, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie
Januar 2001-Januar 2003	Promotion in Lebensmittelchemie an der Universität Würzburg, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie bei Priv.-Doz. Dr. Wilfried Schwab
Februar 2003-April 2004	Promotion in Lebensmittelchemie am Fachgebiet Biomolekulare Lebensmitteltechnologie der TU München, Freising-Weihenstephan bei Prof. Dr. Wilfried Schwab
Thema der Dissertation	Reifekorrelierte Enzyme des Sekundärstoffwechsels von Erdbeeren ( <i>Fragaria x ananassa</i> ) – Expression und Funktion
Während der Promotion	mehrmalige Forschungsaufenthalte (insgesamt 6 Monate) am Plant Research International, Wageningen, Niederlande

## Berufsausbildung

---

1987-1990	Abgeschlossene Berufsausbildung zum Koch
1990-1992	Abgeschlossene Berufsausbildung zum Konditor
08/2004-01/2005	Lebensmittelchemisches Praktikum am Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Erlangen
Abschluss	2. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

## Schulbildung

---

1978-1987	Grund- und Hauptschule in Ebensfeld
1992/93	Berufsaufbauschule in Bamberg
1993-1995	Berufsoberschule in Nürnberg
Abschluss	Fachgebundene Hochschulreife

## Ersatzdienst

---

1995-1996	Zivildienst im Canisiusheim der Salesianer Don Boscos, Bamberg
-----------	--





