

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Fachgebiet Biotechnologie der Naturstoffe

Funktionelle Charakterisierung von Lipoxygenasen des
Kulturapfels (*Malus × domestica* Borkh.)

Doreen Schiller

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. I. Antes

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. W. Schwab

2. Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle

Die Dissertation wurde am 17.07.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 12.11.2014 angenommen.

DON'T PANIC

The Hitchhiker's Guide to the Galaxy

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von Juni 2010 bis Mai 2013 in der Arbeitsgruppe Biotechnologie der Naturstoffe am Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München durchgeführt.

Auszüge dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Originalartikel

Schiller D, Contreras C, Vogt J, Dunemann F, Defilippi B, Beaudry R, Schwab W (2015) A dual positional specific lipoxygenase functions in the generation of flavor compounds during climacteric ripening of apple. *Horticulture Research* **2**: 15003; doi:10.1038/hortres.2015.3

Diese Veröffentlichung enthält einen Großteil, der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zur biochemischen Aktivität einiger LOX-Kandidaten und der zielgerichteten Mutagenese von *MdLOX1a*.

Vogt J, Schiller D, Schwab W, Dunemann F (2013) Cloning and characterization of apple lipoxygenase (LOX) genes putatively involved in the formation of fruit flavour volatiles. *Acta Hort (ISHS)* **976(1)**: 369-376

Die *in vitro* beobachtete Aktivität von Kandidaten floss in die Diskussion der genetischen Assoziation von LOX-Genen mit relevanten Aromastoffen der Frucht ein.

Vogt J, Schiller D, Ulrich D, Schwab W, Dunemann F (2013) Identification of lipoxygenase (LOX) genes putatively involved in fruit flavour formation in apple (*Malus × domestica*). *Tree Genet Genom* **9(6)**: 1493-1511

Die hier beschriebenen LOX-Klone wurden u.A. für die Erstellung eines phylogenetischen Baumes der LOX-Genfamilie des Kulturapfels herangezogen.

Vortrag

Schiller D, Schwab W. Characterisation of a lipoxygenase involved in volatile formation during fruit ripening of *Malus × domestica*. 4th European Yeast Flavour Workshop, Freising, 23. Juli 2013

Schiller D, Schwab W. Characterization of a lipoxygenase with dual positional specificity and its putative role in aroma production in apple. Tagung der Sektion "Pflanzliche Naturstoffe" der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Hildesheim, 01. Oktober 2012

Schiller D, Schwab W. Characterization of a lipoxygenase with dual positional specificity and its putative role in aroma production in apple. 8th Plant Science Student Conference, Gatersleben, 04. Juni 2012

Poster

Schiller D, Vogt J, Dunemann F, Schwab W. *MdLOX1a* – A determinant of aroma formation in ripening apple fruit. Deutsche Botanikertagung 2013, Tübingen, 29. September -04. Oktober 2013

Schiller D, Vogt J, Dunemann F, Schwab W. *MdLOX1a* – A determinant of aroma formation in ripening apple fruit. 1st International Symposium of the SFB924 "Plant Biology for the Next Generation", Freising, 18.-20. September 2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Zusammenfassung.....	VII
Summary	IX
1 Einleitung	1
1.1 Der Kulturapfel	1
1.1.1 Wirtschaftliche Bedeutung des Kulturapfels.....	1
1.1.2 „An apple a day ...“ – Ernährungsphysiologische Bedeutung	2
1.1.3 Neue Herausforderungen für die Apfelzüchtung.....	4
1.2 Das Apfelaroma.....	5
1.2.1 Die enzymatische Bildung von Aromastoffen aus Fettsäuren.....	6
1.3 Der Lipoxygenase-Stoffwechselweg in Pflanzen	7
1.4 Lipoxygenasen	9
1.4.1 Klassifikation.....	10
1.4.2 Struktur pflanzlicher Lipoxygenasen.....	11
1.5 Ziele der Arbeit	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Materialien.....	15
2.1.1 Chemikalien	15
2.1.2 Enzyme	17
2.1.3 Biologische Materialien.....	18
2.1.3.1 Pflanzen	18
2.1.3.2 Mikroorganismen.....	18
2.1.4 Vektoren.....	19
2.1.5 Primer	19
2.1.6 Kommerzielle Kits	23
2.1.7 Sonstiges Material	23
2.2 Geräte.....	24
2.2.1 Hochleistungsflüssigkeits-Chromatografie (HPLC).....	24
2.2.2 Flüssigkeitschromatografie-Elektrosprayionisations- Massenspektrometrie (LC-UV/ESI-MS ⁿ).....	25
2.2.3 Sonstige Geräte	25

2.3	Software und Internet-Ressourcen	27
2.4	Mikrobiologische Methoden	28
2.4.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	28
2.4.1.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	28
2.4.1.2	Heterologe Expression in <i>E. coli</i> Rosetta™(DE3)pLysS	29
2.4.2	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.4.2.1	Herstellung kompetenter INVSc1-Zellen	30
2.4.2.2	Heterologe Expression in Hefe	30
2.4.3	Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen	31
2.5	Molekularbiologische Methoden	31
2.5.1	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
2.5.2	Isolation von Nukleinsäuren aus <i>Malus × domestica</i>	31
2.5.2.1	Isolation genomischer DNA	31
2.5.2.2	Isolation von Gesamt-RNA	32
2.5.3	Reverse Transkription	33
2.5.4	Polymerase-Kettenreaktion	33
2.5.4.1	Protokoll für die Prüfung der cDNA-Qualität	34
2.5.4.2	Protokoll für die Klonierung von LOX-Genen aus <i>Malus × domestica</i>	35
2.5.4.3	Protokoll für die Selektion von Klonen mittels Kolonie-PCR	36
2.5.4.4	Protokolle für die Umklonierung in Expressionsvektoren	36
2.5.5	Quantifizierung von Nukleinsäuren	37
2.5.5.1	Photometrische Bestimmung	37
2.5.5.2	Agarose-Gelelektrophorese	37
2.5.6	DNA-Extraktion aus PCR-Ansätzen und Agarosegelen	38
2.5.7	Klonierung und Transformation	38
2.5.7.1	Klonierung mittels pGEM®-T Easy Vector System I	38
2.5.7.2	Restriktion von DNA mittels Endonukleasen	38
2.5.7.3	Ligation von DNA-Fragmenten	38
2.5.7.4	Hitzeschock-Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	39
2.5.7.5	Transformation von kompetente <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	39
2.5.8	Sequenzierung	40
2.5.9	Zielgerichtete Mutagenese von <i>MdLOX1a</i>	40
2.5.9.1	Mutagenese mittels <i>overlap-extension</i> -PCR	40
2.5.9.2	Mutagenese nach QuikChange Protokoll	41
2.6	Biochemische Methoden	42
2.6.1	Protein-Isolation aus <i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLysS	42
2.6.2	Protein-Isolation aus <i>S. cerevisiae</i> INVSc1	42

Inhaltsverzeichnis

2.6.3	His-Tag-Affinitätschromatografie.....	43
2.6.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	43
2.6.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
2.6.6	Western Blot von rekombinantem <i>Malus</i> LOX-Protein	45
2.6.6.1	Immunodetektion mit Anti-Lipoxygenase-Antikörper	45
2.6.6.2	Immunodetektion mit Anti-6x His tag [®] -Antikörper.....	46
2.6.7	<i>In vitro</i> Nachweis von Lipoxygenase-Aktivität	47
2.6.7.1	Enzymtest für die photometrische Aktivitätsbestimmung.....	47
2.6.7.2	Enzymtest für die chromatografische Produktidentifizierung	47
2.6.8	Bestimmung des pH und Temperaturoptimums.....	48
2.6.9	Ermittlung der kinetischen Parameter von <i>Malus</i> Lipoxygenasen	48
2.7	Analytische Methoden.....	49
2.7.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie	49
2.7.1.1	Quantifizierung der LOX-Aktivität mittels RP-HPLC	49
2.7.1.2	Bestimmung der Regioselektivität von <i>Malus</i> LOX mittels NP-HPLC	49
2.7.1.3	Bestimmung der Stereoselektivität von <i>Malus</i> LOX mittels CP-HPLC	49
2.7.2	Identifizierung der Reaktions-Produkte mittels LC-UV/ESI-MS ⁿ	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Klonierung putativer Lipoxygenasen des Kulturapfels	51
3.1.1	Bestandsaufnahme der Lipoxygenase-Genfamilie des Apfels	51
3.1.2	Amplifikation putativer Lipoxygenase-Gene	53
3.1.3	<i>In silico</i> -Analyse putativer Lipoxygenasen des Apfels.....	54
3.2	Heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i>	56
3.3	Heterologe Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
3.4	Biochemische Charakterisierung putativer Lipoxygenasen des Apfels.....	59
3.4.1	Substratscreening.....	60
3.4.1.1	Enzymatischer Umsatz von Linolsäure	60
3.4.1.2	Enzymatischer Umsatz von α -Linolensäure.....	61
3.4.1.3	Enzymatischer Umsatz von Arachidonsäure.....	62
3.4.2	Untersuchung der Enantioselektivität der LOX-Reaktion.....	64
3.4.3	Einfluss von Temperatur und pH auf die enzymatische Aktivität	66
3.5	Zielgerichtete Mutagenese von <i>MdLOX1a</i>	69
3.5.1	Strukturelle Untersuchung von LOX1:Md:1a	69
3.5.2	Stereo- und Regiospezifität von <i>mdlox1a</i> -Mutanten	72
3.5.3	Kinetische Eigenschaften von Wildtyp- und Mutanten-LOX.....	74

4	Diskussion	76
4.1	Lipoxygenasen mit Funktionen während der Fruchtreife	77
4.1.1	Genexpression während der Fruchtreife.....	77
4.1.2	Kandidaten von potenzieller Bedeutung für die Aroma-Produktion	78
4.2	Biochemische Charakterisierung von LOX-Kandidaten	79
4.2.1	LOX-Selektivität und ihre Bedeutung während der Fruchtreife	80
4.2.2	Apfel-LOX produzieren (<i>R</i>)-konfigurierte Hydroperoxide	81
4.2.3	Biologische Bedeutung von pH- und Temperatur-Optima	83
4.3	Grundlagen der Regio- und Stereospezifität von LOX1:Md:1a	84
4.4	Physiologische Funktion von LOX-Kandidaten in der Pflanze	89
4.4.1	Metabolisierung von Hydroperoxiden im Apfel.....	90
4.4.1.1	Der Allenoxid-Synthase-Stoffwechselweg	91
4.4.1.2	Der Hydroperoxid-Lyase-Weg	92
4.4.1.3	Die Lipoxygenase-katalysierte Umsetzung von Hydroperoxiden	94
4.5	Relevanz für die wirtschaftlichen Eigenschaften des Apfels	95
4.5.1	Einfluss auf die Lagerfähigkeit	95
4.5.2	Bedeutung in der Herstellung von Säften	96
	Literaturverzeichnis	97
	Anhang	XII
	Danksagung.....	XXVI

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
AAT	Alkohol-Acyl-CoA-Transferase
Abs	Absorption
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
AOS	Allenoxid-Synthase(n)
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure(n)
Å	Ångström
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CP-HPLC	Chiralphasen-HPLC
cv.	Kultivar
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DES	Divinylether-Synthase(n)
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
EAS	Epoxyalkohol-Synthase(n)
EST	engl. <i>expressed sequence tags</i>
FD	engl. <i>FastDigest</i>
for	vorwärts (engl. <i>forward</i>)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
6x His	Poly-Histidin, bestehend aus sechs Histidin-Resten
HODE	Hydroxyoctadecadiensäure
HOTE	Hydroxyoctadecatriensäure
HpETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
HPL	Hydroperoxid-Lyase(n)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatografie
HpODE	Hydroperoxyoctadecadiensäure
HpOTE	Hydroperoxyoctadecatriensäure
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatografie
inkl.	inklusive
kb	Kilobasenpaar(e)
k_{cat}	katalytische Konstante
kDa	Kilodalton
K_m	Michaelis-Konstante
LA	Linolsäure
LB	Vollmedium zur Bakterienanzucht (engl. <i>lysogeny broth</i>)

Abkürzungsverzeichnis

LC-UV/ESI-MS ⁿ	Flüssigkeitschromatografie-Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
LnA	α -Linolensäure
LOX	Lipoxygenase(n)
MSA	engl. <i>multiple sequence alignment</i>
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NaPi	Natriumphosphat-Puffer
NP-HPLC	Normalphasen-HPLC
OD _{λ}	Optische Dichte _{Wellenlänge in nm}
oePCR	engl. <i>overlap extension PCR</i>
ORF	Offenes Leseraster
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POX	Peroxygenase(n)
QTL	engl. <i>quantitative trait locus</i>
rev	rückwärts (engl. <i>reverse</i>)
SC-U	Minimalmedium zur Hefeselektion (engl. <i>synthetic complete medium, without uraci</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SNP	engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>
RP-HPLC	Umkehrphasen-HPLC
rpm	Umdrehungen pro Minute
T _m	Schmelztemperatur
tRNA	Transfer-RNA
U	Einheit (engl. <i>unit</i>)
UTR	Nicht-kodierender Bereich
UV	ultraviolett
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
Vol.	Volumen
v/v	Volumenprozent (engl. <i>volume per volume</i>)
w/v	Masseprozent (engl. <i>weight per volume</i>)
YBB	Hefe-Aufschluss-Puffer (engl. <i>yeast breaking buffer</i>)
YPD	Vollmedium zur Hefeanzucht (engl. <i>yeast extract peptone dextrose medium</i>)

Die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen für Nukleotide und Aminosäuren entsprechen den Vorgaben der IUPAC-Nomenklatur. Abkürzungen verwendeter Chemikalien können Tabelle 2.1 entnommen werden.

Zusammenfassung

Das Aroma eines Apfels ist ein hoch komplexes Merkmal und hat einen entscheidenden Einfluss auf seine Konkurrenzfähigkeit am Markt. Trotz des umfangreichen Wissens über die Biochemie der etwa 370 am Aroma beteiligten Metaboliten, ist noch wenig über die genetischen Grundlagen ihrer Synthese bekannt und der Beitrag einzelner Stoffwechselwege während der Reifung wird gerade erst verstanden. Der Lipoxygenase-Weg stellt in der Frucht Vorläufer für Aroma-relevante C₆-Aldehyde, -Alkohole und unverzweigte Ester zur Verfügung. Eine Reife-bedingte Änderung stromaufwärts von der Bereitstellung dieser Alkohole scheint Voraussetzung für die vollständige Ausbildung des Apfel-Aromas zu sein. Über die beteiligten Enzyme ist allerdings noch sehr wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung von Lipoxygenasen (LOX) des Kulturapfels (*Malus × domestica*) und die Ermittlung ihres potenziellen Beitrags zur Aroma-Produktion während der Reifung. Rekombinantes Protein von vier in der Frucht exprimierten Kandidaten wurde *in vitro* auf die Metabolisierung der Fettsäuren Linolsäure, α -Linolensäure und Arachidonsäure untersucht. Alle vier Enzyme waren katalytisch aktiv und wurden als 9-LOX (*MdLOX1c*), 13-LOX (*MdLOX2b*) und dual spezifische 13/9-LOX (*MdLOX1a* und *MdLOX2a*) klassifiziert. Die Hauptprodukte der Reaktion mit Linolsäure befanden sich entweder in (*S*)- (*MdLOX1c* und *MdLOX2b*) oder (*R*)-Konfiguration (*MdLOX1a* und *MdLOX2a*). Letzteres wurde bei pflanzlichen LOX bisher nur selten beobachtet und hat vermutlich Implikationen für die Metabolisierung dieser Produkte in der Pflanze.

Durch zielgerichtete Mutagenese gelang es Determinanten der Regio- und Stereospezifität der dual spezifischen LOX1:Md:1a zu bestimmen. Von insgesamt sieben Einzelmutanten des korrespondierenden *MdLOX1a*-Gens bewirkten drei (I566F, L572I und T775L) einen nahezu vollständigen Verlust katalytischer Aktivität. Die restlichen vier Mutanten (R268A, G567A, I578L und V582F) zeigten Substrat-Umsatz vergleichbar zum Wildtyp-Enzym. Für die G567A-Mutante wurde sogar ein deutlicher Anstieg der katalytischen Aktivität mit Linol- und α -Linolensäure festgestellt. Gleichzeitig konvertierte die Mutation von G567 LOX1:Md:1a zu einem Enzym mit hoher Spezifität für die Bildung von 9(*S*)-Hydroperoxiden. Anhand der

gewonnenen Daten wird postuliert, dass sich die Spezifität von LOX1:Md:1a durch eine Kombination folgender Faktoren erklären lässt: I) Ein Valin-Rest (V582) in der Sloane-Position erlaubt Fettsäure-Substraten mit der Carboxy-Gruppe voran in das aktive Zentrum einzudringen und mit dem Arginin-Rest (R732) im Inneren der Tasche zu interagieren. II) Ein Glycin-Rest (G567) in der Coffa-Position ermöglicht die Oxidation sowohl an der C₉- als auch der C₁₃-Position des Kohlenstoffrückgrats von Linolsäure. III) Die Form der Substrat-Bindetasche, einschließlich eines postulierten Sauerstoff-Kanals, begünstigt die Oxidation an der C₁₃-Position und beeinflusst damit die Produkt-Verhältnisse.

Für eine mögliche Beteiligung an der Aroma-Biosynthese während der späten Fruchtreife und Lagerung kommt besonders LOX1:Md:1a in Frage. Die hohe Genexpression des *MdLOX1a*-Gens in gelagerten Äpfeln, die genetische Assoziation zu einem *quantitative trait locus* (QTL) für Fruchttester und die hohe Übereinstimmung der Regio- und Stereoselektivität der LOX1:Md:1a-Reaktion mit der LOX-Aktivität in reifen Früchten deuten auf eine wichtige Funktion während der klimakterischen Reifung hin. Während LOX1:Md:1c, LOX2:Md:2a und LOX2:Md:2b bei Gewebezersetzung vermutlich zur Aldehyd-Produktion in unreifen Früchten beitragen, könnte LOX1:Md:1a auch im intakten Fruchtgewebe Hydroperoxide bereitstellen und damit zur Aroma-Synthese beitragen.

Summary

The aroma of apple is a highly complex trait and has an immense impact on the competitiveness of a cultivar in the market. Despite of the extensive knowledge on the biochemistry of the 370 involved metabolites, very little information is available on the genetic background of their synthesis and the participation of single metabolic routes during fruit ripening is only now understood. The lipoxygenase pathway is an important contributor to the formation of precursors for aroma relevant C₆-aldehydes, -alcohols and straight-chain esters in the fruit. A ripening-dependent shift in processes upstream of the allocation of C₆-alcohols seems to be required for the formation of the typical apple aroma. However, so far only little is known of the enzymes involved in this process.

The aim of this thesis was to functionally characterize lipoxygenases (LOX) which potentially contribute to aroma formation during climacteric ripening of the cultivated apple (*Malus × domestica*). Recombinant protein of four candidate genes with distinct expression patterns during fruit ripening were analysed for conversion of the fatty acids linoleic acid, α -linolenic acid and arachidonic acid. All four enzymes were catalytically active and were classified as 9-LOX (*MdLOX1c*), 13-LOX (*MdLOX2b*) and dual positional specific 13/9-LOX (*MdLOX1a* and *MdLOX2a*), respectively. The main products of the reaction with linoleic acid were either (*S*)- (*MdLOX1c* and *MdLOX2b*) or (*R*)-configured (*MdLOX1a* and *MdLOX2a*). (*R*)-LOX specificity is a rare trait among plant LOX and might have implications for the metabolism of their products in plants.

Site-directed mutagenesis was conducted to identify determinants of regio- and stereospecificity in the dual positional specific LOX1:Md:1a. Three out of seven single mutants (I566F, L572I and T775L) of the corresponding *MdLOX1a* gene led to an almost complete loss of catalytic activity. Four mutants (R268A, G567A, I578L and V582F) exhibited substrate conversion comparable to the wild type enzyme. The G567A-mutant displayed even a considerable increase in catalytic activity with linoleic and α -linolenic acid. Additionally, site-directed mutagenesis of G567 converted the LOX1:Md:1a to an enzyme with a high specificity for 9(*S*)-hydroperoxide formation. Based on the obtained data the product specificity of

Summary

LOX1:Md:1a can be explained as a combination of the following factors: i) A valine residue (V582) in the Sloane position allows fatty acid substrates to penetrate the active site with their carboxy group first and interact with a conserved arginin residue (R732) at the bottom of the pocket. ii) A glycine residue (G567) in the Coffa position sterically enables oxygenation at both C₉- and C₁₃-position in the carbon chain of linoleic acid. iii) The shape of the substrate binding pocket, including a proposed oxygen channel, favours oxygenation at C₁₃- over C₉-position, thereby determining product proportions.

LOX1:Md:1a is a promising candidate which probably contributes to aroma formation during the late phase of fruit ripening. The high expression level of the *MdLOX1a* gene in stored apple fruit, the genetic association with a quantitative trait locus (QTL) for fruit ester and the remarkable agreement in regio- and stereo-selectivity of the LOX1:Md:1a reaction with the overall LOX activity found in mature apple fruits, suggest a major physiological function of LOX1:Md:1a during climacteric ripening of apples. While LOX1:Md:1c, LOX2:Md:2a, and LOX2:Md:2b may contribute to aldehyde production in immature fruit upon cell disruption, LOX1:Md:1a probably allocates precursors for aroma formation in intact fruit tissue.

1 Einleitung

1.1 Der Kulturapfel

Der Kulturapfel (*Malus × domestica* Borkh.) ist das wichtigste Obstgehölz der temperierten Regionen (Janick *et al.*, 1996). Botanisch zählt er zur Gattung *Malus* (Tribus Pyreae) aus der Familie der Rosaceae. Seine Entwicklung geht vermutlich auf den aus Zentralasien stammenden *Malus sieversii* (Ledeb.) M.Roem. zurück (Robinson *et al.*, 2001; Velasco *et al.*, 2010). Wie viele weitere Mitglieder der Gattung zum Genpool des Kulturapfels beigetragen haben, ist noch umstritten (Coart *et al.*, 2006; Harrison & Harrison, 2011). Marker-Analysen der Genome verschiedener Wildarten belegen jedoch die bedeutende Beteiligung des in Europa heimischen Holzapfels *Malus sylvestris* (L.) Mill. (Cornille *et al.*, 2012).

Es wird angenommen, dass die Domestizierung des Apfels vor über 3000 Jahren in Zentralasien begann (Vavilov, 1930). Die Vorläufer heutiger Kultursorten entstanden vor allem durch Selektion von Zufallssämlingen. Erst mit Thomas Andrew Knight (1759-1838) begann die kontrollierte Züchtung von Äpfeln (Janick *et al.*, 1996). Weltweit sind heute mehr als 10.000 Apfelsorten dokumentiert, doch nur wenige werden auch in kommerziellem Umfang kultiviert (Way *et al.*, 1991).

1.1.1 Wirtschaftliche Bedeutung des Kulturapfels

Im Jahr 2011 wurden weltweit etwa 626 Millionen Tonnen¹ Obst erzeugt. Der Apfel stand dabei mit 75 Millionen Tonnen¹ nach den Zitrusfrüchten (129 Mio. t¹) und Bananen (106 Mio. t¹) in der Produktion an dritter Stelle. Global betrachtet unterliegt die Apfelproduktion schon seit über 50 Jahren einem kontinuierlichen Wachstum. Seit 1990 ist diese Steigerung aber vor allem auf einen intensivierten Anbau in China zurückzuführen (Abbildung 1.1). Das Land entwickelte sich so innerhalb weniger Jahre zu dem mit Abstand größten Apfel-Produzenten der Welt und steuerte 2011 mit 36 Millionen Tonnen¹ Äpfeln 47,7% der gesamten Welternte bei. Auf Platz zwei befanden sich die USA mit einem Produktionsvolumen von 4,3 Millionen Tonnen¹, gefolgt von Indien (2,9 Mio. t¹) und der Türkei (2,7 Mio. t¹).

¹ Produktionszahlen für das Kalenderjahr 2011, Quelle: FAO (2014)

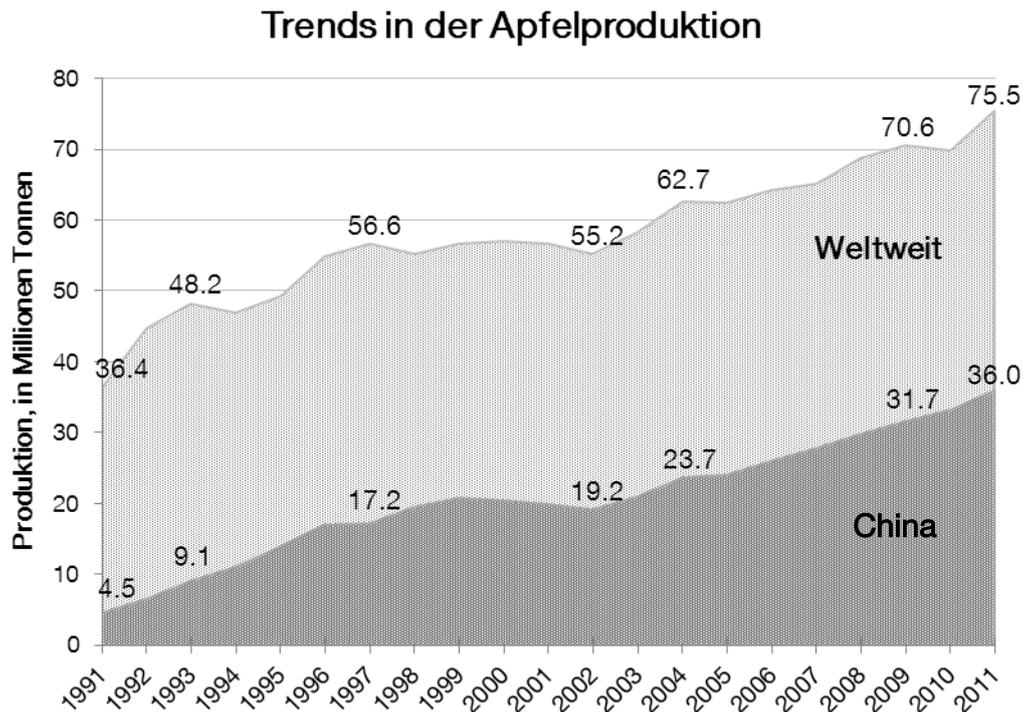


Abbildung 1.1 Entwicklung der weltweiten Produktion von Äpfeln in den letzten 20 Jahren. Die rasche Zunahme der Obsterzeugung ist auf eine enorme Entwicklung in China zurückzuführen. Insgesamt steigerte sich Chinas Marktanteil innerhalb der letzten 20 Jahre von 12,5% (1991) auf 47,7% (2011). Quelle: FAO (2014)

Der Baumobstbau in Deutschland beschränkt sich auf einige wenige Regionen in Baden-Württemberg, Niedersachsen, Rheinland-Pfalz und Sachsen. Mit etwa 32.000 ha werden aktuell rund 70% dieser Flächen für den Anbau von Äpfeln genutzt (BMELV, 2013). Im Jahr 2012 betrug die Ernte in Deutschland 972.000 Tonnen, was in etwa 72% der gesamten Obsternte entspricht. Damit ist der Apfel die wichtigste heimische Baumobstart. Im weltweiten Vergleich spielt Deutschland als Apfel-Produzent jedoch eher eine untergeordnete Rolle.

1.1.2 „An apple a day ...“ – Ernährungsphysiologische Bedeutung

Mit einem Pro-Kopf-Verbrauch von 25,9 kg² ist der Apfel das mit Abstand beliebteste Obst der Deutschen. Die Frucht gilt nicht nur als äußerst gesund, sondern ist durch ihre gute Haltbarkeit und Lagerfähigkeit auch das ganze Jahr über frisch zu erwerben. Damit ist der Apfel auch im Winter eine wichtige Quelle für Vitamine, Mineralstoffe und die sogenannten „bioaktiven Substanzen“.

² Vorläufige Verbrauchszahlen für das Wirtschaftsjahr 2011/2012, Quelle: BMELV (2013)

Einleitung

Sein Nährwert wird im Wesentlichen durch den Gehalt an Zuckern bestimmt (Tabelle 1.1), die in Form von Monosacchariden (Glukose und Fruktose) und Disacchariden (Saccharose) vorliegen. Als Besonderheit der Familie der Rosaceae enthalten Äpfel zudem größere Mengen des Zuckeralkohols Sorbitol (Souci *et al.*, 2008). Ob ein Apfel süß schmeckt, entscheidet jedoch vor allem das Verhältnis von Zuckern zu organischen Säuren (MLR, 2011). Je nach Sorte können in der Frucht neben der Äpfelsäure auch unterschiedlich hohe Mengen Zitronen- und Oxalsäure enthalten sein (Souci *et al.*, 2008).

Tabelle 1.1 Inhaltsstoffe des Apfels nach Souci *et al.* (2008). Angegeben sind gemittelte Werte für den Gehalt in 100 g essbarem Fruchtanteil. Der tatsächliche Gehalt kann sortenabhängig und umweltbedingt Schwankungen unterliegen (Angaben in Klammern).

Inhaltsstoffe		
Wasser	84,90 g	
Protein	0,34 g	(0,20 - 0,45)
Lipide	0,58 g	
Kohlenhydrate	11,40 g	
Organische Säuren	0,46 g	
Ballaststoffe	2,02 g	
Mineralstoffe		
Kalium	119 mg	(100 – 130)
Phosphor	11 mg	
Kalzium	5,3 mg	(5,0 – 7,2)
Magnesium	5 mg	
Vitamine		
Vitamin B ₃	0,300 mg	(0,100 – 0,500)
Vitamin B ₅	0,100 mg	(0,086 – 0,130)
Vitamin B ₆	0,103 mg	
Vitamin C	12 mg	(3 – 25)
Vitamin E	0,490 mg	

Die gesundheitsfördernde Wirkung des Apfels liegt unter anderem an den reichlich vorhandenen Vitaminen. Der Gehalt ist nicht so hoch wie in anderen Früchten, dafür enthält er eine ausgewogene Mischung von Vitamin C, E und verschiedenen Vertretern der Vitamin B-Gruppe (Tabelle 1.1). Der tatsächliche Vitamin C-Gehalt ist sortenabhängig und reicht von 8 mg/100 g in den Sorten Elstar und Cox Orange bis 25 mg/100 g in Jonagold und Braeburn (Heseker & Heseker, 2007). Bei den Mineralstoffen ist besonders sein hoher Gehalt an Kalium hervorzuheben.

Unlängst wurde gezeigt, dass ein regelmäßiger Verzehr von Äpfeln langfristig das Risiko von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Asthma, Lungenfunktionsstörungen, Diabetes und bestimmten Formen von Krebs senkt (Boyer & Liu, 2004). Einen enormen Beitrag leisten die besonders in der Fruchtschale konzentrierten Polyphenole (Mayr & Treutter, 1997). Dabei handelt es sich vor allem um die Flavan-3-ole (+)-Catechin und (-)-Epicatechin, Procyanidine und verschiedene Quercetin-Konjugate (Tsao *et al.*, 2003). Ihnen werden antioxidative, antimikrobielle und antivirale Wirkungen nachgesagt (Watzl & Rechkemmer, 2001). Hinzu kommt ein nicht unwesentlicher Gehalt an Ballaststoffen. Pektine und Zellulose sorgen nicht nur für den Erhalt einer gesunden Darmflora (Licht *et al.*, 2010), sondern haben bei regelmäßigem Verzehr auch einen positiven Effekt auf Blutdruck und Cholesterinspiegel (Lairon *et al.*, 2005).

1.1.3 Neue Herausforderungen für die Apfelzüchtung

Die Apfelzüchtung ist ein langwieriger und schwieriger Prozess, da jede neue Sorte einer Vielzahl von Anforderungen genügen muss, bevor sie Marktreife erlangt. Entscheidend für die Vermarktung ist vor allem die Akzeptanz beim Konsumenten. Deshalb werden bei der Züchtung neben der Qualität (Konsistenz, Geruch, Geschmack) auch das Erscheinungsbild (Größe, Farbe, Form, Makellosigkeit) und die Individualität einer Sorte berücksichtigt (Janick *et al.*, 1996; Rühmer *et al.*, 2006). Aktuell spielen auch wirtschaftliche Faktoren immer häufiger eine Rolle: Durch das Einbringen vorteilhafter Eigenschaften in die Obstsorten und ihre Unterlagen sollen hohe Erträge bei gleichzeitig möglichst geringen Produktionskosten gewährleistet werden. So verlängert zum Beispiel eine gute Lagerfähigkeit den Zeitraum, in dem der Markt mit einer Sorte versorgt werden kann (Rühmer *et al.*, 2006).

Um in möglichst kurzer Zeit Kultivare mit erwünschten Eigenschaften zu erhalten, wurde traditionell vor allem unter den marktrelevanten Apfelsorten gekreuzt (Janick *et al.*, 1996). Jedoch sind diese Sorten in der Mehrzahl anfällig für Pilzkrankheiten, wie Apfel-Schorf (*Venturia inaequalis*) und Apfel-Mehltau (*Podosphaera leucotricha*), oder den bakteriell verursachten Feuerbrand (*Erwinia amylovora*). Diese Krankheiten sind von wirtschaftlicher Relevanz, weil sie zu Qualitäts- und Ertragsverlusten führen und nur durch aufwendige und zudem teure Pflanzenschutzmaßnahmen bekämpft werden können. Deshalb konzentriert sich die Züchtung heute auf die Einkreuzung

Einleitung

von Resistenzen aus natürlichen Resistenzquellen, wie *Malus × floribunda* und *Malus × robusta* (Crosby *et al.*, 1992; Fischer, 1994). Das ist ein langwieriger Prozess, da eine stabile Feldresistenz nur durch Pyramidisierung mehrerer Resistenzgene erreicht wird (Fischer & Fischer, 2008) und anschließend häufig Rückkreuzungen erforderlich sind, um unerwünschte Eigenschaften der kleinfruchtigen Wildarten zu eliminieren. Hinzu kommt die lange juvenile Phase des Kulturapfels, so dass oft erst nach sechs bis zehn Jahren ersichtlich wird, ob eine resistente Sorte den hohen Anforderungen an Produktivität und Fruchtqualität gerecht wird (Kumar *et al.*, 2014).

Die gezielte Züchtung von Fruchtmerkmalen, wie ein bestimmtes Aroma, gestaltete sich auf Grund ihrer Komplexität in der Vergangenheit oft eher problematisch. Denn trotz des stetig wachsenden Wissens um die biochemische Zusammensetzung von Aromaprofilen (Dixon & Hewett, 2000; Fuhrmann & Grosch, 2002) und die sensorische Qualität bestimmter Aromastoffe (Steinhaus *et al.*, 2008; Ulrich *et al.*, 2009), ist noch wenig über deren genetische Grundlagen bekannt. Die kürzlich erfolgte Veröffentlichung des Apfel-Genoms ermöglicht nun eine umfassende Analyse der beteiligten Gene bzw. Genfamilien. Mit dem Ziel der Entwicklung biotechnologischer Verfahren zur Optimierung des Züchtungsprozesses, werden so Einblicke in die entwicklungsbedingte Regulation und Bedeutung einzelner Stoffwechselwege für die Ausprägung wirtschaftlich relevanter Eigenschaften gewonnen.

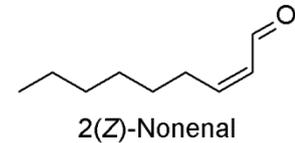
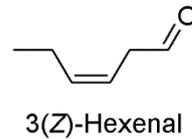
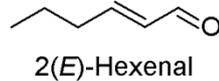
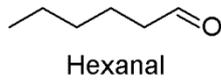
1.2 Das Apfelaroma

Das Aroma eines Apfels ist komplex und wird oft als Kombination von Eindrücken wie Süße, Säure, Bitterkeit, Strenge und Fruchtigkeit wahrgenommen (Yahia, 1994). Für den Geschmack ist besonders das Verhältnis von Zuckern zu Säuren bedeutsam. Allerdings sind es die flüchtigen Aromastoffe, die einem Apfel seinen unverwechselbaren Charakter verleihen (Yahia, 1994).

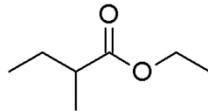
Inzwischen sind über 370 Metaboliten bekannt, die zur Ausbildung des Fruchtaromas beitragen können (Dixon & Hewett, 2000; Fuhrmann & Grosch, 2002). Sie gehören zu den Stoffklassen der Ester, Alkohole, Aldehyde, Ketone und Terpene (Song & Forney, 2008). Die genaue Zusammensetzung eines Aroma-Profiles ist neben Faktoren wie dem Reifegrad der Frucht und den eingesetzten Lagerbedingungen (Drawert *et al.*, 1969) vor allem auch vom Genotyp einer Sorte abhängig (Ulrich *et*

al., 2009). Da es sich bei der Mehrheit der flüchtigen Aromastoffe aber entweder um Ester oder Alkohole handelt (Paillard, 1990), werden Apfelsorten häufig nur in sogenannte „Ester-“ und „Alkohol-Typen“ unterschieden.

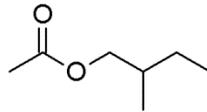
Aldehyde



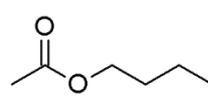
Ester



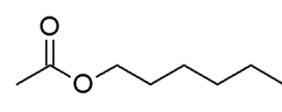
Ethyl-2-methylbutanoat



2-Methylbutylacetat



Butylacetat



Hexylacetat

Sonstige

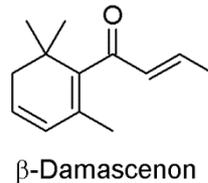
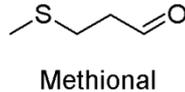
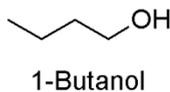


Abbildung 1.2 Übersicht von Schlüsselaromastoffen aus Fruchtexttrakten der Kultivare Golden Delicious, Elstar und Cox Orange (nach Fuhrmann & Grosch 2002; Steinhaus *et al.*, 2008)

Natürlich tragen nicht alle flüchtigen Bestandteile im gleichen Maße zum Aroma einer Frucht bei. In der Tat scheint die sensorische Qualität eines Apfels nur von etwa 15 bis 20 charakteristischen Schlüsselsubstanzen abzuhängen (Cunningham *et al.*, 1986; Plotto *et al.*, 2000), darunter verschiedene Alkohole, Aldehyde, verzweigte und unverzweigte Ester und das C₁₃-Norisoprenoid β -Damascenon (Abbildung 1.2). Dabei unterscheidet man primäre Metabolite, die den Geruch der intakten Frucht prägen, und sekundäre Metabolite, welche als Folge der Zerstörung des Zellverbandes freigesetzt werden.

1.2.1 Die enzymatische Bildung von Aromastoffen aus Fettsäuren

Das typische Aroma-Profil eines Apfels entwickelt sich erst mit der Reifung und Lagerung der Frucht. Während des Wachstums werden nur relativ geringe Mengen an Aromastoffen gebildet (Drawert *et al.*, 1969), deswegen unterscheidet man bei Äpfeln auch zwischen Pflück- und Genussreife. Mit Beginn des respiratorischen

Einleitung

Klimakteriums und Einsetzen der autokatalytischen Ethylen-Produktion steigt auch die Synthese von Aromastoffen (Mattheis *et al.*, 1991b; Dixon & Hewett, 2000). Die Freisetzung von Lipiden ist dabei eine wichtige Voraussetzung für die Produktion aliphatischer Ester, Ketone und Alkohole (Tressl & Drawert, 1973).

In der intakten Frucht geschieht dies hauptsächlich durch β -Oxidation von Fettsäuren (Rowan *et al.*, 1999). Die entstandenen Carbonsäuren werden zunächst zu Alkoholen reduziert, bevor sie zu Estern umgewandelt werden können (Paillard, 1990). Aldehyde werden von der intakten Frucht dagegen nur in sehr geringen Mengen produziert (Mattheis *et al.*, 1991b). Sie zählen zu den sekundären Aromastoffen und werden erst bei Gewebezzerstörung, zum Beispiel durch Verarbeitung und Verzehr, über den Lipoxygenase-Stoffwechselweg gebildet. Die beteiligten Enzyme sind während der gesamten Reifung in der Frucht vorhanden, ihre Bedeutung für die Aroma-Synthese im intakten Gewebe ist allerdings noch immer umstritten (Contreras & Beaudry, 2013a).

Die primäre Reaktion dieses Stoffwechselweges ist die regio- und stereospezifische Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren durch eine Lipoxygenase (LOX). Die gebildeten Fettsäure-Hydroperoxide werden von einer Hydroperoxid-Lyase (HPL) zu C₆- oder C₉-Aldehyden oxidiert, und können anschließend durch eine Alkohol-Dehydrogenase (ADH) in Alkohole umgewandelt werden (Schwab *et al.*, 2008). Aldehyde, wie Hexanal, 2(*E*)-Hexenal und 3(*Z*)-Hexenal, tragen vor allem zum Aroma unreifer Früchte bei (Paillard, 1990). Während der Reifung werden die sogenannten „Grünnoten“ zunehmend von den Aromen der Fruchtester überlagert (Mattheis *et al.*, 1991b). Alkohol-Acyl-CoA-Transferasen (AAT) katalysieren die Bildung dieser Ester durch Übertragung eines Acyl-Restes auf die zuvor gebildeten Alkohole. Der Lipid-Stoffwechsel ist somit eine wichtige Quelle für die Bildung flüchtiger Aromastoffe. In der Tat entstehen ungesättigte, unverzweigte Ester im Apfel lediglich über den Lipoxygenase-Stoffwechselweg (Rowan *et al.*, 1999).

1.3 Der Lipoxygenase-Stoffwechselweg in Pflanzen

Die Zusammensetzung intrazellulärer Lipide unterliegt permanenten Veränderungen in der Entwicklung einer Pflanze (Feussner & Kühn, 2000). Abgesehen von der Umwandlung und Freisetzung von Membranlipiden (Chapman, 1998), ist die Bildung oxidierter Fettsäuren eine der Hauptreaktionen des Lipid-Stoffwechsels auf umwelt-

bedingte Einflüsse und Stress (Feussner & Wasternack, 1998). Diese Metabolite werden unter dem Begriff „Oxylipine“ zusammengefasst (Blée, 1998).

Die Primärreaktion der Oxylipin-Biosynthese besteht aus der Bildung von Fettsäure-Hydroperoxiden, wobei ein Großteil aus der enzymatischen Reaktion mit einer Lipoxygenase, dem sogenannten LOX-Stoffwechselweg, resultiert (Feussner & Wasternack, 2002). Fettsäure-Hydroperoxide sind sehr instabil und zudem zytotoxisch, deshalb werden sie in Pflanzen sehr schnell durch weitere Enzymreaktionen metabolisiert (Feussner & Wasternack, 1998).

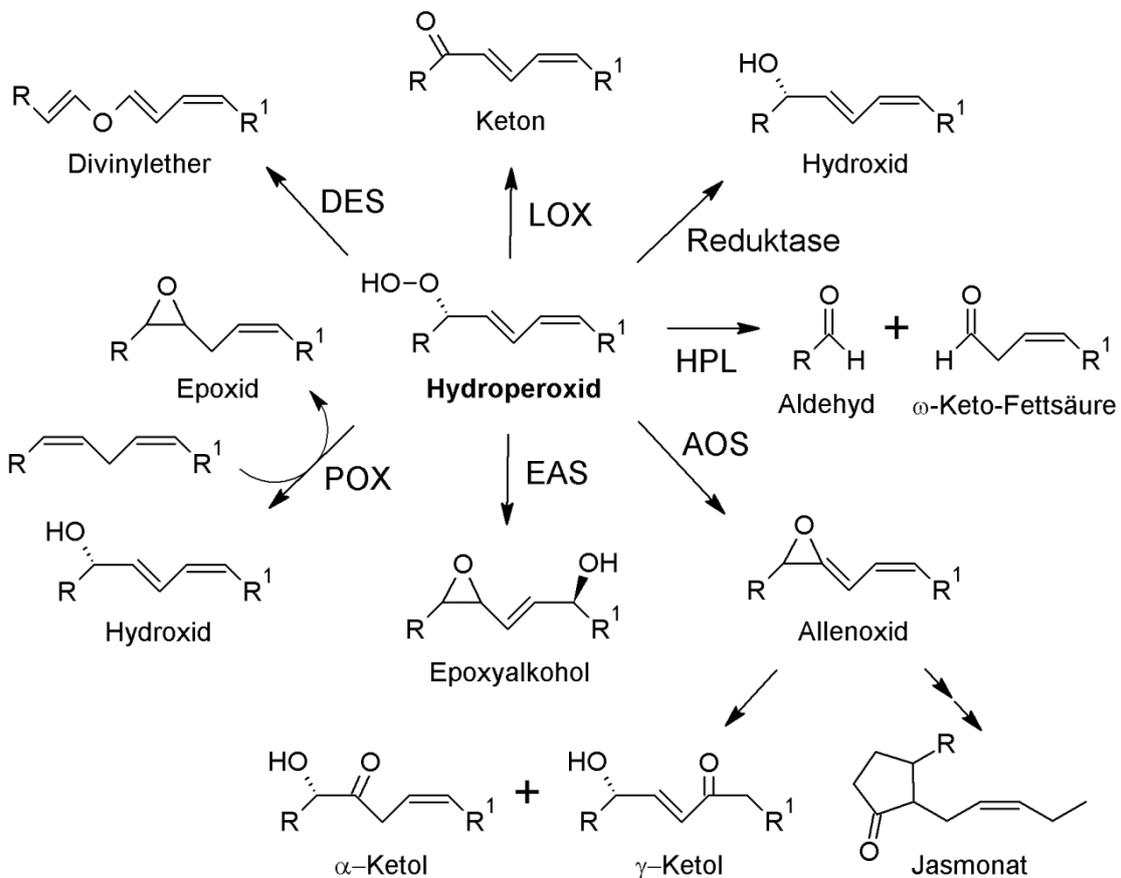


Abbildung 1.3 Übersicht des Fettsäure-Metabolismus über den LOX-Stoffwechselweg. Hydroperoxide können von einer Vielzahl an Enzymen metabolisiert werden, darunter die Divinylether-Synthase (DES), die Hydroperoxid-Lyase (HPL), die Allenoxid-Synthase (AOS), die Epoxyalkohol-Synthase (EAS) und die Peroxygenase (POX). (abgewandelt von Feussner & Wasternack, 1998).

Bis jetzt wurden sechs Enzymklassen identifiziert, die Fettsäure-Hydroperoxide umwandeln (Abbildung 1.3): Allenoxid-Synthasen (AOS), Peroxygenasen (POX), Hydroperoxid-Lyasen, Divinylether-Synthasen (DES), Hydroperoxid-Reduktasen und Epoxyalkohol-Synthasen (EAS) (Feussner & Wasternack, 2002). Je nach Zeitpunkt

Einleitung

und Ort der Hydroperoxid-Produktion kann der LOX-Weg so zur Bildung einer Vielzahl unterschiedlicher Oxylipine beitragen (Porta & Rocha-Sosa, 2002). Die AOS katalysieren beispielsweise die Bildung instabiler Allenoxid-Intermediate, welche entweder spontan zu Ketolen zerfallen oder enzymatisch zu einer Vorstufe des Pflanzenhormons Jasmonsäure metabolisiert werden können (Brash *et al.*, 1988). Während eine HPL Hydroperoxide in kurzkettige C₆- oder C₉-Aldehyde und die korrespondierenden ω -Keto-Fettsäuren spaltet (Matsui, 1998). Darüber hinaus sind auch LOX unter bestimmten Bedingungen in der Lage ihre Hydroperoxid-Produkte in Keto-Fettsäuren (Kühn *et al.*, 1991) oder flüchtige C₅-Verbindungen (Garssen *et al.*, 1971; Shen *et al.*, 2014) umzuwandeln.

Die meisten der genannten Oxylipine besitzen biologische Aktivität (Feussner & Wasternack, 1998), jedoch ist ihre exakte physiologische Funktion nicht immer bekannt. Denn Oxylipine können an einer Vielzahl von Prozessen in der Pflanze beteiligt sein. Bisher wurden Funktionen bei der Samenkeimung, dem vegetativen Wachstum, der Fruchtreife und der Bildung flüchtiger Substanzen als Reaktion auf Verwundung und Pathogen-Angriff beschrieben (Porta & Rocha-Sosa, 2002). So entfalten zum Beispiel Hydroperoxide und von der HPL gebildete Aldehyde eine fungizide Wirkung (Croft *et al.*, 1993). Weiterhin wird auch den aus dem DES-Weg resultierenden Divinylethern Colnensäure und Colnelensäure eine antimikrobielle und fungizide Wirkung zugesprochen (Weber *et al.*, 1999). Jasmonsäure und seine Vorstufe 12-Oxophytodiensäure sind Produkte des AOS-Weges und fungieren als Signalmoleküle bei der Wundantwort. Bei Verwundung durch Herbivoren steigt deren Level in der Pflanze und induziert damit die Bildung von Abwehrsubstanzen (Creelman & Mullet, 1997). Bei Verwundung werden auch Produkte des HPL-Wegs freigesetzt. Traumatin gilt als Wundhormon der Pflanze (Zimmerman & Coudron, 1979) und die sogenannten „green leaf volatiles“ (C₆-Aldehyde, -Alkohole und ihre Ester) können eine anziehende Wirkung auf Fraßfeinde von Herbivoren haben (Halitschke *et al.*, 2008).

1.4 Lipoxygenasen

Lipoxygenasen (E.C. 1.13.11.12) katalysieren die regio- und stereospezifische Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren mit einem oder mehreren 1(*Z*),4(*Z*)-Pentadien-Strukturen (Feussner & Kühn, 2000). Lange Zeit wurde angenommen,

dass sie lediglich freie Fettsäuren oxidieren. Inzwischen konnte allerdings gezeigt werden, dass zumindest einige Enzyme auch Fettsäureester, Triglyzeride oder Cholesterinester akzeptieren (Andreou & Feussner, 2009). In Pflanzen werden hauptsächlich die C₁₈-Fettsäuren Linolsäure und α -Linolensäure umgesetzt. Arachidonsäure spielt auf Grund seines geringen Vorkommens kaum eine Rolle.

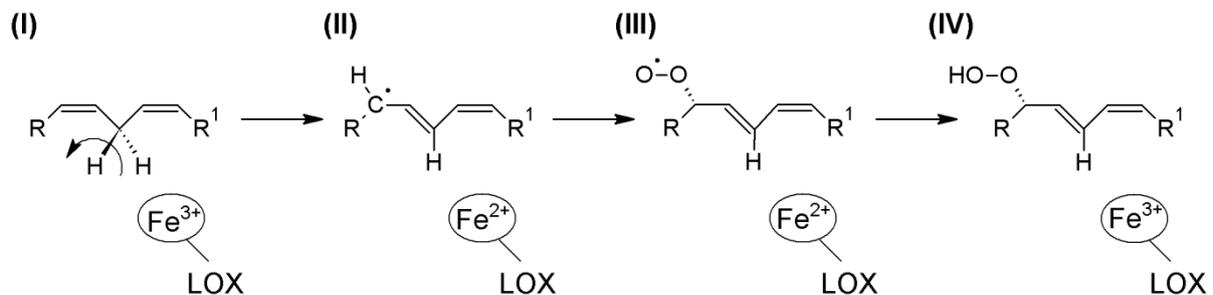


Abbildung 1.4 Reaktionsschema für die LOX-katalysierte Oxidation einer Fettsäure. Der Mechanismus besteht aus vier grundlegenden Schritten. (I) Der Abspaltung von Wasserstoff, bei gleichzeitiger Reduktion des aktivierten, dreiwertigen Eisens der LOX; (II) Der Radikalumlagerung; (III) Der stereoselektiven Einführung molekularen Sauerstoffs; (IV) Der Reduktion des Peroxy-Radikals, bei gleichzeitiger Rückführung des zweiwertigen Eisens in die aktive Form (abgewandelt von Ivanov *et al.*, 2010).

Die LOX-katalysierte Oxidation von Fettsäuren benötigt vier aufeinanderfolgende Reaktionsschritte (Abbildung 1.4): (I) Zunächst erfolgt der stereoselektive Entzug von Wasserstoff aus der Methylen-Gruppe einer 1(*Z*),4(*Z*)-Pentadien-Einheit der Fettsäure. (II) Das dabei entstehende Radikal wird um [+2] in Richtung Methyl-Ende oder [-2] in Richtung Carboxy-Ende auf dem Kohlenstoffrückgrat verlagert. (III) Molekularer Sauerstoff wird dann von der entgegengesetzten Seite des Substrates an Position [+2] oder [-2] eingeführt, wobei ein Fettsäure-Peroxy-Radikal entsteht. (IV) Der katalytische Zyklus wird durch die Reduktion des Radikals zu einem Hydroperoxid mit (*Z,E*)-konjugierten Doppelbindungen beendet (Schneider *et al.*, 2007).

1.4.1 Klassifikation

Aktuell gibt es zwei Formen der Klassifikation für pflanzliche Lipoxygenasen. Eine häufig genutzte Methode ist die Unterteilung anhand der Regiospezifität bei der Dioxygenierung von C₁₈-Fettsäuren. Molekularer Sauerstoff wird dabei spezifisch entweder an Position 9 (9-LOX) oder 13 (13-LOX) des Kohlenstoffgerüsts eingeführt und resultiert in der Bildung von 9(*S*)- oder 13(*S*)-Hydroperoxiden (Feussner *et al.*,

2001). Eine klare Einordnung als 9- oder 13-LOX ist jedoch nicht immer möglich. So wurden bereits einige Lipoxygenasen mit dualer Spezifität identifiziert (Hughes *et al.*, 2001a; Hughes *et al.*, 2001b), die enzymatisch die Bildung einer Mischung von Regioisomeren der Fettsäure-Hydroperoxide katalysieren. Darüber hinaus wird die Spezifität der Dioxygenierung zusätzlich von Faktoren wie der Konzentration (Van Os *et al.*, 1979) und dem physikalisch-chemischen Zustand des Substrates (Bild *et al.*, 1977; Began *et al.*, 1999), dem pH-Wert (Gardner, 1989; Hornung *et al.*, 2008) und der Zufuhr von Sauerstoff (Berry *et al.*, 1998) beeinflusst.

Eine zweite, umfassendere Form der Klassifikation wurde von Shibata *et al.* (1994) vorgeschlagen. Demnach können pflanzliche Lipoxygenasen anhand von Ähnlichkeiten in der Primärstruktur in zwei Gruppen unterteilt werden: Die sogenannten *Typ 1*-LOX weisen hohe Sequenzhomologien (>75%) zueinander auf (Feussner & Wasternack, 2002). Außerdem ist ihnen das Fehlen eines chloroplastidären Transitpeptids und damit eine zytosolische Lokalisation gemein. *Typ 2*-LOX tragen ein N-terminales Chloroplasten-Targeting-Peptid, besitzen allerdings nur moderate Ähnlichkeit (~35%) zueinander. Bis heute zählen alle identifizierten *Typ 2*-LOX zur Unterfamilie der 13-LOX (Andreou & Feussner, 2009). Den *Typ 1*-LOX gehören dagegen sowohl 9- als auch 13-LOX an.

1.4.2 Struktur pflanzlicher Lipoxygenasen

Pflanzliche LOX sind monomere Proteine mit einer durchschnittlichen Größe von 95-100 kDa und bestehen im Wesentlichen aus zwei Domänen (Andreou & Feussner, 2009). Die N-terminal gelegene β -Fass-Struktur besteht aus acht antiparallel angeordneten β -Faltblättern. Sie besitzt selbst keine katalytische Aktivität, scheint jedoch Einfluss auf die Aneignung und den Umsatz von Substraten, sowie die Interaktion mit Membranen zu haben (Tatulian *et al.*, 1998; Maccarrone *et al.*, 2001). Die größere C-terminale Domäne ist überwiegend α -helikal aufgebaut und beinhaltet das aktive Zentrum mit dem katalytischen Eisen-Ion (Abbildung 1.5). Der Kofaktor wird nicht über Häm, sondern über die Seitenketten von fünf hoch konservierten Aminosäuren und einem Wasser- oder Hydroxid-Liganden koordiniert (Minor *et al.*, 1996). Im Fall von pflanzlichen LOX handelt es sich dabei um drei Histidin-Reste, einen Asparagin-Rest und die Carboxy-Gruppe des C-terminalen Isoleucins (Andreou & Feussner, 2009). Das aktive Zentrum einer pflanzlichen Lipoxygenase

wurde zuerst für LOX-1 aus Sojabohne beschrieben (Boyington *et al.*, 1993). Es besteht aus zwei großen Hohlräumen (I und II), die in der Nähe des katalytischen Eisens aufeinanderstoßen. Hohlraum II wird durch die Seitenketten von R707 und V354 in zwei Abschnitte (IIa und IIb) unterteilt (Minor *et al.*, 1996), wobei es sich bei dem tunnelartigen Hohlraum IIa um die Substrat-Bindetasche von LOX-1 handelt. Dafür spricht auch, dass viele der Tunnel-begrenzenden Aminosäuren konserviert sind (Boyington *et al.*, 1993). Sie besitzen in der Mehrzahl hydrophobe oder neutrale Seitenketten und verleihen dem aktiven Zentrum so seinen hydrophoben Charakter.

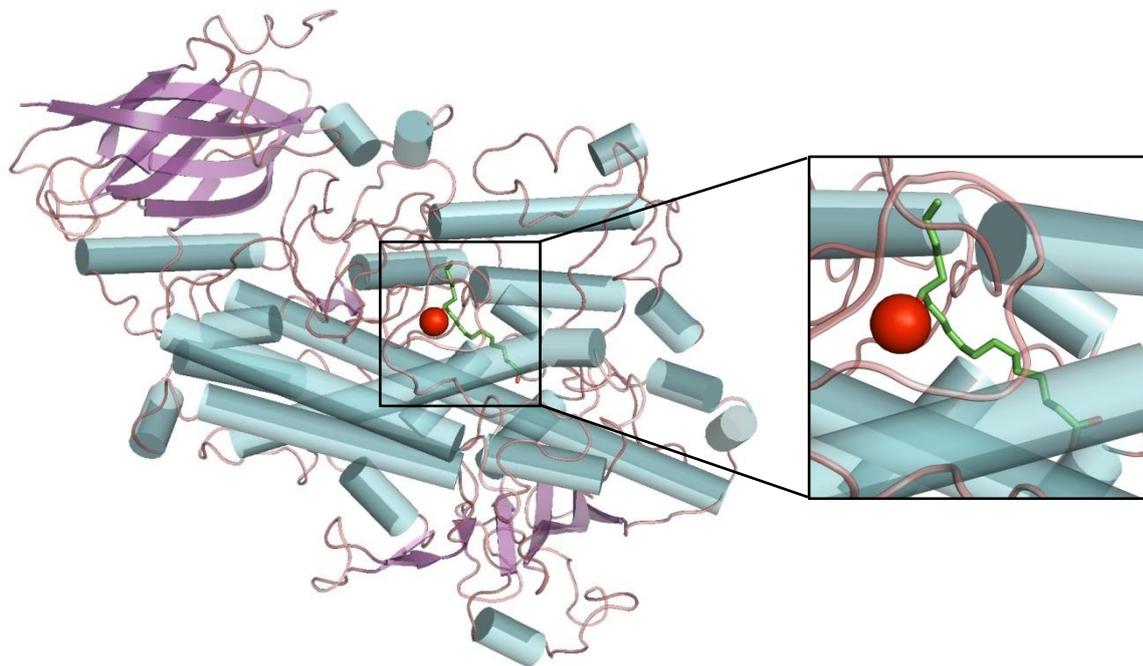


Abbildung 1.5 Dreidimensionale Struktur von LOX-3 aus Sojabohne (Skrzypczak-Jankun *et al.*, 2001) Dargestellt ist der typische Aufbau einer Lipoxygenase aus der N-terminalen β -Fass-Struktur und einer großen katalytischen Domäne. Sekundärstruktur-Elemente sind durch blaugrüne Zylinder (α -Helices) und lila Pfeile (β -Faltblätter) gekennzeichnet. Im aktiven Zentrum binden das katalytische Eisen-Ion (rote Kugel) und das 13(S)-Hydroperoxid der Linolsäure (grün, siehe Kasten). (PDB-Nr.: 1IK3; dargestellt mit PyMOL)

Eine Besonderheit pflanzlicher Lipoxygenasen ist der hochkonservierte Arginin-Rest am Boden der postulierten Tasche. Durch zielgerichtete Mutagenese wurde gezeigt, dass er Einfluss auf deren Aktivität und Regiospezifität hat (Hornung *et al.*, 1999). Darüber hinaus wurden noch einige weitere konservierte Positionen mit Bedeutung für die Regio- oder Stereospezifität beschrieben (Sloane *et al.*, 1995; Hornung *et al.*, 1999; Coffa & Brash, 2004). Nichtsdestotrotz gibt es bis heute kein umfassendes

Modell, welches die Stereospezifität aller pflanzlichen Lipoxygenasen erklärt (Feussner & Wasternack, 2002).

1.5 Ziele der Arbeit

Die Apfel-Sorte Golden Delicious erfreut sich auf Grund ihrer hervorragenden Eigenschaften weltweit großer Beliebtheit und ist daher auch für die moderne Apfelzüchtung von enormer Bedeutung (Noiton & Alspach, 1996). Viele ihrer Sämlinge, darunter Elstar, Gala, Jonagold und Pink Lady, gehören zu den markt-relevanten Sorten (Janick *et al.*, 1996; Rühmer *et al.*, 2006). Trotz des zunehmenden Einsatzes moderner biotechnologischer Verfahren ist die Züchtung von Sorten mit wünschenswerten Merkmals-Kombinationen in Fruchtqualität, Resistenz und Lager-eigenschaften noch immer ein langwieriger und kostenintensiver Prozess. In den letzten Jahren hat es durch die Entwicklung von Transformations-Systemen, genetischen Karten, funktionellen Markern und der Veröffentlichung des Apfel-Genoms bereits große Fortschritte gegeben (Brown, 2012). Die Entwicklung neuer Züchtungsmethoden erfordert allerdings ein noch umfassenderes Verständnis der genetischen Grundlagen wirtschaftlich relevanter Eigenschaften.

Das Aroma einer Sorte ist ein hoch komplexes Merkmal und hat einen gravierenden Einfluss auf dessen Akzeptanz beim Konsumenten (Ulrich *et al.*, 2009). Bislang sind über 370 flüchtige Substanzen bekannt, die das Apfel-Aroma prägen können (Dixon & Hewett, 2000). Viele davon entstehen aus dem Lipidstoffwechsel durch β -Oxidation oder den enzymatischen Abbau freier Fettsäuren über den LOX-Weg (Rowan *et al.*, 1999). Die Lipoxygenasen des Kulturapfels stehen auf Grund der durch sie bereitgestellten Vorläufer für C_6 -Aldehyde und -Alkohole während der Fruchtreife (Grosch *et al.*, 1977; Beuerle & Schwab, 1999) seit Kurzem im Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen. Eine umfangreiche bioinformatische Analyse identifizierte 23 potenziell funktionelle LOX-Gene im Genom von *Malus × domestica* cv. Golden Delicious (Vogt *et al.*, 2013a; Vogt *et al.*, 2013b). Abgesehen von zwei frühen Berichten über partiell gereinigte LOX aus der Frucht (Kim & Grosch, 1979; Feys *et al.*, 1982) ist jedoch noch wenig über deren biologische Aktivität und etwaige Funktionen einzelner Isozyme in der Pflanze bekannt.

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung von Lipoxygenasen des Kulturapfels. Besonderes Interesse galt dabei der Identifizierung von Kandidaten mit

potenzieller Beteiligung an der Aroma-Synthese während der Fruchtreife. Anhand von Expressions-Profilen verschiedener Mitglieder der Genfamilie, die am Julius-Kühn-Institut für Züchtungsforschung an Obst generiert wurden, sollten zunächst potenzielle Kandidaten zur funktionellen Analyse ausgewählt werden. Ein Ziel war die Klonierung der LOX-Gene in einen bakteriellen Vektor zur heterologen Expression in *Escherichia coli*. Rekombinantes LOX-Protein sollte partiell gereinigt und in enzymatischen Reaktionen mit den natürlich auftretenden Substraten Linolsäure, α -Linolensäure und Arachidonsäure auf katalytische Aktivität getestet werden. Um Einblicke in die physiologischen Funktionen der einzelnen Kandidaten und deren potenzielle Beteiligung an der Aroma-Synthese zu gewinnen, wurden die gebildeten Hydroperoxide mittels chromatografischer Verfahren analysiert. Regio- und Stereoselektivität der Fettsäure-Dioxygenierung sollten mittels Normalphasen- und Chiralphasen-HPLC ermittelt werden. Die Identifizierung der Produkte erfolgte durch LC-MS-Analytik. Schließlich sollte mittels zielgerichteter Mutagenese die Bedeutung ausgewählter Aminosäuren für die Regio- und Stereoselektivität der Lipoxygenasen bestimmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien entsprachen, soweit nicht anders in Tabelle 2.1 vermerkt, p. A. Qualität und wurden von folgenden Herstellern bezogen: AppliChem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck Schuchardt (Hohenbrunn), Molekula (Taufkirchen), Sigma-Aldrich (Steinheim). Lösungsmittel wurden immer im höchsten Reinheitsgrad von den Firmen J.T. Baker (Deventer, Niederlande) und Carl Roth (Karlsruhe) bezogen. Alle für die Chromatografie verwendeten Referenzsubstanzen stammen von der Firma Cayman Chemical (Tallinn, Estland).

Tabelle 2.1 Chemikalienliste

Chemische Bezeichnung	Abkürzung	Hersteller
Acrylamid, 30%		Carl Roth
Adenin, $\geq 98\%$		Carl Roth
Agar		Molekula
Agarose		Sigma-Aldrich
Aluminiumsulfat Hexadecahydrat, $\geq 95\%$		Carl Roth
Ameisensäure, $\geq 98\%$		Carl Roth
Ammoniumpersulfat, $\geq 98\%$	APS	Carl Roth
Ampicillin-Natriumsalz, $\geq 99\%$	Amp	Sigma-Aldrich
Arachidonsäure	AA	Sigma-Aldrich
L-Arginin, $\geq 98,5\%$	Arg	Carl Roth
L-Asparaginsäure Monohydrat	Asp	Fluka
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat	BCIP	Sigma-Aldrich
5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid	X-Gal	Carl Roth
Chloramphenicol, $\geq 98,5\%$	Cam	Carl Roth
Chloroform		Carl Roth
Cetyltrimethylammoniumbromid, $\geq 98\%$	CTAB	Carl Roth
Coomassie Brilliant Blue G250	CBB G250	Sigma-Aldrich
L-Cystein-hydrochlorid, $\geq 99\%$		Carl Roth
Dichlormethan, HPLC Qualität		Carl Roth
Diethylpyrocarbonat	DEPC	Carl Roth
N,N-Dimethylformamid, $\geq 99,8\%$	DMF	Carl Roth
Dimethylsulfoxid	DMSO	Carl Roth

Fortsetzung Tabelle 2.1

Chemische Bezeichnung	Abkürzung	Hersteller
Dinatriumhydrogenphosphat, ≥98%		Carl Roth
Eisen(II)-chlorid		Sigma-Aldrich
Eisen(III)-chlorid Hexahydrat		Merck
Essigsäure, 100%		Carl Roth
Ethanol, 96%	EtOH	J.T. Baker
Ethidumbromid, 10 mg/mL		AppliChem
Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz Dihydrat, ≥99%	EDTA	Carl Roth
D-Galaktose		AppliChem
D-Glukose, wasserfrei		Carl Roth
Glyzerin, ≥99%		Carl Roth
Glyzin, ≥99%		Carl Roth
Hefeextrakt, für die Bakteriologie		Carl Roth
Hefe-Stickstoff-Basismedium (ohne Aminosäuren)		Sigma-Aldrich
n-Hexan, HPLC Qualität		Carl Roth
L-Histidin, ≥99%	His	Carl Roth
Hydroperoxy HPLC Mix		Cayman Chemical
(±)9-Hydroperoxy-10(<i>E</i>),12(<i>Z</i>)-octadecadiensäure	(±)9-HpODE	Cayman Chemical
(±)13-Hydroperoxy-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-octadecadiensäure	(±)13-HpODE	Cayman Chemical
(±)9-Hydroxy-10(<i>E</i>),12(<i>Z</i>)-octadecadiensäure	(±)9-HODE	Cayman Chemical
(±)13-Hydroxy-9(<i>Z</i>),11(<i>E</i>)-octadecadiensäure	(±)13-HODE	Cayman Chemical
Imidazol, ≥99%		Carl Roth
Isoamylalkohol, ≥98,5%		Carl Roth
L-Isoleucine, ≥98,5%	Ile	Carl Roth
Isopropanol, HPLC Qualität		Carl Roth
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid	IPTG	Carl Roth
Kaliumchlorid, ≥99,5%		Carl Roth
Kalziumchlorid Dihydrat		Merck
L-Leucin, ≥99%	Leu	Carl Roth
Linolsäure	LA	Carl Roth
Linolensäure	LnA	Carl Roth
Lithiumchlorid, ≥99%		Carl Roth
L-Lysin, ≥98%	Lys	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid Hexahydrat		Carl Roth
Magnesiumsulfat		Merck
β-Mercaptoethanol		Carl Roth
Methanol, LC-MS Qualität	MeOH	J.T. Baker
L-Methionin, ≥99%	Met	Carl Roth
Milchpulver		Carl Roth
Natriumacetat	NaAc	Merck

Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 2.1

Chemische Bezeichnung	Abkürzung	Hersteller
Natriumchlorid, $\geq 95\%$		Carl Roth
tri-Natriumcitrat Dihydrat, $\geq 99\%$		Carl Roth
Natriumdodecylsulfat, $\geq 99\%$	SDS	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat, $\geq 98\%$		Carl Roth
Natriumhydroxid	NaOH	Hanns Nierle, Freising
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	NBT	Fluka
Orange G		Sigma-Aldrich
Pepton aus Casein		Carl Roth
L-Phenylalanin, $\geq 99\%$	Phe	Carl Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid	PMSF	Carl Roth
Phosphorsäure, 85%		Carl Roth
Polyvinylpyrrolidon K30	PVP	Sigma-Aldrich
L-Prolin, $\geq 98,5\%$	Pro	Carl Roth
Rinderserumalbumin	BSA	Carl Roth
Salzsäure, $\geq 32\%$		Carl Roth
L-Serin, $\geq 99\%$	Ser	Carl Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, $\geq 99\%$	TEMED	Carl Roth
L-Threonin, $\geq 99\%$	Thr	Carl Roth
Triphenylphosphin	TPP	Merck Schuchardt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, $\geq 99,5\%$	TRIS	Carl Roth
TRIZMA® Hydrochlorid	TRIS-HCl	Sigma-Aldrich
L-Tyrosin, $\geq 99\%$	Tyr	Carl Roth
Tween 20		Carl Roth
L-Valin, $\geq 98,5\%$	Val	Carl Roth
Wasser, LC-MS Qualität		J.T. Baker
Zitronensäure, $\geq 99,5\%$		Carl Roth

2.1.2 Enzyme

Polymerasen

Taq DNA Polymerase, 5 U/ μ L (New England Biolabs, Frankfurt)

Phusion® high-fidelity DNA Polymerase, 2 U/ μ L (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot)

Reverse Transkriptase

SuperScript™ III Reverse Transkriptase, 200 U/ μ L (Invitrogen, Karlsruhe)

Andere Enzyme**FastDigest (FD) Restriktionsenzyme** (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot)

FD BamHI, FD DpnI, FD EcoRI, FD HindIII, FD KpnI, FD NcoI, FD NotI,
FD SacI, FD XbaI, FD XhoI

DNase I, 1 U/μL (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot)

RNase A, 10 mg/mL (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot)

T4 DNA Ligase, 5 U/μL (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot)

RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, 40 U/μL (Invitrogen, Karlsruhe)

Den Enzymen lagen jeweils die vom Hersteller spezifizierten Puffer und Detergenzien bei.

2.1.3 Biologische Materialien

2.1.3.1 Pflanzen

Das in dieser Arbeit verwendete Pflanzenmaterial wurde, mit freundlicher Genehmigung des Fachgebietes für Obstbau der Technischen Universität München, den Versuchsanlagen in Freising entnommen. Blätter und Früchte entstammten *Malus × domestica* cv. Golden Delicious Typus Auvil Spur.

2.1.3.2 Mikroorganismen

Die folgenden Mikroorganismen fanden Anwendung in dieser Arbeit:

- ***E. coli* NEB 10-beta** (New England Biolabs, Frankfurt)

Genotyp: $\Delta(\text{ara-leu})7697 \text{ araD139 } \text{fhuA } \text{lacX74 } \text{galK } (\Phi 80 \Delta(\text{lacZ})M15) \text{ mcrA } \text{galU } \text{recA1 } \text{endA1 } \text{nupG } \text{rpsL } (\text{Str}^R) \Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$

- ***E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS** (Novagen, Darmstadt)

Genotyp: $F^- \text{ ompT } \text{hsdS}_{B(r_B^- m_B^-)} \text{ gal dcm } (DE3) \text{ pLysSRARE } (\text{Cam}^R)$

- ***S. cerevisiae* INVSc1** (Invitrogen, Karlsruhe)

Genotyp: $MATa \text{ his3D1 } \text{leu2 } \text{trp1-289 } \text{ura3-52}$

2.1.4 Vektoren

Alle in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind nachfolgend aufgelistet. Weitere Informationen zu relevanten Charakteristika befinden sich in Kapitel 3.2 und 3.3 sowie im Anhang dieser Arbeit (Abbildung 4.2 bis Abbildung 4.4).

- Klonierung von *Malus* LOX-Genen
pGEM®-T Easy (Promega, Mannheim)
- Heterologe Expression in *Escherichia coli*
pRSET B (Invitrogen, Karlsruhe)
- Heterologe Expression in *Saccharomyces cerevisiae*
pYES2 (Invitrogen, Karlsruhe)

Als Referenzen wurden in vielen der nachfolgend beschriebenen Experimente heterolog exprimiertes Protein der 13(S)-LOX *GmVLXC* aus Sojabohne (Huang *et al.*, 2010) und der 9(S)-LOX *Nb-9-LOX* aus *Nicotiana benthamiana* (Huang & Schwab, 2011) verwendet. Die entsprechenden Vektor-Konstrukte pYES2-Soy-vlxc und pYES2-Nb-9-lox wurden freundlicherweise von Dr. Fong-Chin Huang zur Verfügung gestellt. Sie enthielten das jeweilige Vollängen-Gen unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors zur heterologen Expression in Hefe.

2.1.5 Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei den Firmen Microsynth (Balgach, Schweiz) und MWG Eurofins (Berlin) synthetisiert. Sie wurden im niedrigsten Reinheitsgrad hergestellt und anschließend für die nachfolgenden Anwendungen eingesetzt:

Klonierung von Apfel-LOX-Genen in pGEM®-T Easy	Tabelle 2.2
Umklonierung in den Expressionsvektor pRSET B	Tabelle 2.3
Umklonierung in den Expressionsvektor pYES2	Tabelle 2.4
Zielgerichtete Mutagenese von <i>MdLOX1a</i>	Tabelle 2.5
Sequenzierung	Tabelle 2.6
Sonstige Primer	Tabelle 2.7

Material und Methoden

Tabelle 2.2 Primer für die Klonierung potenzieller *Malus* LOX-Gene. Die Oligonukleotide wurden anhand genomischer Sequenzen aus der ‚Apple Genome v1.0‘-Datenbank (Velasco *et al.*, 2010) entworfen und sind im 5‘- und 3‘-UTR des jeweiligen Gens lokalisiert. Die exakte Position der Primer ist durch den Abstand vom erwarteten Translationsstart dargestellt. Gennamen und Akzessionsnummern wurden von Vogt *et al.* (2013b) übernommen.

Primer	Sequenz (5' → 3')	5'-Position ^a	T _m	Zielgen (Akzession)
L1a_for	TTATTCACAACATTCTTTGC	-48	61°C	<i>MdLOX1a</i> (MDP0000450991)
L1a_rev	ACGCTTGTTTGATCCCATAC	+2671		
L1b_for	GAAACTGGAGGTCCGAC	-24	58°C	<i>MdLOX1b</i> (MDP0000312397)
L1b_rev	GGTCATACTTCTAGCATATCAC	+2853		
L1c_for	ATTCGTGTAAAGCAAAGCAG	-37	57°C	<i>MdLOX1c</i> (MDP0000423544)
L1c_rev	GGTCATACTTCTAGCATATCAC	+2680		
L1d_for	AGATCAAAGATGCTGCATTG	-9	58°C	<i>MdLOX1d</i> (MDP0000146677)
L1d_rev	CAAACAAAGAATCACAGAAGC	+2881		
L2a_for	GGATTCAAACCTTCTCGAAC	-59	66°C	<i>MdLOX2a</i> (MDP0000874800)
L2a_rev	CCACCACCACCTCAAATAA	+2775		
L2b_for	GAAGAAGAAGATGGCACTGACTAAAC	-10	62°C	<i>MdLOX2b</i> (MDP0000755511)
L2b_rev	CTAAATGTTGTTGAGAGTCATATCG	+2735		
L3a_for	CCACATTCTCATCCATCTTCT	-88	61°C	<i>MdLOX3a</i> (MDP0000257474)
L3a_rev	CTTTCACCTCCTGTTGTCGGTTG	+2714		
L5a_for	ACCAGATTAGAAAGCATATTATCC	-44	56°C	<i>MdLOX5a</i> (MDP0000169311)
L5a_rev	TGTTTGGAACACCGATTG	+2788		
L5b_for	GTCAAGCATTACAAAGCACACATC	-42	69°C	<i>MdLOX5b</i> (MDP0000753547)
L5b_rev	ATTAGCACAGTCTGAATCAAAC	+2857		
L6a_for	ACTCCCTCTCCCTGTG	-29	58°C	<i>MdLOX6a</i> (MDP0000277666)
L6a_rev	ACACACAAGAAAGTTCCTAG	+2841		
L6b_for	TCTCTCTCTGTGTCTGC	-31	60°C	<i>MdLOX6b</i> (MDP0000300321)
L6b_rev	GTTATGGACCAAAGCAC	+2850		
L7a_for	ACCTTCTCCTTCTGTTAAC	-46	64°C	<i>MdLOX7a</i> (MDP000264666)
L7a_rev	CACGAGTGAAATACAATGTAGAC	+2647		
L7c_for	TCAGTCAATGGCAGACC	-42	62°C	<i>MdLOX7c</i> (MDP0000172092)
L7c_rev	AGCAAGCCAAGAATAAGATACG	+2693		
L7d_for	TCAGTCAATGGCAGACC	-42	59°C	<i>MdLOX7d</i> (MDP0000923670)
L7d_rev	TGACAAAGGACTCGGATAC	+2703		
L8a_for	GTCCTTCTACTGTAAAGCATTACACT	-45	61°C	<i>MdLOX8a</i> (MDP0000215405)
L8a_rev	AGCTAATCGCTTGAGCGTACAAG	+2914		
L8b_for	CTTCCTGTTACTGTAAAGCATTAAACC	-45	60°C	<i>MdLOX8b</i> (MDP0000154668)
L8b_rev	TCCGAGTACAGCTATCAGATAGA	+2777		
L9a_for	GTTGATTTGCCGAGTCACTTTTC	-44	61°C	<i>MdLOX9a</i> (MDP0000135993)
L9a_rev	ATGGTGCCTCTCCTGGG	+2585		

Material und Methoden

Tabelle 2.3 Primer für die Umklonierung in den Expressionsvektor pRSET B. Unterstrichene Sequenzpositionen zeigen die verwendeten Restriktionsschnittstellen an.

Primer	Sequenz (5' → 3')	T _m	Zielgen
SET L1a XhoI_for	ATAATA <u>CTCGAG</u> CATGTTGCACAACCTGCT	62°C	<i>MdLOX1a</i>
SET L1a NcoI_rev	AATGTCC <u>CATGG</u> TTAGATAGAGACGCTGTTG		
SET L1c XhoI_for	AGAA <u>CTCGAGA</u> AATGCTGCAGAATATCGTTG	61°C	<i>MdLOX1c</i>
SET L1c KpnI_rev	AGCTGGT <u>ACCTT</u> AAATTGAGACACTGTTGG		
SET L2a XhoI_for	ATAA <u>CTCGAGA</u> AATGGCACTGGCTAAAC	61°C	<i>MdLOX2a</i>
SET L2a KpnI_rev	CCCCTGGT <u>ACCTC</u> ATATCGAAATACTATT		
SET L2b XhoI_for	ACTA <u>CTCGAGA</u> AATGGCACTGACTAAAC	60°C	<i>MdLOX2b</i>
SET L2b KpnI_rev	TGCTGGT <u>ACCTC</u> ATATCGAAATACTATTAGG		
SET L5b SacI_for	AGGTGAGCTCCATGATGACATCTCAGC	63°C	<i>MdLOX5b</i>
SET L5b EcoRI_rev	GACGGAA <u>TTCTT</u> AGATGGAGATGCTGTTTGAAC		
SET L7a XhoI_for	TGTAAT <u>CTCGAG</u> TATGCTGCATTCCAAGTATCC	62°C	<i>MdLOX7a</i>
SET L7a NcoI_rev	TAGAGTCC <u>ATGG</u> TTAGATGTTGATACTGGTGG		
SET L8b XhoI_for	ATGTGT <u>CTCGAG</u> CATGTATGCGGTGAAACAATC	63°C	<i>MdLOX8b</i>
SET L8b KpnI_rev	TCTACTGGT <u>ACCTC</u> AGATAGAGATGCTGTTGG		

Tabelle 2.4 Primer für die Umklonierung in den Expressionsvektor pYES2. Unterstrichene Sequenzpositionen zeigen die verwendeten Restriktionsschnittstellen an. Kursiv geschriebene Basen entsprechen den Histidin-Resten des N-terminal fusionierten 6xHis-Tags.

Primer	Sequenz (5' → 3')	T _m	Zielgen
YES Lhis KpnI_for	CAAGGTACCAACACAATGTCTGGTTCTCATCAT	62°C	Umklonierung aus pRSET B (Tabelle 2.3)
YES L1a NotI_rev	GTTGCGGCCGCTTAGATAGAGACG		
YES L1c XbaI_rev	GGCTCTAGATTAATTGAGACACTGTTGG		
YES L2a/b NotI_rev	ACTGCGGCCGCTCATATCGAAATACTATT		
YES L7a NotI_rev	ATTGCGGCCGCTTAGATGTTGATACTGG		
YES L8b NotI_rev	TATGCGGCCGCTCAGATAGAGATGC		
YES L5bhis EcoRI_for	ATAGAATTC AACACAATGTCCCATCATCATCACCATCA CATGATGACATCTCAGCTG	67°C	<i>MdLOX5b</i>
YES L5b NotI_rev	ATAGCGGCCGCTTAGATGGAGATGCTGTTTGG	67°C	<i>MdLOX6a</i>
YES L6ahis HindIII_for	AACAAGCTTTAAACAATGTCCCATCATCATCATCATCA CATGTTGAATCCCCAAGTTCACC		
YES L6a NotI_rev	TTGCGGCCGCTCAAATAGAGATGCTATATGGAACTCC CTTC		

Material und Methoden

Tabelle 2.5 Primer für die zielgerichtete Mutagenese von *MdLOX1a*. Die Oligonukleotide wurden entsprechend der Spezifikationen ^(a) von Horton (1995) bzw. ^(b) des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits entworfen. Unterstrichene Basen markieren für die Mutagenese erforderliche Basenaustausche. Kursiv gestellte Basen zeigen Sequenz-erhaltende Basenaustausche, die zur Minimierung des Risikos von Haarnadelstruktur- und Selbstdimer-Bildung eingeführt worden.

Primer	Sequenz (5' → 3')	T _m	Methode
L1a R268A_for	CAAGAGATGAAG <u>C</u> ATTTGG TCACTTG	58°C	oePCR ^a
L1a R268A_rev	CAAGTGACCAA <u>A</u> TGCTTCATC TCTTG		
L1a I566F_for	GTACATCAA <u>C</u> GCAITTTGG TAGAGG	58°C	oePCR ^a
L1a I566F_rev	CC TCTACCAA <u>A</u> TGCGTTGATGTAC		
L1a G567A_for	CCATGTACATCAATGCAATTG <u>C</u> TAGGGGAATCCTCCTTAATGC	66°C	QuikChange ^b
L1a G567A_rev	GCATTAAGGAGGATCCCCTAGCAATTGCATTGATGTACATGG		
L1a L572I_for	TTGGCAGGGGAATCCTC <u>A</u> TTAATGCTCGCGGAGTTATAGAG	67°C	QuikChange ^b
L1a L572I_rev	CTCTATAACTCCGCGAGCATTAA <u>I</u> GAGGATCCCCTGCCAA		
L1a I578L_for	CCTTAATGCTCGCGGAGTT <u>I</u> TAGAGTCGACAGTTTTTCCAGC	68°C	QuikChange ^b
L1a I578L_rev	GCTGGAAAACTGTGCGACTCTAA <u>A</u> ACTCCGCGAGCATTAAAGG		
L1a V582F_for	GTTATAGAGTC TACA <u>I</u> TCTTTCCAGCTAG	58°C	oePCR ^a
L1a V582F_rev	CTAGCTGGAAAG <u>A</u> TGTAGACTCTATAAC		
L1a T775L_for	GACTGTACTTGTTATTGCC <u>I</u> TGATTGAGATTTGTCAAGGC	65°C	QuikChange ^b
L1a T775L_rev	GCCTTGACAAAATCTCAAT <u>C</u> AAGGCAATACCAAGTACAGTC		

Tabelle 2.6 Primer für die Sequenzierung der klonierten *Malus* LOX-Gene. Genspezifische Primer wurden anhand genomischer Sequenzen aus der ‚Apple Genome v1.0‘-Datenbank entworfen. Unterstrichene Basen markieren Positionen, die von der Sequenz der Gene abweichen können.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Zielvektor/-gen
T7	TAATACGACTCACTATAGG	pGEM [®] -T, pRSET
T7term	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG	pRSET B
SP6	ATTTAGGTGACTATAG	pGEM [®] -T Easy
pYES2_for	TACCTCTATACTTTAAGCTC	pYES2
pYES2_rev	TCTAACTCCTTCCTTTTCGG	pYES2
<i>MdLOX1</i> int_for	G <u>A</u> CCGTGT <u>A</u> CACTT <u>C</u> GTTTGC	<i>MdLOX1a</i> , <i>MdLOX1c</i>
<i>MdLOX1</i> int_rev	GCTTGCTC <u>A</u> GT <u>G</u> AAAT <u>T</u> CCAATC	
<i>MdLOX2</i> int_for	TGAAGAATCTGAGGGGTGATG	<i>MdLOX2a</i> , <i>MdLOX2b</i>
<i>MdLOX2</i> int_rev	CCTGGAGTGAAGCATGAC	
<i>MdLOX5</i> int_for	ACGCCAAGTGGGTGAAG	<i>MdLOX5b</i>
<i>MdLOX5</i> int_rev	TGCAAATGGGTAGTCTTC	
<i>MdLOX6</i> int_for	TCCCATGTGGCTCTGTTCAATCA	<i>MdLOX6a</i>
<i>MdLOX6</i> int_rev	AATTGTTAGCCTTAGGCCATGTG	
<i>MdLOX7</i> int_for	TTCCTTATCCTCGCAGAG	<i>MdLOX7a</i>
<i>MdLOX7</i> int_rev	CAGGACTGGAGTTCCGAG	
<i>MdLOX8</i> int_for	TTGGGAAATCCTGATAAGAG	<i>MdLOX8b</i>
<i>MdLOX8</i> int_rev	TCCAGGACTAAAAGAAGCCTC	

Material und Methoden

Tabelle 2.7 **Sonstige Primer**

Primer	Sequenz (5' → 3')	T _m	Referenz
<u>cDNA Synthese</u>			
GeneRacer™ Oligo dT	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGA CAGTGT ₁₈		Invitrogen
<u>Haushaltsgen</u>			
<i>Malus Actin_for</i>	CTACAAAGTCATCGTCCAGACAT	55°C	Gasic <i>et al.</i> (2004)
<i>Malus Actin_rev</i>	TGGGATGACATGGAGAAGATT		

2.1.6 Kommerzielle Kits

Die folgenden kommerziell erhältlichen Kits wurden für die Erstellung dieser Arbeit gemäß den Angaben des jeweiligen Herstellers verwendet:

- Isolierung von Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus Pflanzen:
innuPREP Plant DNA Kit (Analytik Jena, Jena)
- Klonierung von PCR-Produkten:
pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, Mannheim)
- Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*:
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Mannheim)
- Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarose-Gelen und PCR-Ansätzen:
NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel, Düren)
- Herstellung kompetenter Hefezellen/ Transformation mit Plasmid-DNA:
S. c. EasyComp™ Transformation Kit (Invitrogen, Karlsruhe)

2.1.7 Sonstiges Material

Größenstandards

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot)

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot)

Antikörper

Anti-Lipoxygenase (LOX)-Antikörper, Kaninchen, polyklonal (Agrisera, Vännas, Schweden)

Anti-rabbit IgG-Antikörper, Ziege, polyklonal, an AP konjugiert (Agrisera, Vännas, Schweden)

Anti-6x His tag[®]-Antikörper, Maus, monoklonal, an AP konjugiert (Abcam, Cambridge, Großbritannien)

Detergenzien für die Molekularbiologie

dNTP-Mix, 10 mM (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot)

dATP, 100 mM (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot)

Zubehör zur Sterilfiltration

Rotilabo[®] Spritzenfilter, PVDF, 0,45 µm (Carl Roth, Karlsruhe)

Filtropur V 50, PES, 0,1 µm (Sarstedt, Nümbrecht)

Zubehör für die Proteinbiochemie

Profinity[™] IMAC Ni-Charged Resin (Bio-Rad Laboratories, München)

Vivaspin 500, MWCO 50.000 (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen)

ZelluTrans[®] Dialysierschlauch, MWCO 12.000-14.000 (Carl Roth, Karlsruhe)

Roti[®]-Load 1, 4x Proteinauftragspuffer, reduz. (Carl Roth, Karlsruhe)

Roti[®]-PVDF-Membran, 0,45 µm (Carl Roth, Karlsruhe)

Rotilabo[®] Einmal-Küvetten, PS (Carl Roth, Karlsruhe)

SUPRASIL[®] Präzisionsküvetten (Hellma Analytics, Müllheim)

Weitere Verbrauchsmaterialien entsprachen der üblichen Laborausstattung.

2.2 Geräte

2.2.1 Hochleistungsflüssigkeits-Chromatografie (HPLC)

Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC)

System	Jasco HPLC (Jasco, Groß-Umstadt) inkl. UV-Detektor Jasco UV-1575 mit variabler Wellenlänge
Trennsäule	Luna[®] 3u C18(2) , 100Å, 150 × 2 mm, 3,5 µm Partikelgröße (Phenomenex, Aschaffenburg)

Material und Methoden

Normalphasen-HPLC (NP-HPLC)

System	Knauer HPLC Maxi-Star (Knauer, Berlin) inkl. UV-Detektor Knauer 29815 mit variabler Wellenlänge
Trennsäule	LiChospher® 100 Diol , 125 × 4 mm, 5 µm Partikelgröße (Merck, Darmstadt)

Chiralphasen-HPLC (CP-HPLC)

System	Knauer HPLC Maxi-Star (Knauer, Berlin) inkl. UV-Detektor Knauer 29815 mit variabler Wellenlänge
Trennsäule	Chiralpak® IA , 250 × 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße (Altmann Analytik, München)

2.2.2 Flüssigkeitschromatografie-Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (LC-UV/ESI-MSⁿ)

System	Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) inkl. UV-Detektor Agilent G1315A mit variabler Wellenlänge
MS	Bruker Daltonics esquire 3000^{plus} (Bruker Daltonics, Bremen)
Trennsäule	Luna® 3u C18(2) , 100Å, 150 × 2 mm, 3,5 µm Partikelgröße (Phenomenex, Aschaffenburg)
Vorsäule	Security Guard Cartridges C18 , 4 × 2 mm (Phenomenex)

2.2.3 Sonstige Geräte

Mikrobiologische Arbeiten

Autoklav	Systemec V95 (Systemec, Wetztenberg)
Horizontalschüttler	Shaker DOS-10L (neoLab, Heidelberg)
Inkubatoren	Forma Steri-Cycle CO2 (Thermo, Cambridge, UK) GFL3033 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
Reinstwasseranlage	PureLab Classic (ELGA Labwater, Celle)

Material und Methoden

Sterilbank	Hera Safe (Heraeus Holding, Hanau)
Ultraschallsonde	Bandelin UW2070 (Bandelin Electronic, Berlin)
Vortex-Schüttler	Vortex VV3 (VWR International, Darmstadt)
Zentrifuge	Sigma 4K15 (Sigma, Osterode)
<u>Molekularbiologische Arbeiten</u>	
Gelektrophorese	Elektrophoresekammer MIDI (Carl Roth, Karlsruhe)
PCR-Maschinen	Primus 96 advanced (Peqlab Biotechnologie, Erlangen)
	SensoQuest labcycler (SonsoQuest, Göttingen)
Photometer	Nanodrop 1000 (Peqlab Biotechnology, Erlangen)
	Nicolet evolution 100 (Thermo, Cambridge, UK)
Spannungsquelle	Consort E132 (Consort, Turnhout, Belgien)
Thermocycler	Thermomixer® comfort (Eppendorf, Hamburg)
UV-Transilluminator	G:BoX (Syngene, Cambridge, UK)
Wasserbad	Julabo HC 5/7 (Julabo, Seelbach)
Zentrifugen	Sigma 1-14 (Sigma, Osterode)
	Eppendorf 5415R (Eppendorf, Hamburg)
<u>Biochemische Arbeiten</u>	
Blotter	Semi Dry Blotter (biostep, Jahnsdorf)
Gelelektrophorese	MINI-Vertical Elektrophoresesystem (Carl Roth, Karlsruhe)
Orbitalschüttler	Polymax 1040 (Heidolph Instruments, Schwabach)
pH-Meter	CG 820 (Schott Geräte, Mainz)
Rotationsinkubator	Labinco Rotary Mixer L26 (Labinco, Breda, Niederlande)
Spannungsquellen	Consort E835 (Consort, Turnhout, Belgien)
	PowerPac 200 (BioRad, Hercules, Kalifornien, USA)
Ultraschallbad	RK103H (Bandelin Electronic, Berlin)
Vakuum-Zentrifuge	Christ RVC 2-18 (Martin Christ, Osterode)

Material und Methoden

Waagen	SCALTEC SPB61 (SCALTEC Instruments, Heiligenstadt)
	Scout Pro SP U4001 (Ohaus, Pine Brook, New Jersey, USA)
	TP 214 (Denver Instrument, Bohemia, New York, USA)
Wasserbad	ECO RE 2025 (Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen)

Weitere Geräte entsprachen der üblichen Laborausstattung.

2.3 Software und Internet-Ressourcen

Software

A Plasmid Editor (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>)

Bruker DataAnalysis, Version 3.1 (Bruker Daltonics, Bremen)

ChemSketch, Version 12 (ACD Labs, Toronto, Kanada)

EuroChrom 2000 (Knauer, Berlin)

Jasco ChromPass 1.9.302.1124 (Jasco, Groß-Umstadt)

Geneious, Version 5.6.6 (Biomatters, Auckland, Neuseeland)

PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 (Schrödinger, Portland, USA)

Internet-Ressourcen

Graphical Codon Usage Analyser, Version 2.0 (<http://gcu.schoedl.de/>)

LIPID MAPS Lipidomics Gateway (<http://www.lipidmaps.org/>)

MassBank – High quality mass spectral database (<http://www.massbank.jp/>)

'*M. domestica* Genome V1.0'-Datenbank (Genome Database for Rosaceae, GDR)

http://www.rosaceae.org/species/malus/malus_x_domestica/genome_v1.0

OligoAnalyzer, Version 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc, Coralville, USA)

<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/Default.aspx>

Protein Families Database (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)

RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org/)

SWISS-MODEL Server (<http://swissmodel.expasy.org/>)

2.4 Mikrobiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Kulturmedien wurden mit destilliertem Wasser hergestellt und autoklaviert. Zur Herstellung von Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar ergänzt. Antibiotika, IPTG und X-Gal wurden immer frisch in das benötigte Volumen des autoklavierten Kulturmediums gegeben. Die Konzentrationen verwendeter Antibiotika und Medienzusätze sind Tabelle 2.8 zu entnehmen.

Tabelle 2.8 Antibiotika und Medienzusätze. ^(a) In bidestilliertem Wasser hergestellte Lösungen wurden vor dem Gebrauch sterilfiltriert. Erläuterungen zu den verwendeten Abkürzungen für Chemikalien befinden sich in Tabelle 2.1.

Antibiotika	Stocklösung		Arbeitskonzentration	
	Konzentration	Lösungsmittel ^a	Festmedium	Flüssigmedium
Amp	100 mg/mL	Bidest. Wasser	100 µg/mL	100 µg/mL
Cam	34 mg/mL	EtOH	100 µg/mL	100 µg/mL
Medienzusätze				
IPTG	238 mg/mL	Bidest. Wasser	0,2 mM	
X-Gal	20 mg/mL	DMSO	40 µg/mL	

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte, sofern nicht anders angegeben, in LB-Medium mit den entsprechenden Medienzusätzen. Die Inkubation fand über Nacht bei 37°C im Brutschrank (Festmedien) oder im Inkubationsschüttler bei 150 rpm (Flüssigkulturen) statt.

LB-Medium	0,5% (w/v)	Hefeextrakt
nach Bertani (1951)	1% (w/v)	NaCl
	1% (w/v)	Pepton
		pH 7,5

2.4.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen wurden 10 mL LB-Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C, 150 rpm inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 100 mL LB-Medium 1:100 mit der Vorkultur beimpft und für weitere 2-3 Stunden bis zum Erreichen einer Optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,5 inkubiert. Danach wurde die Kultur für 30 min in Eiswasser gekühlt. Nach Zentrifugation bei 5.000 rpm (10 min, 4°C) wurde das Kulturmedium

Material und Methoden

abdekantiert. Das verbleibende Zell-Pellet wurde in 5 mL eiskaltem Triturationspuffer resuspendiert, anschließend auf 40 mL aufgefüllt und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden noch einmal mit 40 mL Puffer gewaschen und schließlich in 10 mL Triturationspuffer resuspendiert. Kompetente Zellen wurden mit 7% (v/v) DMSO versetzt und in Aliquots zu je 200 μ L in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

Triturationspuffer	100 mM	CaCl ₂ × 2H ₂ O
	90 mM	MgCl ₂ × 6H ₂ O
	40 mM	NaAc
		pH 5,5

2.4.1.2 Heterologe Expression in *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS

Zur heterologen Expression von Lipoxygenasen in *E. coli* wurden zunächst 10 mL LB-Medium (plus Amp und Cam) mit einer Einzelkolonie des zu untersuchenden Stammes beimpft und bei 37°C und 150 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 200 mL LB-Medium (plus Amp und Cam) 1:50 mit der Vorkultur beimpft und weiter bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert.

Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG. Anschließend wurde bei 18°C und 150 rpm für weitere 16-18 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden durch 10 min Zentrifugation bei $5.000 \times g$ (4°C) geerntet, einmal mit bidest. Wasser gewaschen und anschließend bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

IPTG-Stocklösung	23,8% (w/v)	IPTG
-------------------------	-------------	------

2.4.2 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Kulturmedien wurden mit destilliertem Wasser hergestellt und autoklaviert. Zur Herstellung von Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar ergänzt. Galaktose- und Glukose-Lösungen wurden als 20% (w/v) Stocklösungen hergestellt, sterilfiltriert und immer frisch in das benötigte Volumen des autoklavierten Kulturmediums gegeben.

Die Kultivierung des INVSc1-Stammes erfolgte in YPD-Vollmedium. Zur Selektion und Kultivierung von transformierten Hefezellen wurde SC-U-Minimalmedium

verwendet. Die Inkubation fand über Nacht bei 30°C im Brutschrank (Festmedien) oder im Inkubationsschüttler bei 150 rpm (Flüssigkulturen) statt.

Glukose-Stocklösung	20% (w/v)	D-Glukose
Galaktose-Stocklösung	20% (w/v)	D-Galaktose
YPD-Medium	1% (w/v)	Hefeextrakt
	2% (w/v)	Pepton
<i>Frisch zugesetzt:</i>	2% (v/v)	D-Glukose
SC-U-Medium	0,67% (w/v)	Hefe-Stickstoff-Basismedium (ohne Aminosäuren)
nach Guthrie & Fink (1991)	0,01% (w/v) ³	Adenin, Arg, Cystein, Leu, Lys, Thr, Trp
	0,005% (w/v) ¹	Asp, His, Ile, Met, Phe, Pro, Ser, Tyr, Val
<i>Frisch zugesetzt:</i>	2% (w/v)	D-Glukose/D-Galaktose

2.4.2.1 Herstellung kompetenter INVSc1-Zellen

Die Herstellung kompetenter *S. cerevisiae* INVSc1-Zellen erfolgte mit Hilfe des *S. c.* EasyComp™ Transformation-Kits von Invitrogen. Kompetente Zellen wurden in 50 µL Aliquots bei -80°C gelagert.

2.4.2.2 Heterologe Expression in Hefe

Die heterologe Expression von Proteinen in *S. cerevisiae* erfolgte gemäß den Vorgaben von Huang *et al.* (2010). Dazu wurden 30 mL SC-U-Medium (plus 2% (w/v) Glukose) mit einer Hefekolonie beimpft und über Nacht bei 30°C und 150 rpm kultiviert. Am nächsten Tag wurde die OD₆₀₀ der Vorkultur ermittelt und damit das erforderliche Kulturvolumen berechnet⁴, um bei Verdünnung in 200 mL Hauptkultur eine OD₆₀₀ von 0,4 zu erhalten. Die Zellen in dem berechneten Kulturvolumen wurden zunächst bei 1.500 × g (4°C) pelletiert und anschließend in 200 mL SC-U-Medium (plus 2% (w/v) Galaktose) resuspendiert. Danach wurde die Kultur für weitere 24 Stunden bei 30°C und 150 rpm inkubiert. Gegebenenfalls wurde eine

³ Die eingesetzten Aminosäuren sind der Einfachheit halber in Dreibuchstabenform angegeben. Als Hilfe zur Entzifferung der einzelnen Komponenten kann Tabelle 2.1 zu Rate gezogen werden.

⁴ Die Berechnung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers für die heterologe Expression mit Hilfe des pYES2-Vektors (Invitrogen, Karlsruhe).

Material und Methoden

Zeitreihe durchgeführt: Dafür wurden 0, 4, 8 und 24 Stunden nach Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von Galaktose je 50 mL Kultur entnommen. Die Zellernte erfolgte in 25 mL Aliquots bei $5.000 \times g$ (4°C). Die Pellets wurden danach mit bidest. Wasser gewaschen und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.4.3 Herstellung von Glycerin-Dauerkulturen

Für die Langzeit-Lagerung von Bakterien- und Hefe-Stämmen wurden Dauerkulturen hergestellt. Dazu wurden 700 μL einer Vorkultur mit 700 μL steriler Glycerin-Lösung gemischt, in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Glycerin-Lösung	65% (v/v)	Glycerin
nach Mülhardt (2006)	100 mM	MgSO ₄
	25 mM	TRIS-HCl
		pH 8,0

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmid-Isolation aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems von Promega. Dazu wurden Zellen aus 5-10 mL Kultur geerntet und entsprechend der Anweisungen des Herstellers behandelt. Durch die Elution mit 65°C -warmen Wasser konnte die Ausbeute der Plasmid-Isolationen noch erhöht werden. Die Bestimmung von Reinheit und Konzentration erfolgte dann wie in Abschnitt 2.5.5 beschrieben.

2.5.2 Isolation von Nukleinsäuren aus *Malus × domestica*

2.5.2.1 Isolation genomischer DNA

Die Isolierung pflanzlicher DNA aus Blättern von *Malus × domestica* erfolgte mit dem InnuPREP Plant DNA-Kit von Analytik Jena. Qualität und Quantität der genomischen DNA wurden anschließend durch photometrische Messung mit dem Nanodrop (2.5.5.1) überprüft.

2.5.2.2 Isolation von Gesamt-RNA

Im Zuge dieser Arbeit wurde Gesamt-RNA aus reifen Früchten der Sorte Golden Delicious Typus Auvil Spur isoliert. Dies erfolgte in leicht abgewandelter Form nach dem Protokoll von Liao *et al.* (2004). Dazu wurden 0,2 g Pflanzenmaterial in einem sterilen Mörser mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben. Das Pulver wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 700 µL vorgewärmten CTAB-Extraktionspuffer versetzt. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei 65°C und 500 rpm. Der Extrakt wurde anschließend für 5 min bei 10.000 rpm (10°C) zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Proteine und Zelltrümmer wurden durch Extraktion mit Chloroform:Isoamylalkohol (Cl, 24:1) entfernt: Dazu wurde der Extrakt mit 1 Vol. Cl versetzt und durch 10 min Invertieren ausgeschüttelt. Nach weiteren 10 min Zentrifugation bei 12.000 × *g* (10°C) wurde die wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut mit 1 Vol. Cl ausgeschüttelt. Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 0,25 Vol. 10 M Lithiumchlorid-Lösung bei 8°C über Nacht ausgefällt und durch 30 min Zentrifugation bei 13.200 rpm (10°C) pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in 500 µL 0,5% (w/v) SDS-Lösung resuspendiert und erneut mit 1 Vol. Cl ausgeschüttelt.

Die Präzipitation der RNA erfolgte durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol. Nach 60-minütiger Inkubation bei -20°C schloss sich eine weitere Zentrifugation bei 13.200 rpm (10°C) für 30 min an. Das RNA-Pellet wurde einmalig mit 1 mL 70% (v/v) Ethanol und anschließend mit reinem Ethanol gewaschen und dann vollständig getrocknet, bevor es in 25 µL bidest. Wasser rückgelöst wurde.

Zur Entfernung kopräzipitierter pflanzlicher DNA wurde die isolierte Gesamt-RNA entsprechend der Hersteller-Angaben mit 2 U DNase I versetzt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsvolumen zunächst auf 200 µL erhöht, bevor die Reaktion durch zweimaliges Ausschütteln mit Cl abgestoppt werden konnte. Es folgte die Präzipitation der RNA durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M NaAc-Lösung und 1 Vol. Isopropanol mit anschließender Inkubation bei -20°C. Die RNA wurde wie zuvor beschrieben gewaschen und getrocknet, bevor sie in 10 µL bidest. Wasser rückgelöst wurde.

Material und Methoden

Qualität und Quantität der isolierten Gesamt-RNA wurden durch Agarose-Gelelektrophorese (2.5.5.2) und photometrische Messung (2.5.5.1) überprüft. Intakte, kontaminationsfreie RNA wurde anschließend in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben (2.5.3) und bei -20°C gelagert.

Um während der Isolation den störenden Einfluss von RNasen auszuschließen, wurden alle benötigten Puffer und Lösungen mit DEPC-behandeltem Wasser hergestellt. Dazu wurde bidestilliertes Wasser mit 0,1% (w/v) DEPC über Nacht unter Rühren inkubiert und anschließend zweimal autoklaviert. Die verwendeten Geräte und Arbeitsflächen wurden vor Beginn der Isolation mit 70% (v/v) Ethanol gereinigt. Alle Arbeiten fanden ausschließlich in Eis- oder Stickstoff-gekühlten Behältnissen statt.

CTAB-Extraktionspuffer	3% (w/v) CTAB
nach Liao <i>et al.</i> (2004)	3% (w/v) PVP
	2 M NaCl
	100 mM TRIS-HCl, pH 8,0
	25 mM EDTA
<i>Frisch zugesetzt:</i>	2% (v/v) β -Mercaptoethanol
NaAc-Lösung	3 M Natriumacetat
	pH 5,2

2.5.3 Reverse Transkription

Die Erst-Strang-cDNA-Synthese ausgehend von pflanzlicher Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe der SuperScript™ III Reversen Transkriptase von Invitrogen. Fünf Mikrogramm RNA wurden unter Verwendung von 20 μ M Oligo dT-Primer (Tabelle 2.7) entsprechend der Herstellerangaben in komplementäre DNA transkribiert.

Die Integrität der synthetisierten cDNA wurde durch PCR mit Primern für ein Apfel-Haushaltsgen (0) überprüft. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur selektiven Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendet. Abhängig von der Anwendung und die daran gestellten Anforderungen wurden dabei verschiedene Polymerasen eingesetzt: Reine Kontroll-

PCR-Reaktionen, wie die qualitative Prüfung der cDNA (0) und die Kolonie-PCR (2.5.4.3) wurden mit *Taq* DNA Polymerase durchgeführt. Andere Anwendungen erforderten dagegen den Einsatz von Phusion® high-fidelity DNA Polymerase. Letztere eignet sich auf Grund ihrer 3'→5'-Exonuklease-Aktivität und der damit einhergehenden niedrigen Synthese-Fehlerrate besonders für die Gen-Amplifikation von cDNA (0) und deren Klonierung zur heterologen Expression in *E. coli* und *S. cerevisiae* (0).

Die allgemeine Zusammensetzung der PCR-Ansätze bei Gebrauch der *Taq* DNA Polymerase und Phusion® DNA Polymerase ist der Tabelle 2.9 zu entnehmen.

Tabelle 2.9 Allgemeine PCR-Ansätze bei Gebrauch von *Taq* und Phusion® DNA Polymerase. Angegeben sind die Endkonzentrationen aller eingesetzten Detergenzien in 20 µL Reaktionsvolumen.

<i>Taq</i> DNA Polymerase		Phusion® high-fidelity DNA Polymerase	
1x	10x ThermoPol Puffer	1x	5x Phusion® HF Puffer
200 µM	dNTP-Mix	200 µM	dNTP-Mix
		0-3% ⁵	DMSO
0,4 µM	<i>forward</i> -Primer	0,5 µM	<i>forward</i> -Primer
0,4 µM	<i>reverse</i> -Primer	0,5 µM	<i>reverse</i> -Primer
50 ng	Matrizen-DNA	50 ng	Matrizen-DNA
0,025 U/µL	<i>Taq</i> DNA Polymerase	0,02 U/µL	Phusion® DNA Polymerase

2.5.4.1 Protokoll für die Prüfung der cDNA-Qualität

Die qualitative Prüfung der cDNA verschiedener Apfel-Gewebe erfolgte nach dem Protokoll von Gasic *et al.* (2004). Dazu wurde zuvor synthetisierte cDNA (2.5.3) in einer PCR-Reaktion mit Primern für ein Apfel-Haushaltgen (Tabelle 2.7) verwendet. Intakte cDNA ermöglicht die Vervielfältigung eines 1023 bp großen Fragments für ein Apfel-Actin-Gen. Da bei Amplifikation auf genomischer DNA ein etwa 1,5 kb großes PCR-Produkt entsteht, konnte so außerdem auf Kontamination mit genomischer DNA getestet werden.

Zur Amplifikation des Actin-Fragments wurden ein Standard-Reaktionsansatz mit *Taq* DNA Polymerase (2.5.4) und das in Tabelle 2.10 beschriebene Temperatur-Programm gewählt.

⁵ Dimethylsulfoxid (DMSO) war kein Bestandteil des Standard-PCR-Ansatzes, sondern fand lediglich bei schwer zu amplifizierenden PCR-Produkten Anwendung.

Material und Methoden

Tabelle 2.10 PCR-Programm für die Prüfung der cDNA-Qualität

Schritt	Temperatur	Dauer	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	95°C	60 sec	1
Denaturierung	95°C	30 sec	
Annealing	53°C	60 sec	35
Elongation	68°C	120 sec	
Finale Elongation	68°C	300 sec	1
Lagerung	10°C	Unbegrenzt	1

2.5.4.2 Protokoll für die Klonierung von LOX-Genen aus *Malus × domestica*

Die Amplifikation von LOX-Genen erfolgte von cDNA generiert aus der Fruchtschale von *Malus × domestica* cv. Golden Delicious. Dazu verwendete Primer wurden anhand bioinformatisch ermittelter LOX-Sequenzen aus dem Apfel-Genom (Vogt *et al.*, 2013b) erstellt. Sie erlaubten die Amplifikation der erwarteten Vollängen-Gensequenzen samt kurzer Abschnitte des flankierenden 5'- und 3'-Nicht-kodierenden Bereichs (UTR). Tabelle 2.2 zeigt alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide samt ihrer Lage in Bezug zu dem bioinformatisch vorhergesagten Translationsstart des betreffenden Zielgens.

Zur Amplifikation der LOX-Gene wurden ein Standard-Reaktionsansatz mit Phusion DNA Polymerase (2.5.4) und das in Tabelle 2.11 beschriebene Temperatur-Programm gewählt.

Tabelle 2.11 PCR-Programm für die Gen-Amplifikation von Apfel-cDNA. Temperaturen (T_m) und Elongationszeiten wurden an die verwendeten Primer und die Länge des erwarteten PCR-Produktes angepasst (Tabelle 2.2).

Schritt	Temperatur	Dauer	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	98°C	60 sec	1
Denaturierung	98°C	10 sec	
Annealing	T_m	30 sec	35
Elongation	72°C	30 sec/kb	
Finale Elongation	72°C	300 sec	1
Lagerung	10°C	Unbegrenzt	1

PCR-Produkte der erwarteten Größe wurden aus dem Agarosegel extrahiert (2.5.6) und zur weiteren Analyse in dem pGEM[®]-T Easy-Vektor kloniert (2.5.7.1).

2.5.4.3 Protokoll für die Selektion von Klonen mittels Kolonie-PCR

Die erfolgreiche Insertion eines Zielgens in einen bestimmten Vektor konnte durch Kolonie-PCR mit Hilfe genspezifischer Primer nachgewiesen werden. Dazu wurde Zellmaterial von auf Festmedium selektierten Klonen in einem PCR-Reaktionsgefäß manuell zerrieben und in PCR-Mastermix resuspendiert.

Zur Amplifikation des Zielgens wurden ein Standard-Reaktionsansatz mit *Taq* DNA Polymerase (2.5.4) und das in Tabelle 2.12 beschriebene Temperatur-Programm gewählt.

Tabelle 2.12 PCR-Programm für die Kolonie-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95°C	120 sec	1
Denaturierung	95°C	30 sec	
Annealing	60°C	30 sec	45
Elongation	68°C	180 sec	
Finale Elongation	68°C	300 sec	1
Lagerung	10°C	Unbegrenzt	1

2.5.4.4 Protokolle für die Umklonierung in Expressionsvektoren

Zur heterologen Expression in *E. coli* oder *S. cerevisiae* wurden LOX-Gene in den pRSET B- beziehungsweise den pYES2-Expressionsvektor kloniert.

Zunächst wurde die heterologe Expression in *E. coli* angestrebt: Dazu mussten die Lipoxygenasen mit genspezifischen Primern von den pGEM®-T Easy-Vektor-Konstrukten (0) amplifiziert werden. Tabelle 2.3 zeigt die dafür benötigten Oligonukleotide samt den Restriktionsschnittstellen für eine gerichtete Klonierung in den pRSET B-Vektor. Bei erfolgreicher Umklonierung wurden die LOX-Gene so *in frame* hinter die Vektor-kodierte Sequenz für ein 6x His-Tag ligiert.

Des Weiteren war eine Umklonierung in den Expressionsvektor pYES2 erforderlich. Da der Hefe-Vektor nicht für Fusions-Peptide zur späteren Aufreinigung des rekombinant erzeugten Proteins kodiert, wurden die LOX-His-Tag-Fusionskonstrukte von den zuvor generierten pRSET B-Vektoren amplifiziert. Der *forward*-Primer war in dem Fall für alle klonierten LOX-Gene gleich und enthielt neben der zum His-Tag komplementären Sequenz ein Translationsstart-Signal für Hefen. Die

Material und Methoden

reverse-Primer waren dagegen genspezifisch. Zwei Lipoxygenasen (*MdLOX1d* und *MdLOX6a*) wurden direkt von den pGEM[®]-T Easy-Vektor-Konstrukten amplifiziert. Die *forward*-Primer kodierten in dem Fall für einen vollständigen 6x His-Tag, der *in-frame* vor das Start-Codon des Zielgens fusioniert wurde.

Zur Amplifikation der LOX-Gene wurden ein Standard-Reaktionsansatz mit Phusion[®] DNA Polymerase (2.5.4) und das in Tabelle 2.11 beschriebene Temperatur-Programm gewählt. PCR-Produkte der erwarteten Größe wurden anschließend aus dem Agarosegel extrahiert, mit Restriktions-Endonukleasen geschnitten (2.5.7.2) und gerichtet in die Multiple Klonierungsstelle (MCS) des Zielvektors ligiert (2.5.7.3).

2.5.5 Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.5.5.1 Photometrische Bestimmung

Die photometrische Messung der Nukleinsäure-Konzentration erfolgte mit dem NanoDrop Spektrophotometer. Als Nullwert diente 1 µL bidest. Wasser.

2.5.5.2 Agarose-Gelelektrophorese

Alternativ konnte die Konzentrationsbestimmung auch mittels Agarose-Gelelektrophorese erfolgen. Dazu wurde 1% (w/v) Agarose durch Erhitzen in 1x TAE-Puffer gelöst. Vor dem Erstarren der Agarose-Lösung wurde noch Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/mL zugefügt.

DNA-Und RNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1x Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard dienten 0,5 µg GeneRuler[™] 1 kb DNA Ladder. Nukleinsäuren wurden in 1x TAE-Puffer bei 130 V gelelektrophoretisch getrennt und anschließend im UV-Licht der Gel-Dokumentationsanlage visualisiert.

50x TAE-Puffer nach Mülhardt (2006)	24,2% (w/v)	TRIS
	5,71% (v/v)	Essigsäure
	50 mM	EDTA
		pH 8,0
10x Ladepuffer	0,21% (w/v)	Orange G
	100 mM	EDTA
	50% (v/v)	Glyzerin
		pH 8,0

2.5.6 DNA-Extraktion aus PCR-Ansätzen und Agarosegelen

Die Extraktion von Nukleinsäuren aus PCR-Reaktionsansätzen und Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II-Kits von Macherey-Nagel. Proben wurden entsprechend der Hersteller-Angaben aufbereitet. Die Bestimmung von Reinheit und Konzentration der extrahierten DNA erfolgte dann wie in Abschnitt 2.5.5 beschrieben.

2.5.7 Klonierung und Transformation

2.5.7.1 Klonierung mittels pGEM®-T Easy Vector System I

Die Klonierung von LOX-Genen nach Amplifikation von Apfel-cDNA erfolgte mit Hilfe des pGEM®-T Easy Vector Systems I von Promega. Dazu wurde gereinigtes PCR-Produkt zunächst in 1x ThermoPol-Puffer unter Zugabe von 5 U *Taq* DNA Polymerase und 0,2 mM dATP für 30 min bei 70°C inkubiert. Dabei werden von der Polymerase 3'-d(A)-Überhänge an den Enden des PCR-Produktes generiert. Diese Überhänge sind komplementär zu den 3'-d(T)-Überhängen des pGEM®-T Easy-Vektors und erlauben eine effizientere Ligation beider DNA-Fragmente. Ein Teil der Ligation wurde in *E. coli*-Zellen transformiert (2.5.7.4) und auf LB-Medium (mit Amp, IPTG und X-Gal) selektioniert.

2.5.7.2 Restriktion von DNA mittels Endonukleasen

Die restriktive Spaltung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der FastDigest-Restriktionsenzyme von Thermo Fisher Scientific. Zu spaltende DNA wurde mit 1x FastDigest Green Buffer und 1-2 µL Endonuklease versetzt und für mindestens 15 min bei 37°C inkubiert. Der Erfolg der Restriktion wurde mit Agarose-Gelelektrophorese überprüft und das DNA-Fragment gegebenenfalls wieder aus dem Gel extrahiert (2.5.6).

2.5.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation komplementärer DNA-Enden erfolgte mit Hilfe von T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific). Tabelle 2.13 verdeutlicht die Zusammensetzung der Ligations-Ansätze und mitgeführten Kontrollen. Die Reaktion fand für 1 Stunde bei 20°C oder über Nacht bei 8°C statt.

Material und Methoden

Tabelle 2.13 Allgemeine Zusammensetzung eines Ligations-Ansatzes. Angegeben sind die Endkonzentrationen aller eingesetzten Detergenzien in 10 μ L Reaktionsvolumen.

Ligations-Ansatz		Negativkontrolle	
1x	10x T4 DNA Ligase Puffer	1x	10x T4 DNA Ligase Puffer
150 ng	Insert-DNA		
50 ng	Linearisierter Vektor	50 ng	Linearisierter Vektor
1 U	T4 DNA Ligase	1 U	T4 DNA Ligase

Anschließend wurde ein Teil der Ligation in *E. coli*-Zellen transformiert und die korrekte Insertion der PCR-Produktes mittels Kolonie-PCR (2.5.4.3) überprüft.

2.5.7.4 Hitzeschock-Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation rekombinanter Plasmid-DNA in *Escherichia coli* mittels Hitzeschock wurden 50 μ L chemokompetente Zellen für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 50 ng ungeschnittener Vektor-DNA oder 5 μ L Ligations-Ansatz gemischt und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Hitzeschock für 45 sec bei 42°C transformiert. Der Ansatz wurde kurz auf Eis gestellt, mit 1 mL SOC-Medium versetzt und für 1 Stunde bei 37°C und 150 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 100 μ L des Ansatzes auf LB-Medium mit Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

SOC-Medium	2% (w/v) Pepton
	0,5% (w/v) Hefeextrakt
	10 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	2,5 mM KCl
	<i>Frisch zugesetzt:</i> 20 mM Glukose
	pH 7,0

2.5.7.5 Transformation von kompetente *S. cerevisiae*-Zellen

Die Transformation rekombinanter Plasmid-DNA in kompetente Hefen des Stammes INVSc1 erfolgte mit Hilfe des *S. c.* EasyComp™ Transformation Kits von Invitrogen. Die Selektion erfolgreich transformierter Hefen fand auf SC-U-Minimalmedium statt.

Dazu wurden 100 μL des Transformations-Ansatzes auf Festmedium ausplattiert und für 48 h bei 30°C inkubiert.

2.5.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung der in dieser Arbeit beschriebenen Klone wurde durch die Firma MWG Eurofins (Berlin) durchgeführt. Die dafür verwendeten Primer (Tabelle 2.6) wurden dem Ansatz in einer Konzentration von 10 pMol/ μL zugesetzt oder lagen als Standard-Primer bei dem Sequenzier-Anbieter vor.

2.5.9 Zielgerichtete Mutagenese von *MdLOX1a*

2.5.9.1 Mutagenese mittels *overlap-extension*-PCR

Für die zielgerichtete Mutagenese mittels *overlap-extension*-PCR (oePCR) wurden Primer entsprechend der Spezifikationen von Horton (1995) erstellt. Tabelle 2.5 enthält die in dieser Arbeit verwendeten Primer und verdeutlicht die für die Punktmutation sowie für eine optimale Amplifikation des Zielgens erforderlichen Basenaustausche.

Die Einführung der gewünschten Punktmutation in das *MdLOX1a*-Gen erfolgte in zwei separaten PCRs: Im ersten Schritt wurden zwei Fragmente des Zielgens synthetisiert. Das erste Fragment wurde mit pYES Lhis KpnI_for (Tabelle 2.4) und einem *reverse*-Primer nach Tabelle 2.5 amplifiziert. Das zweite Fragment wurde mit pYES L1a NotI_rev (Tabelle 2.4) und einem *forward*-Primer nach Tabelle 2.5 amplifiziert. Beide Mutagenese-Primer führen dieselbe Sequenzänderung in die PCR-Produkte ein, wodurch diese außerdem ein kurzes überlappendes Segment gleicher Sequenz enthalten. Im zweiten Schritt werden diese überlappenden Regionen als *priming*-Stellen zur Amplifikation des Gesamtgens genutzt, wobei ein Fragment jeweils dem anderen Fragment als Matrize dient.

Zur Amplifikation des mutierten Gens wurden ein Standard-Reaktionsansatz mit Phusion® high-fidelity DNA Polymerase (2.5.4) und das in Tabelle 2.14 beschriebene Temperatur-Programm gewählt.

PCR-Produkte der erwarteten Größe wurden aus dem Gel extrahiert, mit FD KpnI und FD NotI geschnitten (2.5.7.2) und in linearisierten pYES2-Vektor ligiert. Die

Material und Methoden

Einführung der Mutation in das Zielgen wurde durch Sequenzierung des entsprechenden Bereiches bestätigt.

Tabelle 2.14 PCR-Programm für die zielgerichtete Mutagenese mittels oePCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	98°C	30 sec	1
Denaturierung	98°C	30 sec	
Annealing	50°C	30 sec	20-35
Elongation	72°C	60 sec	
Finale Elongation	72°C	120 sec	1
Lagerung	10°C	Unbegrenzt	1

2.5.9.2 Mutagenese nach QuikChange-Protokoll

Für die zielgerichtete Mutagenese mittels QuikChange-Protokoll wurden Primer entsprechend der Spezifikationen des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits von Stratagene erstellt. Tabelle 2.5 enthält die in dieser Arbeit verwendeten Primer und verdeutlicht die integrierten Basenaustausche, die für die Punktmutation von *MdLOX1a* erforderlich waren.

Für die Erstellung der Mutanten mussten die PCR-Bedingungen des Protokolls geringfügig angepasst werden: Pro einzuführende Mutation wurden je zwei Reaktionsansätze entsprechend der Spezifikationen für Phusion® high-fidelity DNA Polymerase (Tabelle 2.9) vorbereitet. Als Matrize dienten 50 ng DNA des pYES2-Expressionskonstrukts von *MdLOX1a*, welche mit je 125 ng des *forward*- oder *reverse*-Primers ergänzt wurden. Die Einführung der Punktmutationen erfolgte dann in zwei separaten Schritten unter den in Tabelle 2.15 dargestellten Bedingungen. Zunächst wurde in einer PCR mit 15 Zyklen jeweils ein Strang des Matrizen-Vektors amplifiziert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze mit *forward*- und *reverse*-Primer vereinigt, noch einmal 1 U Phusion Polymerase ergänzt und in einer weiteren PCR mit 20 Zyklen beide DNA-Stränge des Vektors vervielfältigt.

Der Erfolg der Amplifikation wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.5.5.2) überprüft, das PCR-Produkt aufgereinigt (2.5.6) und entsprechend der Angaben des QuikChange-Protokolls weiterbearbeitet. Die Einführung der Mutation in das Zielgen wurde durch Sequenzierung des entsprechenden Bereiches bestätigt.

Material und Methoden

Fe²⁺-Stocklösung	10 µM	FeCl ₂
Fe³⁺-Stocklösung	10 µM	FeCl ₃ × 6H ₂ O

2.6.3 His-Tag-Affinitätschromatografie

Die partielle Aufreinigung von rekombinantem LOX-Protein aus Rohprotein-Extrakten erfolgte mittels „Immobilisierte Metallionen“-Affinitätschromatografie (IMAC). Der N-terminal an das LOX-Protein fusionierte 6x His-Tag bindet reversibel an die am Resin chelatisierten Nickel-Ionen. Durch Zugabe von Imidazol wird gebundenes Protein anschließend kompetitiv von der Matrix verdrängt und eluiert.

Rohprotein-Extrakt aus 200 mL Kulturvolumen wurde auf eine Säule mit Profinity™ IMAC Ni-charged Resin (Bio-Rad Laboratories) geladen und für 2 Stunden bei 8°C invertiert. Anschließend wurde ungebundenes Protein durch zweimaliges Waschen mit 5 mL His Wash/Bind-Puffer entfernt. Die Elution gebundener Proteine erfolgte durch wiederholte Inkubation mit 600 µL His Elution-Puffer. Fraktionen mit messbarem Protein-Gehalt (2.6.4) wurden vereinigt und zur Entfernung der hohen Konzentration störenden Imidazols über Nacht gegen 50 mM Natriumphosphat-Puffer (NaPi), pH 7,5 dialysiert. Partiiell gereinigtes Protein wurde anschließend durch Ultrafiltration aufkonzentriert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

0,1 M NaPi, pH 7,5	80,95 mM	Na ₂ HPO ₄
	19,05 mM	NaH ₂ PO ₄
His Wash/Bind-Puffer	50 mM	NaPi, pH 7,5
	300 mM	NaCl
	30 mM	Imidazol
His Elution-Puffer	50 mM	NaPi, pH 7,5
	300 mM	NaCl
	500 mM	Imidazol

2.6.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Konzentration von Rohprotein-Extrakten und partiell gereinigtem, rekombinanten Protein erfolgte nach dem Protokoll von Bradford (1976). Dazu wurden 100 µL verdünnte Protein-Lösung mit 1 mL Bradford-Lösung vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Nullwert dienten 100 µL des

Puffers, in dem das Protein verdünnt wurde. Der Protein-Gehalt der Lösung konnte dann photometrisch durch Veränderung der Absorption bei 595 nm erfasst werden. Zur Quantifizierung wurde eine Standardkurve mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt.

Bradford-Lösung	0,01% (w/v)	CBB G250
nach Bradford (1976)	5% (v/v)	EtOH
	10% (v/v)	H ₃ PO ₄

2.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Trennung von Proteinen zur Visualisierung und Analyse durch Immunodetektion erfolgte mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli (1970). Dazu wurde ein Polyacrylamid-Gel bestehend aus 5% Sammelgel und 10% Trenngel entsprechend Tabelle 2.16 hergestellt.

Tabelle 2.16 Zusammensetzung von Sammelgel und Trenngel für die SDS-PAGE. Angegeben sind die Endkonzentrationen aller eingesetzten Detergenzien

5% Sammelgel		10% Trenngel	
5% (w/v)	Acrylamid	10% (w/v)	Acrylamid
125 µM	TRIS, pH 6,8	380 µM	TRIS, pH 8,8
0,1% (w/v)	SDS	0,1% (w/v)	SDS
0,1% (w/v)	APS	0,1% (w/v)	APS
0,001% (v/v)	TEMED	0,0004% (v/v)	TEMED

Protein-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1x Roti®-Load 1 (Carl Roth) versetzt und zur Denaturierung für 10 min bei 95°C inkubiert. Als Größenstandard dienten 10 µL PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder. Proteine wurden in 1x Ober-Puffer bei 160 V, 400 mA gelelektrophoretisch getrennt, bevor sie durch selektive Färbung mit kolloidalem Coomassie visualisiert werden konnten (Kang *et al.*, 2002). Dazu wurde das Gel aus der Laufkammer entfernt und für mindestens 16 Stunden in Färbelösung inkubiert. Etwaig erforderliches Entfärben des Gels erfolgte mit bidest. Wasser.

TRIS-Stocklösung (pH 6,8)	1 M	TRIS
		pH 6,8

Material und Methoden

TRIS-Stocklösung (pH 8,8)	1,5 M	TRIS pH 8,8
APS-Stocklösung	10% (w/v)	APS
10x Ober-Puffer	250 mM	TRIS
nach Lämmli (1970)	1,92 M	Glyzin
	34,67 mM	SDS
Färbelösung	0,02% (w/v)	CBB G250
nach Kang <i>et al.</i> (2002)	5% (w/v)	Al ₂ (SO ₄) ₃ × 16H ₂ O
	10% (v/v)	EtOH
	2,5% (v/v)	H ₃ PO ₄

2.6.6 Western Blot von rekombinantem *Malus* LOX-Protein

Für die Immunodetektion rekombinanter Proteine mittels spezifischer Antikörper mussten diese zunächst an einer Matrix fixiert werden. Dazu wurden Protein-Proben mittels SDS-PAGE (2.6.5) aufgetrennt und anschließend auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF-)-Membran (Carl Roth) übertragen.

Die Membran wurde zunächst für einige Minuten mit Ethanol aktiviert und anschließend zusammen mit dem Polyacrylamid-Gel in Semidry Blotting-Puffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte bei 15 V (400 mA) für 60 min. Anschließend wurde die Membran für 60 min in Blocking-Puffer inkubiert, mehrmals mit Washing-Puffer gespült und erst dann für die Immunodetektion (2.6.6.1; 2.6.6.2) eingesetzt.

Semidry Blotting-Puffer	25 mM	TRIS
	200 mM	Glyzin
	20% (v/v)	MeOH
Blocking-Puffer	20 mM	TRIS
	140 mM	NaCl
	5% (w/v)	Milchpulver
	0,1% (v/v)	Tween 20
Washing-Puffer	20 mM	TRIS
	140 mM	NaCl
	0,1% (v/v)	Tween 20

2.6.6.1 Immunodetektion mit Anti-Lipoxygenase-Antikörper

Die spezifische Detektion von LOX in Rohprotein-Extrakten oder partiell gereinigtem Protein aus Bakterien und Hefen erfolgte mit Anti-Lipoxygenase (Anti-LOX)-Antikörper (Agrisera). Dabei handelte es sich um einen polyklonal in Kaninchen produzierten Antikörper gegen eine Lipoxygenase der Sojabohne.

Die Bindung des primären Antikörpers erfolgte durch 1-stündige Inkubation der PVDF-Membran in Blocking-Puffer mit 1:2000 verdünnten Anti-LOX-Antikörper. Die Membran wurde anschließend gründlich mit Washing-Puffer gespült und dann für 1 Stunde in Blocking-Puffer mit 1:4000 verdünnten sekundären Anti-rabbit IgG-Antikörper (Agrisera) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Washing-Puffer wurde die Detektion durch Äquilibrieren in Detection-Puffer und anschließende Zugabe von 50 μ L NBT-Lösung und 25 μ L BCIP-Lösung gestartet. Die Reaktion wurde durch Spülen mit bidest. Wasser gestoppt.

Detection-Puffer	100 mM	TRIS
	100 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
NBT-Lösung	5% (w/v)	NBT in 70% DMF
BCIP-Lösung	5% (w/v)	BCIP

2.6.6.2 Immunodetektion mit Anti-6x His tag[®]-Antikörper

Da die Detektion mit Anti-LOX-Antikörper auf Proteine mit hoher Homologie zu dem für die Immunisierung eingesetzten Antigen limitiert ist, wurde weiterhin eine spezifische Detektion des N-terminal an das Zielprotein fusionierten 6x His-Tags angestrebt. Der dazu eingesetzte Anti-6x His tag[®]-(Anti-His)-Antikörper wurde monoklonal in Maus produziert und ist bereits an die Alkalische Phosphatase (AP) konjugiert.

Die Bindung des Antikörpers erfolgte durch 1-stündige Inkubation der PVDF-Membran in Blocking-Puffer mit 1:3000 verdünnten Anti-His-Antikörper. Nach gründlichem Spülen mit Washing-Puffer konnte die Detektion durch Äquilibrieren in Detection-Puffer und anschließende Zugabe von 50 μ L NBT-Lösung und 25 μ L

Material und Methoden

BCIP-Lösung direkt gestartet werden. Die Reaktion wurde anschließend durch Spülen mit bidest. Wasser gestoppt.

2.6.7 *In vitro* Nachweis von Lipoxygenase-Aktivität

2.6.7.1 Enzymtest für die photometrische Aktivitätsbestimmung

Der Standard-Reaktionsansatz für die photometrische Messung der Lipoxygenase-Aktivität bestand aus 120 μL 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,5) mit 0,2-2 μg partiell gereinigtem LOX-Protein. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,25 mM Substrat gestartet. Die Bildung von Fettsäure-Hydroperoxiden konnte anschließend durch die kontinuierliche Zunahme der Absorption bei 234 nm verfolgt werden.

Stocklösungen der Substrate Linolsäure (LA), α -Linolensäure (LnA) und Arachidonsäure (AA) wurden in verschiedenen Konzentrationen in Ethanol hergestellt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.6.7.2 Enzymtest für die chromatografische Produktidentifizierung

Der Standard-Reaktionsansatz für die Identifizierung der Lipoxygenase-Produkte bestand aus 500 μL 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,5) mit 0,5-5 μg partiell gereinigtem LOX-Protein. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,3 mM Substrat gestartet und dann bei 25°C und 600 rpm für 60 min fortgesetzt.

Die Reaktionsprodukte wurden mit 1 Vol. Dichlormethan extrahiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 14.200 rpm (4°C) wurde die organische Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 400 nMol Triphenylphosphin (TPP) vermischt. Die Reduktion der Hydroperoxide erfolgte in den nächsten 30 min Inkubation bei -20°C . Danach wurde der Reaktionsansatz bis zum vollständigen Verdampfen des Lösungsmittels eingengt und in 100 μL Laufmittel für die chromatografische Analyse rückgelöst.

Alle Versuche wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. Als Kontrolle diente ein mit Wasser versetzter Reaktionsansatz, der unter den gleichen Bedingungen inkubiert wurde.

TPP-Lösung

0,1% (w/v) TPP

2.6.8 Bestimmung des pH und Temperaturoptimums

Die Bestimmung der Temperatur- und pH-Optima rekombinanter Lipoxygenasen erfolgte wie unter Abschnitt 2.7.1.1 beschrieben. Der Standard-Reaktionsansatz für die chromatografische Analyse wurde mit 0,3 mM Linolsäure versetzt und unter den in Abschnitt 2.6.7.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Zur Bestimmung der pH-Optima wurden die folgenden Puffer mit schrittweiser Erhöhung um 0,5 pH-Einheiten hergestellt: 50 mM Natriumcitrat-Puffer (pH 3-6), 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 6-8) und 50 mM TRIS-HCl-Puffer (pH 8-10). Die Reaktion erfolgte dann in einem der angegebenen Puffer mit einem pH im Bereich von 3-10 und 25°C.

Die Bestimmung des Temperatur-Optimums erfolgte in 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0) in einem Temperaturbereich von 5-55°C mit schrittweiser Erhöhung um 5°C.

2.6.9 Ermittlung der kinetischen Parameter von *Malus* Lipoxygenasen

Die Aktivität rekombinanter Lipoxygenasen wurde über einen Bereich verschiedener Konzentrationen von LA und LnA mit einem Spektrophotometer (2.6.7.1) gemessen. Die Messung für LOX1:Md:1a und die Mutante G567A erfolgte in 50 mM Natriumcitrat-Puffer (pH 6,0) und 2,5 bis 100 µM Substrat bei 45°C. Die Messung für LOX1:Md:1c erfolgte ebenso bei 45°C aber in 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,5). Alle Reaktionen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die Umsatzrate von Fettsäure-Substraten wurde als Änderung der Absorption bei 234 nm erfasst und mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten $23.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in $\mu\text{Mol min}^{-1}$ pro Milligramm partiell gereinigtem Protein umgerechnet. Eine Einheit (U) an LOX-Aktivität wurde dabei als die Enzymmenge definiert, welche die Bildung von 1 µMol Hydroperoxid pro Minute katalysiert. Die berechneten Daten wurden mit der Michaelis-Menten-Gleichung ausgewertet und mittels Lineweaver-Burk-Auftragung überprüft.

2.7 Analytische Methoden

2.7.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatografie

2.7.1.1 Quantifizierung der LOX-Aktivität mittels RP-HPLC

Die quantitative Messung des Gesamtprodukts spezifischer LOX-Aktivität erfolgte mit RP-HPLC/UV an einer Jasco HPLC (2.2.1) mit Detektion der Absorption bei 234 nm. Als Laufmittel diente eine Mischung aus A) Wasser mit 0,1% (v/v) Ameisensäure und B) Methanol mit 0,1% (v/v) Ameisensäure. Pro Probe wurden 5-20 µL injiziert und bei einem Fluss von 0,2 mL/min auf einer Luna® 3u C18(2)-Säule (Phenomenex) aufgetrennt. Dazu wurde der folgende Gradient eingesetzt:

0-15 min	70% A/ 30% B auf 100% B
15-22 min	100% B
22-25 min	100% B auf 70% A/ 30% B
25-35 min	70% A/ 30% B

2.7.1.2 Bestimmung der Regioselektivität von *Malus* LOX mittels NP-HPLC

Die Bestimmung der Regioselektivität der Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch Lipoxygenasen erfolgte mittels NP-HPLC/UV an einer Knauer HPLC (2.2.1) mit Detektion der Absorption bei 234 nm. Als Laufmittel diente eine Mischung aus n-Hexan, Isopropanol und Ameisensäure im Verhältnis 100:2:0,1. Pro Probe wurden 30-100 µL injiziert und bei einem Fluss von 2 mL/min isokratisch auf einer LiChrospher® 100 Diol-Säule (Merck) getrennt. Fraktionen der Hydroxyfettsäuren wurden aufgefangen und für eine chirale Untersuchung der Produkte (2.7.1.3) eingesetzt.

2.7.1.3 Bestimmung der Stereoselektivität von *Malus* LOX mittels CP-HPLC

Die Analyse der Stereochemie von Hydroxyfettsäuren erfolgte mit CP-HPLC/UV an einer Knauer HPLC (2.2.1) mit Detektion der Absorption bei 234 nm. Fraktionen aus der NP-HPLC wurden aufgefangen, das Lösungsmittel vollständig verdampft und Produkte in 100 µL Laufmittel resuspendiert. Als Laufmittel diente eine Mischung aus n-Hexan, Ethanol und Essigsäure im Verhältnis 95:5:0,02. Je Probe wurden 30-100 µL injiziert und bei einem Fluss von 0,75 mL/min isokratisch auf einer ChiralPak® IA-Säule (Altmann Analytik) getrennt.

2.7.2 Identifizierung der Reaktions-Produkte mittels LC-UV/ESI-MSⁿ

Die LC-UV/ESI-MSⁿ-Analyse zur Identifizierung der Hydroperoxid-Produkte erfolgte mit einem modifizierten Protokoll nach Huang *et al.* (2010). Die analytische Auftrennung der Proben erfolgte wie unter 2.7.1.1 beschrieben. Im Anschluss an die HPLC von Agilent befand sich der UV-Detektor, der die Bildung von Hydroperoxiden bei 234 nm aufzeichnete, und das Massenspektrometer Esquire 3000 plus (Bruker Daltonics). Für das Massenspektrometer wurden folgende Einstellungen gewählt:

Spraygas	Stickstoff (30,0 psi)
Trockengas	Stickstoff (330°C, 9 L/min)
Scanbereich	<i>m/z</i> 50-800
Polarität	positiv/negativ alternierend
ICC Target	20000 oder 200 ms
Ionisierungsspannung	± 4000 V
Endplattenspannung	± 500 V
MS/MS	Auto-tandem MS ²
Kollisionsgas	Helium 5.0 (3,56 × 10 ⁶ mbar)
Kollisionsspannung	1,0 V

Einstellungen Ionenfalle :

Skimmer	± 40,0 V
Cap Exit	± 121 V
Oct 1 DC	± 12,0 V
Oct 2 DC	± 1,7 V
Trap Drive	49,4
Oct RF	112,2 V
Lens 1	± 5,0 V
Lens 2	± 60,0 V

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung putativer Lipoxygenasen des Kulturapfels

3.1.1 Bestandsaufnahme der Lipoxygenase-Genfamilie des Apfels

Die funktionelle Analyse pflanzlicher Lipoxygenasen stellt noch immer eine enorme Herausforderung für die Wissenschaft dar. Einer der Gründe dafür ist, dass sie in sogenannten Multigen-Familien vorkommen und damit eine Vielzahl hoch homologer Isozyme für die Beteiligung an bestimmten physiologischen Prozessen zur Verfügung stehen. Die Anzahl der Gene kann abhängig vom Organismus stark variieren und reicht beispielsweise von sechs Genen in *Arabidopsis thaliana* bis zu den 14 bislang bekannten Isoformen der Kartoffel (Liavonchanka & Feussner, 2006).

Die Lipoxygenase-Genfamilie des Kulturapfels wurde erst vor Kurzem umfangreich bioinformatisch analysiert: Vogt *et al.* (2013b) identifizierten 23 potenziell funktionelle LOX-Gene im Genom von *Malus × domestica* cv. Golden Delicious. Die relativ hohe Zahl von Genen ist vermutlich die Folge einer Kombination von Prozessen, wie der Tandem-Duplikation einzelner Chromosomen-Bereiche und der entwicklungs-geschichtlich erst kürzlich eingetretenen genomweiten Verdopplung (Velasco *et al.*, 2010). Dafür spricht auch, dass sich alle potenziellen LOX-Gene anhand von Sequenzhomologien einer von insgesamt sieben Gen-Gruppen zuordnen lassen (Abbildung 3.1). Lediglich *MdLOX9a* weicht in seiner Sequenz so stark ab, dass es nicht mit ähnlichen Genen gruppiert werden konnte (Vogt *et al.*, 2013b).

Eine phylogenetische Analyse der Genfamilie ergab, dass die 23 identifizierten Gene in zwei Teilbäume entfallen. Diese Einteilung spiegelt gleichzeitig deren Klassifikation gemäß den Vorgaben von Shibata *et al.* (1994) wider. Die Mitglieder der Gruppen MdLOX1, MdLOX3 und MdLOX7 gruppieren in einem Baum und wurden als *Typ 1-LOX* klassifiziert. Die Mitglieder der Gruppen MdLOX2, MdLOX5, MdLOX6 und MdLOX8 besitzen ein putatives Chloroplasten-Targeting-Peptid und werden daher zu den *Typ 2-LOX* gezählt (Vogt *et al.*, 2013b).

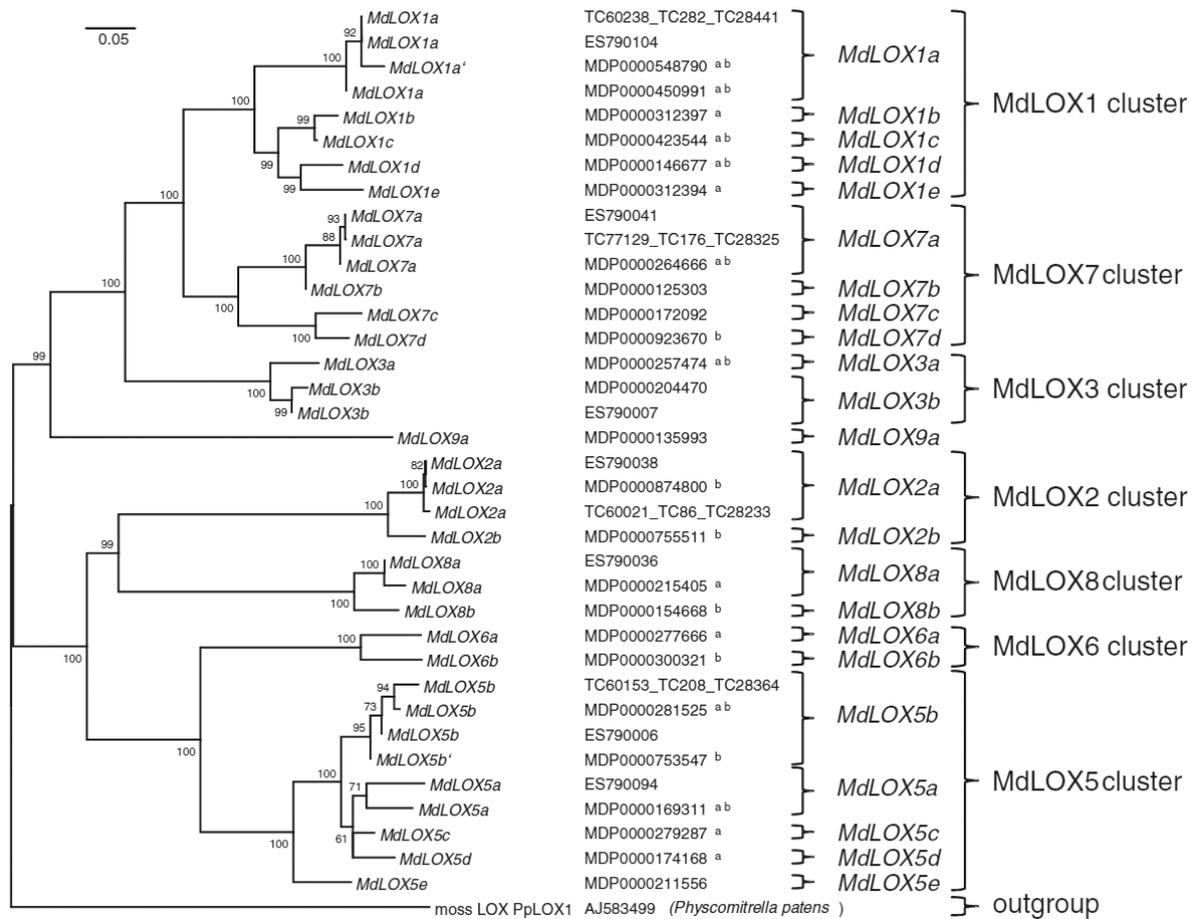


Abbildung 3.1 Phylogenetischer Baum der Lipoxygenase-Genfamilie von *Malus x domestica*. Für die Erstellung des Baumes wurden *in silico* berechnete LOX-kodierende Sequenzen („*Malus x domestica* predicted LOX protein“, MDP) aus dem Genom des Kulturapfels verwendet. Die 23 identifizierten Lipoxygenase-Gene entfallen anhand von Sequenzhomologien in zwei Teilbäume. Entsprechend der Klassifikation von Shibata *et al.* (1994) wurden alle Gene der Gruppen MdLOX1, MdLOX3 und MdLOX7, sowie *MdLOX9a* als *Typ 1*-LOX klassifiziert. Die Gene der Gruppen MdLOX2, MdLOX5, MdLOX6 und MdLOX8 gehören zu den *Typ 2*-LOX (übernommen von Vogt *et al.*, 2013b).

Über die physiologischen Funktionen einzelner Lipoxygenase-Gene im Kulturapfel ist bislang noch nichts bekannt. Erste Untersuchungen zu den Expressions-Profilen von 14 Lipoxygenase-Genen in den Sorten Golden Delicious und McIntosh zeigten, dass zumindest acht Gene während der Fruchtreife exprimiert sind (Vogt *et al.*, 2013b). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Contreras & Beaudry (2013b), die sechs hochgradig exprimierte Gene mit Reife-abhängigen Expressions-Profilen identifizierten. Mit dem Ziel der funktionellen Charakterisierung von Kandidaten mit Bedeutung für die Aroma-Synthese, sollten potenzielle Lipoxygenase-Gene ausgehend von mRNA aus der Frucht kloniert und in *E. coli* heterolog exprimiert werden.

Ergebnisse

Die Oligonukleotide für die Amplifikation potenzieller Kandidaten-Gene wurden anhand von LOX-kodierenden Sequenzen aus der 'Malus domestica Genome V1.0'-Datenbank (MDP-Akzessionen in Abbildung 3.1) erstellt. Die von Vogt *et al.* (2013b) beschriebenen Sequenzen wurden mit Hilfe der Geneious-Software nochmals auf Vollständigkeit des offenen Leserasters (ORF) und Anwesenheit aller funktionellen Motive überprüft. Dazu gehören die N-terminal gelegene PLAT (Polycystin-1, Lipoxygenase, Alpha-Toxin)-Domäne mit der LOX-typischen β -Fass-Struktur, das aktive Zentrum bestehend aus 38 hochgradig konservierten Aminosäuren, die Substratbindestelle und das konservierte C-terminale Motiv, welches eine der Eisenbindenden Aminosäuren beinhaltet. Insgesamt entsprachen 17 Gene diesen Anforderungen und wurden für die Erstellung von Primern herangezogen (Tabelle 2.2). Von den Genen *MdLOX3b*, *MdLOX5c*, *MdLOX5d* und *MdLOX7b* wurden lediglich Teilsequenzen⁶ beschrieben, die für ein C- oder N-terminal verkürztes Protein kodieren. Die *in silico* ermittelten ORFs von *MdLOX1e* (MDP0000312394) und *MdLOX5e* (MDP0000211556) kodierten dagegen nicht für funktionell aktive Lipoxygenasen. Die bioinformatische Analyse beider Sequenzen ergab das teilweise oder vollständige Fehlen des aktiven Zentrums. MDP0000211556 kodierte darüber hinaus weder für eine Substratbindestelle noch für das Stopp-Codon unmittelbar stromabwärts von dem konservierten C-terminalen Motiv. Auch eine manuelle Evaluation der genomischen Sequenz von Golden Delicious erbrachte keine vollständigen ORFs für die sechs genannten Gene, so dass sie in die nachfolgenden Untersuchungen nicht einbezogen worden.

3.1.2 Amplifikation putativer Lipoxygenase-Gene

Die Amplifikation potenzieller Lipoxygenasen erfolgte von cDNA reifer Früchte der Sorte Golden Delicious. Dazu wurde die RNA mittels CTAB-Extraktion isoliert und anschließend durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (Kapitel 2.5.2.2 und 2.5.3). Da sowohl die Genexpression als auch die messbare LOX-Aktivität in der Fruchtschale höher ist als im Fruchtfleisch (Feys *et al.*, 1980; Defilippi *et al.*, 2005; Schaffer *et al.*, 2007), erfolgte die RNA-Isolation dabei gezielt aus der Schale reifer Äpfel.

⁶ gemeint sind MDP0000204470, MDP0000279287, MDP0000174168 und MDP0000125303

Um eine möglichst spezifische Vervielfältigung der Gene zu gewährleisten, erfolgte die Amplifikation ausgehend von den weniger konservierten 5'- und 3'-Nicht-kodierenden Bereichen direkt stromauf- und stromabwärts der ermittelten ORF-Sequenzen (Tabelle 2.2). Die verwendeten Oligonukleotide wurden mit Hilfe der OligoAnalyzer-Software erstellt. Ihre Funktionalität wurde durch PCR mit genomischer DNA von Golden Delicious bestätigt und die verwendeten Reaktionsbedingungen gegebenenfalls angepasst.

Tabelle 3.1 Übersicht der klonierten Lipoxygenase-Gene des Kulturapfels. Die Sequenzen der Gene wurden in der GenBank-Datenbank unter den hier angegebenen Akzessionen hinterlegt. Die offenen Leseraster einzelner LOX-Gene wurden zum Teil nachannotiert und müssen daher nicht mit den Größen der MDP-Sequenzen aus der 'M. domestica Genome V1.0'-Datenbank übereinstimmen.

Gen	MDP-Akzession	GenBank Akzession	ORF-Größe (in bp)	Putatives Protein (in AS)
<i>MdLOX1a</i>	MDP0000450991	KC706480	2592	863
<i>MdLOX1c</i>	MDP0000423544	KC706481	2589	862
<i>MdLOX2a</i>	MDP0000874800	KC706483 KC706484	2721	906
<i>MdLOX2b</i>	MDP0000755511	KC706485	2718	905
<i>MdLOX5b</i>	MDP0000753547	KC706490 KC706491	2745	914
<i>MdLOX6a</i>	MDP0000277666	KC706492	2820	939
<i>MdLOX7a</i>	MDP000264666	KC706495	2607	868
<i>MdLOX8b</i>	MDP0000154668	KC706498	2763	920

Insgesamt ließen sich acht potenzielle Lipoxygenase-Gene von der cDNA aus der Fruchtschale klonieren (Tabelle 3.1). Spezifisch amplifizierte Gene wurden für die weitere Untersuchung in den pGEM®-T Easy-Vektor kloniert (Kapitel 2.5.7.1). Von jedem Gen wurden drei Klone ausgewählt und sequenziert. Dabei wurden für *MdLOX2a* und *MdLOX5b* je zwei Sequenzen mit variablen Positionen identifiziert. Die zugehörigen Sequenzen wurden in der GenBank-Datenbank unter den in Tabelle 3.1 dargestellten Akzessionen abgelegt.

3.1.3 *In silico*-Analyse putativer Lipoxygenasen des Apfels

Die bioinformatische Sequenzanalyse der klonierten LOX-Gene offenbarte eine Reihe variabler Sequenz-Positionen (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*). Dazu wurden die in der GenBank-Datenbank hinterlegten Sequenzen mit der genomischen Sequenz aus der 'M. domestica Genome V1.0'-Datenbank verglichen. Mit

Ergebnisse

Ausnahme einiger weniger Punktmutationen ließen sich die meisten variablen Positionen mit der Heterozygotie des Apfel-Genoms erklären (Anhang XIII, Tabelle 4.1). Die restlichen SNPs betreffen zumeist den schwach konservierten N-Terminus der Proteine (Anhang XIV, Abbildung 4.5) und gehen vermutlich auf die natürliche Variabilität zwischen der sequenzierten Sorte (Velasco *et al.*, 2010) und dem in dieser Arbeit untersuchten Typus zurück. Lediglich in den Sequenzen KC706480 (*MdLOX1a*), KC706484 (*MdLOX2a*) und KC706490 (*MdLOX5b*) befinden sich Punktmutationen, die auch zu einer veränderten Aminosäure-Zusammensetzung der resultierenden Proteine führen. Diese SNPs betreffen jedoch keine Positionen mit potenzieller Bedeutung für die enzymatische Aktivität von Lipoxygenasen.

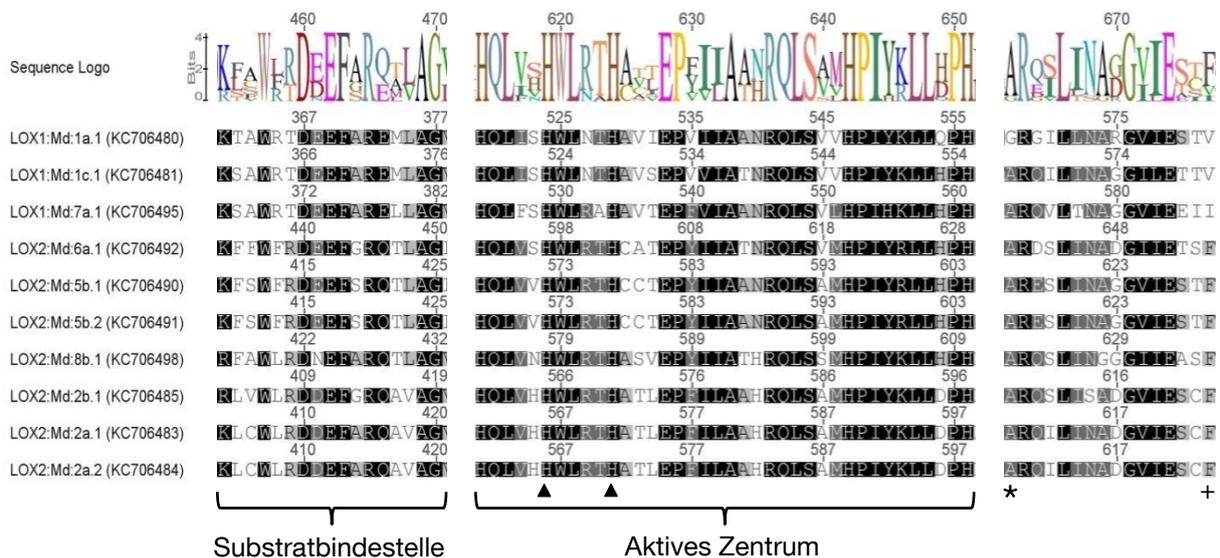


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung der Protein-Primärstruktur der klonierten LOX-Gene. Auszug eines *Multiple Sequence Alignments* (MSA) der hergeleiteten Protein-Sequenzen für die in der GenBank-Datenbank hinterlegten Sequenzen (Anhang XIV, Abbildung 4.5). Dargestellt sind die funktionellen Motive von Lipoxygenasen, darunter die Substrat-Bindestelle, das aktive Zentrum und Positionen mit Bedeutung für die Regio- und Stereospezifität (* Coffa-Position, + Sloane-Position). Aminosäuren, die an der Koordinierung des Eisen-Kofaktors beteiligt sind, wurden mit einem Dreieck gekennzeichnet.

Die Translation der GenBank-Einträge ergab putative Proteine von 862 bis 939 Aminosäuren (AS) Länge (Tabelle 3.1). Abbildung 3.2 verdeutlicht den hohen Konservierungsgrad in der Protein-Primärstruktur der klonierten LOX-Gene. Die Proteine wurden entsprechend der von Vogt *et al.* (2013b) eingeführten Nomenklatur benannt. Der vollständige Name gibt dementsprechend deren Einordnung als *Typ 1-/Typ 2-LOX*, den entstammenden Organismus und die Bezeichnung des Gens wieder. Ein Vergleich der Protein-Primärstruktur zeigte, dass die potenziellen *Typ 1-*

LOX *MdLOX1a* und *MdLOX1c* für das 9-LOX typische TV-Motiv in der Sloane-Position kodieren (Abbildung 3.2), welche in Zusammenhang mit der Regiospezifität von Lipoxygenasen steht (Sloane *et al.*, 1995; Hornung *et al.*, 1999). Während LOX1:Md:7a an dieser Stelle zwei für LOX untypische Isoleucin-Reste besitzt. Die untersuchten *Typ 2*-LOX tragen dagegen die raumfordernderen AS-Reste Cystein/Serin/Threonin und Phenylalanin, welche wiederum oft in Enzymen mit 13-LOX-Aktivität vorkommen. Darüber hinaus wird die LOX-Stereospezifität von einem hoch konservierten AS-Rest in der Coffa-Position beeinflusst (Coffa & Brash, 2004). Alle untersuchten Lipoxygenasen tragen dort einen Alanin-Rest (Abbildung 3.2), was entweder auf 9(*S*)- oder 13(*S*)-LOX-Aktivität hindeutet. Lediglich LOX1:Md:1a besitzt den Glycin-Rest (G567), der in Zusammenhang mit dualer Regiospezifität und (*R*)-LOX-Aktivität steht (Coffa *et al.*, 2005a; Boeglin *et al.*, 2008).

3.2 Heterologe Expression in *Escherichia coli*

Für die heterologe Expression in *E. coli* wurden sieben LOX-Kandidatengene (*MdLOX1a*, *MdLOX1c*, *MdLOX2a*, *MdLOX2b*, *MdLOX5b*, *MdLOX7a* und *MdLOX8b*) in den bakteriellen Expressionsvektor pRSET B (Anhang XII, Abbildung 4.3) umkloniert. Amplifiziertes und geschnittenes PCR-Produkt wurde *in-frame* hinter das Vektor-kodierte Start-Codon und die nachfolgende kurze Sequenz für ein N-terminales Fusionspeptid ligiert. Bei erfolgreicher Expression sollte so ein rekombinantes Protein mit N-terminal fusioniertem Poly-Histidin-Tag (6x His), einer Transkript-stabilisierenden Sequenz (Xpress™ Epitop) von Phage T7 und einer Enterokinase-Schnittstelle zur späteren Entfernung des Tags entstehen. Verlängerungen am N-Terminus von LOX-Proteinen werden in der Regel toleriert und sind bereits mehrfach in der Literatur beschrieben worden (Feussner *et al.*, 1998; Hughes *et al.*, 2001a). Die Fusion mit einem 6x His-Tag diente vor allem der späteren Aufreinigung des heterolog exprimierten Proteins mittels Affinitätschromatografie (IMAC).

Ein exemplarischer Vergleich des Codon-Vorkommens in *MdLOX1a* mit dem in *E. coli* K12-Stämmen ergab deutliche Unterschiede in der Verwendung einiger Codons der Aminosäuren Alanin, Arginin und Glycin (Anhang XIX, Abbildung 4.6). In der Regel korreliert die Häufigkeit der Verwendung eines Codons mit der Häufigkeit der tRNA, die das entsprechende Anti-Codon trägt. Stimmen Codon-Vorkommen

Ergebnisse

zwischen Gen und Wirtstamm nicht überein, sinkt die Translationsrate. Die Expression rekombinanten LOX-Proteins erfolgte daher in Zellen des Stammes *E. coli* Rosetta™(DE3)pLysS, welcher die tRNAs für sechs zusätzliche Codons liefert und damit eine bessere Expression heterologen Proteins ermöglicht. Protein-Rohextrakte und partiell gereinigtes Protein aus Stämmen mit heterolog exprimierten LOX1:Md:1a, LOX1:Md:1c, LOX2:Md:2a, LOX2:Md:2b, LOX2:Md:5b, LOX1:Md:7a und LOX2:Md:8b wurden in enzymatischen Tests mit Linolsäure auf Lipoxygenase-Aktivität getestet. Die Bildung von Hydroperoxyoctadecadiensäure (HpODE) wurde photometrisch durch die Zunahme der Absorption bei 234 nm verfolgt. Abgesehen von einer stets beobachtbaren geringfügigen Autooxidation der Linolsäure (Porter *et al.*, 1995) war in keiner der untersuchten Proben enzymatische Umsetzung messbar.

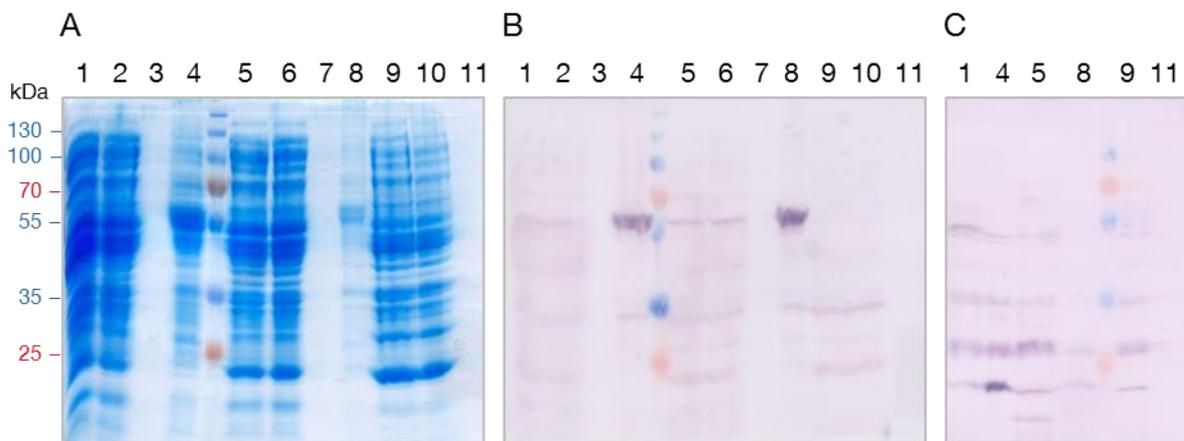


Abbildung 3.3 SDS-PAGE (A) und Immunodetektion mit Anti-His- (B) und Anti-LOX-Antikörper (C) von rekombinatem LOX1:Md:1a und LOX2:Md:8b. Aufgetragen wurde ein definiertes Volumen (10 μ L) von Proben, die während der IMAC-Aufreinigung von heterolog exprimierten LOX1:Md:1a (1-4) und LOX2:Md:8b (5-8) aus bakteriellen Rohprotein-Extrakten genommen wurden. Als Kontrolle wurde Rohprotein mit dem pRSET B-Leervektor (9-11) mitgeführt. Bei den Proben handelt es sich um Rohprotein-Extrakt (1, 5, 9), Durchfluss (2, 6, 10), Wasch-Fraktion (3, 7) und Elutions-Fraktion (4, 8, 11). Bei erfolgreicher Expression wurden Proteine mit den Größen 101,7 kDa (LOX1:Md:1a) und 107,4 kDa (LOX2:Md:8b) erwartet.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunodetektion mit spezifischem Anti-LOX- beziehungsweise Anti-His-Antikörper sollten Aufschluss über den Erfolg der Expression liefern: Proben der IMAC-Aufreinigung von rekombinanten LOX1:Md:1a und LOX2:Md:8b wurden exemplarisch mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 3.3, A). Allerdings konnte in keiner der Proben eine spezifische Aufreinigung rekombinanten Proteins der erwarteten Größen von 101,7 kDa (LOX1:Md:1a) und 107,4 kDa (LOX2:Md:8b) nachgewiesen werden. Die Immunodetektion mit

spezifischen Antikörpern lieferte ebenso keinen Nachweis der Expression, stattdessen wurden Banden für unspezifisch gebundenes Protein detektiert (Abbildung 3.3, B und C).

3.3 Heterologe Expression in *Saccharomyces cerevisiae*

Da in der Arbeitsgruppe bereits Erfahrungen mit der heterologen Expression von Lipoxygenasen in *S. cerevisiae* bestanden (Huang *et al.*, 2010), wurde daraufhin die Expression in Hefe angestrebt. Dazu mussten die LOX-Kandidatengene zunächst in den Expressionsvektor pYES2 (Anhang XII, Abbildung 4.4) kloniert werden. pYES2 ermöglicht die induzierbare Expression von Proteinen unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors, kodiert aber nicht für N- oder C-terminale Tags zur Protein-Aufreinigung. Um die Aktivität heterolog exprimierten Proteins von vorhandener Hefe-eigener LOX-Aktivität (Bisakowski *et al.*, 1995) zu unterscheiden, war eine Aufreinigung aus Rohprotein-Extrakt jedoch essentiell.

Dazu wurden die Sequenzen der His-Fusionsproteine von *MdLOX1a*, *MdLOX1c*, *MdLOX2a*, *MdLOX2b*, *MdLOX7a* und *MdLOX8b* mit spezifischen Primern (Tabelle 2.4) von den zuvor erstellten pRSET B-Vektoren amplifiziert und gerichtet in die Multiple Klonierungsstelle von pYES2 kloniert. Das Fusionsprotein von *MdLOX5b* ließ sich auf diese Weise nicht klonieren, da das für die Klonierung verwendete Restriktionsenzym KpnI auch im Gen schneidet. Die Gene *MdLOX5b* und *MdLOX6a* sollten daher mit Primern, die für einen N-terminal an das Gen fusionierten 6xHis-Tag kodieren, von den pGEM-T-Vektoren amplifiziert werden.

Sieben Lipoxygenase-Gene wurden erfolgreich in den pYES2-Vektor kloniert. Die heterologe Expression erfolgte dann in Zellen des Stammes *S. cerevisiae* INVSc1. Um den Verlauf der Expression zu verfolgen, wurden an mehreren Zeitpunkten der Kultivierung Proben entnommen. Protein-Extrakte dieser Proben wurden durch SDS-PAGE und Immunodetektion mit spezifischen Anti-LOX- beziehungsweise Anti-His-Antikörper auf Anwesenheit des Fusionsproteins untersucht.

Der Erfolg der Expression konnte für sechs der untersuchten Apfel-Lipoxygenasen durch Immunodetektion mit Anti-His-Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 3.4). Rekombinantes Protein von LOX1:Md:1a, LOX1:Md:1c und LOX2:Md:2b wurde bereits 4 Stunden nach Induktion detektiert, erreichte nach 8 Stunden ein Maximum

Ergebnisse

und blieb danach konstant. LOX2:Md:2a, LOX1:Md:7a und LOX2:Md:8b waren erst 24 Stunden nach Induktion im Rohprotein-Extrakt der Hefen detektierbar. Lediglich die Expression von LOX2:Md:6a konnte auch nach 24 Stunden Kultivierung nicht nachgewiesen werden. Bei Immunodetektion mit polyklonalem Anti-LOX-Antikörper konnte rekombinantes Protein von LOX1:Md:1a, LOX1:Md:7a und LOX2:Md:8b nachgewiesen werden (Anhang XXI, Abbildung 4.8). Eine spezifische Detektion von LOX2:Md:2a und LOX2:Md:2b war dagegen nicht möglich.

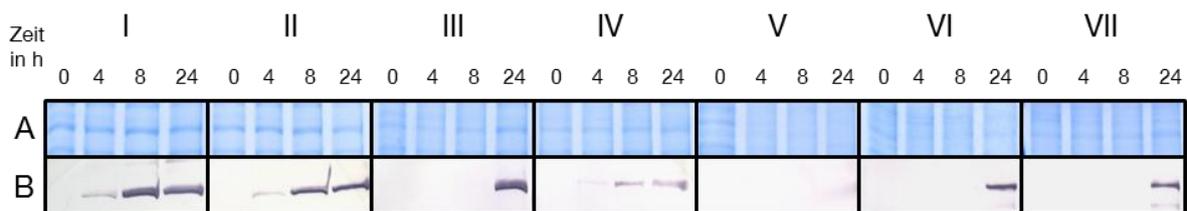


Abbildung 3.4 Heterologe Expression von rekombinatem LOX-Fusionsprotein zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion mit Galaktose. Proben wurden 0, 4, 8 und 24 Stunden nach Induktion der Expression genommen. SDS-PAGE (A) mit Rohprotein-Extrakt zeigte keine Zunahme heterolog exprimierten Proteins. Erst durch Immunodetektion mit Anti-His-Antikörper (B) ließ sich die Expression von LOX1:Md:1a (I), LOX1:Md:1c (II), LOX2:Md:2a (III), LOX2:Md:2b (IV), LOX1:Md:7a (VI) und LOX2:Md:8b (VII) nachweisen. Lediglich für LOX2:Md:6a (V) war kein rekombinantes Protein detektierbar (vollständige Abbildungen in Anhang XX, Abbildung 4.7).

Rohprotein-Extrakte von Stämmen mit heterolog exprimierten LOX wurden in enzymatischen Tests mit Linolsäure auf Lipoxygenase-Aktivität getestet. Für vier Kandidaten konnte photometrisch die Bildung von HpODE nachgewiesen werden. Dagegen war in Reaktionen mit rekombinatem LOX1:Md:7a und LOX2:Md:8b, abgesehen von einer geringfügigen Autooxidation des Substrates, keine signifikante Bildung von Hydroperoxiden zu verzeichnen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Versuchen mit α -Linolensäure und Arachidonsäure erlangt.

Aufgrund des *in vitro* gezeigten Umsatzes mehrfach ungesättigter Fettsäuren wurde rekombinantes LOX1:Md:1a-, LOX1:Md:1c-, LOX2:Md:2a- und LOX2:Md:2b-Protein biochemisch charakterisiert. Dafür wurde das LOX-Protein zunächst partiell aus dem Rohprotein-Extrakt gereinigt (Anhang XXI, Abbildung 4.9).

3.4 Biochemische Charakterisierung putativer Lipoxygenasen des Apfels

Mit dem Ziel der Identifizierung von Lipoxygenasen mit Funktionen während der Fruchtreife und potenzieller Beteiligung an der Bildung von Aromastoffen wurden die

vier katalytisch aktiven Kandidaten biochemisch charakterisiert. Die Gene *MdLOX1a* und *MdLOX1c* gehören zu der MdLOX1-Gruppe, die *in silico* als *Typ 1-9-LOX* klassifiziert wurden. *MdLOX2a* und *MdLOX2b* werden zu den *Typ 2-13-LOX* gezählt. Sowohl 9- als auch 13-Hydroperoxide können über den HPL-Weg in flüchtige Aromastoffe umgewandelt werden. An der Ausbildung des Apfel-Aromas ist jedoch besonders die 13-LOX-Aktivität durch die Bereitstellung von Vorläufern für flüchtige C₆-Verbindungen beteiligt (Tressl *et al.*, 1970).

3.4.1 Substratscreening

Rekombinantes LOX-Protein wurde mit den drei natürlich vorkommenden Substraten Linolsäure (LA), α -Linolensäure (LnA) und Arachidonsäure (AA) getestet. Spezifisch gebildete Hydroperoxide wurden zu Hydroxiden reduziert und mittels NP-HPLC chromatografisch getrennt. Authentischer HPLC-Standard diente dabei der Identifizierung der Fettsäure-Hydroxide. Die entstandenen Reaktionsprodukte wurden fraktioniert und einer LC-UV/ESI-MSⁿ-Analyse unterzogen. Die gemessenen Massenspektren wurden schließlich mit Daten von Referenzsubstanzen aus dem „LIPID MAPS Lipidomics Gateway“ verglichen.

3.4.1.1 Enzymatischer Umsatz von Linolsäure

Die chromatografische Untersuchung der Hydroxy-Fettsäuren ergab, dass drei der getesteten Apfel-LOX (LOX1:Md:1a, LOX2:Md:2a und LOX2:Md:2b) 13-HpODE aus LA bilden können (Abbildung 3.5, A). Während aber LOX2:Md:2b Linolsäure spezifisch zu dem 13-Hydroperoxid (94% des Gesamtprodukts; Tabelle 3.2, Seite 65) umsetzte, bildeten LOX1:Md:1a und LOX2:Md:2a 13- und 9-HpODE in einem Verhältnis von 8:1. LOX1:Md:1c produzierte ausschließlich 9-HpODE und besaß damit die höchste Spezifität der untersuchten LOX-Enzyme.

Die *in silico* vorhergesagte Klassifikation der Lipoxygenasen konnte biochemisch für *MdLOX1c* (9-LOX) und *MdLOX2b* (13-LOX) bestätigt werden. *MdLOX1a* und *MdLOX2a* wurden auf Grund ihrer niedrigen Produkt-Verhältnisse entsprechend der Vorgaben von Casey *et al.* (1999) als 13/9-LOX mit dualer Regiospezifität neu klassifiziert.

Ergebnisse

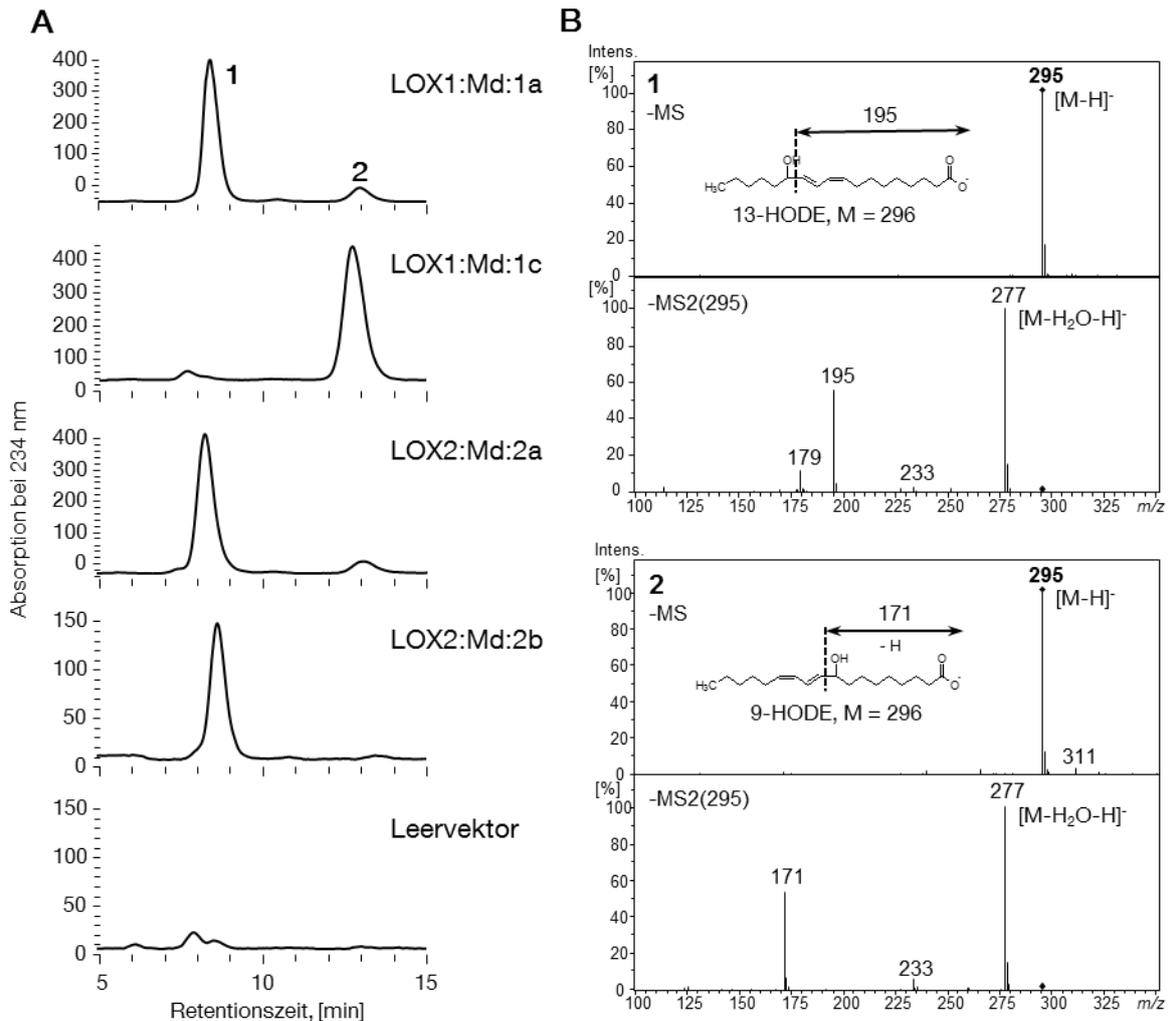


Abbildung 3.5 Identifizierung der Reaktionsprodukte aus spezifischer LOX-Reaktion mit Linolsäure nach chemischer Reduktion. **(A)** Fettsäure-Hydroxide wurden mittels NP-HPLC chromatografisch getrennt. Die Aufzeichnung der Absorption bei 234 nm zeigte die Bildung von zwei Produkten mit Retentionszeiten von 8,5 min (1) und 13,0 min (2). Die Produkte wurden durch Koelution mit authentischem Standard als 13-HODE (1) und 9-HODE (2) identifiziert. **(B)** Eine LC-MSⁿ-Analyse der fraktionierten Produkte bestätigte, dass die Massenspektren mit den für 13-HODE (m/z 295 \rightarrow 195, negative Ionenspur) und 9-HODE (m/z 295 \rightarrow 171, negative Ionenspur) erwarteten Fragmenten übereinstimmen.

3.4.1.2 Enzymatischer Umsatz von α -Linolensäure

Ähnlich wie bei der Reaktion mit Linolsäure bildeten LOX1:Md:1a, LOX2:Md:2a und LOX2:Md:2b auch aus α -Linolensäure hauptsächlich 13-Hydroperoxyoctadecatriensäure (HpOTE), während LOX1:Md:1c spezifisch 9-HpOTE produzierte (Abbildung 3.6). Im Vergleich zu Linolsäure reagierte LOX1:Md:1c mit LnA jedoch weniger spezifisch. Das Hydroperoxid-Produkt von LOX2:Md:2b mit LnA bestand

dagegen zu 97% aus 13-HpOTE (Anhang XXII, Tabelle 4.2). Damit war LOX2:Md:2b das Enzym mit der höchsten Regiospezifität bei der Oxidation von α -Linolensäure.

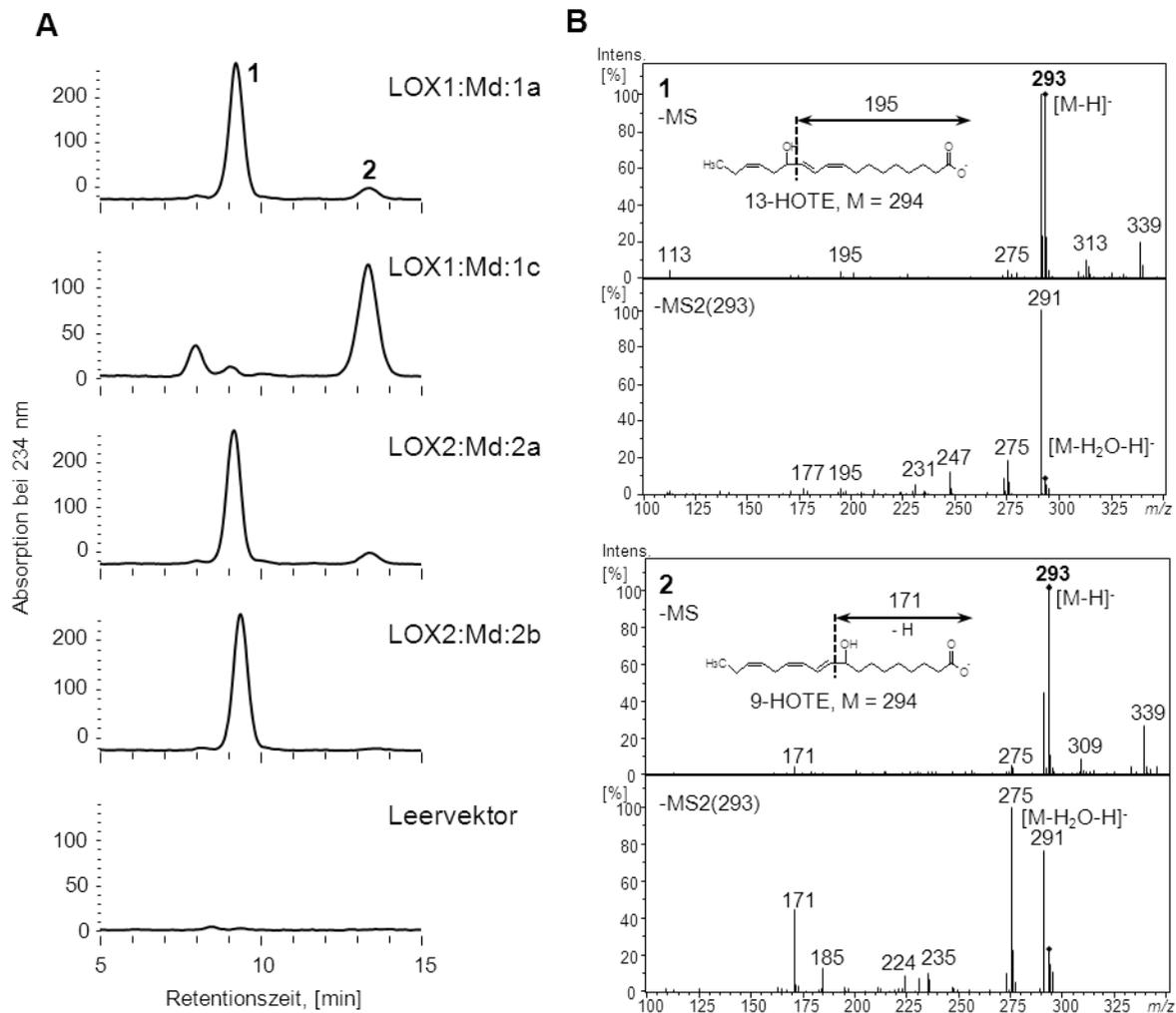


Abbildung 3.6 Identifizierung der Reaktionsprodukte aus spezifischer LOX-Reaktion mit α -Linolensäure nach chemischer Reduktion. (A) Fettsäure-Hydroxide wurden mittels NP-HPLC chromatografisch getrennt. Die Aufzeichnung der Absorption bei 234 nm zeigte die Bildung von zwei Hauptprodukten mit Retentionszeiten von 9,1 min (1) und 13,3 min (2). Die Produkte wurden durch Koelution mit selbst produziertem Standard als 13-HOTE (1) und 9-HOTE (2) identifiziert. (B) Eine LC-MSⁿ-Analyse der Produkt-Fractionen bestätigte, dass die Massenspektren mit den für 13-HOTE (m/z 293 \rightarrow 195, negative Ionenspur) und 9-HOTE (m/z 293 \rightarrow 171, negative Ionenspur) erwarteten Fragmenten übereinstimmen.

3.4.1.3 Enzymatischer Umsatz von Arachidonsäure

Ähnlich wie viele andere pflanzliche Lipoxygenasen setzten die LOX des Apfels Arachidonsäure nur schwach um. Dennoch waren alle getesteten Enzyme zur Bildung von Hydroperoxyeicosatetraensäure (HpETE) fähig (Abbildung 3.7). Im Gegensatz zu den getesteten C₁₈-Fettsäuren kann molekularer Sauerstoff in AA an

Ergebnisse

insgesamt sechs Positionen spezifisch in das Kohlenstoffrückgrat eingeführt werden (Schneider *et al.*, 2007), sodass für die meisten Apfel-LOX ein Gemisch aus 15-, 12-, 11-, 9-, 8- und 5-HpETE-Produkten detektiert wurde (Anhang XXII, Tabelle 4.2).

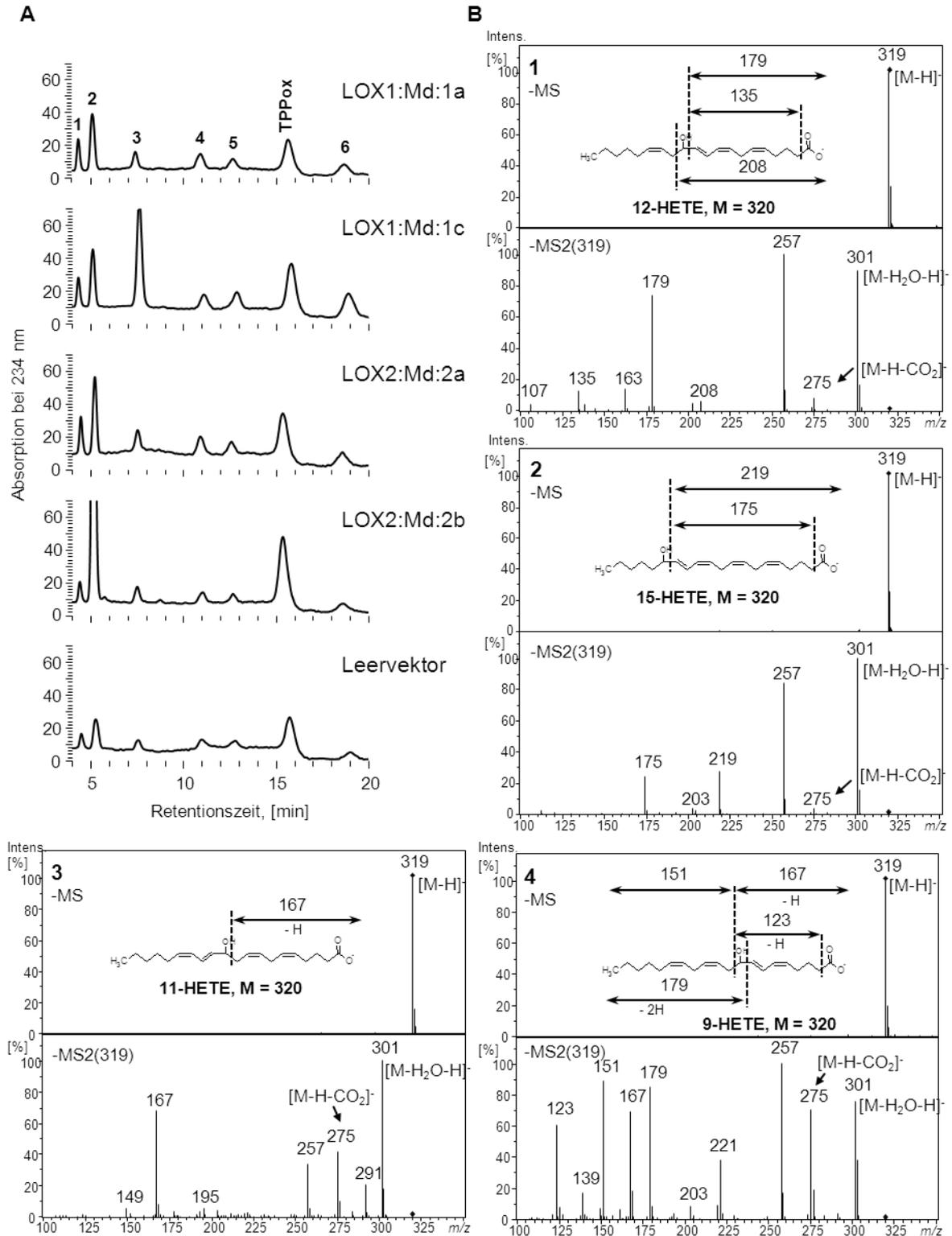


Abbildung 3.7 Fortsetzung auf Seite 64

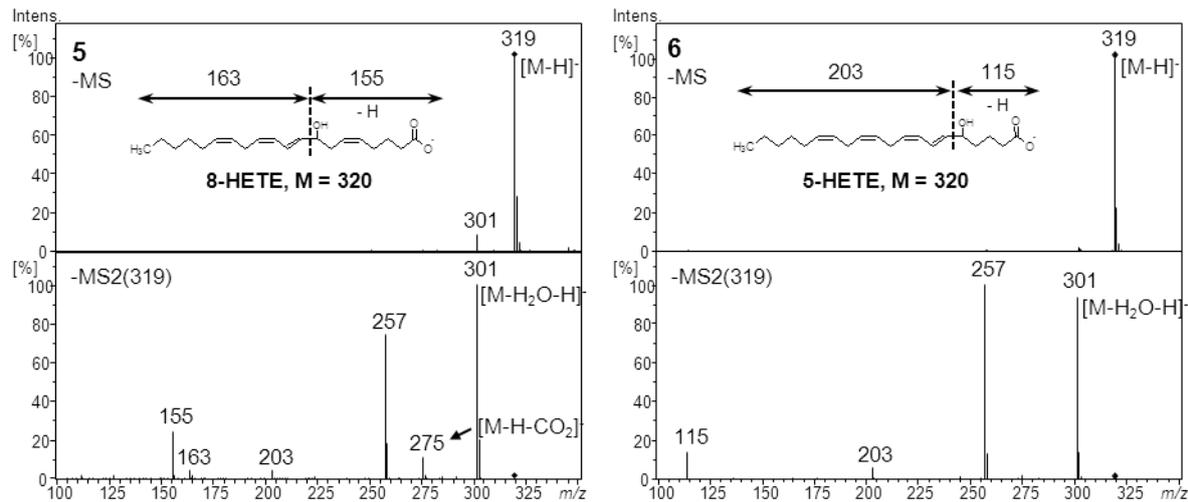


Abbildung 3.7 Identifizierung der Reaktionsprodukte aus spezifischer LOX-Reaktion mit Arachidonsäure nach chemischer Reduktion. (A) Fettsäure-Hydroxide wurden mittels NP-HPLC chromatografisch getrennt. Die Aufzeichnung der Absorption bei 234 nm zeigte die Bildung von sechs Produkten mit Retentionszeiten von 4,3 min (1), 5,1 min (2), 7,5 min (3), 11,0 min (4), 12,8 min (5) und 18,8 min (6). Drei Produkte wurden durch Koelution mit authentischem Standard als 12-HETE (1), 15-HETE (2) und 5-HETE (6) identifiziert. Ein weiteres Produkt mit Absorption bei 234 nm war das oxidierte Reduktionsmittel Triphenylphosphinoxid (TPPOx, Anhang XXII, Abbildung 4.10). (B) Eine LC-MSⁿ-Analyse der fraktionierten Produkte bestätigte, dass deren Massenspektren mit den erwarteten Massen von 12-HETE (m/z 319 → 179, negative Ionenspur), 15-HETE (m/z 319 → 219 + 175, negative Ionenspur) und 5-HETE (m/z 319 → 115, negative Ionenspur) übereinstimmen. Bei den Produkten 3, 4 und 5 handelt es sich vermutlich um 11-HETE (m/z 319 → 167, negative Ionenspur), 9-HETE (m/z 319 → 179 + 151, negative Ionenspur) und 8-HETE (m/z 319 → 155, negative Ionenspur).

LOX2:Md:2b zeigte die höchste Produkt-Spezifität, indem es ausschließlich 15-HpETE bildete. LOX1:Md:1a und LOX2:Md:2a produzierten vergleichsweise hohe Mengen von 15-HpETE (42-45% des Gesamtprodukts), aber auch 12-HpETE (16-17%), 9-HpETE (12-16%) und geringe Mengen von 11-, 8- und 5-HpETE. Während die Hauptprodukte von LOX1:Md:1c 11-HpETE (53%) und 5-HpETE (18%) waren.

3.4.2 Untersuchung der Enantioselektivität der LOX-Reaktion

Fraktionen der 9- und 13-Hydroxy-Fettsäuren aus Kapitel 3.4.1.1 wurden gesammelt und mittels CP-HPLC auf die Enantioselektivität der Apfel-Lipoxygenasen untersucht. Wie *in silico* vorhergesagt, befanden sich die Hauptprodukte der Reaktion von LOX1:Md:1c und LOX2:Md:2b mit LA in (*S*)-Konfiguration (Abbildung 3.8). Die geringen Mengen des jeweiligen alternativen Regioisomers bestanden dagegen aus einem racemischen Gemisch beider Enantiomere, was auf eine unspezifische Bildung hindeutet (Tabelle 3.2).

Ergebnisse

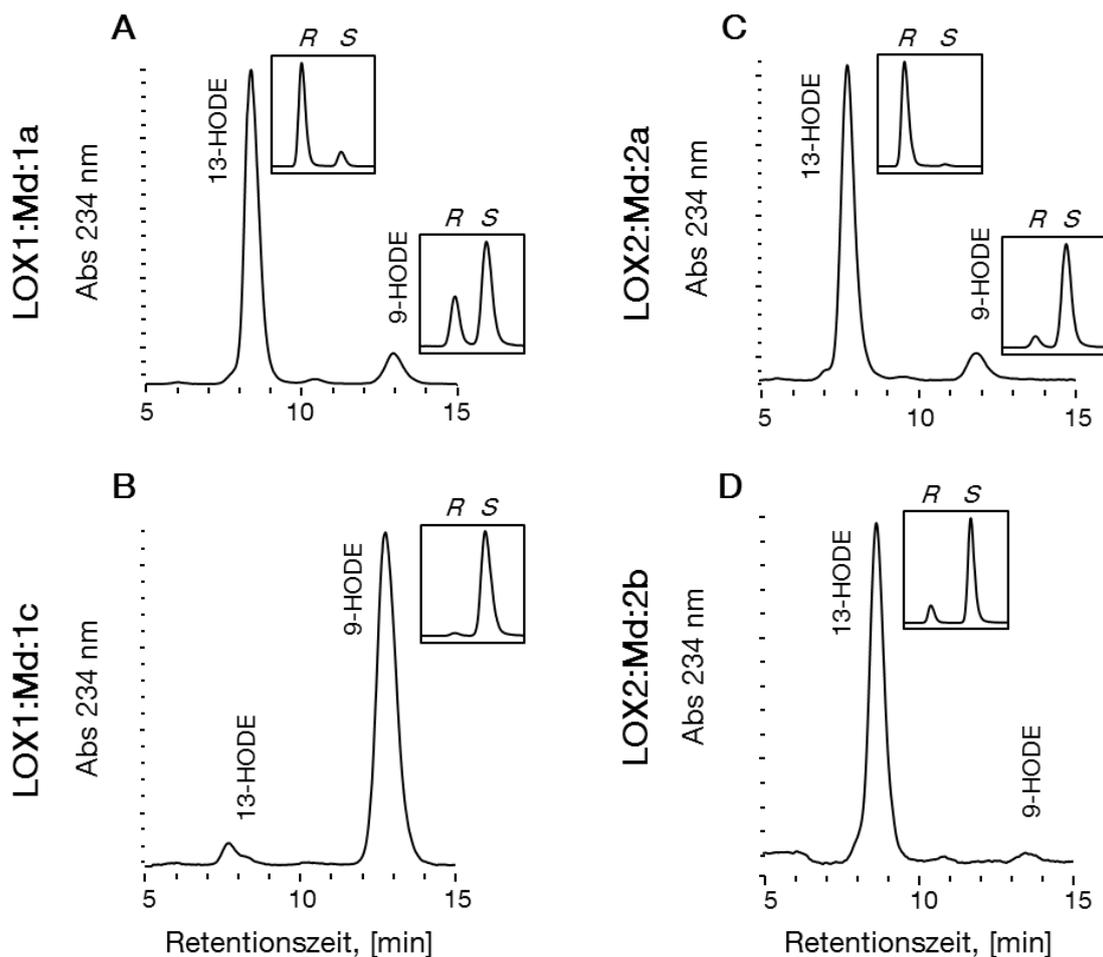


Abbildung 3.8 HPLC-Analyse der Reaktionsprodukte von Lipoxygenasen des Kulturapfels mit Linolsäure. Enzymatisch geformte HpODE wurde zunächst zu HODE reduziert und mittels NP-HPLC und Messung der Absorption (Abs) bei 234 nm untersucht. Das Verhältnis von (*R*)- und (*S*)-Enantiomeren der jeweiligen HODE wurde mit CP-HPLC ermittelt (**Kasten**). Untersucht wurden die Produkt-Profile von rekombinanten LOX1:Md:1a (**A**), LOX1:Md:1c (**B**), LOX2:Md:2a (**C**) und LOX2:Md:2b (**D**).

Tabelle 3.2 Verteilung der Hydro(pero)xy-Produkte nach der Reaktion rekombinanter Apfel-LOX mit Linolsäure. Die Anteile von H(p)ODE sind als Prozent der gesamten Produkt-Ausbeute aus spezifischer LOX-Aktivität mit LA bei pH 7,0 und 25°C angegeben.

Enzym	9-H(p)ODE (in %)		13-H(p)ODE (in %)	
LOX1:Md:1a	11,2		88,8	
LOX1:Md:1c	99,5		0,5	
LOX2:Md:2a	12,4		87,6	
LOX2:Md:2b	6,0		94,0	
	Chirale Analyse (in %)			
	9(<i>R</i>)-	9(<i>S</i>)-	13(<i>R</i>)-	13(<i>S</i>)-
LOX1:Md:1a	3,3	7,9	77,1	11,7
LOX1:Md:1c	2,3	97,2	0,3	0,2
LOX2:Md:2a	1,1	11,3	85,8	1,8
LOX2:Md:2b	3,0	3,0	12,8	81,2

Interessanterweise wiesen beide dual spezifischen Enzyme LOX1:Md:1a und LOX2:Md:2a (*R*)-LOX-Aktivität auf und produzierten hauptsächlich 13(*R*)-HpODE. Während LOX2:Md:2a jedoch spezifisch 13(*R*)- und 9(*S*)-HpODE bildete, katalysierte LOX1:Md:1a zudem auch die Bildung von 13(*S*)- und 9(*R*)-HpODE (11,7% und 3,3% des gesamten Hydroperoxid-Produkts, Tabelle 3.2).

3.4.3 Einfluss von Temperatur und pH auf die enzymatische Aktivität

Die Spezifität der Fettsäure-Dioxygenierung durch LOX ist in hohem Maße von externen Faktoren wie Substrat-Konzentration, pH und Sauerstoff-Zufuhr abhängig. Der Einfluss von pH und Temperatur auf die Regiospezifität der LOX-Reaktion mit Linolsäure wurde exemplarisch für die vier katalytisch aktiven Lipoxygenasen des Apfels untersucht. Gleichzeitig wurden die Temperatur- und pH-Optima der Enzyme ermittelt.

Für die Bestimmung des Temperatur-Optimums wurde die LOX-Aktivität mit Linolsäure in einem Bereich von 5°C bis 55°C aufgezeichnet. Beide Mitglieder der MdLOX1-Gruppe zeigten höchste Enzymaktivität bei 45°C (Abbildung 3.9, A und B). Rekombinantes LOX1:Md:1a-Protein besaß ein eher schmales Optimum bei 45°C mit stark abfallenden Umsatzraten bei höheren oder niedrigeren Temperaturen. Dafür zeigte es noch vergleichbar hohe Aktivität bei 55°C (~54%). LOX1:Md:1c zeigte hohe katalytische Aktivität (> 60%) in einem breiten Temperaturbereich von 15°C bis 50°C, aber stark abfallende Umsatzraten bei Temperaturen über 50°C. Im Gegensatz dazu wiesen LOX2:Md:2a und LOX2:Md:2b niedrigere Temperatur-Optima von 35°C und 25°C auf (Abbildung 3.9, C und D). Beide Enzyme zeigten nur äußerst geringen Substratumsatz bei Temperaturen über 45°C. Dafür besaß LOX2:Md:2b *in vitro* auch bei 5°C noch 60% seiner maximalen Aktivität mit LA.

Ergebnisse

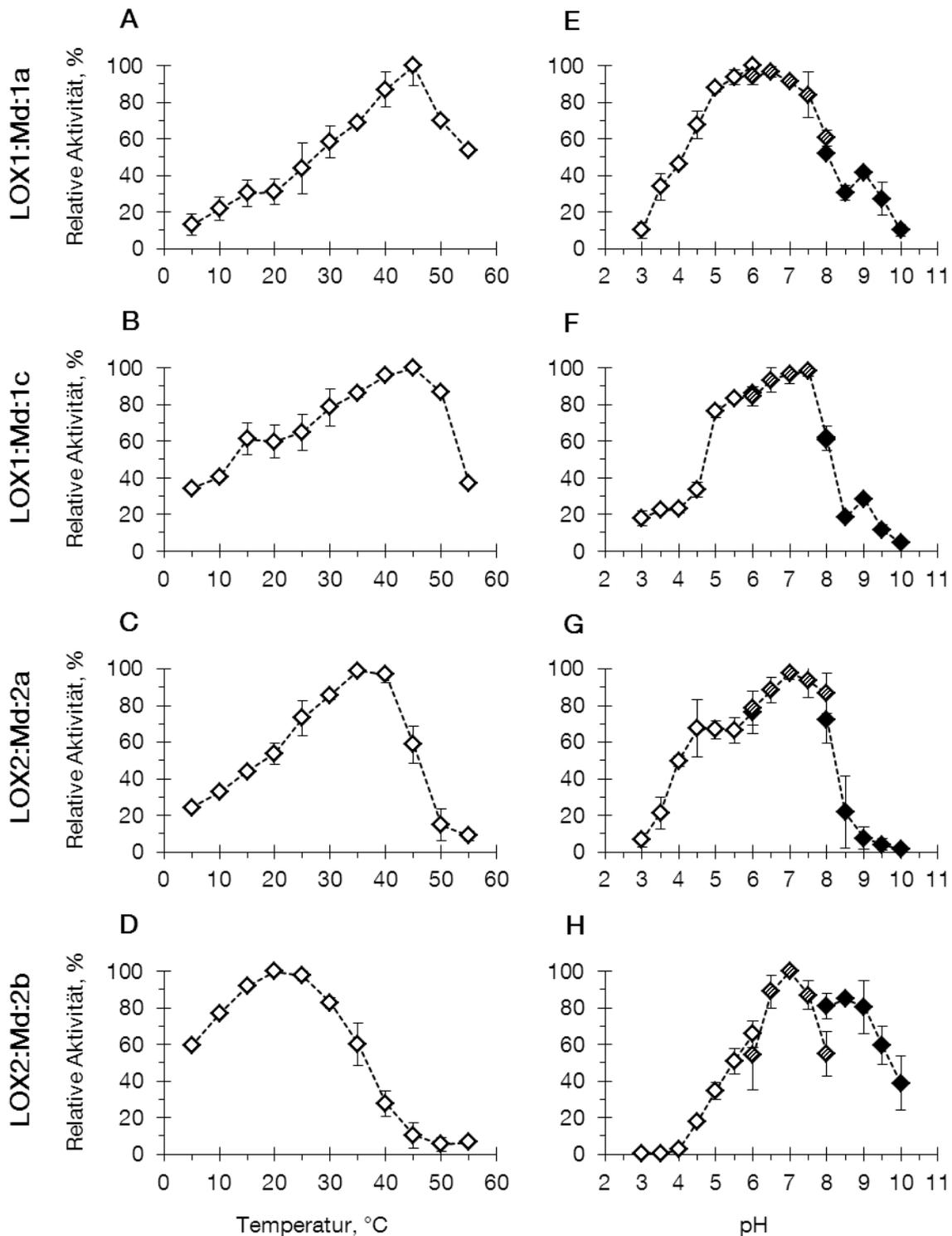


Abbildung 3.9 Auswirkungen von Temperatur und pH auf die enzymatische Aktivität von Lipoxygenasen des Kulturapfels. Aktivitätsraten von rekombinantem LOX1:Md:1a (A, E), LOX1:Md:1c (B, F), LOX2:Md:2a (C, G) und LOX2:Md:2b (D, H) mit Linolsäure wurden chromatografisch bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten bestimmt. Die optimale Reaktionstemperatur wurde bei pH 7 zwischen 5 und 55°C ermittelt (A-D). Die Bestimmung des pH-Optimums erfolgte bei 25°C in einem pH-Bereich von 3 bis 10 (E-H). Dafür fanden die folgenden Puffer Anwendung: Natriumcitrat-Puffer (pH 3-6, **weiße Rauten**), Natriumphosphat-Puffer (pH 6-8, **schraffierte Rauten**) und TRIS-HCl-Puffer (pH 8-10, **schwarze Rauten**).

Ergebnisse

Die Regiospezifität der LOX-Enzyme änderte sich in dem untersuchten Temperaturbereich nur geringfügig (Tabelle 3.3). LOX1:Md:1a wies die höchste Spezifität bei niedrigen Temperaturen um 20°C auf. Mit steigender Temperatur wurde mehr 9-HpODE gebildet; Das Hauptprodukt der Reaktion blieb jedoch 13-HpODE. Die Produkt-Verhältnisse von LOX1:Md:1c und LOX2:Md:2a unterlagen leichten Schwankungen, wiesen allerdings keinen klaren Trend auf.

Tabelle 3.3 Verteilung der Hydro(pero)xy-Produkte aus der spezifischen Reaktion von Apfel-LOX mit Linolsäure in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Regiospezifität rekombinanter LOX1:Md:1a, LOX1:Md:1c und LOX2:Md:2a bei verschiedenen Temperaturen wurde mittels NP-HPLC analysiert. LOX2:Md:2b konnte auf Grund von sehr niedrigem Substratumsatz in diesem Versuch nicht getestet (*ng*) werden. H(p)ODE-Anteile sind als Prozent der Gesamt-Ausbeute an spezifischem Produkt der LOX-Reaktion nach chemischer Reduktion angegeben.

	H(p)ODE (in %)									
	9- 13- 10°C		9- 13- 20°C		9- 13- 30°C		9- 13- 40°C		9- 13- 50°C	
LOX1:Md:1a	9,7	90,3	9,2	90,8	11,2	88,8	12,1	87,9	14,1	85,9
LOX1:Md:1c	99,2	0,8	98,1	1,9	99,0	1,0	99,3	0,7	100,0	0,0
LOX2:Md:2a	9,1	90,9	11,5	88,5	10,5	89,5	11,9	88,1	11,2	88,8
LOX2:Md:2b	<i>ng</i>	<i>ng</i>								

Für die Bestimmung des optimalen pH wurden die Reaktionen in einem pH-Bereich von 3,0 bis 10,0 bei 25°C durchgeführt. Alle vier untersuchten Lipoxygenasen zeigten höchste Enzymaktivität bei pH-Werten nahe 7,0 (Abbildung 3.9, E-H). Die Mitglieder der MdLOX1-Gruppe besaßen pH-Optima von 6,0 (LOX1:Md:1a) und 7,5 (LOX1:Md:1c). Beide Enzyme wiesen hohe enzymatische Aktivität (> 80%) in einem breiten pH-Bereich mit stark abfallenden Aktivitätsraten bei pH-Werten unter 5,0 und über 7,5 auf. Die Mitglieder der MdLOX2-Gruppe hatten ein pH-Optimum von 7,0. Beide Enzyme zeigten moderate Aktivität (> 60%) in pH-Bereichen von 4,5 bis 8,0 (LOX2:Md:2a) und 6,0 bis 9,5 (LOX2:Md:2b), aber nur einen relativ engen Bereich mit hoher Aktivität nahe pH 7,0.

Der pH-Wert hatte einen deutlichen Einfluss auf die Regiospezifität der Apfel-LOX (Tabelle 3.4). Im getesteten pH-Bereich war für alle Enzyme eine Zunahme an Spezifität bei steigenden pH-Werten zu erkennen. Dies beruht aber nicht allein auf einer Zunahme der enzymatisch katalysierten Synthese von Hydroperoxiden (im Vergleich zur unspezifischen Bildung durch Autooxidation). Von den untersuchten Enzymen zeigten LOX1:Md:1a, LOX1:Md:1c und LOX2:Md:2a einen starken Abfall

Ergebnisse

an Aktivität bei pH-Werten über 7,5 (Abbildung 3.9), was mit einer Zunahme an Regiospezifität einherging.

Tabelle 3.4 Verteilung der Hydro(pero)xy-Produkte aus der spezifischen Reaktion von Apfel-LOX mit Linolsäure in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Regiospezifität rekombinanter LOX1:Md:1a, LOX1:Md:1c, LOX2:Md:2a und LOX2:Md:2b bei verschiedenen pH-Werten wurde mittels NP-HPLC analysiert. H(p)ODE-Anteile sind als Prozent der Gesamt-Ausbeute an spezifischem Produkt der LOX-Reaktion nach chemischer Reduktion angegeben.

	H(p)ODE (in %)									
	9- 13- pH 4,0		9- 13- pH 5,0		9- 13- pH 6,0		9- 13- pH 7,0		9- 13- pH 8,0	
LOX1:Md:1a	14,3	85,7	12,9	87,1	11,2	88,8	11,2	88,8	10,9	89,1
LOX1:Md:1c	98,2	1,8	98,9	1,1	99,0	1,0	99,6	0,4	99,9	0,1
	pH 5,0		pH 6,0		pH 7,0		pH 8,0		pH 9,0	
LOX2:Md:2a	14,2	85,8	14,6	85,4	11,6	88,4	8,2	91,8	8,5	91,5
LOX2:Md:2b	10,0	90,0	8,9	91,1	4,9	95,1	4,1	95,9	1,9	98,1

3.5 Zielgerichtete Mutagenese von *MdLOX1a*

Bei der Reaktion mit C₁₈-Fettsäuren bilden pflanzliche Lipoxygenasen oft spezifisch entweder 9(*S*)- oder 13(*S*)-Hydroperoxide (Feussner *et al.*, 2001). Enzyme mit geringer Spezifität, die beide Regioisomere in einem Verhältnis von weniger als 10:1 produzieren, werden als dual regiospezifisch bezeichnet (Casey *et al.*, 1999). Das Kandidatengen *MdLOX1a* wurde *in silico* als *Typ-1-9-LOX* klassifiziert. Heterolog exprimiertes LOX1:Md:1a-Protein besaß jedoch duale Regiospezifität und bildete *in vitro* ein Gemisch von 13- und 9-Hydroperoxiden der Linol- und α -Linolensäure. Das Hauptprodukt der Reaktion befand sich zudem in (*R*)-Konfiguration. (*R*)-LOX-Aktivität wurde bereits für verschiedene Lipoxygenasen von Pilzen und Tieren beschrieben (Coffa *et al.*, 2005b), tritt jedoch nur selten bei pflanzlichen Lipoxygenasen auf. Auf Grund der unerwarteten Regio- und Stereochemie seiner Reaktionsprodukte wurde eine zielgerichtete Mutagenese des Gens *MdLOX1a* durchgeführt. Das Ziel war die Identifizierung der auf seine Aktivität und Spezifität Einfluss-nehmenden Faktoren.

3.5.1 Strukturelle Untersuchung von LOX1:Md:1a

Die Auswahl von Sequenz-Positionen für die zielgerichtete Mutagenese des Gens *MdLOX1a* erfolgte mit Hilfe zwei verschiedener Verfahren: I) Zunächst wurde die

verfügbare Literatur nach Mutagenese-Versuchen an pflanzlichen und tierischen Lipoxygenasen durchsucht. Die Protein-Primärstrukturen charakterisierter Enzyme dienen zur Identifizierung von Positionen mit potenzieller Bedeutung für die enzymatische Aktivität und Spezifität von LOX1:Md:1a. II) Darüber hinaus wurden mit Hilfe des SWISS-MODEL-Servers (Arnold *et al.*, 2006) Homologie-Modelle von LOX1:Md:1a und einer homologen 9-LOX (LOX1:Md:1c) anhand der Röntgen-Struktur der LOX-3 von Sojabohne (PDB ID 1IK3, Skrzypczak-Jankun *et al.*, 2001) erstellt. Die überlagerten dreidimensionalen Strukturen beider Proteine wurden mit der PyMOL-Software visualisiert und auf Sequenz-Unterschiede in einem Umkreis von 8 Å um das 13(*S*)-HpODE-Molekül im aktiven Zentrum (Abbildung 3.10) untersucht.

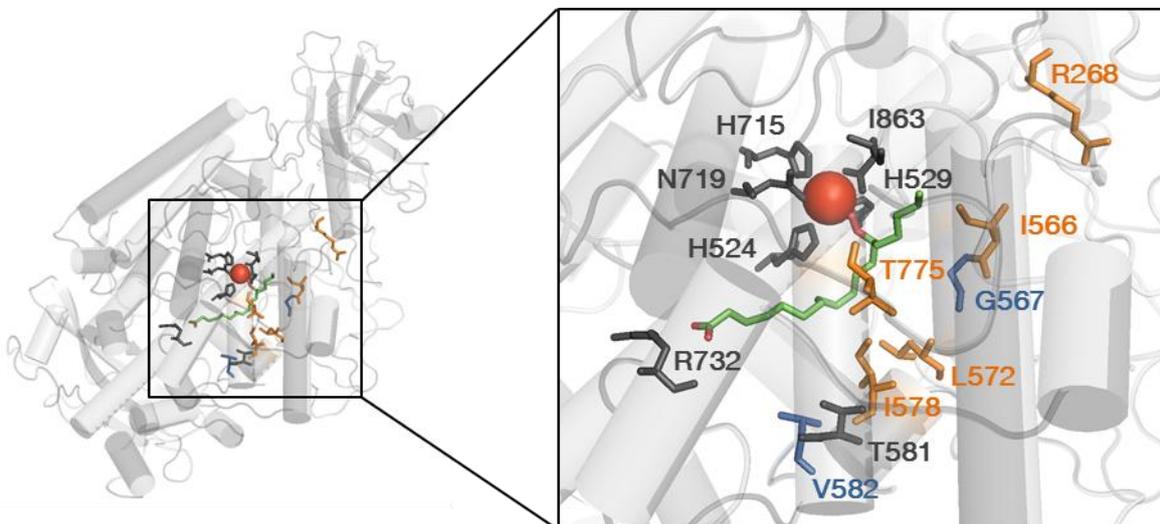


Abbildung 3.10 Übersicht über die Substrat-Bindestelle von LOX1:Md:1a. Die dreidimensionale Struktur zeigt Sequenz-Positionen mit essentieller Bedeutung für die Aktivität und Spezifität von Lipoxygenasen (**grau, blau**). Das 13(*S*)-Hydroperoxid der Linolsäure (**grün**) verdeutlicht die Lage und Größe der Substrat-Bindetasche. Der Boden der Tasche wird durch einen konservierten Arginin-Rest (**R732**) gekennzeichnet. Wohingegen das katalytische Eisen-Ion (**rote Kugel**) durch fünf Aminosäure-Reste (**H524, H529, H715, N719, I863**) in der Nähe des Eingangs zum aktiven Zentrum koordiniert wird. Die Reste **T581** und **V582** alignieren mit der Sloane-Position, die an der Kontrolle der Regiospezifität beteiligt ist. Darüber hinaus, wurde die Coffa-Position **G567** als bestimmender Faktor von Regio- und Stereospezifität beschrieben. Positionen, die für die zielgerichtete Mutagenese von LOX1:Md:1a gewählt worden, sind **orange** und **blau** dargestellt.

Abbildung 3.10 verdeutlicht die Größe und Lage des aktiven Zentrums in LOX1:Md:1a. Sequenz-Positionen mit entscheidendem Einfluss auf die katalytische Aktivität von Lipoxygenasen sind beispielsweise der Arginin-Rest (R732) am Boden der Substrat-Bindetasche (Hornung *et al.*, 1999) und die fünf Eisen-koordinierenden AS-Reste H524, H529, H715, N719 und I863 (Minor *et al.*, 1996). Die Spezifität der

Ergebnisse

LOX-Reaktion wird vor allem durch die Aminosäuren in der Sloane- (T581/V582) und Coffa-Position (G567) beeinflusst. Sowohl LOX1:Md:1a als auch LOX1:Md:1c besitzen das 9-LOX typische TV-Motiv in der Sloane-Position, allerdings bildet nur Letztere ausschließlich 9-Hydroperoxide aus LA und LnA. Beide Enzyme besitzen 85% Sequenz-Identität zueinander und hoch konservierte aktive Zentren, die lediglich in vier Positionen (G567, L572, I578 und T775 bezogen auf LOX1:Md:1a) Unterschiede aufweisen (Anhang XXIII, Abbildung 4.11). Darunter befindet sich auch die Aminosäure in Coffa-Position. LOX1:Md:1c trägt einen in (*S*)-LOX konservierten Alanin-Rest (A566), während in LOX1:Md:1a der für (*R*)-LOX typische Glycin-Rest (G567) vorliegt (Coffa *et al.*, 2005b). Die vier sich unterscheidenden Positionen wurden für die Mutagenese von LOX1:Md:1a jeweils mit der korrespondierenden Aminosäure aus LOX1:Md:1c ausgetauscht und resultierten in den Einzelmutanten G567A, L572I, I578L und T775L.

Darüber hinaus wurden drei weitere Positionen mutiert, um die Rolle der Substrat-Orientierung im aktiven Zentrum (Gardner, 1989) auf die Bildung von 9- und 13-Hydroperoxiden durch LOX1:Md:1a zu untersuchen. In aufrechter Substrat-Orientierung dringen freie Fettsäuren mit dem Methyl-Ende voran in die hydrophobe Bindetasche ein. Das Carboxy-Ende bildet dann vermutlich Salzbrücken mit polaren AS-Resten nahe dem Eingang des aktiven Zentrums (Kühn *et al.*, 2005). In LOX1:Md:1a sind die Positionen R268 und K283 mögliche Kandidaten für eine solche Bindung. Ihr Einfluss auf die Regiospezifität der LOX-Reaktion wurde exemplarisch durch den Austausch von R268 mit einem hydrophoben Alanin-Rest getestet. Zusätzlich wurde I566 am Eingang zur Substrat-Bindetasche mit dem größeren Phenylalanin-Rest von LOX1:Md:1c ausgetauscht, um eine potenzielle räumliche Hinderung der Salzbrücken-Bildung zu simulieren. Ein ähnlicher Effekt wurde in pflanzlichen LOX für den konservierten Arginin-Rest am Boden der Tasche und die Aminosäuren in der Sloane-Position beschrieben (Hornung *et al.*, 1999). 9-LOX tragen vergleichsweise kleine Aminosäuren wie Valin in der Sloane-Position und ermöglichen damit dem Substrat in inverser Orientierung, also dem Carboxy-Ende voran, in die Tasche einzudringen und eine Salzbrücke mit dem konservierten Arginin zu bilden. Der Austausch von V582 in LOX1:Md:1a mit einem größeren Phenylalanin-Rest sollte eine Salzbrücken-Bildung zwischen R732 und dem Carboxy-Ende von Fettsäuren verhindern. Das Substrat kann dann nur in aufrechter

Orientierung in das aktive Zentrum eindringen und bedingt damit 13(*S*)-LOX-Aktivität. Im Gegensatz dazu sollten die Mutationen R268A und I566F das Substrat in die inverse Orientierung zwingen und damit 9(*S*)-LOX-Aktivität bewirken.

3.5.2 Stereo- und Regiospezifität von *mdlox1a*-Mutanten

Von den sieben getesteten Einzelmutanten zeigten lediglich R268A, G567A und I578L einen vergleichbar hohen Umsatz von LA und LnA (60 bis 100% der Aktivität von LOX1:Md:1a). V582F setzte LA zwar mit einer zum Wildtyp-Enzym vergleichbaren Effizienz um, offenbarte bei Reaktion mit LnA jedoch nur einen Bruchteil seiner Aktivität (Anhang XXIV, Abbildung 4.12). Dies schien allerdings keinen Einfluss auf die Regiochemie seiner HpOTE-Produkte zu haben (Anhang XXII, Tabelle 4.2).

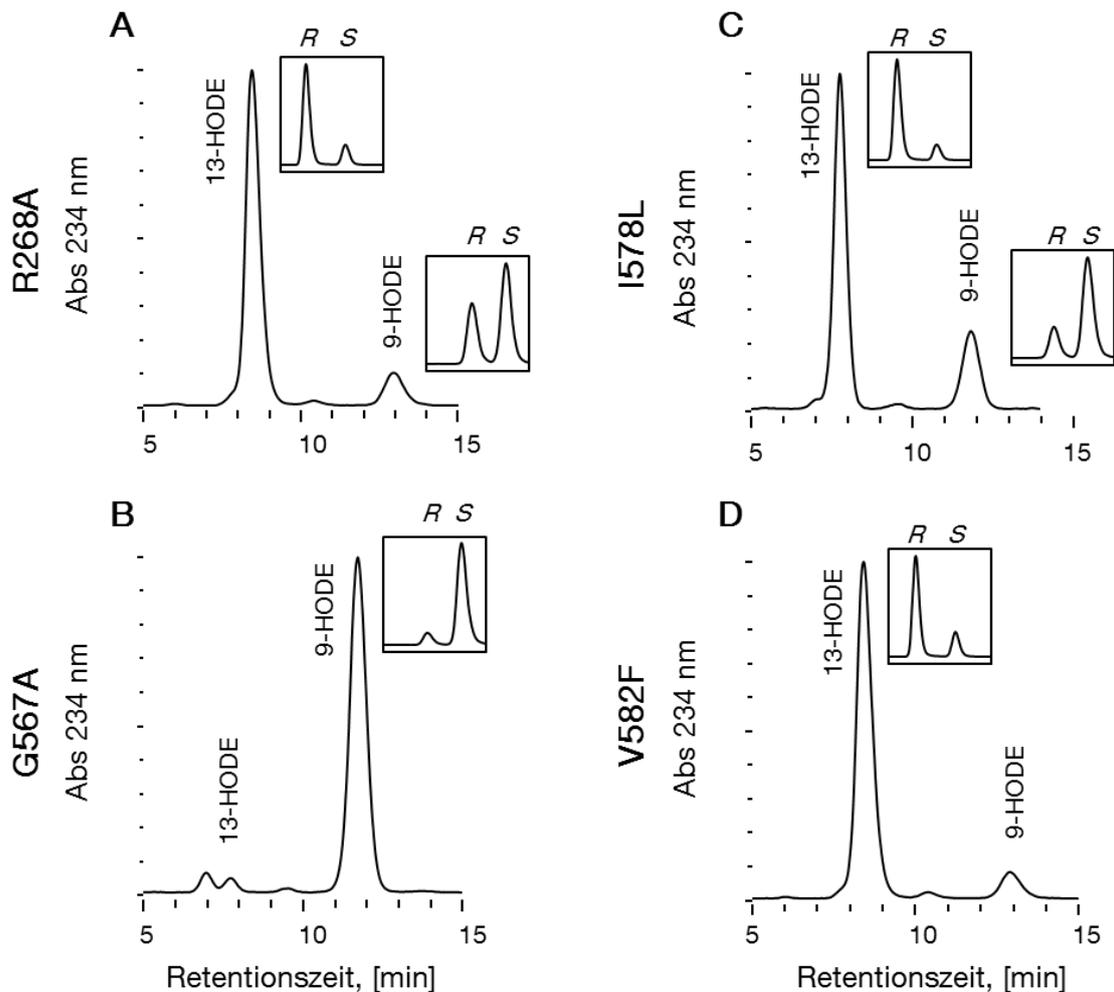


Abbildung 3.11 HPLC-Analyse der Reaktionsprodukte von *mdlox1a*-Mutanten mit Linolsäure. Enzymatisch geformte HpODE wurde zunächst zu HODE reduziert und mittels NP-HPLC und Messung der Absorption (Abs) bei 234 nm untersucht. Das Verhältnis von (*R*)- und (*S*)-Enantiomeren wurde mit CP-HPLC ermittelt (**Kasten**). Untersucht wurden die Produkt-Profile von rekombinantem Protein der R268A-Mutante (**A**), der G567A-Mutante (**B**), der I572L-Mutante (**C**) und der V582F-Mutante (**D**) von *MdLOX1a*.

Ergebnisse

Die LOX-Aktivität der T775L-Mutante war signifikant niedriger (~33%), während bei Reaktion von I566F- und L572I-Protein mit beiden Substraten fast kein Substrat-Umsatz verzeichnet wurde. Für die vier Mutanten mit hoher katalytischer Aktivität wurden die Regio- und Stereospezifität bei Reaktion mit LA bestimmt.

Mit Ausnahme der Mutante G567A bildeten alle mutierten LOX-Proteine Hydroperoxide in einem ähnlichen Verhältnis wie LOX1:Md:1a (Abbildung 3.11). Anstelle der dualen Regiospezifität des Wildtyp-Enzyms, offenbarte die G567A-Mutante 9-LOX-Aktivität und wandelte Linolsäure hauptsächlich zu 9(*S*)-HpODE um (~87,5% des gesamten Hydroperoxid-Produkts, Tabelle 3.5). Bei Reaktion mit LnA und AA zeigte sie darüber hinaus Produkt-Profile ähnlich denen von LOX1:Md:1c (Anhang XXII, Tabelle 4.2). Die Mutation von V582 zu Phenylalanin verursachte keine Änderung der Regio- oder Stereospezifität des Enzyms (Abbildung 3.11). Die V582F-Mutante produzierte immer noch hauptsächlich das 13(*R*)-Hydroperoxid der Linolsäure, während die niedrigen Mengen an 9-HpODE aus einem racemischen Gemisch beider Enantiomere bestanden (Tabelle 3.5). Die Produkt-Profile für die Reaktion mit LnA und AA ähnelten ebenso denen von Wildtyp-LOX1:Md:1a-Protein (Anhang XXII, Tabelle 4.2). Im Gegensatz dazu waren die Hauptprodukte der I578L-Mutante mit Arachidonsäure 9-HpETE (29%) und 5-HpETE (21%). Obwohl das Enzym hauptsächlich 13-Hydroperoxide von LA und LnA bildete, war ein Verlust an Regioselektivität zu verzeichnen, der zu höheren Mengen des 9-Regioisomers führte.

Tabelle 3.5 Verteilung der Hydro(pero)xy-Produkte nach der Reaktion von *mdlox1a*-Mutanten mit Linolsäure. Die Anteile von H(p)ODE sind als Prozent der gesamten Produkt-Ausbeute aus spezifischer LOX-Aktivität mit LA bei pH 7,0 und 25°C angegeben.

Enzym	9-H(p)ODE (in %)		13-H(p)ODE (in %)	
R268A	10,9		89,1	
G567A	97,3		2,7	
I578L	22,6		77,4	
V582F	8,7		91,3	
	Chirale Analyse (in %)			
	9(<i>R</i>)-	9(<i>S</i>)-	13(<i>R</i>)-	13(<i>S</i>)-
R268A	4,1	6,8	73,5	15,6
G567A	9,8	87,5	1,6	1,1
I578L	5,0	17,6	67,0	10,4
V582F	3,7	5,0	72,2	19,1

3.5.3 Kinetische Eigenschaften von Wildtyp- und Mutanten-LOX

Da die G567A-Mutation eine komplette Änderung der Spezifität der Lipoxygenase zur Folge hatte, wurden die kinetischen Parameter der Mutante bestimmt und mit den Werten der Wildtyp-Enzyme LOX1:Md:1a und LOX1:Md:1c verglichen. Die Hydroperoxid-Bildung aus LA und LnA wurde in einem Konzentrationsbereich von 2,5 bis 100 μM Substrat dokumentiert. Die ermittelten Kurven entsprachen jedoch meist nicht der typischen Michaelis-Menten-Kinetik, sondern offenbarten stattdessen abnehmende Reaktionsgeschwindigkeiten bei hohen Substratkonzentrationen (Anhang XXV, Abbildung 4.13). Daher wurden nur die Daten der Substrat-Konzentrationen im Bereich linear ansteigender Reaktionsgeschwindigkeit in die Berechnung nach Michaelis-Menten einbezogen. Die ermittelten kinetischen Parameter aller untersuchten Enzyme sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.6 Kinetische Parameter partiell gereinigter Wildtyp-Lipoxygenasen des Apfels und der G567A-Mutante von *MdLOX1a* mit Linol- (LA) und α -Linolensäure (LnA).

	Substrat	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
LOX1:Md:1a	LA	10,35 \pm 0,28	1,57 \pm 0,07	2,67 \pm 0,13	0,26
	LnA	26,65 \pm 0,99	3,05 \pm 0,14	5,16 \pm 0,24	0,19
LOX1:Md:1c	LA	40,61 \pm 3,10	30,21 \pm 0,93	51,14 \pm 1,58	1,26
	LnA	70,85 \pm 5,48	18,22 \pm 2,69	30,86 \pm 4,56	0,44
G567A	LA	11,43 \pm 1,21	18,74 \pm 0,86	31,75 \pm 1,45	2,78
	LnA	15,53 \pm 0,87	14,82 \pm 0,46	25,10 \pm 0,77	1,62

Die Berechnung der katalytischen Effizienz von rekombinantem LOX1:Md:1a-Protein zeigte keine deutliche Präferenz für LA ($0,26 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) oder LnA ($0,19 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$). Ein direkter Vergleich der kinetischen Parameter beider Substrate offenbarte allerdings Unterschiede. Denn obwohl LOX1:Md:1a *in vitro* eine geringfügig höhere Affinität zu LA besaß, wurde LnA etwa doppelt so schnell umgesetzt. Interessanterweise führte die G567A-Mutation zu einer etwa 10fach höheren katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_m) für beide Substrate. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) von LA war fast 12mal höher, während LnA 5fach schneller umgesetzt wurde. Darüber hinaus besaß die Mutante eine geringfügig höhere Affinität für LnA ($K_m = 15,53 \mu\text{M}$) als LOX1:Md:1a. Die katalytischen Effizienzen von $2,78 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ und $1,62 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ für die Metabolisierung von LA und LnA demonstrieren, dass Linolsäure das bevorzugte Substrat

Ergebnisse

der G567A-Mutante war. Die 9(*S*)-LOX LOX1:Md:1c zeigte niedrigere Affinitäten zu LA ($K_m = 40,61 \mu\text{M}$) und LnA ($K_m = 70,85 \mu\text{M}$) als LOX1:Md:1a, besaß dafür aber höhere Umsatzraten vergleichbar mit denen der G567A-Mutante. Darüber hinaus war auch ihre katalytische Effizienz für LA deutlich höher als für LnA.

4 Diskussion

Das Aroma ist eines der wichtigsten Qualitätsmerkmale einer Frucht und hat einen maßgeblichen Einfluss auf seine Akzeptanz durch den Konsumenten (Ulrich *et al.*, 2009). Die Züchtung von Sorten eines bestimmten Aromas gestaltet sich aufgrund seiner biochemischen und genetischen Komplexität aber noch immer schwierig und ist eher ein Zufallsprodukt, denn das Ergebnis gezielter Züchtungsbestrebungen (Vogt & Dunemann, 2011). Die lange Zeit übliche Kreuzung zwischen etablierten Marktsorten, wie Royal Gala, Elstar oder Golden Delicious, verspricht zwar eine verhältnismäßig schnelle Züchtung von Kultivaren mit wünschenswerten Frucht- und Qualitätsmerkmalen (Janick *et al.*, 1996), wird aber den gestiegenen Bedürfnissen nach Wirtschaftlichkeit, etwa durch das Einbringen von Resistenzen gegen Apfelschädlinge, nicht gerecht. Deshalb konzentriert sich die Züchtung seit Jahren auf die Einkreuzung von Resistenzen aus natürlichen Quellen, wie *Malus × floribunda* und *Malus × robusta* (Crosby *et al.*, 1992; Fischer, 1994). Diese Art der Resistenz-Züchtung ist jedoch langwierig und resultiert selten in Kultivaren, die in ihren Verzehreigenschaften am Markt gegen etablierte Sorten konkurrenzfähig sind (Fischer & Fischer, 2008; Ulrich *et al.*, 2009). Neue biotechnologische Verfahren sollen die Apfelzüchtung über die Grenzen der konventionellen Sorten-Kreuzung hinweg effizienter und wirtschaftlicher gestalten. Dazu müssen zunächst die genetischen Grundlagen der wirtschaftlich relevanten Eigenschaften des Apfels verstanden werden. Mit der Veröffentlichung des Apfel-Genoms durch Velasco *et al.* (2010) wurde der Grundstein für eine umfassende Untersuchung beteiligter Stoffwechselwege und ihrer entwicklungsbedingten Regulation gelegt.

Der Lipoxygenase-Stoffwechselweg leistet einen wichtigen Beitrag zur Aroma-Biosynthese des Apfels. Viele der daraus hervorgehenden flüchtigen Aromastoffe beeinflussen die Geruchswahrnehmung einer Sorte (Plotto *et al.*, 2000). Es wird angenommen, dass Mechanismen stromaufwärts von der Bereitstellung von C₆-Alkoholen, wie enzymatische Aktivitäten (LOX, HPL) oder Verfügbarkeit von Ausgangsstoffen, limitierend auf die Bildung aromarelevanter Ester wirken (Defilippi *et al.*, 2005). Erst eine Reife-bedingte Änderung im LOX-Stoffwechselweg bewirkt die Ausbildung des vollen Apfel-Aromas. Über die Art der Regulation oder die Spezifität der beteiligten Enzyme ist indes noch sehr wenig bekannt.

4.1 Lipoxygenasen mit Funktionen während der Fruchtreife

Die Lipoxygenase-Genfamilie des Kulturapfels wurde erst vor Kurzem umfangreich bioinformatisch analysiert: Für die Suche nach LOX-Kandidaten im Genom der Sorte Golden Delicious wurden sieben zuvor beschriebene EST-Sequenzen putativer Lipoxygenasen (Schaffer *et al.*, 2007) verwendet. Dabei konnten etwa 40 unterschiedliche LOX-Sequenzen identifiziert werden (Vogt *et al.*, 2013a). Die sorgfältige Evaluierung und Prüfung des Vorhandenseins funktioneller Motive führte letztendlich zu der aktuellen Zahl von 23 potenziellen LOX-Genen des Apfels (Vogt *et al.*, 2013b). Eine ähnliche Anzahl putativer Mitglieder der Genfamilie wurde auch in einer zweiten unabhängigen Inventur des Apfel-Genoms von Contreras & Beaudry (2013b) beschrieben. Beide Untersuchungen fanden, dass die meisten LOX-Gene anhand von Sequenz-Homologien in Gengruppen entfallen. Jede Gruppe enthält wiederum bis zu sechs paraloge Sequenzen. Nur *MdLOX9a* weicht in seiner Sequenz so stark ab, dass es einen separaten Ast im phylogenetischen Baum der Familie einnimmt (Vogt *et al.*, 2013b).

4.1.1 Genexpression während der Fruchtreife

Eine Analyse der Expression von 22 putativen LOX-Genen aus *Malus x domestica* verdeutlichte, dass zumindest 17 Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt während des Wachstums und der Reifung der Frucht exprimiert sind (Contreras & Beaudry, 2013b). Die Beteiligung mehrerer Lipoxygenasen an Prozessen während der Fruchtreife wurde bereits für Tomate (Griffiths *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2004), Aprikose (González-Agüero *et al.*, 2009), Pfirsich (Zhang *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2011) und Kiwi (Zhang *et al.*, 2006) beschrieben. In der Tomate wurden insgesamt sechs LOX-Gene mit entwicklungsabhängigen Expressionsmustern identifiziert. Bezogen auf Zeitpunkt und Auslöser ihrer Expression ließen sich für einige Gene potenzielle Funktionen in der Pflanze ableiten (Shen *et al.*, 2014).

In dieser Arbeit konnten die Gene *MdLOX1a*, *MdLOX1c*, *MdLOX2a*, *MdLOX2b*, *MdLOX5b*, *MdLOX6a*, *MdLOX7a* und *MdLOX8b* von cDNA aus der Fruchtschale amplifiziert und kloniert werden. Ein Vergleich mit den für die Fruchtreife gewonnenen Expressionsdaten von Golden Delicious (Contreras & Beaudry, 2013b) zeigte, dass alle acht Gene hochgradig in der Frucht exprimiert sind. Fünf Gene wiesen zusätzlich reifeabhängige Änderungen in ihren Expressionsprofilen auf:

MdLOX2a, *MdLOX2b* und *MdLOX6a* waren besonders in der frühen Phase exprimiert, während die Expression von *MdLOX1a* und *MdLOX7a* erst spät während der Reifung und Lagerung anstieg (Contreras & Beaudry, 2013b; Vogt *et al.*, 2013b). Eine ähnliche Zunahme der mRNA von Genen mit hoher Homologie zu *MdLOX1a* und *MdLOX7a* wurde auch in Royal Gala und Mondial Gala beobachtet (Park *et al.*, 2006; Goulao & Oliveira, 2007), scheint aber Sorten-abhängigen Schwankungen in Ausmaß und Dauer zu unterliegen (Vogt *et al.*, 2013b). Mit Hilfe von ACC-Oxidase-antisense-Linien der Sorte Royal Gala wurde gezeigt, dass sich die Expression beider Gene durch exogen appliziertes Ethylen induzieren lässt (Schaffer *et al.*, 2007). Dies stimmt wiederum damit überein, dass die Zunahme ihrer Transkript-Menge mit dem Einsetzen des Klimakteriums und der autokatalytischen Ethylen-Produktion einherging (Park *et al.*, 2006; Contreras & Beaudry, 2013b).

Die *in silico*-Analyse der acht klonierten Kandidaten bestätigte das Vorhandensein aller funktionellen Motive von Lipoxygenasen. Demnach könnten auch alle acht Gene *in vivo* Funktionen erfüllen (Vogt *et al.*, 2013a). An Hand ihrer Expressionsprofile lässt sich ableiten, dass *MdLOX2a*, *MdLOX2b* und *MdLOX6a* vermutlich bevorzugt an Prozessen in der frühen Phase der Fruchtreife beteiligt sind. Die Gene *MdLOX1c*, *MdLOX5b* und *MdLOX8b* zeigten dagegen keine Änderungen und könnten bei Gewebe-Zerstörung kontinuierlich Hydroperoxide bereitstellen. Für eine mögliche Beteiligung an der Aroma-Produktion in der reifen Frucht kommen besonders *MdLOX1a* und *MdLOX7a* auf Grund ihrer Ethylen-induzierbaren Genexpression in der späten Phase des Reifeprozesses in Frage.

4.1.2 Kandidaten von potenzieller Bedeutung für die Aroma-Produktion

MdLOX1a und *MdLOX7a* wurden *in silico* anhand von Sequenz-Homologien zu anderen Lipoxygenasen als *Typ 1-9-LOX* klassifiziert (Vogt *et al.*, 2013b). Allerdings besitzen beide LOX Merkmale, die auf andere Spezifitäten hindeuten: So kodiert *MdLOX1a* für den (*R*)-LOX-typischen Glycin-Rest in der Coffa-Position, welcher in pflanzlichen LOX oft duale Regiospezifität bewirkt (Coffa *et al.*, 2005a; Boeglin *et al.*, 2008). *MdLOX7a* trägt dagegen zwei für LOX untypische Isoleucin-Reste (I586/I587) in der Sloane-Position. Solche Abweichungen von dem konservierten TV-Motiv pflanzlicher 9-LOX wurden auch für *MoLOX1* der Bittergurke (T598/Q599; GenBank: CAP59449.1), *PtLOX* der Westlichen Balsampappel (T515/L516; GenBank:

XP_002320571) und *VvLOXD* der Weintraube (I437/L438; GenBank: ADJ67988.1) beschrieben (Hornung *et al.*, 2008; Podolyan *et al.*, 2010). Prinzipiell sind die AS-Reste in der Sloane-Position wichtige Einflussfaktoren der Spezifität pflanzlicher und tierischer Lipoxygenasen: Erst kürzlich wurde beispielsweise eine Lipoxygenase im Samen der Bittergurke identifiziert, die *in vitro* in Abhängigkeit vom pH-Wert ihre Regiospezifität änderte (Hornung *et al.*, 2008). Die zielgerichtete Mutagenese von MoLOX1 bestätigte, dass dieser Effekt auf der Anwesenheit eines Glutamin-Restes (Q599) in der Sloane-Position beruht. Darüber hinaus bewirkte die T596I-Mutation in der Sloane-Position einer 13-LOX aus Gurke (T596/H597; GenBank: CAA63483.1) einen nahezu vollständigen Verlust an Regiospezifität bei Reaktion mit LA (Hornung *et al.*, 1999). Der Einfluss der Isoleucin-Reste von *MdLOX7a* auf die enzymatische Reaktion mit Fettsäuren ist unklar und bedarf der biochemischen Charakterisierung des Enzyms. Auf Grund der hohen Konservierung der Sloane-Position und seiner Bedeutung für die Spezifität von Lipoxygenasen ist jedoch wahrscheinlich, dass die potenzielle *in vivo*-Aktivität von LOX1:Md:7a ebenso eine unspezifische Bildung von Hydroperoxiden bewirkt.

Untersuchungen von Apfel-Homogenaten ergaben, dass die LOX-Aktivität reifer Früchte Linolsäure ebenso zu einem Gemisch aus 9- und 13-HpODE umwandelt (Grosch *et al.*, 1977; Beuerle & Schwab, 1999). Zur Ausbildung des Apfel-Aromas trägt jedoch vor allem die 13-LOX-Aktivität durch die Bereitstellung von Vorläufern für C₆-Aldehyde und -Alkohole bei (Tressl *et al.*, 1970). Sowohl LOX1:Md:1a als auch LOX1:Md:7a könnten theoretisch zur Bildung von 13-Hydroperoxiden beitragen. Ein möglicher Zusammenhang von *MdLOX1a* mit dem Apfel-Aroma wurde bereits angedeutet: So fanden Park *et al.* (2006) bei der Identifizierung von Genen mit Beteiligung an der Entwicklung von Frucht und Aroma in Royal Gala ein Kandidatengen (EST cluster MD187410) mit hoher Homologie zu *MdLOX1a*. Dieses Gen wurde später auf Chromosom 9 des Apfel-Genoms kartiert und scheint mit einem QTL-Cluster für die Fruchtester Butylacetat, Pentylacetat und Hexylacetat assoziiert zu sein (Dunemann *et al.*, 2009; Vogt *et al.*, 2013b).

4.2 Biochemische Charakterisierung von LOX-Kandidaten

Mit dem Ziel der Identifizierung von Lipoxygenasen mit Funktionen in der Biosynthese von Fruchtestern wurden biochemisch je zwei Kandidaten der

MdLOX1- und MdLOX2-Gengruppe charakterisiert. Alle vier Gene sind während der Reifung in der Fruchtschale der Sorte Golden Delicious exprimiert. *MdLOX1c* und *MdLOX2b* gehören zu den Genen mit konstitutiver Expression, während die mRNA von *MdLOX2a* und *MdLOX1a* jeweils nur während der frühen oder späten Phase der Reifung detektierbar ist (Contreras & Beaudry, 2013b; Vogt *et al.*, 2013b). Anhand einer *in silico*-Analyse der LOX-Genfamilie wurden für die Kandidaten verschiedene Spezifitäten bei Reaktion mit C₁₈-Fettsäuren erwartet. Die Gene *MdLOX1a* und *MdLOX1c* wurden *in silico* als 9-LOX, die Gene *MdLOX2a* und *MdLOX2b* als 13-LOX klassifiziert.

4.2.1 LOX-Selektivität und ihre Bedeutung während der Fruchtreife

Die meisten pflanzlichen Lipoxygenasen bevorzugen freie Fettsäuren als Substrat (Siedow, 1991). Daher wurde rekombinantes LOX-Protein des Kulturapfels auf den Umsatz von Linolsäure, Linolensäure und Arachidonsäure getestet. Diese drei Fettsäuren stellen fast die Hälfte aller in der Frucht enthaltenen Lipide dar (Souci *et al.*, 2008). Der Gehalt an Arachidonsäure ist allerdings gering und unterliegt kaum Schwankungen während Wachstum und Reifung, sodass es sich vermutlich eher um einen strukturellen Bestandteil als um einen aktiven Teilnehmer des Frucht-Metabolismus handelt (Song & Bangerth, 2003).

Grundsätzlich war die beobachtbare katalytische Aktivität der Apfel-LOX mit LA und LnA deutlich höher als bei Reaktion mit AA. Die erhobenen kinetischen Daten für LOX1:Md:1a und LOX1:Md:1c sind vergleichbar zu denen von rekombinanten LOX aus Erbse und Kartoffel (Chen *et al.*, 1998; Hughes *et al.*, 1998). Rekombinantes LOX1:Md:1c-Protein setzte *in vitro* bevorzugt Linolsäure um. LOX1:Md:1a zeigte dagegen für beide C₁₈-Fettsäuren eine ähnliche katalytische Effizienz (Tabelle 3.6). Dies ist damit zu erklären, dass für LnA im Vergleich zu LA zwar ein höherer K_m -Wert gemessen wurde, aber auch eine doppelt so hohe Reaktionsgeschwindigkeit.

Die Verfügbarkeit von Fettsäuren ist ein wichtiger limitierender Faktor der Aroma-Biosynthese im Apfel (Bangerth *et al.*, 1998). Unreife Früchte enthalten so gut wie keine freien Fettsäuren (Song & Bangerth, 2003). Erst mit Beginn der klimakterischen Reifung werden in der Schale ungesättigte Fettsäuren freigesetzt (Meigh & Hulme, 1965; Meigh *et al.*, 1967; Song & Bangerth, 2003; Defilippi *et al.*, 2005). Dieser Vorgang hängt im hohen Maße mit der Ethylen-Produktion in der Pflanze zusammen

(Defilippi *et al.*, 2005) und wird bislang entweder mit der Lipase-katalysierten Freisetzung aus Membranen und Lipid-Speichern (Bartley, 1985; Fellman *et al.*, 2000) oder *de novo*-Synthese erklärt (Song & Bangerth, 2003). Ein Vergleich der Lipid-Gehalte in Fruchtschale vor und nach Beginn des Klimakteriums zeigte einen Anstieg an Linolsäure (Galliard, 1968; Paillard, 1986). Der Gehalt von Linolensäure war dagegen deutlich geringer und schien während der späten Phase eher abzunehmen (Song & Bangerth, 2003). Gleichzeitig wurde in zerkleinertem Fruchtgewebe eine drastische Zunahme der 2(*E*)-Hexenal-Produktion verzeichnet (Sapers *et al.*, 1977; Paillard, 1986; Defilippi *et al.*, 2005). Dieser Wandel im LOX-Stoffwechselweg scheint Voraussetzung für die Bildung aromarelevanter Alkohole und Ester im Apfel zu sein (Defilippi *et al.*, 2005; Contreras & Beaudry, 2013a). Interessanterweise gehen die geänderten Aldehyd-Gehalte in zerkleinertem Fruchtgewebe mit der Ethylen-induzierten Expression und vermutlich zeitgleichen Zunahme enzymatischer Aktivität von *MdLOX1a* einher. In der Tat scheint die beobachtete Zunahme an 2(*E*)-Hexenal-Produktion durch die Substratspezifität der Lipoxygenasen während der späten Fruchtreife bedingt, denn auch die extrahierbare LOX-Aktivität aus reifen Äpfeln oxidiert bevorzugt Linolensäure (Grosch *et al.*, 1977) und das obwohl der Gehalt freier Linolsäure im Gewebe deutlich höher ist (Song & Bangerth, 2003).

4.2.2 Apfel-LOX produzieren (*R*)-konfigurierte Hydroperoxide

Mittels Chromatografie wurde gezeigt, dass rekombinantes LOX1:Md:1c- und LOX2:Md:2b-Protein *in vitro* bevorzugt 9(*S*)- beziehungsweise 13(*S*)-konfigurierte Hydroperoxide aus Linolsäure bildet. Das Hauptprodukt bei Reaktion mit LOX1:Md:1a und LOX2:Md:2a war dagegen 13(*R*)-HpODE. Beide Enzyme besaßen duale Regiospezifität und produzierten außerdem geringere Mengen 9(*S*)-HpODE.

Die meisten pflanzlichen Lipoxygenasen wandeln C₁₈-Fettsäuren mit hoher Spezifität entweder zu 9(*S*)- oder 13(*S*)-Hydroperoxiden um (Feussner & Wasternack, 2002). (*R*)-LOX-Spezifität tritt dagegen selten auf und wurde bisher nur für wenige *Typ 2*-LOX aus Sojabohne und Erbse sowie eine 9/13-LOX der Olive beschrieben (Van Os *et al.*, 1979; Palmieri-Thiers *et al.*, 2009). Letztere trägt, ähnlich wie LOX1:Md:1a, einen Glycin-Rest (G568) an der Sequenz-Position, welche die Regio- und Stereospezifität der Fettsäure-Oxidation bestimmt. LOX2:Md:2a besitzt dagegen den

Alanin-Rest (A609), welcher in (S)-LOX konserviert vorliegt (Coffa & Brash, 2004). Es wird vermutet, dass manche *Typ 2*-LOX mit einem Alanin-Rest in der Lage sind unter bestimmten Bedingungen (R)-LOX-Spezifität zu imitieren (Coffa *et al.*, 2005a). Zieht man aktuelle Theorien zur Regio- und Stereospezifität von Lipoxygenasen in Betracht, müsste das jedoch zur Bildung von 9(R)- und 13(S)-Hydroperoxiden durch LOX2:Md:2a führen (Abbildung 4.1, IV, Seite 85).

Die Art der Substrat-Bindung im aktiven Zentrum ist ein entscheidender Faktor für die Spezifität einer pflanzlichen Lipoxygenase (Gardner, 1989; Gillmor *et al.*, 1997). Die Chiralität der Produkte aus der Reaktion von LOX2:Md:2a mit Linolsäure legt eine inverse Substrat-Orientierung nahe, wie sie üblicherweise nur in 9-LOX auftritt (Hornung *et al.*, 1999). Ein raumfordernder Phenylalanin-Rest (F624) am Boden des aktiven Zentrums sollte diese Art der Bindung theoretisch verhindern. Es gibt jedoch Ausnahmen von dieser Regel, die belegen, dass vor allem die Gesamtgeometrie der Bindetasche über die Spezifität einer LOX entscheidet (Hughes *et al.*, 2001b; Ruddat *et al.*, 2004; Andreou *et al.*, 2009). Darüber hinaus deuten aktuelle Daten einen höheren Grad an Flexibilität für Substrate tierischer und pflanzlicher LOX an als bisher angenommen (Mei *et al.*, 2008). Es ist daher möglich, dass Fettsäuren verschiedene thermodynamisch begünstigte Konformationen im aktiven Zentrum einnehmen können, von denen eine begünstigt ist und katalytisch umgesetzt wird (Andreou & Feussner, 2009).

Interessanterweise bildet auch die LOX-Aktivität aus Homogenaten reifer Äpfel ein Gemisch aus 13- und 9-Hydroperoxiden (Grosch *et al.*, 1977). Eine Analyse von deren Regio- und Stereochemie ergab überraschende Übereinstimmungen mit den von LOX1:Md:1a und LOX2:Md:2a gebildeten Hydroperoxiden. Beuerle & Schwab (1999) detektierten 13(R)-HODE, 9(S)-HODE und deren Ketoderivate als primäre Produkte der LOX-Aktivität gelagerter Äpfel mit Linolsäure. Während damals argumentiert wurde, dass die Akkumulation des 13(R)-Stereoisomers auf einer selektiven Metabolisierung von 13(S)-HpODE beruhen könnte, legen die Befunde stattdessen eine enzymatische Bildung von 13(R)-HpODE in der Frucht nahe. *MdLOX1a*, als eines der wenigen Ethylen-induzierten Mitglieder der Genfamilie, liefert offenbar nicht nur den Großteil des Hydroperoxid-Produktes während der

späten Phase der Fruchtreife, sondern kann durch seine duale Spezifität auch Vorläufer für Aromastoffe bereitstellen.

4.2.3 Biologische Bedeutung von pH- und Temperatur-Optima

Bei Untersuchung der LOX-Aktivität in Homogenaten ganzer Äpfel wurde eine maximale enzymatische Aktivität bei pH 6,5 ermittelt (Feys *et al.*, 1982). Daher war es nicht verwunderlich, dass alle untersuchten Apfel-LOX pH-Optima nahe dem neutralen Bereich aufwiesen. Ähnliche Werte wurden auch für die extrahierbare LOX-Aktivität aus anderen Kulturpflanzen ermittelt: So besitzen Lipoxygenasen aus Birnen, Stachelbeeren (Kim & Grosch, 1978), Erdbeeren (Leone *et al.*, 2006), Kiwi-Früchten (Boyes *et al.*, 1992) und Oliven (Salas *et al.*, 1999) maximale Aktivität in einem pH-Bereich von 6,0 bis 7,5. Bislang gibt es nur zwei Berichte über partiell gereinigte Lipoxygenasen aus dem Apfel. Feys *et al.* (1982) beschrieben ein Membran-gebundenes Protein, welches bevorzugt Linolsäure umsetzte. Dieses Enzym zeigte *in vitro* maximale Aktivität bei einem pH von 6,9 und reagierte auf sich ändernde pH-Werte ähnlich wie LOX2:Md:2a. Die zweite beschriebene LOX besaß ein pH-Optimum von 6,0 und setzte wie LOX1:Md:1a bevorzugt Linolensäure um (Kim & Grosch, 1979).

Die optimale Temperatur pflanzlicher Lipoxygenasen kann sehr variabel sein. Viele Enzyme besitzen katalytische Aktivität bei Temperaturen von 15 bis 50°C und die Optima von LOX aus Olive (Padilla *et al.*, 2009) und Weintraube (Podolyan *et al.*, 2010) gleichen den in dieser Arbeit gefundenen Werten für die LOX des Kulturapfels. Allerdings können enorme Unterschiede in deren Hitzestabilität bestehen (Boyes *et al.*, 1992). In der Natur sind Temperaturen über 35°C oft eine Begleiterscheinung von Trockenstress, welcher zur radikalen Änderung des pflanzlichen Metabolismus und Seneszenz führt. In Apfel-Bäumen bewirkt er unter Anderem eine erhöhte Freisetzung flüchtiger Aromastoffe aus dem LOX-Weg, darunter C₆-Aldehyde, -Alkohole und unverzweigte Ester (Ebel *et al.*, 1995). Umgekehrt gibt es auch viele Beispiele für LOX, deren Expression aufgrund von Kältestress induziert wird: Padilla *et al.* (2012) beobachteten schon bei 15°C eine Sorten-abhängige Zunahme der Expressionslevel von *Oep2LOX1* in der Olive. Ein ähnlicher Effekt wurde auch für *CaLOX1* in Blättern von Paprika (Hwang & Hwang, 2010) und *ZmLOX10* im Samen von Mais (Nemchenko *et al.*, 2006) beschrieben. Alle diese Gene werden auch durch

andere Reize wie Verwundung, Pathogen-Befall oder bestimmte Phytohormone induziert und sind damit Teil der pflanzlichen Abwehr gegen biotische und abiotische Stressfaktoren. Feys *et al.* (1980) konnten auch bei 3,5°C LOX-Aktivität in Apfelnachweisen, was durch LOX2:Md:2b hervorgerufen werden könnte (Abbildung 3.9). Die messbare Aktivität nahm bei mehrwöchiger Kühlung vor allem im Kern rapide zu und erfuhr einen weiteren drastischen Anstieg bei Akklimatisierung an Raumtemperatur.

Der Einfluss von Faktoren, wie pH (Gardner, 1989) und Temperatur (Georgalaki *et al.*, 1998), auf die Regio- und Stereospezifität pflanzlicher Lipoxygenasen wurde schon oft beschrieben. Ähnlich wie bei LOX1 aus Sojabohne wurde auch für rekombinantes LOX-Protein aus dem Apfel eine Zunahme an Regiospezifität mit steigenden pH-Werten gemessen (Tabelle 3.4). Gardner (1989) folgerte, dass dies in erster Linie auf dem physikalisch-chemischen Zustand des Substrates beruht. Die protonierte Fettsäure kann in das aktive Zentrum von Lipoxygenasen entweder mit der Methyl- oder der Carboxy-Gruppe voran eindringen (Abbildung 4.1, I und II). Die Substrat-Orientierung entscheidet dann über die Position (C₁₃- oder C₉-) der Dioxygenierung auf dem Kohlenstoffrückgrat. In alkalischer Lösung geht die protonierte Fettsäure in ihre geladene Carboxylat-Form über. Die Ladung lässt sich dann nur noch schwer in der hydrophoben Umgebung der Bindetasche verbergen (Walther *et al.*, 2009) und fördert die Bildung von 13-Hydroperoxiden durch aufrechte Substrat-Orientierung. Im Gegensatz dazu scheinen LOX1:Md:1a und LOX1:Md:1c kaum zur Umsetzung des aufrecht gebundenen Substrats befähigt zu sein, was möglicherweise den rapiden Verlust an Aktivität bei pH-Werten über 8,0 erklärt. Interessanterweise wurde der gleiche Effekt bei LOX2:Md:2a beobachtet, welche *in silico* als *Typ 2-13-LOX* klassifiziert wurde. Daher kann für die drei Enzyme eine bevorzugte Bindung in inverser Orientierung angenommen werden. Lediglich LOX2:Md:2b besaß *in vitro* auch bei pH-Werten über 8,0 noch einen Großteil seiner Aktivität und reagierte auf sich ändernde pH-Werte ähnlich wie LOX1 aus Sojabohne.

4.3 Grundlagen der Regio- und Stereospezifität von LOX1:Md:1a

Bis heute gibt es kein umfassendes Modell, das die Regiospezifität aller pflanzlichen Lipoxygenasen beschreibt (Feussner & Wasternack, 2002). Prinzipiell wird sie häufig anhand einer Kombination von Faktoren, wie der Tiefe der Substrat-Bindetasche

Diskussion

(Gillmor *et al.*, 1997) und der Substrat-Orientierung im aktiven Zentrum (Gardner, 1989) erklärt. Fettsäure-Substrate dringen vermutlich mit dem Methyl-Ende voran in die hydrophobe Umgebung der Substrat-Bindetasche ein. Die Position der Sauerstoff-Einführung in das Kohlenstoffrückgrat des Substrates wird dann durch die Tiefe der Tasche bestimmt. In 13-LOX ist der zur Verfügung stehende Platz in der Regel durch raumfordernde Aminosäuren (Histidin oder Phenylalanin) in der Sloane-Position beschränkt (Sloane *et al.*, 1995). 9-LOX weisen dagegen kleinere Aminosäuren (Valin) auf und erlauben dem Substrat somit tiefer in das aktive Zentrum einzudringen. Für pflanzliche Lipoxygenasen wurde eine zweite Theorie aufgestellt, bei welcher die Position der Substrat-Oxidation von der Erreichbarkeit eines konservierten Arginin-Rests am Boden der Substrat-Bindetasche bestimmt wird (Hornung *et al.*, 1999). Im Falle von 13-LOX, wird der Zugang zu dem Arginin-Rest durch große Aminosäuren, die sich mit der Sloane-Position tierischer LOX decken, blockiert (Abbildung 4.1, II). In 9-LOX ist der positive geladene Rest dagegen zugänglich und erlaubt dem Substrat in inverser Orientierung, also mit dem Carboxy-Ende voran, in die Substrat-Bindetasche einzudringen (Abbildung 4.1, I).

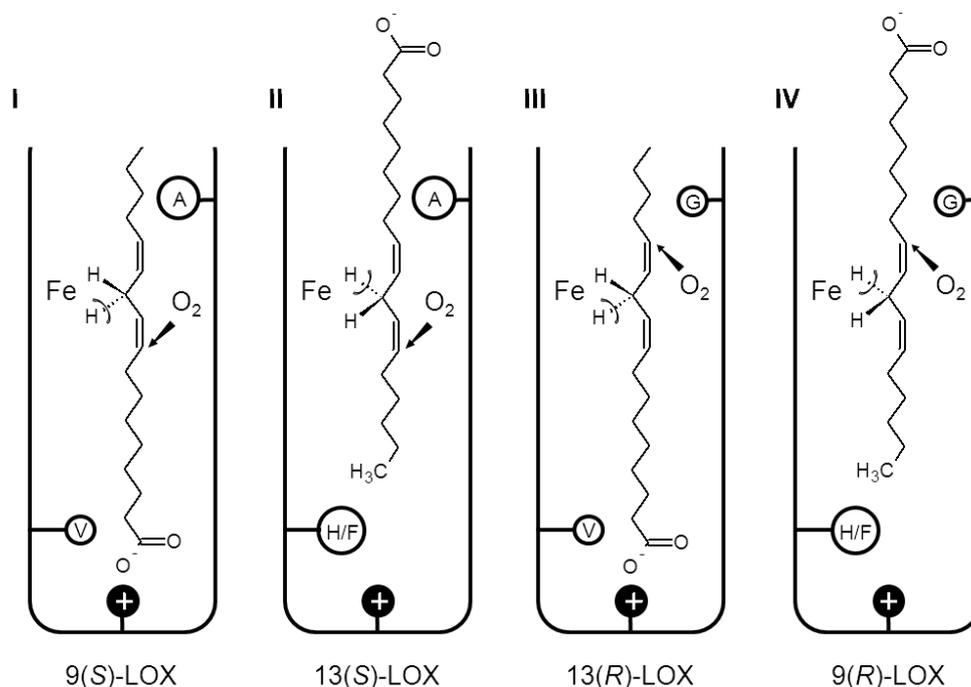


Abbildung 4.1 Regulation der Spezifität pflanzlicher Lipoxygenasen. Dargestellt sind die Mechanismen, welche zur Bildung von 9(*S*)- (I), 9(*R*)- (IV), 13(*S*)- (II) und 13(*R*)-HpODE (III) beitragen. Die Regiospezifität wird von den AS-Resten in der Sloane-Position (V und H/F) beeinflusst. Sie begrenzen den Zugang zu dem Arginin-Rest am Boden der Bindetasche und steuern damit die Substrat-Orientierung. Im Gegensatz zu dem konservierten Alanin-Rest (A) von (*S*)-LOX ermöglicht ein Glycin-Rest (G) in der Coffa-Position eine Oxidation nahe dem katalytischen Eisen-Ion (Fe) und bewirkt damit (*R*)-LOX-Spezifität.

Im Fall von LOX1:Md:1a dringen Fettsäure-Substrate wahrscheinlich mit dem Carboxy-Ende voran in das aktive Zentrum ein. Das Enzym trägt einen Valin-Rest (V582) in der Sloane-Position, der eine Salzbrücken-Bildung zwischen dem Carboxy-Ende des Substrats und dem konservierten Arginin (R732) am Boden der Tasche erlaubt. Dies könnte auch erklären, warum die Mutation von R268, als alternativen Bindungspartner nahe dem Zugang zum aktiven Zentrum, keinen Einfluss auf die Spezifität der LOX-Reaktion mit allen drei getesteten Substraten hatte. Die Mutation von I566 zu Phenylalanin, welche eine sterische Hinderung dieser Bindung bewirken sollte, führte dagegen zu einem fast vollständigen Verlust enzymatischer Aktivität. Der Isoleucin-Rest grenzt an den Eingang der Substrat-Bindetasche und liegt in Helix 11 von LOX1:Md:1a zusammen mit einer Reihe konservierter Aminosäuren, die Einfluss auf die kinetische Effizienz und Regiospezifität von LOX ausüben (Coffa *et al.*, 2005a). Die Mutation von I566 zu dem wesentlich größeren Phenylalanin-Rest könnte eine Einengung des Kanals zur Substrat-Bindetasche bewirkt haben. Der beschränkte Zugang zum aktiven Zentrum führte dann vermutlich zum Verlust der katalytischen Aktivität der Mutante.

Der Versuch, die Spezifität von LOX1:Md:1a zugunsten von 13(*S*)-LOX-Aktivität zu ändern, war nicht erfolgreich. Die V582F-Mutante, welche zur Substratbindung in aufrechter Orientierung führen sollte, produzierte dennoch 13(*R*)-HpODE und geringe Mengen 9-HpODE, bestehend aus einem racemischen Gemisch beider Enantiomere (Tabelle 3.5). Die Substitution einer kleinen Aminosäure in Sloane-Position mit einem Histidin- oder Phenylalanin-Rest ist für gewöhnlich in der Lage eine 9-LOX oder LOX mit dualer Spezifität in eine reine 13-LOX zu konvertieren und umgekehrt (Hornung *et al.*, 1999; Hornung *et al.*, 2008). In manchen Fällen ist die Größe dieses AS-Restes jedoch nicht der einzige Einflussfaktor auf die Spezifität einer LOX (Hughes *et al.*, 2001b). Die unveränderte Stereochemie des von der V582F-Mutante gebildeten 13-Hydroperoxids deutet darauf hin, dass Fettsäure-Substrate trotzdem in inverser Orientierung im aktiven Zentrum binden, wie es beispielweise auch für eine 13-LOX aus Sojabohne und die V576F-Mutante von LOX1 aus Kartoffel vorgeschlagen wurde (Ruddat *et al.*, 2004; Andreou *et al.*, 2009). Der Phenylalanin-Rest könnte jedoch die Oxidation an der C₉-Position des Substrats räumlich stören und damit die unspezifische Bildung von 9-Hydroperoxiden bewirken.

Diskussion

Der bedeutende Einfluss einer einzigen Aminosäure im aktiven Zentrum auf die Regio- und Stereospezifität von Lipoxgenasen wurde erst kürzlich von Coffa & Brash (2004) beschrieben. Die sogenannte Coffa-Position ist konserviert als ein Alanin in (S)-LOX und ein Glycin in (R)-LOX. Der Nachweis dieser Theorie wurde mittels Mutagenese-Versuchen angetreten, in denen der Austausch von Alanin mit Glycin Wildtyp-(S)-LOX in (R)-LOX mit dualer Regiospezifität umwandelte (Coffa *et al.*, 2005a; Boeglin *et al.*, 2008). Die Mutation von G567 in LOX1:Md:1a zu Alanin konvertierte die 13/9(R)-LOX zu einer 9(S)-LOX mit einer Produktbildung ähnlich der von LOX1:Md:1c (Tabelle 3.5). Darüber hinaus wurde eine 10fache beziehungsweise 8,5fache Zunahme an katalytischer Aktivität mit LA und LnA beobachtet (Tabelle 3.6). In gleicher Weise verursachte der Austausch von Alanin mit Glycin eine 6fache Abnahme des LA-Umsatzes in LOX1 aus Sojabohne (Coffa *et al.*, 2005a). Daher wird angenommen, dass die Größe des AS-Restes in der Coffa-Position nicht nur Auswirkungen auf den Sauerstoff-Angriff an das aktivierte Pentadienyl-Radikal hat, sondern auch die Art der Interaktion zwischen dem Substrat und dem katalytischen Eisen-Zentrum beeinflusst (Coffa *et al.*, 2005a). Im Allgemeinen wird vermutet, dass mit der stereochemischen Kontrolle der LOX-Aktivität ein Wechsel der Oxidations-Position auf dem Substrat einhergeht (Coffa & Brash, 2004). Ein Glycin-Rest ermöglicht die Oxidation nahe dem katalytischen Eisen-Ion und führt zu (R)-konfigurierten Produkten (Abbildung 4.1, III und IV), während durch den größeren Alanin-Rest die Oxidation nur tief im aktiven Zentrum stattfinden kann, was zur Bildung von (S)-Hydroperoxiden beiträgt (Abbildung 4.1, I und II). Eine Umkehrung der Substrat-Orientierung im aktiven Zentrum ist daher keine essentielle Voraussetzung für die Bildung von 9- und 13-Hydroperoxiden mit demselben Enzym. Ein ähnlicher Effekt, wurde auch für die spezifische Oxidation von Arachidonsäure beobachtet. Wildtyp-LOX1:Md:1a produzierte größtenteils 15-HpETE (41,5% des Hydroperoxid-Produkts) und geringe Mengen an 12-, 9- und 11-HpETE (jeweils etwa 12-17% des Produkts, Anhang XXII, Tabelle 4.2). Die Mutation von G567 schien dagegen die Oxidation an der C₁₁- und C₅-Position von AA zu begünstigen. Unter Berücksichtigung der zuvor erwähnten Theorie zur Stereokontrolle von LOX kann damit eine inverse Orientierung der Arachidonsäure im aktiven Zentrum von LOX1:Md:1a angenommen werden. Zu diesem Schluss kamen auch Boeglin *et al.* (2008), die bei

der Mutation der 9(S)-LOX AtLOX1 und TomLOXA einen vergleichbaren Wechsel an Produkt-Spezifität mit AA beobachteten.

Darüber hinaus wurde ein Modell der räumlichen Kontrolle der LOX-Aktivität vorgeschlagen, in dem Sauerstoff durch einen postulierten Seitenkanal gerichtet an eine bestimmte Stelle des Substrates geleitet wird (Knapp *et al.*, 2001). In LOX1:Md:1a grenzen drei AS-Reste (L521, L572, I578) an die Stelle, wo der postulierte Kanal auf die Substrat-Bindetasche trifft. Interessanterweise entspricht I578 einem Isoleucin-Rest, der vermutlich die Sauerstoff-Verfügbarkeit in LOX-1 aus Sojabohne bestimmt (Knapp *et al.*, 2001; Ivanov *et al.*, 2010). Die Mutation der korrespondierenden Position (I553) in der Sojabohnen-LOX zu einem größeren Phenylalanin schien den potenziellen Sauerstoff-Kanal einzuengen und führte zu einem drastischen Verlust an katalytischer Aktivität (Knapp & Klinman, 2003). Obwohl die Mutation von I578 zu Leucin kaum einen Einfluss auf die Aktivität von LOX1:Md:1a hatte, verlor rekombinantes I578L-Protein an Regiospezifität und bildete geringfügig mehr 9-Hydroperoxide von LA und LnA (Tabelle 3.5). Die Mutation von L572 zu Isoleucin schien dagegen den Sauerstoff-Zutritt in das aktive Zentrum stark zu limitieren und führte ähnlich wie die I553F-Mutation in Sojabohnen-LOX-1 zu einem beinahe kompletten Verlust der LOX-Aktivität des Enzyms. Unter der Annahme, dass ein Isoleucin-Rest an Position 578 von LOX1:Md:1a eine räumliche Lenkung des Sauerstoffs in Richtung der C₁₃-Position von LA und LnA begünstigt, könnte die Mutation zu Leucin dem Sauerstoff einen besseren Zugang zu der C₉-Position tiefer im Inneren der Substrat-Bindetasche ermöglichen und damit die Abnahme an Regiospezifität erklären. Bei der Reaktion mit AA produzierte die I578L-Mutante zudem größere Mengen an 9- und 5-HpETE, während zeitgleich der Anteil von 15-HpETE abnahm. Beide Beobachtungen unterstützen die These einer räumlichen Kontrolle der Fettsäure-Oxidation dank eines separaten Sauerstoff-Kanals.

Dagegen ist der beobachtete Verlust von Aktivität der T775L-Mutante nur schwer zu erklären. Position T775 liegt in der Wand der Substrat-Bindetasche von LOX1:Md:1a gegenüber vom postulierten Sauerstoff-Kanal und begrenzt seinerseits einen Kanal, der in das aktive Zentrum mündet. Ob es sich dabei um eine alternative Route für Sauerstoff handeln könnte, ist unklar. Sicher ist, dass der Austausch mit dem

korrespondierenden Leucin-Rest von LOX1:Md:1c einen 70%igen Verlust an katalytischer Aktivität mit LA und LnA zur Folge hatte. Interessanterweise ist in dem dreidimensionalen Modell von LOX1:Md:1c kein Kanal an dieser Stelle zu finden. Die T775L-Mutation könnte allerdings die Form der Tasche in einer Weise verändert, die es Substraten nur schwer ermöglicht im aktiven Zentrum von LOX1:Md:1a zu binden.

4.4 Physiologische Funktion von LOX-Kandidaten in der Pflanze

Die konkrete Bestimmung physiologischer Funktionen von Lipoxygenasen stellt aus verschiedenen Gründen eine enorme Herausforderung dar: Pflanzliche LOX treten in Multigenfamilien mit bis zu 20 oder mehr Isoformen auf (Shin *et al.*, 2008; Podolyan *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011). Im Apfel wurden insgesamt 23 potenziell funktionelle LOX-Gene identifiziert (Vogt *et al.*, 2013b), von denen mindestens 17 während der Reife in der Fruchtschale exprimiert sind (Contreras & Beaudry, 2013b). Das Vorkommen mehrerer Isoformen in einer Zelle erschwert jedoch die Zuordnung distinkter physiologischer Funktionen (Grayburn *et al.*, 1991; Feussner & Kindl, 1994). Jedes Gen besitzt darüber hinaus ein zeitliches und räumliches Expressionsmuster, welches durch ein entwicklungspezifisches Programm oder biotischen und abiotischen Stress bestimmt wird (Saravitz & Siedow, 1995; Griffiths *et al.*, 1999). Von 14 untersuchten LOX-Genen des Apfels war keines nur in einem bestimmten Gewebe exprimiert (Vogt *et al.*, 2013b). Abhängig vom Gewebe und ihrer intrazellulären Lokalisation könnten diese Isoformen daher multiple physiologische Funktionen erfüllen.

Viele Lipoxygenasen katalysieren zudem die Bildung einer Mischung von Regio- und Stereoisomeren (Van Os *et al.*, 1979; Hughes *et al.*, 2001b; Jang *et al.*, 2007) und können damit Ausgangsstoffe für verschiedene Stoffwechselwege bereitstellen. Dabei spielt die intrazelluläre Lokalisation der Hydroperoxid-Produktion eine entscheidende Rolle: Wie kürzlich gezeigt wurde, sind AOS und HPL in unterschiedlichen Membranen des Chloroplasten lokalisiert (Froehlich *et al.*, 2001). Es ist denkbar, dass verschiedene LOX-Isozyme an die Membranen binden und damit zu einem bestimmten Stoffwechselweg beitragen (Porta & Rocha-Sosa, 2002). Pflanzliche Lipoxygenasen liegen entweder als zytoplasmatische oder Membran-gebundene Enzyme vor. Letztere können mit einer Reihe von Zellorganellen, wie

zum Beispiel Vakuolen (Grayburn *et al.*, 1991), Lipidkörpern (Feußner & Kindl, 1992; Yadav & Bhatla, 2011), Mikrosomen (Feussner & Kindl, 1994) und Chloroplasten (Feussner *et al.*, 1995; Heitz *et al.*, 1997), assoziiert sein. Allerdings wurde auch für zytoplasmatische LOX eine Kalzium-vermittelte Membranbindung (Tatulian *et al.*, 1998) oder Translokation in den Chloroplasten (Cho *et al.*, 2011) beschrieben. Neben der entwicklungspezifischen Regulation durch Genexpression gibt es also noch einen räumlichen Mechanismus, welcher die Beteiligung von Hydroperoxiden an bestimmten Stoffwechselwegen beeinflusst.

Des Weiteren entscheidet die Substratspezifität der Enzyme stromabwärts von der Hydroperoxid-Produktion über die spezifische Metabolisierung von Isomeren. So bildet die LOX-Aktivität in Tomaten 9(*R*)- und 13(*S*)-HpODE aus Linolsäure (Matthew *et al.*, 1977). Allerdings wird nur das mengenmäßig deutlich geringere 13-Isomer durch die in der Frucht vorhandene HPL-Aktivität umgewandelt, während das 9-Isomer im Gewebe akkumuliert (Galliard *et al.*, 1977). Auch das erfüllt gewisse physiologische Funktionen. So weisen viele primäre Produkte des LOX-Weges bereits biologische Aktivität auf: HpODE, HpOTE, ihre Hydroxide und verschiedene davon abgeleitete Oxylipine besitzen bereits fungizide und antimikrobielle Wirkung (Shimura *et al.*, 1983; Kato *et al.*, 1992; Kato *et al.*, 1993) und werden bei Pathogen-Infektion zügig in der Pflanze akkumuliert (Li *et al.*, 1991).

Eine konkrete Aussage über distinkte physiologische Funktionen einzelner LOX-Isozyme kann daher oft nur dann getroffen werden, wenn gewisse Faktoren, wie die räumliche und zeitliche Expression, die intrazelluläre Lokalisation, das entwicklungs-spezifische Angebot an Substraten sowie die Spezifität der LOX und Hydroperoxid-umsetzenden Enzyme, in Betracht gezogen wurden.

4.4.1 Metabolisierung von Hydroperoxiden im Apfel

Die vier in dieser Arbeit charakterisierten Lipoxygenasen sind alle hochgradig in der Fruchtschale des Apfels exprimiert, wobei zwei Gene reifeabhängige Änderungen in ihrer Expression aufweisen (Contreras & Beaudry, 2013b). *MdLOX2a* wird besonders in der frühen Phase der Fruchtreife exprimiert und stellt bei Gewebeverletzung vermutlich Hydroperoxide für die Synthese diverser Oxylipine zur Verfügung. *MdLOX1a* wird dagegen erst in der späten Phase der Fruchtreife exprimiert und könnte durch die Ethylen-induzierte Freisetzung von Fettsäuren auch im intakten

Gewebe Funktionen erfüllen. Beide Kandidaten produzieren für pflanzliche LOX eher untypische 13(*R*)-Hydroperoxide. Diese stehen bei Gewebeerstörung somit während der gesamten Fruchtreife zur Verfügung und werden vermutlich durch spezifische Stoffwechselwege im Apfel metabolisiert. Während es sich bei LOX1:Md:1a jedoch um ein zytosolisches Enzym handelt, besitzt LOX2:Md:2a ein potenzielles Chloroplasten-Targetingsignal (Vogt *et al.*, 2013b). Es ist daher wahrscheinlich, dass die von ihnen produzierten Hydroperoxide von verschiedenen Enzymen umgesetzt werden.

4.4.1.1 Der Allenoxid-Synthase-Stoffwechselweg

Der AOS-Weg ist einer der am besten untersuchten Reaktionswege der Oxylipin-Biosynthese (Abbildung 1.3). Seine primäre Reaktion wird durch die Allenoxid-Synthase, eine Cytochrom-P450-Monooxygenase (Unterfamilie *CYP74A*), katalysiert und führt zur Bildung instabiler Allenoxide. Diese können entweder spontan zu α - und γ -Ketolen zerfallen oder werden zu 12-Oxophytodiensäure zyklisiert und tragen damit zur Jasmonat-Biosynthese bei (Song & Brash, 1991). Der komplette Reaktionsweg schließt verschiedene Kompartimente der Zelle ein. Die primären Reaktionsschritte, inklusive der von LOX und AOS katalysierten, finden aber vermutlich im Chloroplasten statt (Vick & Zimmerman, 1987; Blee & Joyard, 1996). Ein Großteil der charakterisierten AOS besitzt hohe Spezifität für die Metabolisierung von 13-Hydroperoxiden (Laudert *et al.*, 1996; Howe *et al.*, 2000). Es gibt jedoch auch Enzyme, die *in vitro* zur Umsetzung beider Regioisomere fähig sind (Maucher *et al.*, 2000).

Bislang existiert kein Bericht über die Charakterisierung von Allenoxid-Synthasen aus dem Kulturapfel. Die vielfältigen Wirkungen der Produkte des AOS-Weges auf verschiedene Wachstums- und Entwicklungsprozesse sind dagegen gut untersucht. Speziell während der Fruchtreife wurden eine Reihe stimulierender und hemmender Effekte von Methyljasmonat auf die Synthese von Ethylen (Fan *et al.*, 1997; Kondo *et al.*, 2005), das Aroma (Olias *et al.*, 1992; Fan *et al.*, 1997) sowie die Farbentwicklung des Apfels (Pérez *et al.*, 1993; Kondo *et al.*, 2001) beobachtet. Seine Wirkung ist allerdings entwicklungspezifisch und damit im hohen Maß vom Reifegrad der Frucht abhängig (Fan *et al.*, 1997; Kondo *et al.*, 2005).

Dass die Metabolisierung von Hydroperoxiden über den AOS-Stoffwechselweg von Bedeutung ist, zeigen die vergleichsweise hohen Mengen an Jasmonsäure und Methyljasmonat in Äpfeln (Meyer *et al.*, 1984). Für eine Beteiligung an deren Bildung könnten LOX2:Md:2a und LOX2:Md:2b aufgrund ihrer putativen Lokalisation im Chloroplasten in Frage kommen. Beide Enzyme produzieren vor allem 13-Hydroperoxide, die mit hoher Spezifität entweder (*R*)- (LOX2:Md:2a) oder (*S*)-konfiguriert (LOX2:Md:2b) sind. Untersuchungen zur Stereoselektivität von AOS gibt es bisher keine. Im Apfel wurden jedoch gleich zwei LOX-Isozyme identifiziert, die *in vitro* zur Bildung (*R*)-konfigurierter Substrate der AOS fähig waren. Eine ausführliche Charakterisierung der Enzyme stromabwärts von der Hydroperoxid-Produktion könnte helfen, den Beitrag von 13(*R*)-Hydroperoxiden zu einzelnen Stoffwechselwegen zu bestimmen.

4.4.1.2 Der Hydroperoxid-Lyase-Weg

Der HPL-Weg ist ein zweiter wichtiger Stoffwechselweg für die Metabolisierung von Hydroperoxiden in Pflanzen (Abbildung 1.3). Der Reaktionsweg beginnt mit der oxidativen Spaltung von Hydroperoxiden durch die Hydroperoxid-Lyase, welche ebenso ein Mitglied der Cytochrom-P450-Monooxygenasen ist. Die Spaltung von 13-HpODE (oder 13-HpOTE) führt zur Bildung von 12-Oxo-9(*Z*)-dodecensäure, einem Vorläufer des Traumatins, und dem C₆-Aldehyd Hexanal (oder 3(*Z*)-Hexenal). Bei Reaktion mit 9-HpODE (oder 9-HpOTE) entstehen dagegen 9-Oxononansäure und 3(*Z*)-Nonenal (oder 3(*Z*),6(*Z*)-Nonadienal) (Matsui, 1998, 2006). 3(*Z*)-Aldehyde können im Anschluss entweder zu 2(*E*)-Aldehyden isomerisieren (Phillips *et al.*, 1979; Noordermeer *et al.*, 1999) oder durch Alkohol-Dehydrogenasen zu ihren korrespondierenden Alkoholen reduziert werden (Hatanaka *et al.*, 1995). Während die meisten am HPL-Weg beteiligten Enzyme vermutlich zytosolisch vorliegen, ist der primäre Reaktionsschritt, der zur Bildung von C₆- und C₉-Aldehyden führt, häufig in den Hüllmembranen des Chloroplasten lokalisiert (Vick & Zimmerman, 1987; Blee & Joyard, 1996; Froehlich *et al.*, 2001). Aus etiolierten Pflanzengewebe wurden aber auch lösliche HPLs isoliert, die entweder zytosolisch lokalisiert oder nur lose mit Membranen assoziiert sind (Fukushige & Hildebrand, 2005).

Die Zusammensetzung der bei Gewebeerstörung gebildeten Aldehyde ändert sich im Laufe der Fruchtreife (Sapers *et al.*, 1977; Paillard, 1986; Defilippi *et al.*, 2005).

Diskussion

Bis heute ist nicht abschließend geklärt, wie groß der Einfluss einzelner Faktoren, wie der gesteigerten Verfügbarkeit freier Fettsäuren gegen Ende der Fruchtreife und Änderungen in der Aktivität der beteiligten Enzyme, ist. Ähnlich wie in anderen Früchten könnte die HPL-Spezifität im Apfel allerdings einen entscheidenden Beitrag leisten (Matsui *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 1998). Besonders da viele HPLs für ihr vergleichsweise enges Substrat-Spektrum bekannt sind (Howe *et al.*, 2000; Fukushige & Hildebrand, 2005) und die Aldehyd-Zusammensetzung damit stark von dem entwicklungspezifisch vorhandenen Set an Isozymen abhängig ist. Es wird angenommen, dass bis zu sieben HPL-Gene im Kulturapfel existieren (Velasco *et al.*, 2010). Schaffer *et al.* (2007) berichteten von einer potenziellen EST-Sequenz aus der Frucht; fanden im Gegensatz zu zwei LOX, einer ADH und einer AAT des Apfels jedoch keine Ethylen-induzierte Änderung in dessen Expression.

Untersuchungen der HPL-Aktivität in Homogenaten reifer Äpfel zeigten, dass LA und LnA fast ausschließlich zu Hexanal und Hexenal umgesetzt werden (Drawert *et al.*, 1966; Tressl *et al.*, 1970). Wenig später wurde eine Membran-gebundene HPL aus der Frucht isoliert, welche *in vitro* ebenso spezifisch mit 13-HpODE und -HpOTE reagierte (Schreier & Lorenz, 1982). Allerdings wurden dabei Hydroperoxide aus der Reaktion mit Lipoxygenasen aus Sojabohne (Heimann & Schreier, 1971) und Tomate (Matthew *et al.*, 1977) getestet, deren Hauptprodukte 13(*S*)- und 9(*R*)-Konfiguration aufweisen. 9(*R*)-HpODE wird im Apfel nur in sehr geringen Mengen gebildet (Beuerle & Schwab, 1999) und ist damit vermutlich eher von untergeordneter physiologischer Bedeutung. Dass die HPLs in Früchten dennoch zur Bildung geringer Mengen von C₉-Aldehyden fähig sind, wurde für die Sorten Cox Orange und Elstar nachgewiesen (Fuhrmann & Grosch, 2002). Die meisten bislang charakterisierten HPLs in Pflanzen setzen ausschließlich 13-Hydroperoxide um und werden daher zu der *CYP74B*-Familie gezählt. Mitglieder der *CYP74C*-Familie reagieren *in vitro* dagegen mit 9- und 13-Hydroperoxiden (Feussner & Wasternack, 2002). Die im Apfel enthaltenen Isozyme scheinen zur Umsetzung beider Isomere fähig zu sein. Aufgrund der geringen Metabolisierung von 9-Hydroperoxiden handelt es sich bei der Mehrzahl vermutlich dennoch um Mitglieder der *CYP74B*-Familie.

Abhängig von der Lokalisation der HPLs in der Zelle könnten sowohl Hydroperoxide aus dem Zytosol als auch aus dem Stroma des Chloroplasten metabolisiert werden.

Auf Grund der durch sie bereitgestellten 13-Hydroperoxide kommen daher vor allem LOX1:Md:1a, als auch LOX2:Md:2a und LOX2:Md:2b für eine Beteiligung am HPL-Weg in Frage. Die Umsetzung von 13(*S*)-HpODE und -HpOTE im Apfel wurde bereits demonstriert (Drawert *et al.*, 1966; Schreier & Lorenz, 1982). Die Hauptprodukte von LOX1:Md:1a und LOX2:Md:2a sind dagegen 13(*R*)-konfiguriert. Vor allem LOX1:Md:1a scheint einen essentiellen Beitrag zur Hydroperoxid-Bildung in der reifen Frucht zu leisten und ist damit ein wichtiger Kandidat für die Bildung flüchtiger Aromastoffe über den HPL-Weg. Grundsätzlich wird angenommen, dass Hydroperoxid-Lyase ausschließlich (*S*)-Enantiomere metabolisieren (Gardner & Grechkin, 2002). Es gibt allerdings nur wenige Veröffentlichungen, die deren Selektivität ausführlich untersucht haben (Kajiwara *et al.*, 1982; Gardner *et al.*, 1991). Ein Großteil der Enzyme wurde dagegen einzig auf die Umsetzung (*S*)-konfigurierter Hydroperoxide getestet. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob die HPLs des Apfels 13(*R*)-Hydroperoxide als Substrate akzeptieren.

Alternativ wäre denkbar, dass ähnlich wie in Tomate das geringere 13(*S*)-Produkt ausreicht, um eine Aroma-Synthese während der späten Phase der Reifung zu gewährleisten (Galliard *et al.*, 1977). Immerhin 12% des *in vitro* von LOX1:Md:1a gebildeten Produktes bestand aus 13(*S*)-HpODE und auch *in vivo* wurde es in Form von 13(*S*)-HODE in gelagerten Äpfeln nachgewiesen (Beuerle & Schwab, 1999).

4.4.1.3 Die Lipoxygenase-katalysierte Umsetzung von Hydroperoxiden

Für Lipoxygenasen sind darüber hinaus eine Reihe sekundärer Reaktionen mit Hydroperoxiden bekannt, die zu der Bildung von Ketonen (Kühn *et al.*, 1991), Epoxyhydroxy-Derivaten (de Groot *et al.*, 1975) und C₅-Aldehyden (Garssen *et al.*, 1971; Shen *et al.*, 2014) führen (Abbildung 1.3). Hydroxyoctadecadiensäure (HODE) und Ketoctadecadiensäure (KODE) sind die häufigsten sekundären Produkte der Lipid-Peroxidation von Linolsäure (Kuklev *et al.*, 1997). Letzteres entsteht durch die homolytische Spaltung der O-O-Bindung in Hydroperoxiden. Dabei werden Alkoxy-Radikale gebildet, die sich anschließend zu Ketonen umformen (Kühn *et al.*, 1991).

Die Hauptprodukte der LA-Metabolisierung in gelagerten Äpfeln sind 13(*R*)-HODE, 13-KODE, 9(*S*)-HODE, 9-KODE und Trihydroxyoctadecensäuren (Beuerle & Schwab, 1999). Wie bereits erwähnt, weisen die Produkte hohe Ähnlichkeit zu den *in vitro* von LOX1:Md:1a gebildeten Hydroperoxiden auf. Das Verhältnis von 9- und 13-Isomeren

betrug jeweils 1:10 für KODE und 1:4 für HODE mit enantiomerischen Überschüssen von 9(*S*)- und 13(*R*)-HODE (65% und 75%) (Beuerle & Schwab, 1999). Im Vergleich dazu setzte LOX1:Md:1a Linolsäure im Verhältnis 1:8 um und bildete jeweils 71% und 87% Überschuss an 9(*S*)- und 13(*R*)-H(p)ODE. Das *in vivo* beobachtete, niedrigere Verhältnis von 9- und 13-HODE, könnte für eine selektive Metabolisierung von 13-HpODE über alternative Stoffwechselwege sprechen. Dass diese potenzielle Umsetzung nicht in der Akkumulation des 13(*R*)-Enantiomers resultierte, deutet an, dass im Apfel Mechanismen zur Metabolisierung (*R*)-konfigurierter Hydroperoxide existieren.

4.5 Relevanz für die wirtschaftlichen Eigenschaften des Apfels

Die Wirkungen des LOX-Stoffwechselweges während der Entwicklung des Apfels sind mannigfaltig. Er beeinflusst die Fruchteigenschaften nicht nur durch die Bereitstellung von Vorläufern für Aromastoffe, sondern auch durch seinen Beitrag zur Reifung (Fan *et al.*, 1997; Kondo *et al.*, 2005) und Ausbildung wichtiger Qualitätsmerkmale (Pérez *et al.*, 1993; Kondo *et al.*, 2001). Beim Tafelapfel spielen vor allem das Erscheinungsbild, die Fruchtqualität (Geruch, Geschmack und Konsistenz) und die Lagerfähigkeit der Früchte eine Rolle. Je nach Art der Verwendung können die Anforderungen aber variieren.

4.5.1 Einfluss auf die Lagerfähigkeit

Die Lagerfähigkeit von Äpfeln entscheidet im hohen Maß darüber wie lange der Markt mit einer Sorte versorgt werden kann (Rühmer *et al.*, 2006). Die Ansprüche an die Fruchtqualität sind hoch, daher müssen Äpfel auch nach Langzeitlagerung konstante Eigenschaften in Aussehen, Geruch und Geschmack aufweisen. In Golden Delicious beispielsweise ist das Aroma das anfälligste Qualitätsmerkmal (Gorin *et al.*, 1975). Die Langzeitlagerung bei niedrigen Sauerstoff- oder hohen Kohlendioxid-Konzentrationen führt neben der Bildung unerwünschter Aromen (Mattheis *et al.*, 1991a), auch zu einer gehemmten Fruchtreife und Aroma-Synthese (Brackmann *et al.*, 1993; Rudell *et al.*, 2002) sowie lagerbedingten Schäden an der Frucht (Feys *et al.*, 1980; Marcelle, 1989).

Marcelle (1989) beobachtete einen Zusammenhang von hoher LOX-Aktivität mit dem gehäuften Auftreten physiologischer Störungen während der Reifung im Kühllager.

Die LOX-Aktivität im gelagerten Apfel steigt auch bei 3,5°C stetig an und trägt so vermutlich zur unerwünschten Verbräunung von Fruchtfleisch und Kerngehäuse bei (Feys *et al.*, 1980). Von den untersuchten Apfel-LOX zeigte vor allem LOX2:Md:2b eine hohe Aktivität bei niedrigen Temperaturen (Abbildung 3.9). LOX1:Md:1a besaß bei 5°C zwar nur einen Bruchteil seiner maximalen Aktivität, könnte aber durch seine steigende Genexpression während der Lagerung zur beobachteten Zunahme der LOX-Aktivität in der Frucht beitragen. Darüber hinaus gilt die LOX-Aktivität als ein limitierender Faktor der Synthese-Kapazität unverzweigter Fruchtester nach Langzeitlagerung bei niedrigen Sauerstoff-Konzentrationen (Altisent *et al.*, 2009). Die Früchte besitzen dann zwar in der Regel ein ansprechendes Äußeres, entfalten aber nicht ihr charakteristisches Aroma (Yahia, 1994).

4.5.2 Bedeutung in der Herstellung von Säften

Im Gegensatz zum intakten Apfel spielt für das Aroma von Säften auch das bei der Verarbeitung gebildete Hexanal, 3(*Z*)-Hexenal und 2(*E*)-Hexenal eine Rolle (Drawert *et al.*, 1966; Steinhaus *et al.*, 2008). Die C₆-Aldehyde bestimmen nicht nur den Geruch und Geschmack (Gardner & Grechkin, 2002) sondern auch die Haltbarkeit von Lebensmitteln (Hubert *et al.*, 2008). Ihr Gehalt wird von mehreren Faktoren, wie der Temperatur, dem pH und der Sauerstoffzufuhr beim Zerkleinern der Früchte, beeinflusst (Almosnino *et al.*, 1996; Su & Wiley, 1998). Als ein kritischer Parameter bei der Herstellung gilt vor allem die Standzeit der Maische zwischen Mahlen und Pressung (Schieberle, 2007). In der industriellen Verarbeitung sind nur sehr kurze Standzeiten üblich, um eine unerwünschte Bräunung des Saftes zu verhindern. Dadurch bleibt die erreichbare Ausbeute wichtiger Aromastoffe aber nur gering. Die Saft-Bräunung lässt sich zwar durch Senkung des pH-Wertes mit Ascorbinsäure hemmen, reduziert aber zeitgleich die enzymatische Produktion von C₆-Aldehyden (Schieberle, 2007). Damit übereinstimmend, zeigten die vier in dieser Arbeit untersuchten Lipoxygenasen pH-Optima in einem neutralen bis schwach sauren Bereich und einen deutlichen Abfall enzymatischer Aktivität bei pH-Werten unter 5,0. Die enzymatische Aktivität der LOX wirkt also im hohen Maß limitierend auf die Bildung von Aromastoffen im Saft.

Literaturverzeichnis

- Almosnino AM, Bensoussan M, Belin JM (1996) Unsaturated fatty acid bioconversion by apple pomace enzyme system. Factors influencing the production of aroma compounds. *Food Chem* **55(4)**: 327-332
- Altisent R, Echeverría G, Graell J, López L, Lara I (2009) Lipoxygenase activity is involved in the regeneration of volatile ester-synthesizing capacity after ultra-low oxygen storage of 'Fuji' apple. *J Agric Food Chem* **57(10)**: 4305-4312
- Andreou A-Z, Hornung E, Kunze S, Rosahl S, Feussner I (2009) On the substrate binding of linoleate 9-lipoxygenases. *Lipids* **44(3)**: 207-215
- Andreou A, Feussner I (2009) Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry* **70(13–14)**: 1504-1510
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22(2)**: 195-201
- Bangerth F, Streif J, Song J, Brackmann A (1998) Investigations into the physiology of volatile aroma production of apple fruits. *Acta Hort (ISHS)* **464**: 189-194
- Bartley IM (1985) Lipid metabolism of ripening apples. *Phytochemistry* **24(12)**: 2857-2859
- Began G, Sudharshan E, Appu Rao AG (1999) Change in the positional specificity of lipoxygenase 1 due to insertion of fatty acids into phosphatidylcholine deoxycholate mixed micelles. *Biochemistry* **38(42)**: 13920-13927
- Berry H, Débat H, Garde VL (1998) Oxygen concentration determines regioselectivity in soybean lipoxygenase-1 reaction via a branched kinetic scheme. *J Biol Chem* **273(5)**: 2769-2776
- Bertani G (1951) Studies on lysogeny. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62(3)**: 293
- Beuerle T, Schwab W (1999) Metabolic profile of linoleic acid in stored apples: Formation of 13(*R*)-hydroxy-9(*Z*),11(*E*)-octadecadienoic acid. *Lipids* **34(4)**: 375-380
- Bild GS, Ramadoss CS, Axelrod B (1977) Effect of substrate polarity on the activity of soybean lipoxygenase isoenzymes. *Lipids* **12(9)**: 732-735
- Bisakowski B, Kermasha S, Schuepp C (1995) Partial purification and some properties of lipoxygenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **11(5)**: 494-496
- Blée E (1998) Phytooxylipins and plant defense reactions. *Progress in Lipid Research* **37(1)**: 33-72
- Blee E, Joyard J (1996) Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Plant Physiol* **110(2)**: 445-454
- BMELV (2013) Der Gartenbau in Deutschland. Daten und Fakten. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, Referat 515, Bonn
- Boeglin WE, Itoh A, Zheng Y, Coffa G, Howe GA, Brash AR (2008) Investigation of substrate binding and product stereochemistry issues in two linoleate 9-lipoxygenases. *Lipids* **43(11)**: 979-987
- Boyer J, Liu RH (2004) Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal* **3(5)**: 15
- Boyes S, Perera C, Young H (1992) Kiwifruit lipoxygenase: Preparation and characteristics. *J Food Sci* **57(6)**: 1390-1394
- Boyington JC, Gaffney BJ, Amzel LM (1993) The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science* **260(5113)**: 1482-1486
- Brackmann A, Streif J, Bangerth F (1993) Relationship between a reduced aroma production and lipid metabolism of apples after long-term controlled-atmosphere storage. *J Am Soc Hort Sci* **118(2)**: 243-247

- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72(1)**: 248-254
- Brash AR, Baertschi SW, Ingram CD, Harris TM** (1988) Isolation and characterization of natural allene oxides: unstable intermediates in the metabolism of lipid hydroperoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85(10)**: 3382-3386
- Brown S** (2012) Apple. In ML Badenes, DH Byrne (Hrsg.), Fruit Breeding, Handbook of Plant Breeding. Bd. 8. Springer Science+Business Media, LLC
- Casey R, West SI, Hardy D, Robinson DS, Wu Z, Hughes RK** (1999) New frontiers in food enzymology: Recombinant lipoxygenases. *Trends Food Sci Technol* **10(9)**: 297-302
- Chapman KD** (1998) Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends Plant Sci* **3(11)**: 419-426
- Chen G, Hackett R, Walker D, Taylor A, Lin Z, Grierson D** (2004) Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (TomloxC) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant Physiol* **136(1)**: 2641-2651
- Chen X, Reddanna P, Reddy GR, Kidd R, Hildenbrandt G, Reddy CC** (1998) Expression, purification, and characterization of a recombinant 5-lipoxygenase from potato tuber. *Biochem Biophys Res Commun* **243(2)**: 438-443
- Cho K, Han Y, Woo JC, Baudisch B, Klösigen RB, Oh S, Han J, Han O** (2011) Cellular localization of dual positional specific maize lipoxygenase-1 in transgenic rice and calcium-mediated membrane association. *Plant Sci* **181(3)**: 242-248
- Coart E, Van Glabeke S, De Loose M, Larsen AS, Roldán-Ruiz I** (2006) Chloroplast diversity in the genus *Malus*: new insights into the relationship between the European wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) and the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.). *Mol Ecol* **15(8)**: 2171-2182
- Coffa G, Brash AR** (2004) A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: stereocontrol is linked to the position of oxygenation. *Proc Natl Acad Sci USA* **101(44)**: 15579-15584
- Coffa G, Imber AN, Maguire BC, Laxmikanthan G, Schneider C, Gaffney BJ, Brash AR** (2005a) On the relationships of substrate orientation, hydrogen abstraction, and product stereochemistry in single and double dioxygenations by soybean lipoxygenase-1 and its *Ala542Gly* mutant. *J Biol Chem* **280(46)**: 38756-38766
- Coffa G, Schneider C, Brash AR** (2005b) A comprehensive model of positional and stereo control in lipoxygenases. *Biochem Biophys Res Commun* **338(1)**: 87-92
- Contreras C, Beaudry R** (2013a) Lipoxygenase-associated apple volatiles and their relationship with aroma perception during ripening. *Postharvest Biol Technol* **82**: 28-38
- Contreras C, Beaudry R** (2013b) Lipoxygenase and apple aroma: Gene expression of lipoxygenase family members in apple peel. *HortScience* **48(9)**: S124 (Abstr.)
- Cornille A, Gladieux P, Smulders MJM, Roldán-Ruiz I, Laurens F, Le Cam B, Nersesyan A, Clavel J, Olonova M, Feugey L, Gabrielyan I, Zhang X-G, Tenailon MI, Giraud T** (2012) New insight into the history of domesticated apple: Secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. *PLoS Genet* **8(5)**: e1002703. doi:10.1371/journal.pgen.1002703
- Creelman RA, Mullet JE** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Biol* **48(1)**: 355-381
- Croft K, Juttner F, Slusarenko AJ** (1993) Volatile products of the Lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiol* **101(1)**: 13-24
- Crosby JA, Janick J, Pecknold PC, Korban SS, O'Connor PA, Ries SM-, Goffreda J, Voordeckers A** (1992) Breeding apples for scab resistance: 1945-1990. *Acta Hort (ISHS)* **317**: 43-70

Literaturverzeichnis

- Cunningham DG, Acree TE, Barnard J, Butts RM, Braell PA (1986) Charm analysis of apple volatiles. *Food Chem* **19(2)**: 137-147
- de Groot JJMC, Garssen GJ, Veldink GA, Vliegenthart JFG, Boldingh J (1975) On the interaction of soybean lipoxygenase-1 and 13-L-hydroperoxylinoleic acid, involving yellow and purple coloured enzyme species. *FEBS Lett* **56(1)**: 50-54
- Defilippi BG, Dandekar AM, Kader AA (2005) Relationship of ethylene biosynthesis to volatile production, related enzymes, and precursor availability in apple peel and flesh tissues. *J Agric Food Chem* **53(8)**: 3133-3141
- Dixon J, Hewett EW (2000) Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: a review. *N Z J Crop Hortic Sci* **28(3)**: 155-173
- Drawert F, Heimann W, Emberger R, Tressl R (1966) Über die Biogenese von Aromastoffen bei Pflanzen und Früchten, II., Enzymatische Bildung von Hexen-(2)-al-(1), Hexanal und deren Vorstufen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **694(1)**: 200-208
- Drawert F, Heimann W, Emberger R, Tressl R (1969) Über die Biogenese von Aromastoffen bei Pflanzen und Früchten, IV. Mitteilung, Bildung der Aromastoffe des Apfels im Verlauf des Wachstums und bei der Lagerung. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **140(2)**: 65-88
- Dunemann F, Ulrich D, Boudichevskaia A, Grafe C, Weber WE (2009) QTL mapping of aroma compounds analysed by headspace solid-phase microextraction gas chromatography in the apple progeny 'Discovery' x 'Prima'. *Mol Breed* **23(3)**: 501-521
- Ebel RC, Mattheis JP, Buchanan DA (1995) Drought stress of apple trees alters leaf emissions of volatile compounds. *Physiol Plant* **93(4)**: 709-712
- Fan X, Mattheis JP, Fellman JK, Patterson ME (1997) Effect of methyl jasmonate on ethylene and volatile production by summered apples depends on fruit developmental stage. *J Agric Food Chem* **45(1)**: 208-211
- FAO (2014) FAOSTAT database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://faostat.fao.org/default.aspx>, Datum des Zugriffs 14.01.2014
- Fellman JK, Miller TW, Mattinson DS, Mattheis JP (2000) Factors that influence biosynthesis of volatile flavor compounds in apple fruits. *HortScience* **35(6)**: 1026-1033
- Feussner I, Bachmann A, Höhne M, Kindl H (1998) All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipid body lipoxygenase *in vitro*. *FEBS Lett* **431(3)**: 433-436
- Feussner I, Hause B, Vörös K, Parthier B, Wasternack C (1995) Jasmonate-induced lipoxygenase forms are localized in chloroplasts of barley leaves (*Hordeum vulgare* cv. *Salomé*). *The Plant Journal* **7(6)**: 949-957
- Feußner I, Kindl H (1992) A lipoxygenase is the main lipid body protein in cucumber and soybean cotyledons during the stage of triglyceride mobilization. *FEBS Lett* **298(2-3)**: 223-225
- Feussner I, Kindl H (1994) Particulate and soluble lipoxygenase isoenzymes. *Planta* **194(1)**: 22-28
- Feussner I, Kühn H (2000) Application of lipoxygenases and related enzymes for the preparation of oxygenated lipids. In UT Bornscheuer (Hrsg.), *Enzymes in Lipid Modification*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, S. 309-336
- Feussner I, Kühn H, Wasternack C (2001) Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci* **6(6)**: 268-273
- Feussner I, Wasternack C (1998) Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids. *Lipid / Fett* **100(4-5)**: 146-152
- Feussner I, Wasternack C (2002) The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 275-297
- Feys M, De Mot R, Naesens W, Tobback P (1982) Solubilization, partial purification and properties of lipoxygenase from apples. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **174(5)**: 360-365

- Feys M, Naesens W, Tობback P, Maes E** (1980) Lipoxygenase activity in apples in relation to storage and physiological disorders. *Phytochemistry* **19(6)**: 1009-1011
- Fischer C** (1994) Nutzung von *Malus*-Wildarten und Kultursorten in der Resistenzzüchtung beim Apfel. *Vorträge für Pflanzenzüchtung* **27**
- Fischer M, Fischer C** (2008) The Pillnitz Re-series of apple cultivars – Do they hold promise? – 80 years of professional german fruit breeding 2008. *Erwerbs-Obstbau* **50(2)**: 63-67
- Froehlich JE, Itoh A, Howe GA** (2001) Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiol* **125(1)**: 306-317
- Fuhrmann E, Grosch W** (2002) Character impact odorants of the apple cultivars Elstar and Cox Orange. *Food / Nahrung* **46(3)**: 187-193
- Fukushige H, Hildebrand DF** (2005) Watermelon (*Citrullus lanatus*) hydroperoxide lyase greatly increases C6 aldehyde formation in transgenic leaves. *J Agric Food Chem* **53(6)**: 2046-2051
- Galliard T** (1968) Aspects of lipid metabolism in higher plants—II. The identification and quantitative analysis of lipids from the pulp of pre- and post-climacteric apples. *Phytochemistry* **7(11)**: 1915-1922
- Galliard T, Matthew JA, Wright AJ, Fishwick MJ** (1977) The enzymic breakdown of lipids to volatile and non-volatile carbonyl fragments in disrupted tomato fruits. *J Sci Food Agric* **28(9)**: 863-868
- Gardner HW** (1989) Soybean lipoxygenase-1 enzymically forms both (9S)- and (13S)-hydroperoxides from linoleic acid by a pH-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta* **1001(3)**: 274-281
- Gardner HW, Grechkin AN** (2002) Biocatalysis by the plant lipoxygenase pathway: Oxygenated fatty acid production and hydroperoxide lyases. In TM Kuo, HW Gardner (Hrsg.), Lipid Biotechnology. Marcel Dekker, Inc., New York, S. 157-182
- Gardner HW, Weisleder D, Plattner RD** (1991) Hydroperoxide lyase and other hydroperoxide-metabolizing activity in tissues of soybean, *Glycine max*. *Plant Physiol* **97(3)**: 1059-1072
- Garsen GJ, Vliegenthart JF, Boldingh J** (1971) An anaerobic reaction between lipoxygenase, linoleic acid and its hydroperoxides. *Biochem J* **122(3)**: 327-332
- Gasic K, Hernandez A, Korban SS** (2004) RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology Reporter* **22(4)**: 437-438
- Georgalaki MD, Bachmann A, Sotiroudis TG, Xenakis A, Porzel A, Feussner I** (1998) Characterization of a 13-lipoxygenase from virgin olive oil and oil bodies of olive endosperms. *Lipid / Fett* **100(12)**: 554-560
- Gillmor SA, Villaseñor A, Fletterick R, Sigal E, Browner MF** (1997) The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat Struct Mol Biol* **4(12)**: 1003-1009
- González-Agüero M, Troncoso S, Gudenschwager O, Campos-Vargas R, Moya-León MA, Defilippi BG** (2009) Differential expression levels of aroma-related genes during ripening of apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Plant Physiol Biochem* **47(5)**: 435-440
- Gorin N, Rudolphij JW, Heidema FT, Van Der Vuurst De Vries RG** (1975) Metabolites in golden delicious apples as possible parameters of acceptability. *J Sci Food Agric* **26(5)**: 599-607
- Goulao LF, Oliveira CM** (2007) Molecular identification of novel differentially expressed mRNAs up-regulated during ripening of apples. *Plant Sci* **172(2)**: 306-318
- Grayburn WS, Schneider GR, Hamilton-Kemp TR, Bookjans G, Ali K, Hildebrand DF** (1991) Soybean leaves contain multiple lipoxygenases. *Plant Physiol* **95(4)**: 1214-1218
- Griffiths A, Barry C, Alpuche-Solis AG, Grierson D** (1999) Ethylene and developmental signals regulate expression of lipoxygenase genes during tomato fruit ripening. *J Exp Bot* **50(335)**: 793-798

Literaturverzeichnis

- Grosch W, Laskawy G, Fischer K-H (1977) Positions-Spezifität der Peroxidierung von Linol- und Linolensäure durch Homogenate aus Äpfeln und Birnen. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **163(3)**: 203-205
- Guthrie C, Fink GR (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology. In JN Abelson, MI Simon (Hrsg.), *Methods in enzymology*. Bd. 194. Academic Press, San Diego, CA
- Halitschke R, Stenberg JA, Kessler D, Kessler A, Baldwin IT (2008) Shared signals – ‘alarm calls’ from plants increase apparency to herbivores and their enemies in nature. *Ecol Lett* **11(1)**: 24-34
- Han M, Zhang T, Zhao C, Zhi J (2011) Regulation of the expression of lipoxygenase genes in *Prunus persica* fruit ripening. *Acta Physiologiae Plantarum* **33(4)**: 1345-1352
- Harrison N, Harrison RJ (2011) On the evolutionary history of the domesticated apple. *Nat Genet* **43(11)**: 1043-1044
- Hatanaka A, Kajiwara T, Matsui K (1995) The biogenesis of green odour by green leaves and its physiological functions: Past, present and future. *Z Naturforsch* **50c**: 467-472
- Heimann W, Schreier P (1971) Über das Lipoxygenase-«Lipoperoxidase»-System in Cerealien: I. Untersuchung der Reaktionsprodukte. *Helv Chim Acta* **54(8)**: 2794-2803
- Heitz T, Bergey DR, Ryan CA (1997) A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol* **114(3)**: 1085-1093
- Heseker B, Heseker H (2007) Nährstoffe in Lebensmitteln. Umschau Zeitschriftenverlag, Sulzbach im Taunus
- Hornung E, Kunze S, Liavonchanka A, Zimmermann G, Kühn D, Fritsche K, Renz A, Kühn H, Feussner I (2008) Identification of an amino acid determinant of pH regioselectivity in a seed lipoxygenase from *Momordica charantia*. *Phytochemistry* **69(16)**: 2774-2780
- Hornung E, Walther M, Kühn H, Feussner I (1999) Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96(7)**: 4192-4197
- Horton RM (1995) PCR-mediated recombination and mutagenesis. *Mol Biotechnol* **3(2)**: 93-99
- Howe GA, Lee GI, Itoh A, Li L, DeRocher AE (2000) Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Physiol* **123(2)**: 711-724
- Huang F-C, Schwab W (2011) Cloning and characterization of a 9-lipoxygenase gene induced by pathogen attack from *Nicotiana benthamiana* for biotechnological application. *BMC Biotechnol* **11(1)**: 30
- Huang F-C, Studart-Witkowski C, Schwab W (2010) Overexpression of hydroperoxide lyase gene in *Nicotiana benthamiana* using a viral vector system. *Plant Biotechnol J* **8(7)**: 783-795
- Hubert J, Münzbergová Z, Nesvorná M, Poltronieri P, Santino A (2008) Acaricidal effects of natural six-carbon and nine-carbon aldehydes on stored-product mites. *Exp Appl Acarol* **44(4)**: 315-321
- Hughes RK, Lawson DM, Hornostaj AR, Fairhurst SA, Casey R (2001a) Mutagenesis and modelling of linoleate-binding to pea seed lipoxygenase. *Eur J Biochem* **268(4)**: 1030-1040
- Hughes RK, West SI, Hornostaj AR, Lawson DM, Fairhurst SA, Sanchez RO, Hough P, Robinson BH, Casey R (2001b) Probing a novel potato lipoxygenase with dual positional specificity reveals primary determinants of substrate binding and requirements for a surface hydrophobic loop and has implications for the role of lipoxygenases in tubers. *Biochem J* **353(2)**: 345-355
- Hughes RK, Wu Z, Robinson DS, Hardy D, West SI, Fairhurst SA, Casey R (1998) Characterization of authentic recombinant pea-seed lipoxygenases with distinct properties and reaction mechanisms. *Biochem J* **333(1)**: 33-43
- Hwang IS, Hwang BK (2010) The pepper 9-lipoxygenase gene *CaLOX1* functions in defense and cell death responses to microbial pathogens. *Plant Physiol* **152(2)**: 948-967

- Ivanov I, Heydeck D, Hofheinz K, Roffeis J, O'Donnell VB, Kuhn H, Walther M (2010) Molecular enzymology of lipoxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **503(2)**: 161-174
- Jang S, Huon T, Kim K, Um E, Han O (2007) Regiochemical and stereochemical evidence for enzyme-initiated catalysis in dual positional specific maize lipoxygenase-1. *Organic Letters* **9(16)**: 3113-3116
- Janick J, Cummins JN, Brown SK, Hemmat M (1996) Apples. In J Janick, JN Moore (Hrsg.), Fruit Breeding, Volume I: Tree and Tropical Fruits. John Wiley & Sons, Inc., New York, S. 1-78
- Kajiwara T, Sekiya J, Asano M, Hatanaka A (1982) Enantioselectivity of enzymatic cleavage reaction of 13-hydroperoxylinolenic acid to C₆-aldehyde and C₁₂-oxo acid in tea chloroplasts. *Agric Biol Chem* **46(12)**: 3087-3088
- Kang D, Gho YS, Suh M, Kang C (2002) Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin-Korean Chemical Society* **23(11)**: 1511-1512
- Kato T, Maeda Y, Hirukawa T, Namai T, Yoshioka N (1992) Lipoxygenase activity increment in infected tomato leaves and oxidation product of linolenic acid by its *in vitro* enzyme reaction. *Biosci, Biotechnol, Biochem* **56(3)**: 373-375
- Kato T, Yamaguchi Y, Namai T, Hirukawa T (1993) Oxygenated fatty acids with anti-rice blast fungus activity in rice plants. *Biosci, Biotechnol, Biochem* **57(2)**: 283-287
- Kim I-S, Grosch W (1978) Lipoxygenasen aus Birnen, Erd- und Stachelbeeren: Partielle Reinigung und Eigenschaften. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **167(5)**: 324-326
- Kim I-S, Grosch W (1979) Partial purification of a lipoxygenase from apples. *J Agric Food Chem* **27(2)**: 243-246
- Knapp MJ, Klinman JP (2003) Kinetic studies of oxygen reactivity in soybean lipoxygenase-1. *Biochemistry* **42(39)**: 11466-11475
- Knapp MJ, Seebeck FP, Klinman JP (2001) Steric control of oxygenation regiochemistry in soybean lipoxygenase-1. *J Am Chem Soc* **123(12)**: 2931-2932
- Kondo S, Setha S, Rudell DR, Buchanan DA, Mattheis JP (2005) Aroma volatile biosynthesis in apples affected by 1-MCP and methyl jasmonate. *Postharvest Biol Technol* **36(1)**: 61-68
- Kondo S, Tsukada N, Niimi Y, Seto H (2001) Interactions between jasmonates and abscisic acid in apple fruit, and stimulative effect of jasmonates on anthocyanin accumulation. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **70(5)**: 546-552
- Kühn H, Saam J, Eibach S, Holzhütter H-G, Ivanov I, Walther M (2005) Structural biology of mammalian lipoxygenases: Enzymatic consequences of targeted alterations of the protein structure. *Biochem Biophys Res Commun* **338(1)**: 93-101
- Kühn H, Wiesner R, Rathmann J, Schewe T (1991) Formation of ketodienoic fatty acids by the pure pea lipoxygenase-1. *Eicosanoids* **4(1)**: 9-14
- Kuklev DV, Christie WW, Durand T, Rossi JC, Vidal JP, Kasyanov SP, Akulin VN, Bezuglov VV (1997) Synthesis of keto- and hydroxydienoic compounds from linoleic acid. *Chemistry and Physics of Lipids* **85(2)**: 125-134
- Kumar S, Volz RK, Chagné D, Gardiner S (2014) Breeding for apple (*Malus × domestica* Borkh.) fruit quality traits in the genomics era. In R Tuberosa, A Graner, E Frison (Hrsg.), Genomics of Plant Genetic Resources. Bd. 2. Springer Netherlands, S. 387-416
- Lairon D, Arnault N, Bertrais S, Planells R, Clero E, Hercberg S, Boutron-Ruault M-C (2005) Dietary fiber intake and risk factors for cardiovascular disease in French adults. *The American Journal of Clinical Nutrition* **82(6)**: 1185-1194
- Lämmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227(5259)**: 680-685
- Laudert D, Pfannschmidt U, Lottspeich F, Holländer-Czytko H, Weiler E (1996) Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Mol Biol* **31(2)**: 323-335

Literaturverzeichnis

- Leone A, Bleve-Zacheo T, Gerardi C, Melillo MT, Leo L, Zacheo G (2006) Lipoxygenase involvement in ripening strawberry. *J Agric Food Chem* **54(18)**: 6835-6844
- Li WX, Kodama O, Akatsuka T (1991) Role of oxygenated fatty acids in rice phytoalexin production (pesticide chemistry). *Agric Biol Chem* **55(4)**: 1041-1047
- Liao Z, Chen M, Guo L, Gong Y, Tang F, Sun X, Tang K (2004) Rapid isolation of high-quality total RNA from *Taxus* and *Ginkgo*. *Prep Biochem Biotechnol* **34(3)**: 209-214
- Liavonchanka A, Feussner I (2006) Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *J Plant Physiol* **163(3)**: 348-357
- Licht TR, Hansen M, Bergstrom A, Poulsen M, Krath BN, Markowski J, Dragsted LO, Wilcks A (2010) Effects of apples and specific apple components on the cecal environment of conventional rats: Role of apple pectin. *BMC Microbiol* **10(13)**: 11
- Liu SQ, Liu XH, Jiang LW (2011) Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of the lipoxygenase gene family in cucumber. *Genetics and molecular research: GMR* **10(4)**: 2613-2636
- Maccarrone M, Salucci ML, van Zadelhoff G, Malatesta F, Veldink G, Vliegenthart JFG, Finazzi-Agrò A (2001) Tryptic digestion of soybean lipoxygenase-1 generates a 60 kDa fragment with improved activity and membrane binding ability. *Biochemistry* **40(23)**: 6819-6827
- Marcelle RD (1989) Ethylene formation, lipoxygenase activity and calcium content in apple (cv. Jonagold) *Acta Hort (ISHS)* **258**: 61-68
- Matsui K (1998) Properties and structures of fatty acid hydroperoxide lyase. *Belgian Journal of Botany* **131(1)**: 50-62
- Matsui K (2006) Green leaf volatiles: Hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr Opin Plant Biol* **9(3)**: 274-280
- Matsui K, Shibata Y, Tateba H, Hatanaka A, Kajiwara T (1997) Changes of lipoxygenase and fatty acid hydroperoxide lyase activities in bell pepper fruits during maturation. *Biosci, Biotechnol, Biochem* **61(1)**: 199-201
- Mattheis JP, Buchanan DA, Fellman JK (1991a) Change in apple fruit volatiles after storage in atmospheres inducing anaerobic metabolism. *J Agric Food Chem* **39(9)**: 1602-1605
- Mattheis JP, Fellman JK, Chen PM, Patterson ME (1991b) Changes in headspace volatiles during physiological development of Bisbee Delicious apple fruits. *J Agric Food Chem* **39(11)**: 1902-1906
- Matthew JA, Chan HWS, Galliard T (1977) A simple method for the preparation of pure 9-d-hydroperoxide of linoleic acid and methyl linoleate based on the positional specificity of lipoxygenase in tomato fruit. *Lipids* **12(3)**: 324-326
- Maucher H, Hause B, Feussner I, Ziegler J, Wasternack C (2000) Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): tissue specific regulation in seedling development. *The Plant Journal* **21(2)**: 199-213
- Mayr U, Treutter D (1997) An apple a day keeps the doctor away! - Mit dem Apfel Gesundheit genießen. In U Hallenbach (Hrsg.), 8. Internationaler Erfahrungsaustausch über Forschungsergebnisse zum Ökologischen Obstbau: Beiträge zur Tagung vom 13. und 14. November 1997 an der LVWO Weinsberg. Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau e.V., Weinsberg, S. 142-144
- Mei G, Di Venere A, Nicolai E, Angelucci CB, Ivanov I, Sabatucci A, Dainese E, Kuhn H, Maccarrone M (2008) Structural properties of plant and mammalian lipoxygenases. Temperature-dependent conformational alterations and membrane binding ability. *Biochemistry* **47(35)**: 9234-9242
- Meigh DF, Hulme AC (1965) Fatty acid metabolism in the apple fruit during the respiration climacteric. *Phytochemistry* **4(6)**: 863-871

- Meigh DF, Jones JD, Hulme AC** (1967) The respiration climacteric in the apple. Production of ethylene and fatty acids in fruit attached to and detached from the tree. *Phytochemistry* **6(11)**: 1507-1515
- Meyer A, Miersch O, Büttner C, Dathe W, Sembdner G** (1984) Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *J Plant Growth Regul* **3(1-4)**: 1-8
- Minor W, Steczko J, Stec B, Otwinowski Z, Bolin JT, Walter R, Axelrod B** (1996) Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution. *Biochemistry* **35(33)**: 10687-10701
- MLR** (2011) Obst - Informationen für Verbraucher. Ministerium für Ländlichen Raum, Ernährung und Verbraucherschutz Baden-Württemberg, Stuttgart
- Mülhardt C** (2006) Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Nemchenko A, Kunze S, Feussner I, Kolomiets M** (2006) Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments. *J Exp Bot* **57(14)**: 3767-3779
- Noiton DAM, Alspach PA** (1996) Founding clones, inbreeding, coancestry, and status number of modern apple cultivars. *J Am Soc Hort Sci* **121(5)**: 773-782
- Noordermeer MA, Veldink GA, Vliegenthart JFG** (1999) Alfalfa contains substantial 9-hydroperoxide lyase activity and a 3Z:2E-enal isomerase. *FEBS Lett* **443(2)**: 201-204
- Olias JM, Sanz LC, Rios JJ, Perez AG** (1992) Inhibitory effect of methyl jasmonate on the volatile ester-forming enzyme system in Golden Delicious apples. *J Agric Food Chem* **40(2)**: 266-270
- Padilla MN, Hernández ML, Sanz C, Martínez-Rivas JM** (2009) Functional characterization of two 13-lipoxygenase genes from olive fruit in relation to the biosynthesis of volatile compounds of virgin olive oil. *J Agric Food Chem* **57(19)**: 9097-9107
- Padilla MN, Hernández ML, Sanz C, Martínez-Rivas JM** (2012) Molecular cloning, functional characterization and transcriptional regulation of a 9-lipoxygenase gene from olive. *Phytochemistry* **74**: 58-68
- Paillard NMM** (1986) Evolution of the capacity of aldehyde production by crushed apple tissues, during an extended storage of fruits. In G Charalambous (Hrsg.), *Developments in food science*. Elsevier Science, Amsterdam, S. 369-378
- Paillard NMM** (1990) The flavor of apples, pears and quinces. In ID Morton, AJ MacLeod (Hrsg.), *Food flavours. Part C: The flavour of fruits*. Elsevier, Amsterdam, S. 1-42
- Palmieri-Thiers C, Canaan S, Brunini V, Lorenzi V, Tomi F, Desseyne JL, Garscha U, Oliw EH, Berti L, Maury J** (2009) A lipoxygenase with dual positional specificity is expressed in olives (*Olea europaea* L.) during ripening. *Biochim Biophys Acta* **1791(5)**: 339-346
- Park S, Sugimoto N, Larson MD, Beaudry R, van Nocker S** (2006) Identification of genes with potential roles in apple fruit development and biochemistry through large-scale statistical analysis of expressed sequence tags. *Plant Physiol* **141(3)**: 811-824
- Pérez A, Sanz C, Richardson D, Olías J** (1993) Methyl jasmonate vapor promotes β -carotene synthesis and chlorophyll degradation in Golden Delicious apple peel. *J Plant Growth Regul* **12(3)**: 163-167
- Pérez AG, Sanz C, Olías R, Olías JM** (1998) Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening strawberry fruits. *J Agric Food Chem* **47(1)**: 249-253
- Phillips DR, Matthew JA, Reynolds J, Fenwick GR** (1979) Partial purification and properties of a *cis*-3:*trans*-2-enal isomerase from cucumber fruit. *Phytochemistry* **18(3)**: 401-404
- Plotto A, McDaniel MR, Mattheis JP** (2000) Characterization of changes in 'Gala' apple aroma during storage using Osme analysis, a gas chromatography-olfactometry technique. *J Am Soc Hort Sci* **125(6)**: 714-722
- Podolyan A, White J, Jordan B, Winefield C** (2010) Identification of the lipoxygenase gene family from *Vitis vinifera* and biochemical characterisation of two 13-lipoxygenases expressed in grape berries of Sauvignon Blanc. *Funct Plant Biol* **37(8)**: 767-784

Literaturverzeichnis

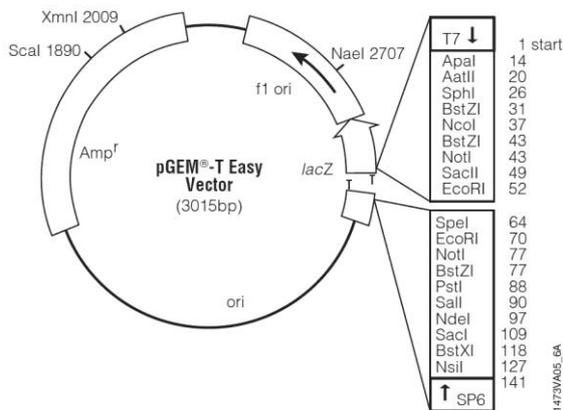
- Porta H, Rocha-Sosa M (2002) Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiol* **130**(1): 15-21
- Porter N, Caldwell S, Mills K (1995) Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* **30**(4): 277-290
- Robinson JP, Harris SA, Juniper BE (2001) Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh. *Plant Syst Evol* **226**(1-2): 35-58
- Rowan DD, Allen JM, Fielder S, Hunt MB (1999) Biosynthesis of straight-chain ester volatiles in red delicious and granny smith apples using deuterium-labeled precursors. *J Agric Food Chem* **47**(7): 2553-2562
- Ruddat VC, Mogul R, Chorny I, Chen C, Perrin N, Whitman S, Kenyon V, Jacobson MP, Bernasconi CF, Holman TR (2004) Tryptophan 500 and arginine 707 define product and substrate active site binding in soybean lipoxygenase-1. *Biochemistry* **43**(41): 13063-13071
- Rudell DR, Mattinson DS, Mattheis JP, Wyllie SG, Fellman JK (2002) Investigations of aroma volatile biosynthesis under anoxic conditions and in different tissues of "Redchief Delicious" apple fruit (*Malus domestica* Borkh.). *J Agric Food Chem* **50**(9): 2627-2632
- Rühmer T, Lafer G, Gölles M, Steinbauer L, Klement J, Innerholfer G, Wiesenhofer M (2006) Obstsorten. Praktische Porträts marktrelevanter Sorten. Österreichischer Agrarverlag Druck- und Verlagsges.m.b.H Nfg. KG, Wien
- Salas JJ, Williams M, Harwood JL, Sánchez J (1999) Lipoxygenase activity in olive (*Olea europaea*) fruit. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **76**(10): 1163-1168
- Sapers GM, Abbott J, Massie O, Watada A, Finney EE (1977) Volatile composition of McIntosh apple juice as a function of naturity and ripeness indices. *J Food Sci* **42**(1): 44-47
- Saravitz DM, Siedow JN (1995) The lipoxygenase isozymes in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] leaves (Changes during leaf development, after wounding, and following reproductive sink removal). *Plant Physiol* **107**(2): 535-543
- Schaffer RJ, Friel EN, Souleyre EJ, Bolitho K, Thodey K, Ledger S, Bowen JH, Ma JH, Nain B, Cohen D, Gleave AP, Crowhurst RN, Janssen BJ, Yao JL, Newcomb RD (2007) A genomics approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway. *Plant Physiol* **144**(4): 1899-1912
- Schieberle P (2007) Vom Apfel zum Saft - Längere Maischestandzeiten sichern optimales Aroma von Apfelsäften. *Getränke! Technologie & Marketing für die Getränkeindustrie* **1**: 46-47
- Schneider C, Pratt DA, Porter NA, Brash AR (2007) Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chem Biol* **14**(5): 473-488
- Schreier P, Lorenz G (1982) Separation, partial purification and characterization of a fatty acid hydroperoxide cleaving enzyme from apple and tomato fruits. *Zeitschrift fuer Naturforschung* **37c**: 165-173
- Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E (2008) Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal* **54**(4): 712-732
- Shen J, Tieman D, Jones JB, Taylor MG, Schmelz E, Huffaker A, Bies D, Chen K, Klee HJ (2014) A 13-lipoxygenase, TomloxC, is essential for synthesis of C5 flavour volatiles in tomato. *J Exp Bot* **65**(2): 419-428
- Shibata D, Slusarenko A, Casey R, Hildebrand D, Bell E (1994) Lipoxygenases. *Plant Molecular Biology Reporter* **12**(2): S41-S42
- Shimura M, Mase S, Iwata M, Suzuki A, Watanabe T, Sekizawa Y, Sasaki T, Furihata K, Seto H, Otake N (1983) Anti-conidial germination factors induced in the presence of probenazole in infected host leaves. III. Structural elucidation of substances A and C. *Agric Biol Chem* **47**(9): 1983-1989
- Shin JH, Van K, Kim DH, Kim KD, Jang YE, Choi B-S, Kim MY, Lee S-H (2008) The lipoxygenase gene family: a genomic fossil of shared polyploidy between *Glycine max* and *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol* **8**(1): 133

- Siedow JN** (1991) Plant lipoxygenase: Structure and function. *Annu Rev Plant Biol* **42(1)**: 145-188
- Skrzypczak-Jankun E, Bross RA, Carroll RT, Dunham WR, Funk MO, Jr.** (2001) Three-dimensional structure of a purple lipoxygenase. *J Am Chem Soc* **123(44)**: 10814-10820
- Sloane DL, Leung R, Barnett J, Craik CS, Sigal E** (1995) Conversion of human 15-lipoxygenase to an efficient 12-lipoxygenase: The side-chain geometry of amino acids 417 and 418 determine positional specificity. *Protein Engineering* **8(3)**: 275-282
- Song J, Bangerth F** (2003) Fatty acids as precursors for aroma volatile biosynthesis in pre-climacteric and climacteric apple fruit. *Postharvest Biol Technol* **30(2)**: 113-121
- Song J, Forney CF** (2008) Flavour volatile production and regulation in fruit. *Can J Plant Sci/Rev Can Phytotech* **88(3)**: 537-550
- Song W-C, Brash AR** (1991) Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450. *Science* **253(5021)**: 781-784
- Souci SW, Fachmann W, Kraut H** (2008) Die Zusammensetzung der Lebensmittel. Nährwert-Tabellen. E Kirchhoff (Hrsg.), 7., revidierte und ergänzte Auflage. MedPharm Scientific Publishers, Stuttgart
- Steinhaus M, Bogen J, Schieberle P** (2008) From apple to juice – Changes in key aroma compounds during processing. In T Hofmann, W Meyerhof, P Schieberle (Hrsg.), Recent Highlights in Flavor Chemistry & Biology, Proceeding of the 8th Wartburg Symposium on Flavor Chemistry and Biology. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Eisenach, S. 123-128
- Su SK, Wiley RC** (1998) Changes in apple juice flavor compounds during processing. *J Food Sci* **63(4)**: 688-691
- Tatulian SA, Steczko J, Minor W** (1998) Uncovering a calcium-regulated membrane-binding mechanism for soybean lipoxygenase-1. *Biochemistry* **37(44)**: 15481-15490
- Tressl R, Drawert F** (1973) Biogenesis of banana volatiles. *J Agric Food Chem* **21(4)**: 560-565
- Tressl R, Drawert F, Heimann W, Emberger R** (1970) Über die Biogenese von Aromastoffen bei Pflanzen und Früchten. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **144(1)**: 4-12
- Tsao R, Yang R, Young JC, Zhu H** (2003) Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J Agric Food Chem* **51(21)**: 6347-6353
- Ulrich D, Hoberg E, Fischer C** (2009) Diversity and dynamic of sensory related traits in different apple cultivars. *Journal of Applied Botany and Food Quality* **83(1)**: 70-75
- Van Os CPA, Rijke-Schilder GPM, Vliegenthart JFG** (1979) 9-L_α-linoleyl hydroperoxide, a novel product from the oxygenation of linoleic acid by *type-2* lipoxygenases from soybeans and peas. *Biochim Biophys Acta* **575(3)**: 479-484
- Vavilov NI** (1930) Wild progenitors of the fruit trees of Turkistan and the Caucasus and the problem of the origin of fruit trees. In Proceedings of the 9th International Horticultural Congress. The Royal Horticultural Society, London, S. 271-286
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar SK, Troggio M, Pruss D, Salvi S, Pindo M, Baldi P, Castelletti S, Cavaiuolo M, Coppola G, Costa F, Cova V, Dal Ri A, Goremykin V, Komjanc M, Longhi S, Magnago P, Malacarne G, Malnoy M, Micheletti D, Moretto M, Perazzolli M, Si-Ammour A, Vezzulli S, Zini E, Eldredge G, Fitzgerald LM, Gutin N, Lanchbury J, Macalma T, Mitchell JT, Reid J, Wardell B, Kodira C, Chen Z, Desany B, Niazi F, Palmer M, Koepke T, Jiwan D, Schaeffer S, Krishnan V, Wu C, Chu VT, King ST, Vick J, Tao Q, Mraz A, Stormo A, Stormo K, Bogden R, Ederle D, Stella A, Vecchietti A, Kater MM, Masiero S, Lasserre P, Lespinasse Y, Allan AC, Bus V, Chagne D, Crowhurst RN, Gleave AP, Lavezzo E, Fawcett JA, Proost S, Rouze P, Sterck L, Toppo S, Lazzari B, Hellens RP, Durel C-E, Gutin A, Bumgarner RE, Gardiner SE, Skolnick M, Egholm M, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R** (2010) The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nat Genet* **42(10)**: 833-839
- Vick BA, Zimmerman DC** (1987) Pathways of fatty acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts. *Plant Physiol* **85(4)**: 1073-1078

Literaturverzeichnis

- Vogt J, Dunemann F** (2011) Molecular characterization of the lipoxygenase gene family in apple (*Malus domestica* Borkh.) contributing to the production of flavour compounds in ripening fruits. In Third Young Scientists Forum, Quedlinburg, Germany, 23-25 November, 2010. Julius Kühn Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, S. 20-28
- Vogt J, Schiller D, Schwab W, Dunemann F** (2013a) Cloning and characterization of apple lipoxygenase (LOX) genes putatively involved in the formation of fruit flavour volatiles. *Acta Hort (ISHS)* **976(1)**: 369-376
- Vogt J, Schiller D, Ulrich D, Schwab W, Dunemann F** (2013b) Identification of lipoxygenase (LOX) genes putatively involved in fruit flavour formation in apple (*Malus × domestica*). *Tree Genet Genom* **9(6)**: 1493-1511
- Walther M, Roffeis J, Jansen C, Anton M, Ivanov I, Kuhn H** (2009) Structural basis for pH-dependent alterations of reaction specificity of vertebrate lipoxygenase isoforms. *Biochim Biophys Acta* **1791(8)**: 827-835
- Watzl B, Rechkemmer G** (2001) Flavonoide. *Ernährungs-Umschau* **48**: 498-502
- Way RD, Aldwinckle HS, Lamb RC, Rejman A, Sansavini S, Shen T, Watkins R, Westwood MN, Yoshida Y** (1991) Apples (*Malus*). *Acta Hort (ISHS)* **290**: 3-46
- Weber H, Chételat A, Caldelari D, Farmer EE** (1999) Divinyl ether fatty acid synthesis in late Blight-diseased potato leaves. *The Plant Cell Online* **11(3)**: 485-493
- Yadav MK, Bhatla SC** (2011) Localization of lipoxygenase activity on the oil bodies and in protoplasts using a novel fluorescence imaging method. *Plant Physiol Biochem* **49(2)**: 230-234
- Yahia EM** (1994) Apple flavor. *Horticultural Reviews* **16**: 197-234
- Zhang B, Chen K, Bowen J, Allan A, Espley R, Karunairetnam S, Ferguson I** (2006) Differential expression within the LOX gene family in ripening kiwifruit. *J Exp Bot* **57(14)**: 3825-3836
- Zhang B, Shen J-y, Wei W-w, Xi W-p, Xu C-J, Ferguson I, Chen K** (2010) Expression of genes associated with aroma formation derived from the fatty acid pathway during peach fruit ripening. *J Agric Food Chem* **58(10)**: 6157-6165
- Zimmerman DC, Coudron CA** (1979) Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-trans-10-dodecenoic acid. *Plant Physiol* **63(3)**: 536-541

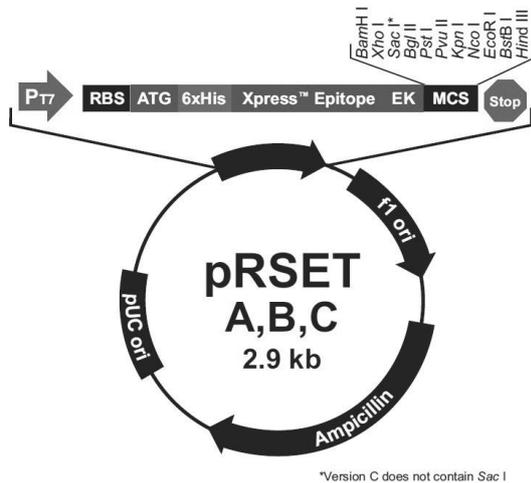
Anhang



pGEM[®]-T easy Vektor (3015 bp)

T7 RNA Polymerase Transkriptionsstart	1
Multiple Klonierungsstelle	10-128
SP6 RNA Polymerase Promotor (-17 bis +3)	139-158
SP6 RNA Polymerase Transkriptionsstart	141
<i>lacZ</i> Start-Codon	180
<i>lac</i> Operator	200-216
β -Lactamase-ORF (<i>Amp^R</i>)	1337-2197
Phage f1 origin	2380-2835
<i>lac</i> Operon-Sequenzen	2836-2996
T7 RNA Polymerase Promotor (-17 bis +3)	2999-3

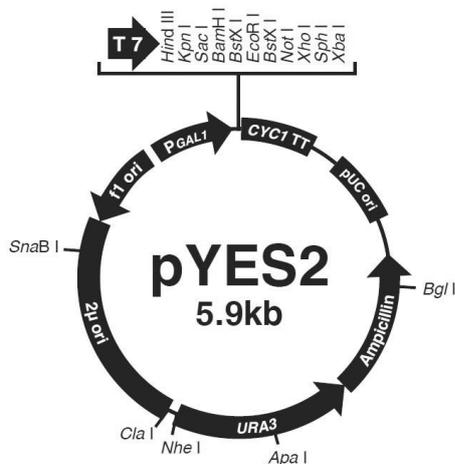
Abbildung 4.2 Karte des Klonierungsvektors pGEM[®]-T easy.



pRSET B Vektor (2897 bp)

T7 Promotor	20-39
6xHis Tag	112-129
T7 gene 10 Leader-Sequenz	133-162
Xpress™ Epitop	169-192
Enterokinase-Schnittstelle	192
Multiple Klonierungsstelle	202-248
T7 Transkriptionsterminator	256-385
Phage f1 origin	456-911
<i>bla</i> Promotor	943-1047
β -Lactamase-ORF (<i>bla</i>)	1042-1902
pUC origin	2047-2720

Abbildung 4.3 Karte des bakteriellen Expressionsvektors pRSET B.



pYES2 Vektor (5856 bp)

<i>GAL1</i> Promotor	1-451
T7 Promotor	475-494
Multiple Klonierungsstelle	501-600
<i>CYC1</i> Transkriptionsterminator	608-856
pUC origin	1038-1711
β -Lactamase-ORF	1856-2716
<i>URA3</i> Gen	2734-3841
2 micron (μ) origin	3845-5316
f1 origin	5384-5839

Abbildung 4.4 Karte des Hefe-Expressionsvektors pYES2.

Anhang

Tabelle 4.1 Auflistung variabler Sequenz-Positionen der klonierten Lipoxygenase-Gene. Die in der GenBank-Datenbank hinterlegten Gene wurden mit der genomischen Sequenz („*Malus × domestica* contig sequence“, MDC) der '*M. domestica* Genome V1.0'-Datenbank verglichen. Sequenz-Abweichungen, die sich nicht anhand der Heterozygotie des Golden Delicious-Genoms erklären lassen, wurden grau unterlegt. Punktmutationen, die zu einer Veränderung der Protein-Sequenz führen (Anhang XIV, Abbildung 4.5), wurden dunkelgrau unterlegt.

Gen	Akzession	Sequenz-Positionen (bezogen auf die GenBank-Akzessionen)							
<i>MdLOX1a</i>		453	487	577	844	1005	1333	1716	1869
	MDC010543.505	T	A	C	Y	R	M	K	R
	KC706480	G	G	G	C	A	A	T	A
		2031	2106	2122	2424	2580			
	MDC010543.505	S	R	R	K	Y			
	KC706480	C	A	A	T	C			
<i>MdLOX1c</i>		1527	2256						
	MDC022765.172	Y	Y						
	KC706481	T	C						
<i>MdLOX2a</i>		2047							
	MDC003732.206	C							
	KC706483	C							
	KC706484	T							
<i>MdLOX2b</i>	MDC005898.374								
	KC706485								
<i>MdLOX5b</i>		25	113	202	786	1023	1026	1070	1689
	MDC008540.289	G	A	C	Y	S	M	C	T
	KC706490	C	G	T	C	C	C	A	C
	KC706491	G	A	C	T	G	A	C	T
		1803	2187	2541	2671				
	MDC008540.289	K	R	T	C				
	KC706490	T	A	T	T				
	KC706491	G	G	A	C				
<i>MdLOX6a</i>		33	971	1548					
	MDC004958.293	Y	C	Y					
	MDP0000277666	Y	Y						
	KC706492	T	T	C					
<i>MdLOX7a</i>		209	1188	1203	1358	1926	2189	2296	2307
	MDC000505.337	M	R	Y	S	R	Y	M	W
	KC706495	A	A	T	C	A	T	A	T
<i>MdLOX8b</i>		73							
	MDC022844.121	S							
	KC706498	C							

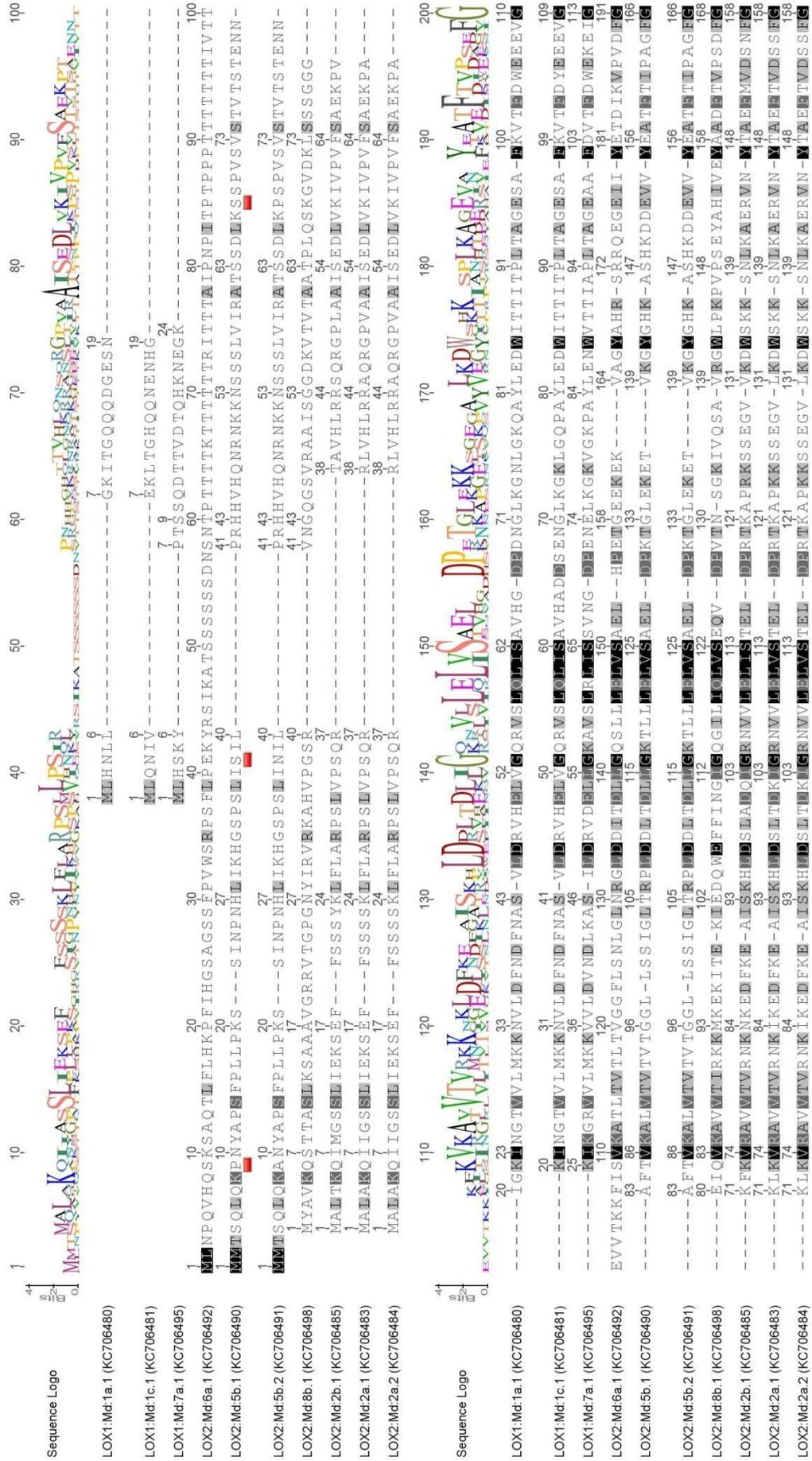
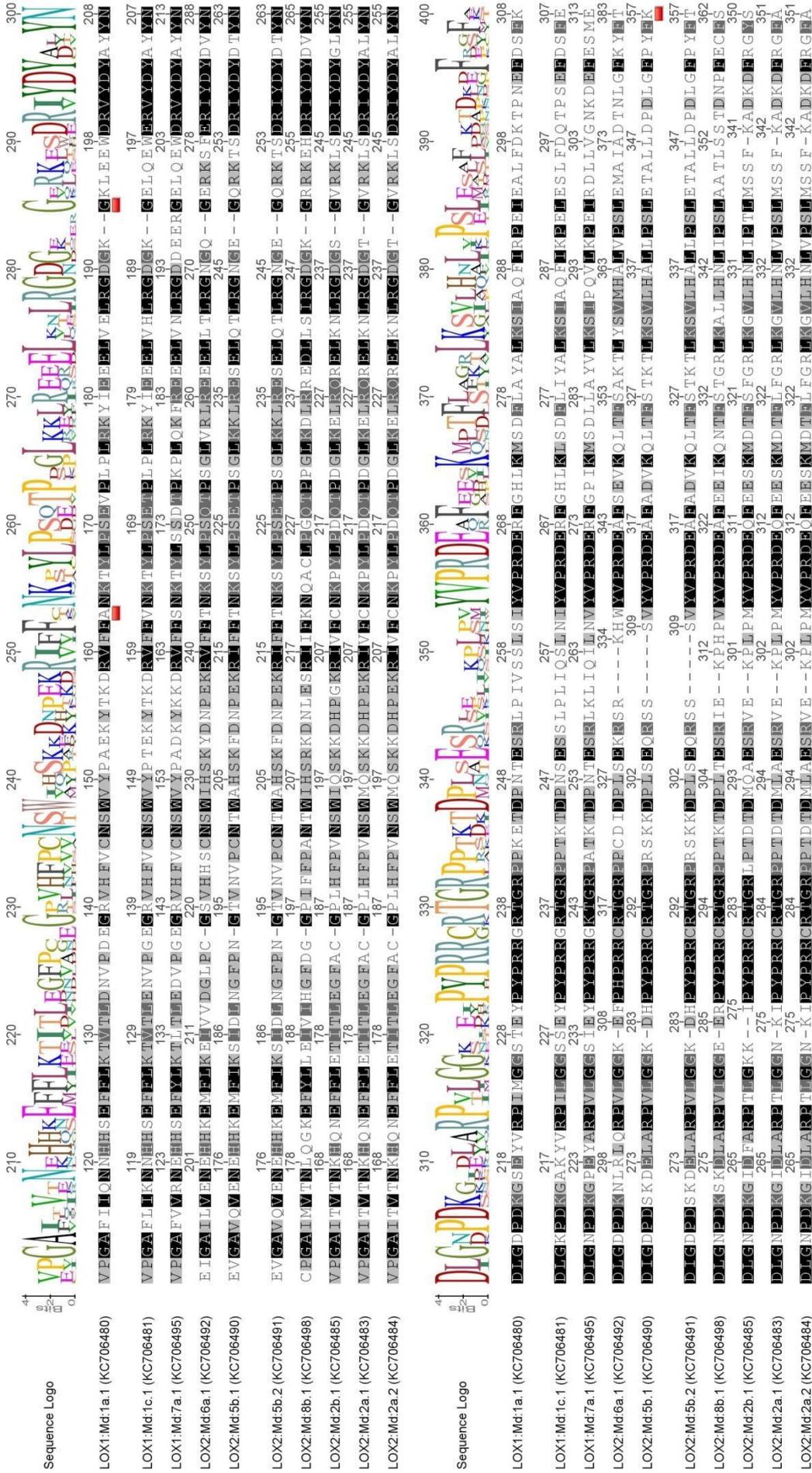
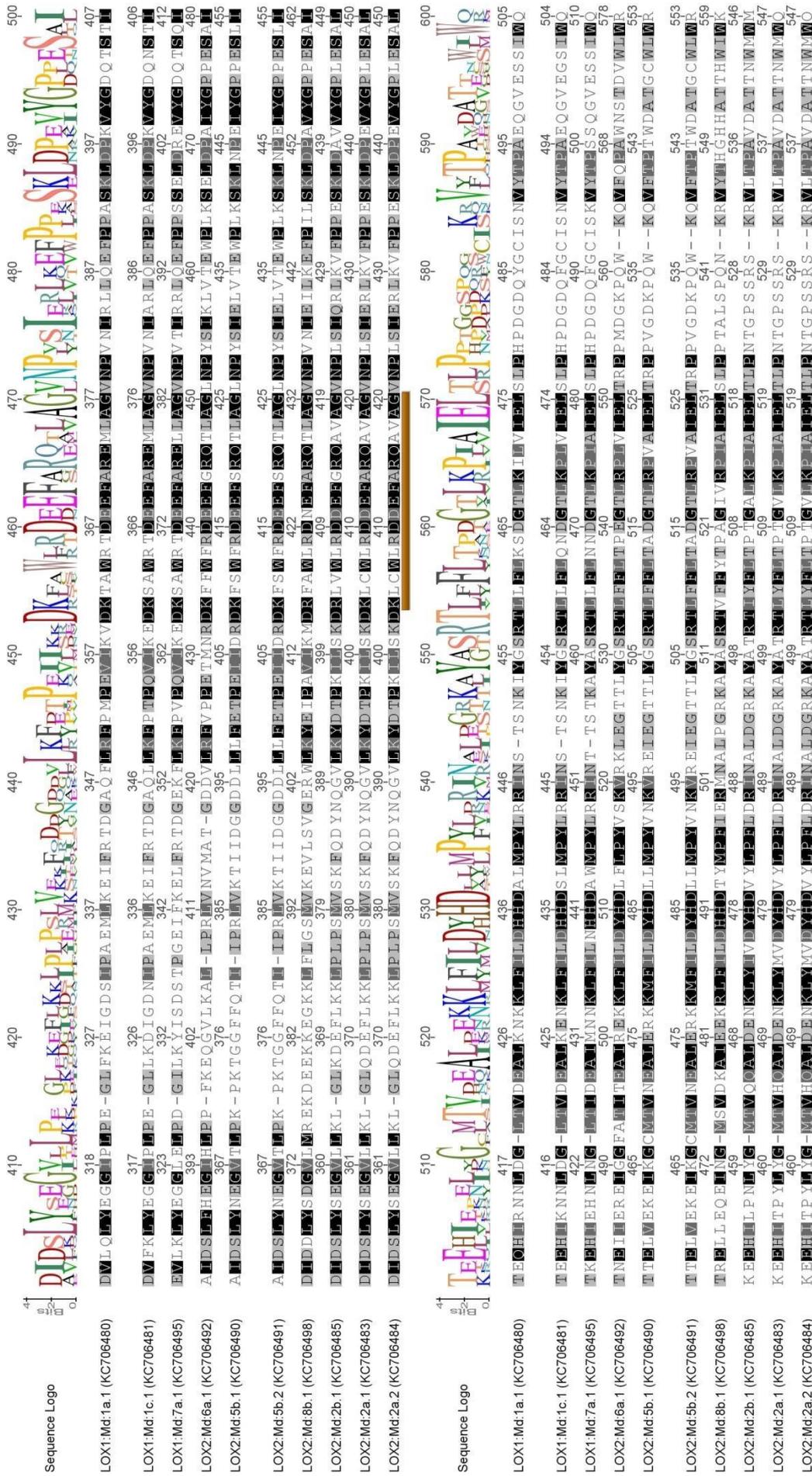


Abbildung 4.5 MSA der hergeleiteten Protein-Sequenzen für die klonierten Lipoxigenase-Gene von *Malus x domestica* cv. Golden Delicious. Als funktionelle Motive wurden die Substrat-Bindestelle (braun), das aktive Zentrum (blau) sowie die Coffa- und Sloane-Position (magenta) annotiert. Rote Markierungen verdeutlichen Punktmutationen in den klonierten Sequenzen (Anhang XIII, Tabelle 4.1), die zu Abweichungen von den vorhergesagten Protein-Sequenzen der MDP-Akzessionen aus der ‘*M. domestica* Genome V1.0’-Datenbank führen. Die farbige Hinterlegung gibt die Stärke der Konservierung einzelner Sequenz-Positionen wieder: Schwarze Hinterlegung bedeutet 100%, dunkelgrau 80-100%, hellgrau 60-80% und weiß <60% Identität.

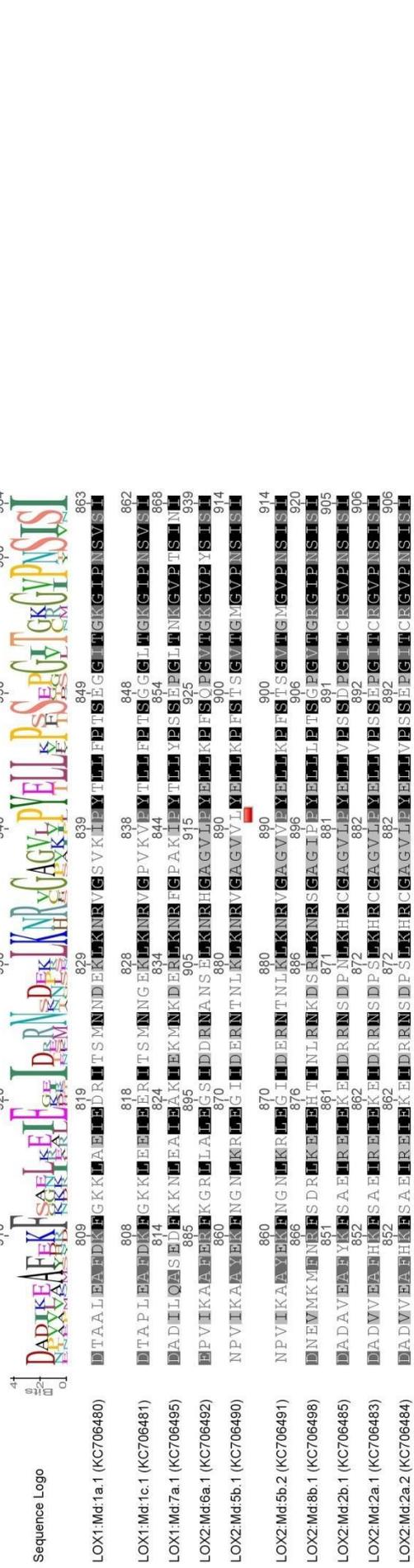
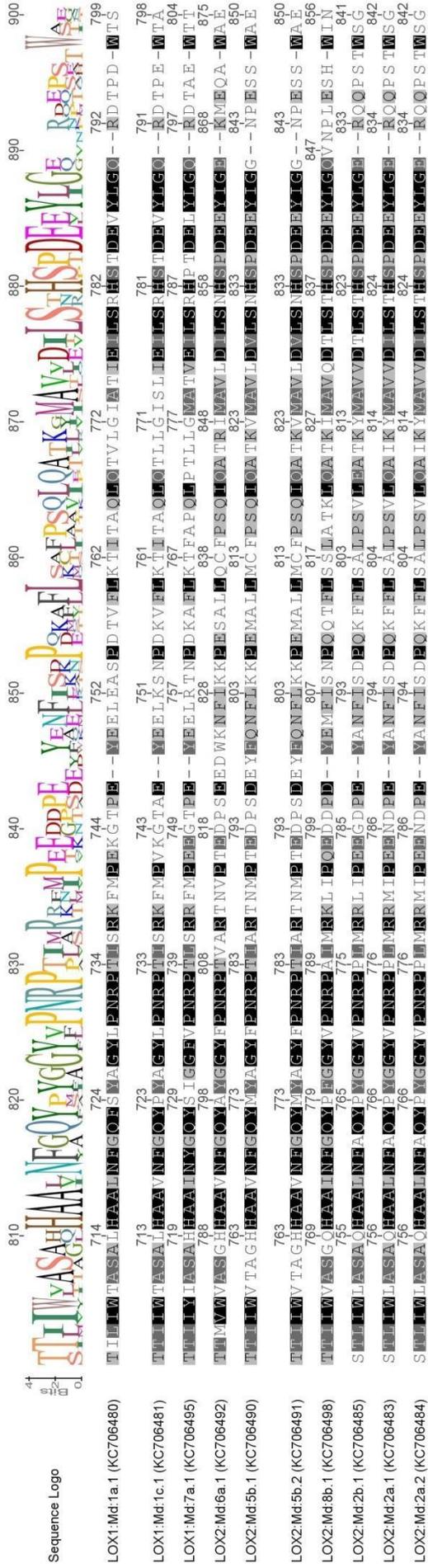
Anhang



Fortsetzung Abbildung 4.5



Fortsetzung Abbildung 4.5



Fortsetzung Abbildung 4.5

Anhang

MdLOX1a (KC706480) (grey):
sequence derived from *Malus x domestica*

Codontable (black):
*Escherichia coli*_K12

Mean difference: 15.45 %

Ordinate (y-axis): frequency

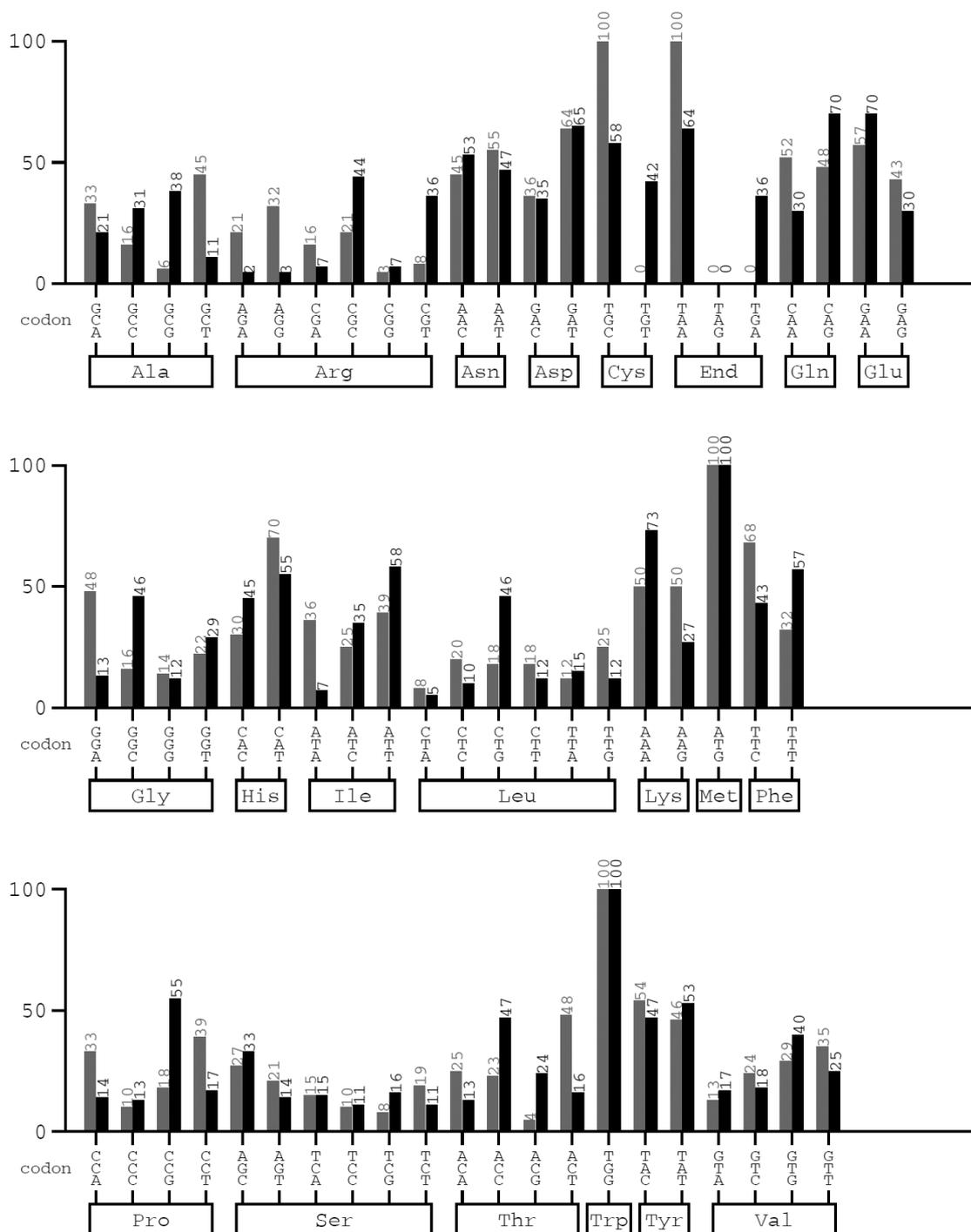


Abbildung 4.6 Vergleich des Codon-Vorkommens in *MdLOX1a* und *E. coli* K12-Stämmen mit dem Graphical Codon Usage Analyser. Angegeben sind die Häufigkeiten mit denen ein Codon in dem LOX-Gen oder im bakteriellen Genom von *E. coli* verwendet wird. Einige in *MdLOX1a* häufig auftretende Codons (AGG, AGA, ATA und GGA) werden von *E. coli* recht selten genutzt und könnten eine heterologe Expression des Gens limitieren.

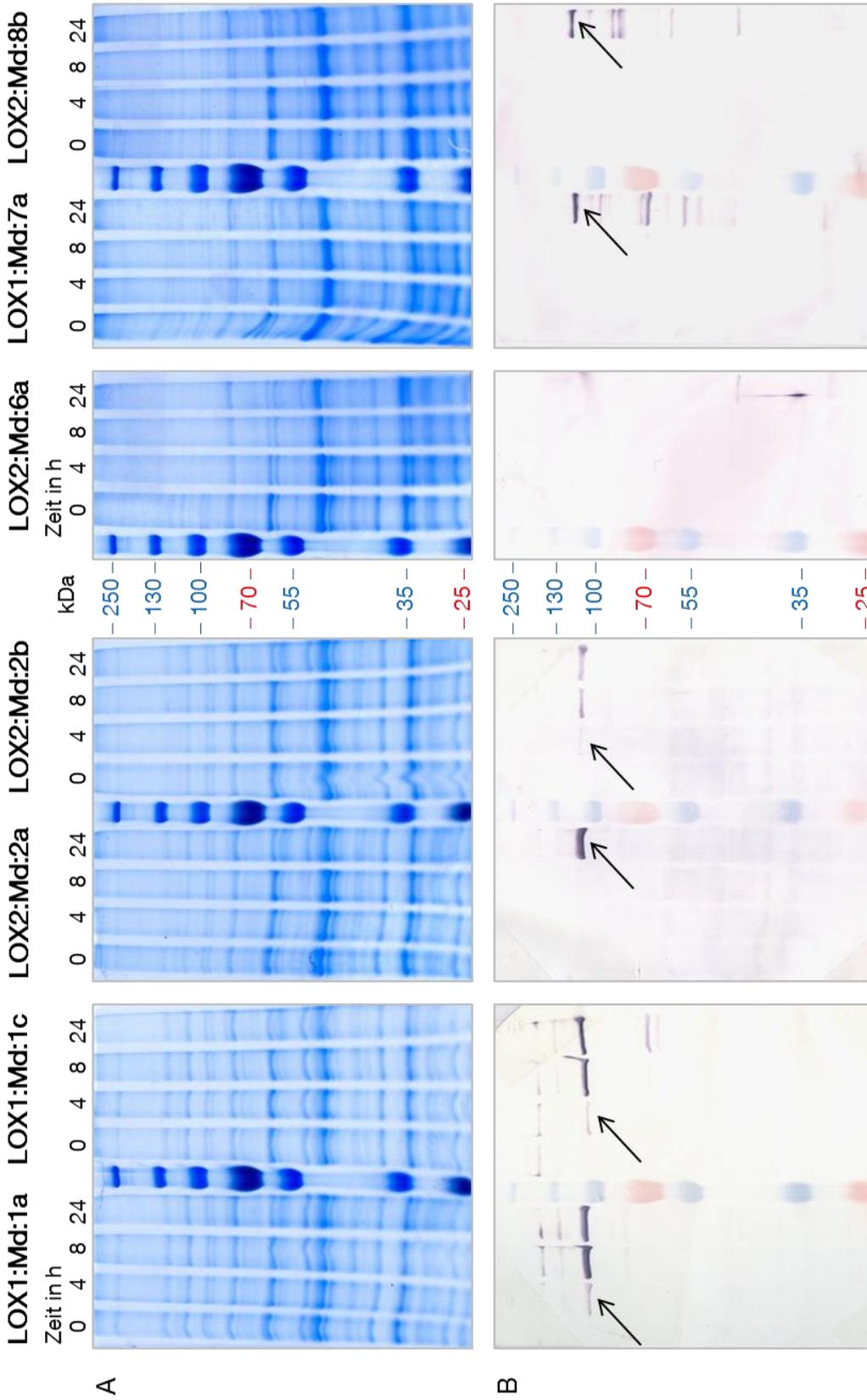


Abbildung 4.7 SDS-PAGE (A) und Immunodetektion (B) von rekombinanten Apfel-Lipoxygenasen in Rohprotein-Extrakten von Hefe. Aufgetragen wurden je 10 µg Rohprotein-Extrakt von Kultur-Proben, die 0, 4, 8 und 24 Stunden nach Induktion der Genexpression genommen wurden. Die spezifische Detektion von rekombinantem LOX-Fusionsprotein erfolgte mit Anti-His-Antikörper (schwarze Pfeile). Bei erfolgreicher Expression wurden Proteine mit den Größen 101,7 kDa (LOX1:Md:1a), 101,6 kDa (LOX1:Md:1c), 106,6 kDa (LOX2:Md:2a), 106,5 kDa (LOX2:Md:2b), 107,5 kDa (LOX2:Md:6a), 102,6 kDa (LOX1:Md:7a) und 107,3 kDa (LOX2:Md:8b) erwartet.

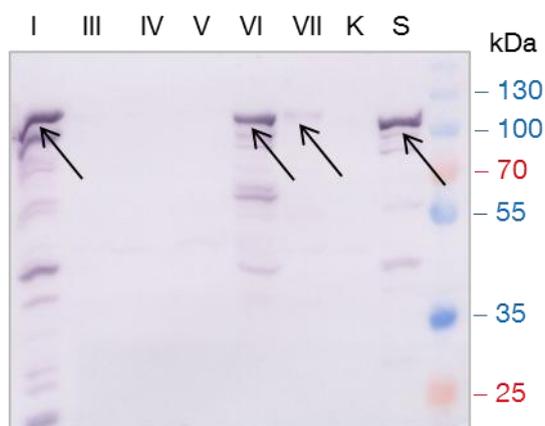


Abbildung 4.8 Immunodetektion von rekombinantem LOX-Fusionsprotein aus Hefe mit spezifischen Anti-LOX-Antikörper. Aufgetragen wurden je 10 µg Rohprotein-Extrakt von Proben, die 24 Stunden nach Induktion der Expression genommen wurden. Die spezifische Detektion von rekombinantem LOX-Fusionsprotein erfolgte mit Anti-LOX-Antikörper (schwarze Pfeile). Bei erfolgreicher Expression wurden Proteine mit den Größen 101,7 kDa (I, LOX1:Md:1a), 106,6 kDa (III, LOX2:Md:2a), 106,5 kDa (IV, LOX2:Md:2b), 107,5 kDa (V, LOX2:Md:6a), 102,6 kDa (VI, LOX1:Md:7a) und 107,3 kDa (VII, LOX2:Md:8b) erwartet (Abbildung 4.7). Als Kontrollen dienten Rohprotein-Extrakte mit dem pYES2-Leervektor (K) und heterolog exprimiertem Protein von *GmVLXC* aus Sojabohne (S).

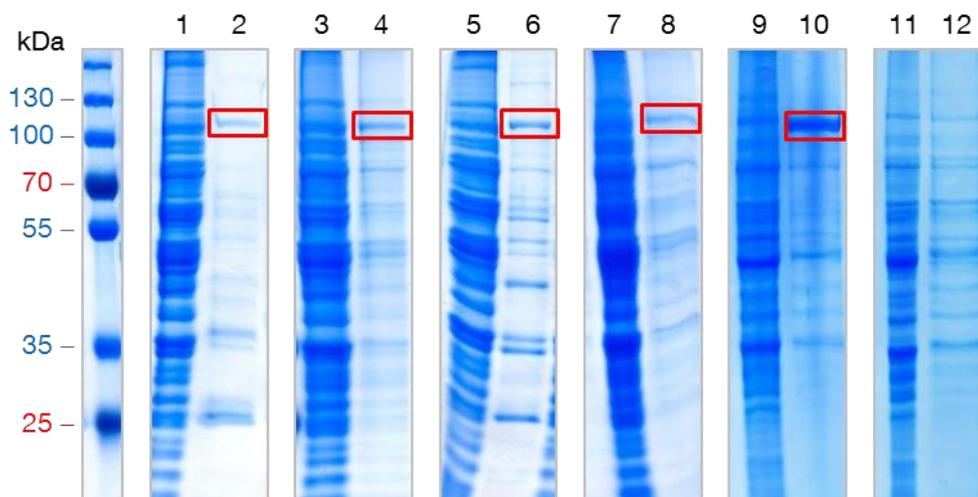


Abbildung 4.9 SDS-PAGE von partiell gereinigtem Apfel-LOX-Protein. Aufgetragen wurden je 30 µg Rohprotein-Extrakt (1, 3, 5, 7, 9, 11) und 5 µg partiell gereinigtes Protein (2, 4, 6, 8, 10, 12) der rekombinanten Wildtyp-Lipoxygenasen LOX1:Md:1a (1, 2), LOX1:Md:1c (3, 4), LOX2:Md:2a (5, 6) und LOX2:Md:2b (7, 8) sowie der *mdlox1a*-Mutante G567A (9, 10). Als Kontrolle dienten Protein-Extrakte mit dem pYES2-Leervektor (11, 12). Partiiell gereinigtes Apfel-LOX-Protein sollte im SDS-Gel Banden der Größen 101,6 kDa (LOX1:Md:1a, LOX1:Md:1c, G567A) sowie 106,6 kDa (LOX2:Md:2a) und 106,5 kDa (LOX2:Md:2b) ergeben (rote Rahmen).

Tabelle 4.2 Verteilung der Hydro(pero)xy-Produkte nach der Reaktion von Wildtyp- und Mutanten-Lipoxygenasen mit α -Linolensäure und Arachidonsäure. Hydroperoxide wurden zu Hydroxiden reduziert und mittels NP-HPLC analysiert. Die Anteile von H(p)OTE und H(p)ETE sind als Prozent der gesamten Produkt-Ausbeute aus spezifischer LOX-Aktivität mit LnA und AA angegeben.

Enzym	H(p)OTE (in %)		H(p)ETE (in %)					
	13-	9-	15-	12-	11-	9-	8-	5-
LOX1:Md:1a	89,8	10,2	41,5	16,8	11,6	15,9	6,1	8,1
LOX1:Md:1c	7,2	92,8	11,8	4,4	53,2	4,0	8,4	18,2
LOX2:Md:2a	90,2	9,8	44,7	16,3	9,6	12,3	8,2	8,9
LOX2:Md:2b	97,0	3,0	97,4	0,7	1,1	0,2	0,3	0,3
R268A	91,9	8,9	34,9	11,1	17,0	19,5	10,9	6,6
G567A	2,7	97,3	7,4	8,5	44,1	7,2	9,1	23,7
I578L	80,5	19,5	17,1	14,9	9,9	28,9	7,8	21,4
V582F	90,9	9,1	29,8	11,8	23,7	13,7	6,4	14,6

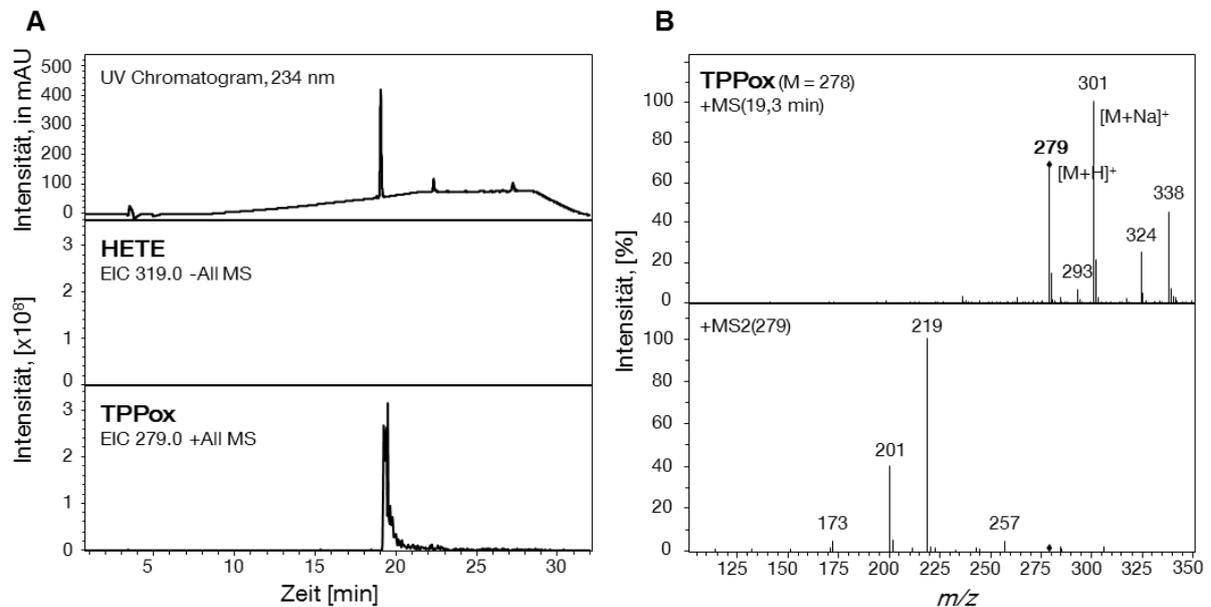


Abbildung 4.10 LC-MSⁿ-Analyse der TPPox-Fraktion aus der Normalphasen-HPLC. (A) Die Fraktion eines unbekannten Produktes aus der Reaktion von LOX-Enzym mit Arachidonsäure wurde mittels RP-HPLC chromatografisch getrennt. Die LC-MSⁿ-Analyse zeigte, dass es sich nicht um Hydroxy-eicosatetraensäure (HETE, m/z 319, positive Ionenspur) sondern um das oxidierte Reduktionsmittel Triphenylphosphinoxid (TPPox, m/z 279, negative Ionenspur) handelt. (B) Das dargestellte Massenspektrum wurde mit Einträgen aus der Massbank-Datenbank (UF419401-UF419404) verglichen. Die erwarteten Fragmente für den Zerfall von TPPox im positiven Modus waren m/z 279 $[M+H]^+ \rightarrow 219 + 201$.

1	MLXNJXXKJT	10	GXQQBXXXNX	20	GKINGTVVLM	30	KKNVLDENDF	40	NASVLDRVHE	50	LVQQRVSLQL	60	ISAVHXXDXX	70	NGLKGXLGXX	80	AYLEDWITTI	90	TPLTAGESAF	100
	MLHNLGKKT	110	GQQQDGSNI	120	GKINGTVVLM	130	KKNVLDENDF	140	NASVLDRVHE	150	LVQQRVSLQL	160	ISAVHGDSE	170	NGLKGXLGXX	180	AYLEDWITTI	190	TPLTAGESAF	200
	MLQNIIVKLT	110	GHQQN--ENH	120	GKINGTVVLM	130	KKNVLDENDF	140	NASVLDRVHE	150	LVQQRVSLQL	160	ISAVHGDSE	170	NGLKGXLGXX	180	AYLEDWITTI	190	TPLTAGESAF	200
	KVTFDXEEV	110	GVPGAFJIXN	120	NHSEFFLKT	130	VTLXNVPEEG	140	RVHFVCSNV	150	YPEXEYTKDR	160	VFFXNKTYP	170	SEXPPLPKY	180	IEEELVXLRG	190	DGKGLXZEWX	200
	KVTFDWEV	210	GVPGAFLIQN	220	NHSEFFLKT	230	VTLDNVDEG	240	RVHFVCSNV	250	YPAEKYTKDR	260	VFFANKTYP	270	SEVPLPKY	280	IEEELVXLRG	290	DGKGLXZEWX	300
	KVTFDWEV	210	GVPGAFLLKN	220	NHSEFFLKT	230	VTLDNVDEG	240	RVHFVCSNV	250	YPAEKYTKDR	260	VFFANKTYP	270	SEVPLPKY	280	IEEELVXLRG	290	DGKGLXZEWX	300
	RVDYAYVND	310	LGXPDKGXXY	320	VRPIXGSXE	330	YPRRRRTGT	340	RPPXXTDPNX	350	ESXLPJXXSL	360	XIYVPRDERF	370	GHLKXSDFLX	380	YALKSIAQFI	390	XPEJEXEFDX	400
	RVDYAYVND	310	LGXPDKGXXY	320	VRPIXGSXE	330	YPRRRRTGT	340	RPPXXTDPNX	350	ESXLPJXXSL	360	XIYVPRDERF	370	GHLKXSDFLX	380	YALKSIAQFI	390	XPEJEXEFDX	400
	RVDYAYVND	310	LGXPDKGXXY	320	VRPIXGSXE	330	YPRRRRTGT	340	RPPXXTDPNX	350	ESXLPJXXSL	360	XIYVPRDERF	370	GHLKXSDFLX	380	YALKSIAQFI	390	XPEJEXEFDX	400
	TPXEEFDSFXD	410	VXXLYEGGIP	420	LPEGLKXXIG	430	DXIPAEMLKE	440	IFRTDGAQL	450	XFPXPZVIKX	460	DKXAWRTDEE	470	FAREMLAGVN	480	PVNIAXLQEF	490	PPASKLDPKV	500
	TPNEFDSFKD	410	VQLYEGGIP	420	LPEGLKXXIG	430	DXIPAEMLKE	440	IFRTDGAQL	450	XFPXPZVIKX	460	DKXAWRTDEE	470	FAREMLAGVN	480	PVNIAXLQEF	490	PPASKLDPKV	500
	TPSEFDSFED	410	VFKLYEGGIP	420	LPEGLKXXIG	430	DXIPAEMLKE	440	IFRTDGAQL	450	XFPXPZVIKX	460	DKXAWRTDEE	470	FAREMLAGVN	480	PVNIAXLQEF	490	PPASKLDPKV	500
	YGDQXSTITE	510	ZHIXNNLDGL	520	TVDEALKXXK	530	LFILDDHDXL	540	MPYLLRRINST	550	SNKIYGSRTL	560	LFLXXDGLTK	570	XLVIELSLPH	580	PDGDQXG CIS	590	NVYTPAEQGV	600
	YGDQXSTITE	510	ZHIXNNLDGL	520	TVDEALKXXK	530	LFILDDHDXL	540	MPYLLRRINST	550	SNKIYGSRTL	560	LFLXXDGLTK	570	XLVIELSLPH	580	PDGDQXG CIS	590	NVYTPAEQGV	600
	YGDQXSTITE	510	ZHIXNNLDGL	520	TVDEALKXXK	530	LFILDDHDXL	540	MPYLLRRINST	550	SNKIYGSRTL	560	LFLXXDGLTK	570	XLVIELSLPH	580	PDGDQXG CIS	590	NVYTPAEQGV	600
	EXSIWQLAKA	610	YVAVNDSGXH	620	QLISHWLNTH	630	AVXEPVIXA	640	NRQLSVVHPI	650	YKLLXPHFRD	660	TMXINAXXRX	670	ILJNAXGXJE	680	XTVFPARYAX	690	XLSSXYKXDW	700
	ESSIWQLAKA	610	YVAVNDSGXH	620	QLISHWLNTH	630	AVXEPVIXA	640	NRQLSVVHPI	650	YKLLXPHFRD	660	TMXINAXXRX	670	ILJNAXGXJE	680	XTVFPARYAX	690	XLSSXYKXDW	700
	EGSIWQLAKA	610	YVAVNDSGXH	620	QLISHWLNTH	630	AVXEPVIXA	640	NRQLSVVHPI	650	YKLLXPHFRD	660	TMXINAXXRX	670	ILJNAXGXJE	680	XTVFPARYAX	690	XLSSXYKXDW	700
	XFXEQALPAD	710	LIKRGVAVKD	720	XNSPHGLRLL	730	IEDYPAVDG	740	IEIWFALXTW	750	VXDYCFYFK	760	IEIWFALXTW	770	LQSWWRELVE	780	EGHGDXXKDEP	790	WPKKQTXEX	800
	IFPEQALPAD	710	LIKRGVAVKD	720	XNSPHGLRLL	730	IEDYPAVDG	740	IEIWFALXTW	750	VXDYCFYFK	760	IEIWFALXTW	770	LQSWWRELVE	780	EGHGDXXKDEP	790	WPKKQTXEX	800
	NFTEQALPAD	710	LIKRGVAVKD	720	XNSPHGLRLL	730	IEDYPAVDG	740	IEIWFALXTW	750	VXDYCFYFK	760	IEIWFALXTW	770	LQSWWRELVE	780	EGHGDXXKDEP	790	WPKKQTXEX	800
	LVEXCTXJIW	810	TASALHAAVN	820	FGQXXYAGYL	830	PNRPTISRKF	840	MPXKGTAEYE	850	ELXXXPDYVF	860	LKTIITQLOI	870	XLGIXXLEIL	880	SRHSTDEVYL	890	GQRDTPFWTX	900
	LVECTIIIW	810	TASALHAAVN	820	FGQXXYAGYL	830	PNRPTISRKF	840	MPXKGTAEYE	850	ELXXXPDYVF	860	LKTIITQLOI	870	XLGIXXLEIL	880	SRHSTDEVYL	890	GQRDTPFWTX	900
	LVEICTIIIW	810	TASALHAAVN	820	FGQXXYAGYL	830	PNRPTISRKF	840	MPXKGTAEYE	850	ELXXXPDYVF	860	LKTIITQLOI	870	XLGIXXLEIL	880	SRHSTDEVYL	890	GQRDTPFWTX	900
	DAXLEAFDK	910	FGKKLXEEEX	920	RITSMNNXEK	930	LKNRVGVXKX	940	PYTLLEFPTSX	950	GGJTGKGI PN	960	SVSI	970	SVSI	980	SVSI	990	SVSI	1000
	DAALEAFDK	910	FGKKLXEEEX	920	RITSMNNXEK	930	LKNRVGVXKX	940	PYTLLEFPTSX	950	GGJTGKGI PN	960	SVSI	970	SVSI	980	SVSI	990	SVSI	1000
	DTAPLEAFDK	910	FGKKLXEEEX	920	RITSMNNXEK	930	LKNRVGVXKX	940	PYTLLEFPTSX	950	GGJTGKGI PN	960	SVSI	970	SVSI	980	SVSI	990	SVSI	1000

Abbildung 4.11 Vergleich der Protein-Primärstruktur von LOX1:Md:1a und LOX1:Md:1c für die zielgerichtete Mutagenese. Aminosäure-Reste in einem Umkreis von acht Ångström um das 13(S)-HpODE-Molekül im aktiven Zentrum des Homologie-Modells von LOX1:Md:1a (Kapitel 3.5.1) wurden mit einem grauen Balken annotiert. Dreiecke markieren die konservierten Aminosäuren, die an der Koordinierung des katalytischen Eisens beteiligt sind. Sequenz-Positionen mit potenzieller Bedeutung für die Regio- und Stereospezifität von Lipoxygenasen wurden mit weißen oder schwarzen Rhomben markiert. Ein Stern markiert den hoch konservierten Arginin-Rest am Boden der Substrat-Bindetasche. Sequenz-Positionen, die für die zielgerichtete Mutagenese von *MalLOX1a* ausgewählt wurden, besitzen einen Rahmen.

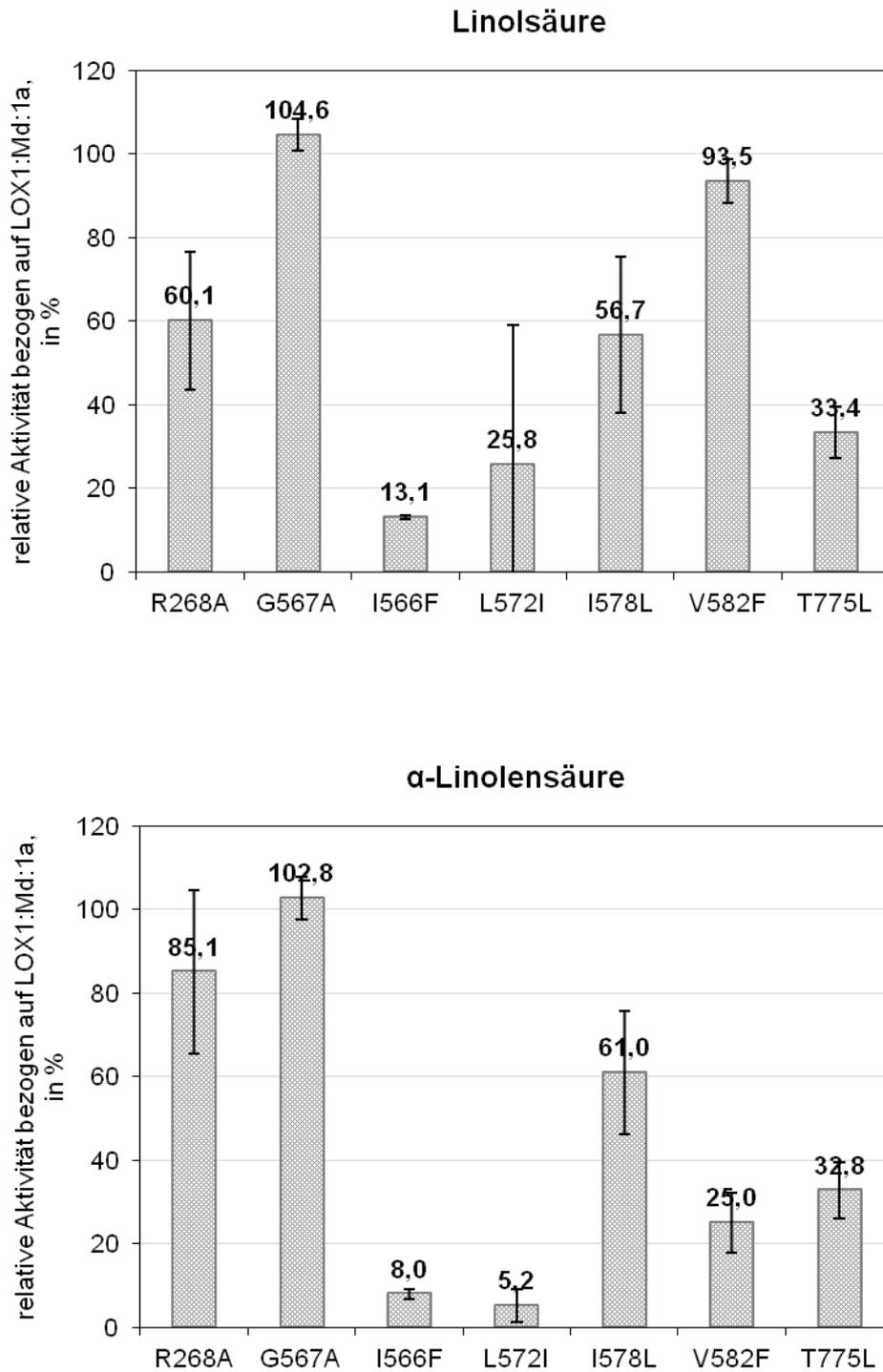


Abbildung 4.12 Relative Aktivität heterolog exprimierten *mdlox1a*-Proteins mit Linolsäure und α -Linolensäure. Spezifisch gebildete LOX-Reaktionsprodukte wurden mittels Absorption bei 234 nm chromatografisch untersucht und quantifiziert. Die angegebenen Prozente an relativer Aktivität beziehen sich auf jeweils 100% Aktivität des Wildtyp-LOX1:Md:1a-Proteins mit einem der beiden getesteten Substrate.

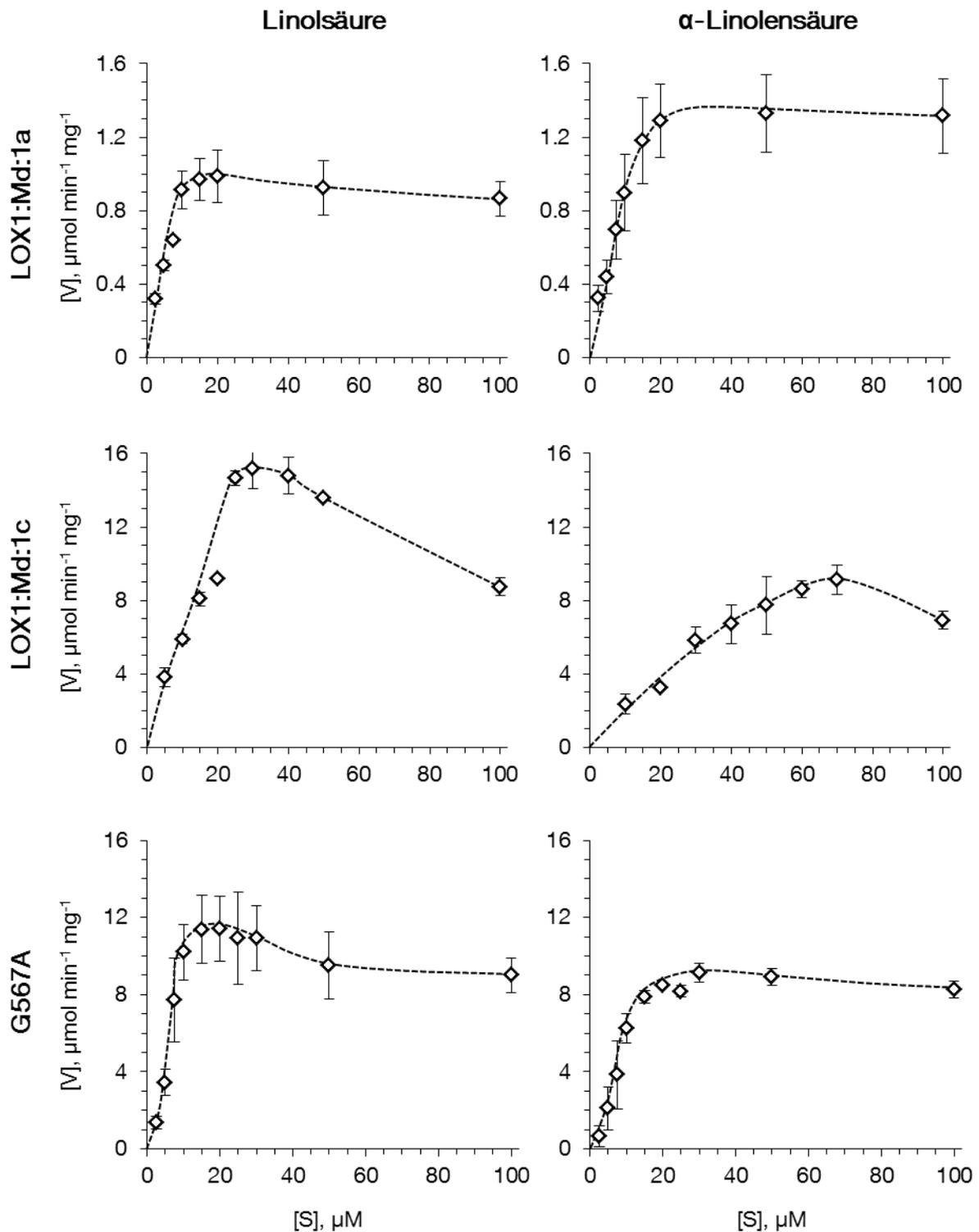


Abbildung 4.13 Auswirkung der Substrat-Konzentration [S] auf die spezifische Aktivität [V] von rekombinantem LOX-Protein des Kulturapfels. Die Umsatzraten rekombinanter LOX1:Md:1a, LOX1:Md:1c und Protein der *mdlox1a*-Mutante G567A mit den Substraten Linolsäure und α -Linolensäure wurden in einen Konzentrations-Bereich von 2,5 bis 100 μM überprüft. Die Berechnung der kinetischen Parameter (Kapitel 3.5.3, Tabelle 3.6) erfolgte mittels Michaelis-Menten-Gleichung durch die Daten-Punkte im linearen Anstieg der Kurven.

Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Wilfried Schwab für die Ermöglichung dieser Arbeit bedanken. Ohne seine ausdauernde Betreuung, zahlreichen Anregungen und konstruktive Kritik wäre sie nie das geworden, was sie heute ist.

Des Weiteren danke ich Dr. Thomas Hoffmann, dass er sich als Mentor zur Verfügung gestellt hat und dieser Funktion gewissenhaft mit zahlreichen Ratschlägen, motivierenden Worten und nicht zuletzt der genauen Prüfung dieses Manuskriptes nachkam.

Dr. Frank Dunemann und Jörg Vogt gilt mein besonderer Dank für viele aufschlussreiche Diskussionen und das Voranbringen des Projektes. Darüber hinaus danke ich Dr. Stephanie Hücherig und Miriam González Rojas für die Hilfe bei der Durchführung diverser Versuche sowie die Unterstützung in allen Lebenslagen. Besonders möchte ich an dieser Stelle Dr. Fong-Chin Huang hervorheben, die mich geduldig und kompetent in die Welt der Lipoxygenasen eingeführt hat.

Alkistis E.L. Bassukas, Ngoc T.K. Nguyen, Silvia Šillerová, Alper Poyraz, Antonia Eckl und Florian Miehle gilt mein Dank für ihr großes Engagement und Interesse an dieser Arbeit.

Außerdem danke ich allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern des Fachgebietes Biotechnologie der Naturstoffe für das angenehme Arbeitsklima in den letzten drei Jahren. Ich kann nur hoffen, dass ich in Zukunft ähnlich freundliche und hilfsbereite Kollegen haben werde! Hervorheben möchte ich an dieser Stelle Friedericke Bönisch, Katrin Franz und Katja Schulenburg. Es ist schön, dass ich euch als meine Freundinnen bezeichnen darf!

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinem Freund für das große in mich gesetzte Vertrauen, die stetige Unterstützung und die vielen ermutigenden Worte. Ich hoffe, ich konnte euch stolz machen!