

**Molekulare und strukturelle Charakterisierung der
Flavonolsynthese aus *Citrus unshiu***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Frank Wellmann
aus
Freiburg im Breisgau

Marburg/ Lahn 2002

Vom Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 17.12.2002 angenommen.

Erstgutachter: Herr Professor Dr. Ulrich Matern

Zweitgutachter: Herr Professor Dr. Alfred Batschauer

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2002

Wesentliche Auszüge dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Publikationen

[1] Wellmann F., Lukacin R., Moriguchi T., Britsch L., Schiltz E. & Matern U. (2002);
Functional expression and mutational analysis of flavonol synthase from *Citrus unshiu*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1-9

[2] Lukacin R., Wellmann F., Britsch L., Martens S. & Matern U. (2002);
Flavonol synthase from *Citrus unshiu* is a bifunctional dioxygenase.
Phytochemistry, im Druck

[3] Martens S., Forkmann G., Britsch L., Wellmann F., Matern U. & Lukacin R. (2002);
Divergent evolution of flavonoid 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases in parsley.
PNAS, submitted

Poster

[1] Wellmann F., Lukacin R. & Matern U.
Functional characterization of flavonol synthase from *Citrus unshiu*;
Deutsche Botanische Gesellschaft, Botanikertagung Freiburg i. Br. 2002

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
A Einleitung	1
A 1 Struktur und physiologische Bedeutung von Flavonoiden	1
A 1.1 Einfluss der Flavonoide auf die Blütenfarben	1
A 1.2 Lichtabhängige Flavonoidbildung	2
A 1.3 Flavonoide als Wachstumsregulatoren	4
A 1.4 Rolle der Flavonoide in der Phytopathogenabwehr	4
A 1.5 Bedeutung von Flavonoiden bei Pflanze - Tier Interaktionen	4
A 2 Humantherapeutische Bedeutung von Flavonoiden	5
A 2.1 Resorption und Metabolismus von Flavonoiden	5
A 2.2 Antioxidative Eigenschaften von Flavonoiden	6
A 2.3 Tumor-protective Wirkung von Flavonoiden	7
A 2.4 Immunmodulatorische Wirkung von Flavonoiden	8
A 2.5 Antivirale Wirkung von Flavonoiden	9
A 2.6 Toxizität von Flavonoiden	10
A 3 Flavonoidbiosynthese	11
A 3.1 Ort der Biosynthese	11
A 3.2 Biosyntheseweg	11
A 4 Klassifikation von Oxygenasen	16
A 4.1 Allgemeine Unterscheidung von Monooxygenasen und Dioxygenasen	16
A 4.2 Pharmazeutische Relevanz 2-Oxoglutarat-abhängiger Dioxygenasen und verwandter Nicht-Häm-Fe (II) Enzyme	19
A 4.3 Funktionelle und mechanistische Aspekte von 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen und verwandten Nicht-Häm-Fe (II) Enzymen	19
A 4.3.1 Penicillin- und Cephalosporin-Biosynthese	19
A 4.3.2 Clavulansäure-Biosynthese	20
A 4.3.3 Hydroxylierung von Prolinen und Prolylresten	21
A 4.3.4 Ethylenbiosynthese	22
A 4.4 Flavonolsynthase	22
A 4.5 Mechanismus von 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen	23

A 5	Aufgabenstellung	26
B	Material	28
B 1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	28
B 2	Enzyme	29
B 3	Antiseren und Proteine	29
B 4	Membranen	29
B 5	Dünnschichtplatten und Laufmittel	29
B 6	Geräte	30
B 7	Stämme von <i>E. coli</i>	30
B 8	Vektoren	30
B 9	Puffer und Lösungen	31
B 10	Medien	33
C	Methoden	34
C 1	Allgemeine proteinbiochemische Methoden	34
C 2	Allgemeine molekularbiologische Methoden	36
C 3	<i>In vitro</i>-Mutagenese mit Oligonukleotiden	37
C 4	Expression der FLS in <i>E. coli</i>	39
C 5	Zellaufschluss	41
C 6	Reinigung der heterolog exprimierten FLS	41
C 7	Aminoterninale Sequenzierung	42
C 8	Test auf Flavonolsynthase-Aktivität	43
C 9	Präparative Gewinnung von Quercetin	44
C 10	Massenspektroskopie	45
C 11	CD-Spektroskopie	45
C 12	FLS-Antiserum	45

D	Ergebnisse und Diskussion	46
D 1	FLS-Klonierung	46
D 2	Heterologe Expression der FLS	46
D 3	Test auf FLS-Aktivität	48
D 4	Reinigung der rekombinanten FLS	49
D 4.1	Ammoniumsulfatfällung	49
D 4.2	Größenausschlusschromatographie an Fractogel EMD Bio SEC	49
D 4.3	Anionenaustauschchromatographie an Fractogel EMD DEAE	51
D 4.4	Reinigungstabelle	52
D 5	Biochemische Charakterisierung der rekombinanten FLS	54
D 5.1	Polypeptidanalyse	54
D 5.2	Präparativer Enzymtest	54
D 5.3	HPLC-Analyse	55
D 5.4	Zeit- und Proteinlinearität	57
D 5.5	pH-Optimum	58
D 5.6	Temperaturoptimum	60
D 5.7	Kinetische Konstanten für 2-Oxoglutarat und Fe ²⁺	60
D 5.8	Bestimmung der apparenten Michaelis Konstante für DHQ und DHK	62
D 6	Datenbankanalyse der FLS	64
D 6.1	Ermittlung einer FLS-Konsensussequenz	64
D 6.2	Aminosäuresequenzanalysen	66
D 7	<i>In vitro</i>-Mutagenesestudien	67
D 7.1	Expression der FLS-Mutanten	69
D 7.2	Reinigung der FLS-Mutanten	70
D 7.3	Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der FLS-Mutanten	71
D 8	Strukturelle Charakterisierung der FLS	72
D 8.1	CD-Spektrum der FLS	72
D 8.2	Serologische Verwandtschaften der FLS	74
D 9	Strukturvorhersage der FLS	75
D 10	Charakterisierung des aktiven Zentrums des FLS-Proteinmodells	83

D 11 Funktionelle Charakterisierung der FLS	85
D 11.1 Überprüfung der FLS auf ANS-Aktivität	85
D 11.2 Überprüfung der FLS auf FHT-Aktivität	86
D 11.3 Stereospezifität der FLS für Flavanon-Substrate	88
E Schlussbetrachtung	93
E 1 Klonierung und Expression der FLS	93
E 2 Reinigung der rekombinanten FLS	94
E 3 Biochemische Charakterisierung	95
E 4 Datenbankanalyse und Strukturvorhersage der FLS	97
E 5 <i>In vitro</i> -Mutagenese	98
E 6 Strukturelle Untersuchungen der FLS	104
E 7 Substratspezifität der FLS	105
F Zusammenfassung	111
G Literaturverzeichnis	113

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
amp	Ampicillin
ANS	Anthocyanidinsynthase
ACV	δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
Da	Dalton
DAOCS	Deacetoxycephalosporin C-Synthase
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig (double-stranded)
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FHT	Flavanon-3 β -hydroxylase
FLS	Flavonolsynthase
FNS	Flavonsynthase
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
IPNS	Isopenicillin N-Synthase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kan	Kanamycin
Km	Michaelis-Menten-Konstante
kat	Katal
kb	Kilobase(npaare)
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar
MCS	multiple Klonierungsstelle
min	Minuten
Mr	relative Molekularmasse
OD600	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	Umdrehungen pro minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecylsulfate)
SEC	Grössenausschluss-Chromatographie (size exclusion chromatography)
ss	einzelsträngig (single-stranded)
syn.	synonym
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N'-N'-Tetramethylethylendiamin

Tween 20	Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat
UV	Ultraviolette Strahlung
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

Abkürzungen der Aminosäuren im Ein- und Dreibuchstabencode:

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

A Einleitung

A 1 Struktur und physiologische Bedeutung von Flavonoiden

Flavonoide sowie die strukturell von ihnen abgeleiteten Anthocyanidine, Isoflavonoide, Proanthocyanidine und Catechine gehören zur großen Gruppe der Phenylpropane und zählen neben den Alkaloiden und Terpenoiden zu den am weitesten verbreiteten Sekundärmetaboliten in Pflanzen. Die Flavonoide leiten sich vom Flavan (2-Phenylbenzodihydropyran) ab (**Abb. 1**), wobei ihre große Variabilität hauptsächlich auf einem unterschiedlichen Hydroxylierungs- und/ oder Methylierungsmuster der drei Ringe, sowie auf der Art, Anzahl bzw. Anordnung nicht acylierter und acylierter Zuckerreste beruht. Verwandtschaften von Flavonoidstrukturen korrelieren vielfach mit phylogenetischen Verwandtschaften der Pflanzenarten, in denen sie auftreten. Sie haben sich daher als Merkmale bewährt, um unabhängig vom Vergleich morphologischer Kriterien Verwandtschaftsbeziehungen bei höheren Pflanzen zu studieren (Harborne, 2000). Als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe werden ihnen vielfältige physiologische Aufgaben zugeschrieben.

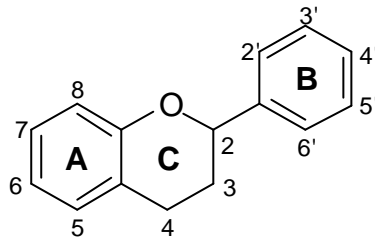


Abb. 1: Das Flavan - Grundgerüst (2-Phenylchroman) der Flavonoide.

A 1.1 Einfluss der Flavonoide auf die Blütenfarben

Die gelb bis rötliche Pigmentierung von Blüten und Früchten wird durch vakuoläre Akkumulation von Flavonoiden, in erster Linie von Anthocyanen, aber auch durch Carotinoide und Betalaine bestimmt. Die Flavonoidklasse ist ubiquitär im Pflanzenreich vorhanden, während die Anthocyane in der Ordnung der *Caryophyllales* durch Betalaine ersetzt sind. Eine individuelle Farbgebung wird durch Variation der Pigmentklassen, durch Unterschiede in der Konzentration der einzelnen Farbstoffkomponenten sowie auch durch

strukturelle Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen, Methylierungen, Acylierungen oder durch Copigmentierung der Anthocyane mit Tanninen, Flavonen und Flavonolen erreicht. So verleihen Flavonole der Blüte eine gelbliche Färbung, wobei sie aufgrund ihrer stark UV-fluoreszierenden Eigenschaften sehr gut von Insekten erkannt werden können (Cooper-Driver, 2001). Auch Komplexierungen der Anthocyane mit Metallionen, wie Eisen-, Magnesium-, Aluminiumionen, ferner die Epidermiszellform (Mol *et al.*, 1998) und vor allem der pH-Wert der Zellsaftvakuole beeinflussen die Blütenfarbgebung maßgeblich (Figueiredo *et al.*, 1996). In Blütenblättern von *Eustoma grandifolium* sind in der Vakuole nachgewiesene Protein-Anthocyan-Verbindungen (AVI = Anthocyanic Vacuolar Inclusions) zusätzlich für eine Farbintensivierung verantwortlich. Solche Einschlüsse wurden verschiedentlich als Orte der Anthocyan-Biosynthese propagiert (Markham *et al.*, 2000).

A 1.2 Lichtabhängige Flavonoidbildung

Es gibt experimentelle Befunde, die eine induzierende nichtschädigende Wirkung von UV-B-Strahlung auf die Flavonoidbiosynthese belegen (Wellmann, 1983; Beggs & Wellmann, 1994). Man konnte auf Grund operationaler Kriterien zeigen, dass dabei ein spezifischer, bisher nicht identifizierter UV-B-Photorezeptor wirksam ist. Für die maximale Induktion der Flavonoidbiosynthese ist in vielen pflanzlichen Systemen eine UV-B-Bestrahlung Voraussetzung, das Ausmaß der Reaktion kann dabei durch die häufig auch allein wirksamen Photorezeptoren des sichtbaren Spektralbereichs (Phytochrom, Blau-Rezeptor) beeinflusst werden (Duell-Pfaff & Wellmann, 1982; Thompson & White, 1991; Beggs & Wellmann, 1994). Diese UV- und Licht-Induzierbarkeit des Biosynthesewegs war von großem Vorteil bei der Identifizierung der beteiligten Enzyme und der molekularen Regulationsprozesse (Wellmann, 1975; Hahlbrock & Scheel, 1989; Thompson & White, 1991).

Im Sonnenlicht als Energiequelle sind Pflanzen zwangsläufig auch der potentiell schädigenden UV-Strahlung ausgesetzt. Als in der Mehrzahl sessile Organismen können sie der UV-Strahlung nicht ausweichen und müssen effektive Schutzmaßnahmen besitzen um zu überleben. Einer dieser Schutzfaktoren ist die durch UV-Bestrahlung induzierte Akkumulation von Flavonoiden in der Epidermis (Wellmann, 1983; Reuber *et al.*, 1996). Die UV-Schutzwirkung dieser Schirmpigmente ließ sich auch unter natürlichen Strahlungsbedingungen nachweisen (Buchholz *et al.*, 1995). Die Schutzfunktion dieser Verbindungen besteht möglicherweise nicht nur in der Absorption von UV-Strahlung,

sondern auch in der Wirkung als effektive Antioxidantien (**A 2.2**) in Form von Radikalfängern für UV-induzierte reaktive Sauerstoffspezies (Larson, 1988; Markham *et al.*, 1998; Kondo & Kawashima, 2000; Foyer *et al.*, 1994).

Phenolische Verbindungen, wie Hydroxyzimtsäurederivate und Flavonoide, besitzen die Fähigkeit ultraviolette Strahlung zu absorbieren. Besondere Bedeutung kommt den Flavonolen zu, die zwei Absorptionsmaxima besitzen. Ein erstes Maximum der Absorption durch Ring B liegt im Bereich von 320-385 nm, und ein zweites Maximum im Bereich von 250-285 nm geht auf die Absorption von Ring A zurück. Eine Erhöhung der Hydroxylierung führt zu einer Verschiebung in den längerwelligen Spektralbereich, beispielsweise von 367 nm für Kämpferol (Hydroxylgruppen in 3,5,7,4') zu 374 nm für Myricetin (Hydroxylgruppen in 3,5,7,3',4',5') (**Abb. 2**). Ein Fehlen der 3-OH-Gruppe oder O-Methylierungen, sowie Glykosylierungen verschieben das Absorptionsspektrum zu kürzeren Wellenlängen hin. Anthocyanidinglykoside absorbieren durch die erweiterte Konjugation der drei planaren Ringsysteme im sichtbaren Bereich (450-560 nm) (**Abb. 3**).

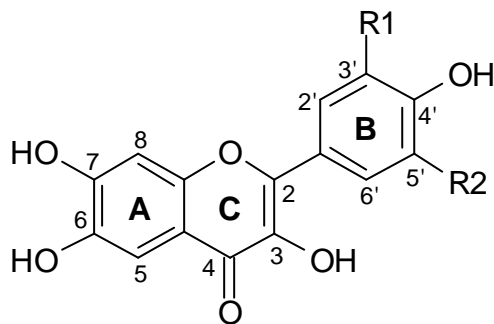


Abb. 2: Flavonolgrundgerüst

R1: H; R2: H: Kämpferol

R1: OH; R2: H: Quercetin

R1: OH; R2: OH: Myricetin

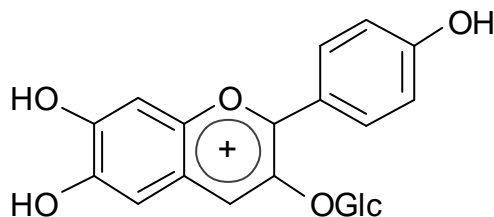


Abb. 3: Anthocyangrundgerüst

A 1.3 Flavonoide als Wachstumsregulatoren

Flavonole wie Kämpferol und Quercetin können offensichtlich ähnlich dem Herbizid NPA (1-*N*-naphthylphtalamic acid) den polaren Auxintransport hemmen und damit zu einer Auxinakkumulation in der Zelle führen (Murphy *et al.*, 2000).

Ferner spielen Flavonoide eine wichtige Rolle bei der Keimung des Pollenkorns und dem Pollenschlauchwachstum. Untersuchungen zeigten, dass Flavonoid-Mangel-Mutanten von Mais steril waren, ebenso auch transgene *Petunia hybrida*-Pflanzen, bei denen durch eine Blockade des Biosyntheseweges die Akkumulation von Flavonolen im Pollen unterdrückt wurde. Von außen dem Pollenkorn, den Antheren oder der Narbe zugeführtes Kämpferol konnte *in vitro* sowie *in vivo* die Keimfähigkeit des Pollens, das Pollenschlauchwachstum und die Fertilität der Pflanzen wiederherstellen (Mo & Taylor, 1992; Cheung, 1996).

A 1.4 Rolle der Flavonoide in der Phytopathogenabwehr

Einige Flavonoide können antibiotisch, antiviral und fungizid wirken (Harborne, 2000) und sind nach Induktion durch biotische oder abiotische Stressfaktoren (Elicitoren) als Phytoalexine an der Abwehr von Schadorganismen beteiligt. Studien an *Pisum sativum* belegten für die Pterocarpane Maackiain und Pisatin eine typische Phytoalexinwirkung bei der Interaktion mit *Nectria haematococca* (Wasmann & Van Etten, 1996; Dixon & Steele, 1999). Ferner ist in diesem Zusammenhang die Bedeutung von Flavonoiden bei der Interaktion von stickstofffixierenden Rhizobien mit Leguminosen zu nennen. Flavonoide aus der Wurzel induzieren bakterielle *nodD* Gene, die für die Wirtsspezifität dieser Symbiose verantwortlich sind (Fisher & Long, 1992; Cullimore *et al.*, 2001).

A 1.5 Bedeutung von Flavonoiden bei Pflanze - Tier Interaktionen

Verschiedentlich wurde berichtet, dass Flavonoide einen gewissen Fraßschutz gegen Herbivoren vermitteln. Beispielsweise werden bei der Reis-pflanze im Blatt als Antwort auf eine Nematodeninfektion erhöhte Konzentrationen des Flavanons Sakuranetin gefunden. Entsprechend schützen Isoflavone in Klee die Wurzel vor Fraßfeinden, wie den Käfer *Costelytra zealandica* oder in Blättern von *Trifolium subterraneum* vor Befall durch die Milbe *Halotydeus destructor* (Harborne, 2000).

Schmetterlinge mit ihren herbivoren Larven sind in besonderem Maße auf Wirtspflanzen angewiesen. Flavonoide, die von bestimmten Tagfaltern (z.B. vielen Bläulingen) während der larvalen Fraßphase aufgenommen werden und später in die Flügel eingelagert werden, sind ausschlaggebend für das Farbmuster des Falters (Proksch *et al.*, 1999).

A 2 Humantherapeutische Bedeutung von Flavonoiden

Epidemiologische Studien weisen auf eine inverse Korrelation zwischen der Flavonoidaufnahme und dem Risiko für eine Reihe von Erkrankungen hin. So liegt die Mortalitätsrate an koronaren Herz-/ Kreislaufkrankungen (KHK) in Frankreich wesentlich niedriger als beispielsweise in Grossbritannien, in den USA oder Deutschland, obwohl die Aufnahme an gesättigten Fettsäuren sowie die Serumcholesterinwerte in allen Ländern vergleichbar sind. Dies wird auf die mediterrane Ernährung in Frankreich mit einem höheren Obst- und Gemüseverzehr sowie den Rotweinkonsum (French paradoxon) zurückgeführt (Renaud *et al.*, 1992). In der "Zutphen Elderly Study" wurde die Flavonoidzufuhr mit der Nahrung und das Risiko einer Erkrankung an KHK untersucht (Hertog *et al.*, 1993). Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen KHK-bedingter Mortalität und aufgenommener Flavonoidmenge. Bei denjenigen Probanden, die in dieser fünfjährigen Follow-up-Studie an Männern von 65 bis 84 Jahren das Viertel mit der höchsten Flavonoidzufuhr bildeten, betrug das relative Risiko 0,42 im Vergleich zu dem Viertel mit der geringsten Flavonoidzufuhr (Hollmann *et al.*, 1997). Daneben sind es hauptsächlich *in vitro*- sowie tierexperimentelle Studien, aus denen physiologische Wirkungen von Flavonoiden abgeleitet werden können. Quercetin, das im Pflanzenreich in quantitativer Hinsicht der bedeutendste Vertreter der Flavonoide ist, gehört dabei zu den am intensivsten untersuchten Flavonoiden.

A 2.1 Resorption und Metabolismus von Flavonoiden

Man geht davon aus, dass Flavonoidglykoside durch die Mikroflora im Dickdarm hydrolysiert werden und die Aglyka durch passive Diffusion absorbiert werden. In der Leber intensiv glukuroniert, sulfatiert oder methyliert, werden sie mit dem Gallensaft ausgeschieden und unterliegen einem enterohepatischen Kreislauf. Abbauprodukte der Aglykone, z.B. Phenolsäuren, werden im Kolon absorbiert. Im Falle der Flavonole werden nur 1-2 % der oral

aufgenommenen Menge mit intakter Grundstruktur ausgeschieden, was auf eine extensive Metabolisierung hindeutet (Hollmann *et al.*, 1997^b). Die biologische Funktion der Flavonoid-metabolite ist weiterhin unklar (Gäßler *et al.*, 2002). Klinische Untersuchungen zur Resorption von Quercetin belegen geringe Resorptionsraten im Menschen von etwa 1 % (Griffiths, 1982). Im Gegensatz dazu konnte in Ratten für peroral verabreichtes ¹⁴C-Quercetin eine mit 20 % deutlich höhere Resorption gezeigt werden, wobei die Produkte nicht analysiert wurden. Neuere Studien deuten darauf hin, dass bestimmte Flavonolglukoside über einen aktiven Transport im Dünndarm aufgenommen werden. Bei Ileostomie-Patienten wurde nach standardisierter oraler Zufuhr von Quercetinglykosiden in Form von Zwiebelextrakten eine doppelt so hohe (52 %) Quercetinresorption ermittelt wie nach der Aufnahme von reinem Quercetin (24 %) (Hollmann *et al.*, 1995, 1997^a). Einschränkend zu bemerken ist jedoch, dass die Probanden zuvor nicht auf ihre intestinale Permeabilität untersucht wurden. Auch ein Einfluss des glykosidischen Zuckers auf die Bioverfügbarkeit von Flavonoidglykosiden wird diskutiert (Hollmann *et al.*, 1997^b).

An Caco-2-Zellen konnte gezeigt werden, dass Quercetinmono- und Quercetindiglykoside Substrate für den intestinalen Na⁺-abhängigen D-Glukose-Cotransporter SGLT1 sind (Gee *et al.*, 1998). Allerdings werden die Glykoside infolge der Aktivität des Multi-Drug-Resistance-assoziierten Proteins MRP2 auf der apikalen Seite der Intestinalzellen wieder zu einem gewissen Grad aus der Zelle heraustransportiert (Walgren & Walle, 1998). Die höchsten Plasmakonzentrationen wurden 0,5 bis 9 h nach oraler Flavonolaufnahme gemessen (Hollmann *et al.*, 1997^b). Die Eliminationshalbwertszeit für die Ausscheidung von Quercetinglukosiden, aufgenommen aus Zwiebeln, beträgt etwa 24 Stunden. Im Plasma liegt Quercetin zu 99 % an Albumin gebunden vor. Diese hohe Affinität erklärt möglicherweise die sehr langsame Elimination von Quercetin (Hollmann *et al.*, 1996; Hollmann *et al.*, 1997^b).

A 2.2 Antioxidative Eigenschaften von Flavonoiden

Flavonoide wirken in der Regel sowohl in lipophilen als auch in hydrophilen Systemen als starke Antioxidantien. Flavonole besitzen ein höheres Redoxpotential als Ascorbat und oxidieren daher das Ascorbylradikal (Rice-Evans *et al.*, 1996). Zudem regenerieren sie oxidiertes α -Tocopherol. Wesentlich für eine antioxidative Wirkung sind *ortho*-ständige Hydroxylgruppen am B-Ring sowie eine 2,3-Doppelbindung und eine 3-Hydroxylgruppe (Rice-Evans *et al.*, 1996). Durch Abgabe von Wasserstoffionen aus den phenolischen

Hydroxylgruppen können Flavonoide reaktive Sauerstoffspezies (z.B. Superoxid, Hydroxylradikale) und Stickstoffverbindungen (z.B. Peroxynitrit) abfangen. Die entstehenden Phenoxyintermediate erweisen sich als relativ stabil und gehen weitere Reaktionen mit freien Radikalen ein (Rice-Evans *et al.*, 1996). Eine weitere wichtige Eigenschaft des antioxidativen Potentials von Flavonoiden besteht in der Fähigkeit, Metalle wie Eisen- und Kupferionen zu chelatisieren, die ihrerseits wahrscheinlich durch Fenton- und Haber-Weiss-Reaktionen (Thompson *et al.*, 1976) die Autoxidation ungesättigter Lipide beschleunigen können. Über die Messung von Malondialdehyd, einem der Endprodukte der Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, kann der schützende Effekt von Pflanzenphenolen auf intakte Zellen und Gewebe vor oxidativem Stress verfolgt werden (Nardini *et al.*, 1998).

Ferner hemmt Quercetin *in vitro* Lipoxygenase- und Cyclooxygenase-Aktivitäten und damit die Eicosanoid-Biosynthese (Formica & Regelson, 1995). *In vitro* hemmt Quercetin auch die Oxidation von LDL (low density lipoprotein) sowohl direkt, als auch indirekt, indem es das in die LDL-Partikel eingelagerte α -Tocopherol vor Oxidation schützt oder bereits oxidiertes Vitamin E regeneriert (Formica & Regelson, 1995). Weiterhin inhibiert Quercetin die Xanthinoxidase und reduziert die Harnsäurebildung (Middleton *et al.*, 1994).

Darüberhinaus können Quercetin und andere Flavonoide mit intrazellulären Antioxidantien wie z.B. Glutathionperoxidase interagieren und möglicherweise deren antioxidative Aktivität erhöhen. Auch die Fähigkeit einiger Flavonoide zur Enzyminduktion spielt in antioxidativen Prozessen offensichtlich eine Rolle (Kuo *et al.*, 1999).

A 2.3 Tumor-protective Wirkung von Flavonoiden

Aufgrund ihrer Redoxaktivität können Flavonoide DNA-Schäden verhindern. Sowohl in HepG2 Leberzellen und menschlichen Lymphozyten, in denen durch H₂O₂-Behandlung DNA-Schäden induziert wurden, als auch in mit *tert*-Butylhydroperoxid induzierten U-937 monozytischen Zellen konnten signifikante Effekte festgestellt werden (Johnson & Loo, 2000).

In Tierexperimenten wurde eine antikanzerogene Wirkung von Flavonoiden gegenüber Brust-, Dickdarm-, Haut-, Magenkrebs, sowie oralen Krebsformen festgestellt. Da die Genese solcher Tumoren nicht im Detail geklärt ist und multifaktorielle Prozesse zugrundeliegen müssen, werden verschiedene Abläufe diskutiert.

Flavonoide modulieren die Aktivität von Cytochrom-P450-(CYP450)-abhängigen Monooxygenasen. Die Hemmung solcher Enzyme aus dem Phase I-Metabolismus von

Xenobiotika kann eine Aktivierung möglicher Kanzerogene verhindern. Beispielsweise wird Benzo[a]pyren durch Cyp1A1 zum ultimativen Mutagen oxidiert und ist selbst über den Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) ein Induktor der Cyp1A1 Transkription. Quercetin wirkt als AhR-Rezeptor Antagonist. Die Effektivität von Flavonoiden als Antagonisten hängt von Zahl und Position der Hydroxylgruppen ab, wobei eine steigende Zahl von Hydroxylgruppen an Ring A und B die Hemmwirkung vermindert, während *ortho*-Substituenten verstärkend wirken (Stiborova *et al.*, 2002). Einige Flavonoide können sich möglicherweise aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit Nukleotiden an die DNA anlagern und damit Bindungsstellen für Kanzerogene maskieren (Dixit & Gold, 1986; Hadi *et al.*, 1994). Eine Induktion von Phase-II-Enzymen (z.B. Glutathion-S-transferase, UDP-Glucuronyltransferase, N-Acetyltransferase) durch Flavonoide kann zudem die Entgiftung von Kanzerogenen erhöhen (Stiborova *et al.*, 2002). Ferner inhibieren Flavonoide Schlüsselenzyme der Signaltransduktion (Proteinkinase C, Tyrosinkinase), die an der Regulation von Zellproliferation, Angiogenese und Apoptose beteiligt sind (Middleton & Kandaswami, 1994). Weiter wurde für verschiedene Flavonoide eine Hemmung der DNA-Topoisomerasen nachgewiesen. Die Flavonole Quercetin, Myricetin, Fisetin und Morin blockieren die Topoisomerasen I und II unspezifisch, das Chalkon Phloretin und das Flavonol Kämpferol dagegen selektiv die Topoisomerase II (Constantinou *et al.*, 1995, 2000). Die Induktion der Apoptose wird als therapeutisches Ziel der aktiven Tumorthherapie gesehen. *In vitro* konnte für Quercetin eine Induktion der Apoptose nachgewiesen werden, die allerdings auch stark vom verwendeten Zelltyp abhängt (Marian *et al.*, 1999). Überdies hemmen Flavonoide *in vitro* die Proliferation von Krebszelllinien, indem sie die Expression von Protoonkogenen wie z.B. *Ki-ras* und *c-myc* vermindern (Olah *et al.*, 1997).

Einige Flavonoide besitzen die Fähigkeit am Östrogenrezeptor zu binden und damit dessen Aktivität zu modulieren. Daneben beeinflussen sie durch eine Hemmung der Aromatase den Östrogenspiegel. Pflanzliche Polyphenole mit einem antiöstrogenen Effekt gelten als potentielle Krebstherapeutika gegenüber Brust und Prostatakrebsformen (Stiborova *et al.*, 2002).

A 2.4 Immunmodulatorische Wirkung von Flavonoiden

Beobachtungen *in vitro* und *in vivo* deuten auf eine immunregulierende Wirkung von Flavonoiden hin, die sich meist als Immunsuppression äußert. Angriffspunkte im Immunsystem sind vermutlich Protein- und Proteintyrosin-Kinasen, die für die

Zellaktivierung wichtig sind. Die Enzyme können möglicherweise kompetitiv an der ATP-Bindungsstelle gehemmt werden (Manthey, 2000). *In vitro* blockieren verschiedene Flavonoide die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α) und Interleukin-6 (IL-6) (Pagonis *et al.*, 1986). Ferner mindern Flavonoide die Freisetzung von Faktoren wie NF-kappa B (Wellmann *et al.*, 2001), welche die Transkription von Zytokinen wie TNF α regulieren (Lin *et al.*, 1999). Flavonoide hemmen dosisabhängig die Lymphozytenproliferation und beeinträchtigen die Antigenpräsentation durch Makrophagen (Middleton und Kandaswami, 1994). Zudem zeigt Quercetin eine starke Hemmwirkung auf die Aktivität der "natürlichen Killerzellen" und unterdrückt die Antigenstimulation von cytotoxischen T-Lymphocyten (Berg & Daniel, 1988). Die antiinflammatorische Wirkung von Quercetin beruht zum Teil auf dessen antioxidativem Effekt auf den NO-Metabolismus (Packer *et al.*, 1999) bzw. auf entzündungsfördernde Enzyme (Cyclooxygenase, Lipoxygenase) und Minderung von Entzündungsmediatoren (Leukotrienen, Prostaglandinen). Zusätzlich setzt Quercetin die Aktivität der Phospholipase A₂ herab, die für die Freisetzung von Arachidonsäure zur Prostaglandinsynthese benötigt wird.

Die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch Quercetin könnte für kardiovaskuläre Erkrankungen Bedeutung erlangen, wobei verschiedene Mechanismen diskutiert werden, etwa eine Verringerung der Thromboxan-A₂-Bildung und gleichzeitige Aktivierung von Prostaglandin I₂, eine Hemmung der Phosphodiesterase und damit Erhöhung der cAMP-Konzentration in den Thrombozyten oder etwa eine Blockade der Thromboxanrezeptoren (Formica & Regelson, 1995).

Die Freisetzung von Histamin aus aktivierten Mastzellen und basophilen Granulozyten wird ebenfalls durch Quercetin gehemmt und trägt zur antiphlogistischen Wirkung von Quercetin bei (Middleton *et al.*, 1994).

A 2.5 Antivirale Wirkung von Flavonoiden

In vitro zeigte Quercetin Wirksamkeit gegen *Herpes simplex* Virus Typ I, Tollwut, *Parainfluenza* Virus Typ 3, RS-Virus (Respiratory syncytial virus) und Sindbis-Virus. Diese Effekte beruhen möglicherweise auf der Fähigkeit, virale Proteine zu binden, oder Quercetin beeinflusst die virale Nukleinsäuresynthese. Für Methylquercetin wurde eine Blockade der Replikation des Poliovirus auf RNA-Ebene nachgewiesen (Formica & Regelson, 1995). Zudem hemmt Quercetin die Reverse Transkriptase des HI-Virus und anderer

Retroviren (Middleton *et al.*, 1994). So konnte beispielsweise mit Quercetin in einer Konzentration von 40 μM *in vitro* eine 80 %ige Hemmung der HIV-1-Replikation erzielt werden (Gatto *et al.*, 2002).

A 2.6 Toxizität von Flavonoiden

Bisher gibt es keine toxikologische Bedenken gegen flavonoidhaltige Lebensmittel. Obwohl für einige Flavonoide, insbesondere Quercetin, mutagene Wirkungen im Ames-Test belegt wurden, sprechen Tierversuche nicht für eine kanzerogene Wirkung (Middleton *et al.*, 1994). Einschränkend ist zu sagen, dass lediglich etwa 200 der rund 8000 bekannten Polyphenole auf mögliche Mutagenität getestet wurden (Ferguson, 2001). Aufgrund der geringen Resorptionsrate der Flavonoide können jedoch über die Ernährung kaum Plasmakonzentrationen erreicht werden, die *in vitro* mutagen oder cytotoxisch wirken. Gleichermäßen kritisch sind *in vitro* Untersuchungen auf einen möglichen humantherapeutischen Nutzen zu interpretieren, da in der Regel nur mit unphysiologisch hohen Flavonoidkonzentrationen Effekte festzustellen sind. Gefahr kann eventuell von flavonoidhaltigen Nahrungsergänzungsmitteln ausgehen, in denen beispielsweise Quercetin in Tagesdosen von 500-1000 mg empfohlen wird. Hohe Flavonoidkonzentrationen in Flavonoidsupplementen stehen im Verdacht bei Schwangeren das Leukämierisiko für Neugeborene zu erhöhen. Als Mechanismus wird eine durch Topoisomerase II-Inhibition ausgelöste Schädigung sog. MLL-Gene diskutiert, welche an der Regulation der Lymphozytendifferenzierung beteiligt sind. Allerdings liegen auch hierzu erst *in-vitro*-Befunde vor (Skibola & Smith, 2000). Als weitere mögliche Folge eines übermäßig hohen Flavonoidkonsums wird eine Schilddrüsendysfunktion postuliert. Flavonoide gelten als alternative Substrate für die Tyrosyl-Jodierung im Thyreoglobulin und hemmen zudem die Thyroidperoxidase, sodass die Thyroxinsynthese gehemmt wird (Divi *et al.*, 1996). Klinisch bedeutsam sind Flavonoidinteraktionen mit dem Cytochrom-P450-abhängigen Enzym CYP3A4, das eine wichtige Rolle im Metabolismus von Medikamenten spielt. So können mit der Nahrung aufgenommene Flavonoide, wie z.B. das im Grapefruitsaft enthaltene Naringenin, den Abbau von Arzneimitteln verzögern (Hodek *et al.*, 2002). Zusammenfassend bleibt trotz intensiver Bemühungen die Frage unbeantwortet, ob und in welcher Menge die Aufnahme von Flavonoiden einen gesundheitlichen Nutzen für den Menschen bedeutet.

A 3 Flavonoidbiosynthese

A 3.1 Ort der Biosynthese

Die Flavonoidbiosynthese findet im Cytoplasma der Zelle unter Beteiligung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) statt, wobei der erste Nachweis einer Flavonoid-Hydroxylierung durch Mikrosomenfraktionen aus *Haplopappus gracilis* Zellkulturen (Fritsch & Grisebach, 1975) erbracht wurde. Bestätigt wurden die Ergebnisse durch Zellfraktionierung mit ER-Markerenzymen einschließlich Gelfiltration, sowie durch Immunlokalisation (Hrazdina & Wagner, 1985). Das zur Zeit gültige Modell geht von einem lose assoziierten Multienzymkomplex an der zytosolischen Seite des rauhen ER aus, der mehrere der löslichen Flavonoidenzyme einschließt und an membranständigen P450-Hydroxylasen verankert ist. (Hrazdina & Jensen, 1992; Winkel-Shirley, 1999). Daneben scheinen einige der an der Flavonoid-Biosynthese beteiligten Enzyme, z.B. eine Acyltransferase in Blütenblättern von *Gentiana triflora*, als frei lösliche Enzyme im Cytosol vorzuliegen (Fujiwara *et al.*, 1998).

A 3.2 Biosyntheseweg

Das Phenylchroman-Gerüst der Flavonoide wird aus dem Produkt des generellen Phenylpropanweges (Ring B und C-2, -3, -4 im Ring C) und drei Acetateinheiten (Ring A) zusammengesetzt. Phenylalanin aus dem Shikimatweg wird durch die Aktivität der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL, E.C. 4.3.15) unter *trans*-Eliminierung zu *trans*-Zimtsäure desaminiert (Schuster & Retey, 1995) (**Abb. 4**). PAL ist eines der bestuntersuchten Enzyme des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. Es stellt ein Tetramer aus 53 bis 83 kDa Untereinheiten dar (Forkmann & Heller, 1999). PAL-Enzyme werden von einer Genfamilie codiert, wobei meist 3-4 Gene vorgefunden wurden (Bolwell *et al.*, 1985; Loggemann *et al.*, 1995; Kumar & Ellis, 2001). Vergleiche der Polypeptidsequenzen deuten auf eine strukturelle und mechanistische Verwandtschaft mit der Histidin-Ammoniak-Lyase (HAL, E.C. 4.3.1.3) hin. Mutagenesestudien und die Kristallstrukturdaten der HAL aus *Pseudomonas putida* sprechen dafür, dass die PAL-Reaktion ebenfalls über eine kovalente Bindung des Substrates an eine prosthetische 4-Methyliden-imidazol-5-on-Gruppe verläuft (Schwede *et al.*, 1999; Röther *et al.*, 2002). *Trans*-Zimtsäure übt eine Produkthemmung auf die PAL-Aktivität aus (Bolwell *et al.*, 1988; Blount *et al.*, 2000).

Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H, E.C. 1.14.13.11) ist eine P450-Monooxygenase des endoplasmatischen Retikulums und katalysiert die Bildung der 4-Cumarsäure. Für diese Reaktion wurde ein NIH-Shift nachgewiesen, was auf ein intermediäres 3,4-Epoxid schließen lässt und typisch für P450 Reaktionen ist (Forkmann & Heller, 1999) (**Abb. 4**).

Die Cumarsäure wird durch 4-Cumarat: CoA Ligase (4CL, E.C. 6.2.1.12) in einer Mg^{2+} /ATP-abhängigen Reaktion aktiviert. In einigen Pflanzen kann auch Zimtsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure oder Hydroxyferulasäure bzw. Sinapinsäure auf diesem Wege aktiviert werden (**Abb. 4**). Es wird angenommen, dass die Reaktion entsprechend den Luciferasen, Peptidsynthetasen sowie Acyl-CoA-Synthetasen über ein Adenylat-Zwischenprodukt verläuft (Ehltling *et al.*, 2001). Die aktivierten Ester sind Vorstufen für viele Sekundärmetabolite, u.a. Lignin, Lignan, Suberin und Flavonoide. Die 4CL tritt als Monomer mit einem Molekulargewicht von 40000-50000 auf und gehört in Pflanzen einer Multi-Genfamilie an. In einigen Spezies differieren 4CL-Isoformen in ihren Substratspezifitäten sowie ihren Expressionsmustern (Meng *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1995; Ehltling *et al.*, 2001; Lindermayr *et al.*, 2002).

Die zur Flavonoidbildung benötigten Acetateinheiten werden nach Carboxylierung von Acetyl-CoA durch Acetyl-CoA Carboxylase (ACC, E.C. 6.4.1.2) in Form von Malonyl-CoA bereitgestellt. Die ACC besteht aus zwei 200 bis 240 kDa Untereinheiten (Forkmann & Heller, 1999) und kann in verschiedenen Pflanzenorganen bzw. Zellkompartimenten in unterschiedlichen Isoformen vorliegen (Schorrosh *et al.*, 1994; Herbert *et al.*, 1996). Die Regulation der ACC im Rahmen der Flavonoidbiosynthese ist bisher nicht untersucht worden (Forkmann & Heller, 1999).

Die Flavonoidbiosynthese beginnt mit schrittweiser Kondensation von 4-Cumaroyl-CoA mit drei Malonyl-CoA unter Decarboxylierung zu einem linearen Tetraketid, das unter Claisen-Kondensation zum primären Reaktionsprodukt Naringeninchalkon zyklisiert (**Abb. 4**). Katalysiert wird diese Reaktion durch die Chalkonsynthase (CHS, E.C. 2.3.1.74), die zur Klasse der Polyketidsynthetasen Typ III gehört (Forkmann & Heller, 1999). Die CHS wurde erstmalig aus Zellkulturen von *Petroselinum crispum* kloniert (Reimold *et al.*, 1983). Seither wurden aus vielen anderen Spezies der Angio- und Gymnospermen CHS-Gene bzw. cDNAs isoliert. Die Identität dieser Enzyme auf Polypeptidebene liegt bei 65-85 %, und ist somit hoch (Springob, 2001). Auffallend ist weiter eine hohe Sequenzhomologie und eine enge Verwandtschaft im Reaktionsmechanismus zwischen CHS und Acridonsynthase, die *N*-Methylantraniloyl-CoA als Startsubstrat für die Bildung des Acridonalkaloids benötigt (Springob *et al.*, 2000; Lukacin *et al.*, 2001). Kristallstrukturen der CHS2 aus *Medicago sativa* (Ferrer *et al.*, 1999) und der 2-Pyronsynthase aus *Gerbera hybrida* (Jez *et al.*, 2000) lieferten die

dreidimensionalen Strukturen und ermöglichten neue Erkenntnisse zum Reaktionsmechanismus pflanzlicher Polyketidsynthasen. Die Enzyme liegen als Homodimere vor, weisen eine CoA-bindende Tunnelstruktur und die Bindungstaschen für das Startsubstrat auf (Ferrer *et al.*, 1999). Die CHS akzeptiert neben 4-Cumaroyl-CoA u.a. auch Cinnamoyl-CoA und Caffeoyl-CoA als Starter-Einheiten, weist jedoch mit diesen Substraten in der Regel eine geringere Umsatzrate auf (Christensen *et al.*, 1998; Schröder *et al.*, 1998).

Das zunächst entstehende Chalkon zyklisiert relativ schnell chemisch zu (2*R/S*)-Naringenin, wird aber *in vivo* durch die Aktivität der Chalkonisomerase (CHI, E.C. 5.5.1.6) spezifisch nur in (2*S*)-Naringenin überführt (**Abb. 4**). CHI-Enzyme sind Monomere mit einem Molekulargewicht zwischen 24000 und 29000 (Forkmann & Heller, 1999). Entsprechend ihrer unterschiedlichen Substratspezifität für Chalkone vom Phloroglucin- und Resorcintyp lassen sich zwei Isoformen der CHI klassifizieren (Liu *et al.*, 1995). Vor kurzem konnte die Struktur einer CHI aus *Medicago sativa* aufgeklärt werden (Jez *et al.*, 2000). Die Kristallstruktur und die Aminosäuresequenzen weisen keine Homologie zu anderen Proteinen auf.

Das (2*S*)-Flavanon Naringenin ist Ausgangssubstanz für eine Vielzahl von Flavonoiden wie Isoflavonoide, Flavone, Flavan-4-ole und Dihydroflavonole. Die Oxidation zum Flavon wird überraschenderweise von zwei Typen von Flavonsynthase katalysiert, die unlängst kloniert werden konnten (Martens & Forkmann, 1999; Martens *et al.*, 2001) (**Abb. 4**). Die Flavonsynthase I (FNS I) zählt zu den 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen und ihr Vorkommen ist nach bisherigen Erkenntnissen auf wenige Mitglieder der Familie der *Apiaceae* beschränkt. Demgegenüber stellt die Flavonsynthase II (FNS II) eine NADPH-abhängige Cytochrom-P450 Monooxygenase dar und ist in der Pflanzenwelt weit verbreitet.

Eine 3 β -Hydroxylierung von (2*S*)-Flavanonen (Naringenin, Eriodictyol und 4,7,3',4',5'-Pentahydroxyflavanon) durch Flavanon 3 β -Hydroxylase (FHT) führt zu den korrespondierenden Dihydroflavonolen (Dihydrokämpferol, Dihydroquercetin und Dihydromyricetin) (Britsch & Grisebach, 1986) (**Abb. 4**). Enantiomere (2*R*)-Flavanone werden nicht als Substrat akzeptiert (Britsch & Grisebach, 1986). Dieses Enzym gehört zur Klasse der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (Britsch *et al.*, 1993; Lukacin *et al.*, 2000) und besitzt eine Größe von etwa 42 kDa. In rohen Extrakten unterliegt das Enzym einem raschen proteolytischen Abbau (Lukacin *et al.*, 2000a, 2000b).

Flavonoidhydroxylasen bestimmen das Hydroxylierungsmuster an den Ringen A und B. Die Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen Flavonoid-3'-Hydroxylase (F3'H) und Flavonoid 3',5'-Hydroxylase (F3'5'H, E.C. 1.14.13.21) hydroxylieren den B-Ring von Flavanonen bzw. Dihydroflavanolen (Forkmann & Heller, 1999), während eine 2-Oxoglutarat-

abhängige Flavonol 6-Hydroxylase aus *Chrysosplenium americanum* den A-Ring hydroxyliert (Anzellotti & Ibrahim, 2000).

Dihydroflavonole können von der Flavonolsynthase (FLS), die im Mittelpunkt dieser Arbeit steht, zu Flavonolen oxidiert werden, oder es kann der Weg zu den Anthocyanidinen eingeschlagen werden.

Im letzteren Fall reduziert die Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR, E.C. 1.1.219) die Substrate (Leucoanthocyanidine) zu Flavan-3,4-cis-diolen, die ihrerseits Vorstufen für Anthocyanidine sind (**Abb. 4**). Die DFRs aus verschiedenen Pflanzen arbeiten NADPH-abhängig, besitzen Molekulargewichte von etwa 41000 und zeigen sehr unterschiedliche Substratspezifitäten. Beispielsweise akzeptieren DFRs aus *Petunia*, *Nicotiana* und *Lycopersicon* Dihydroquercetin und vor allem Dihydromyricetin als Substrate, sind aber nicht in der Lage Dihydrokämpferol umzusetzen. Der umgekehrte Fall lässt sich in *Dahlia* und *Matthiola* beobachten, hier ist Dihydrokämpferol das bevorzugte Substrat (Forkmann & Heller, 1999). Die Leucoanthocyanidine werden durch 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen, die Anthocyanidinsynthasen (ANSs), zu Anthocyanidinen umgesetzt (Saito *et al.*, 1999) (**Abb. 4**). Die erste Kristallstruktur einer *Arabidopsis* ANS wurde kürzlich veröffentlicht und hat wichtige Hinweise auf den Reaktionsmechanismus ergeben (Wilmouth *et al.*, 2002).

Die Instabilität der Anthocyanidine im physiologischen pH-Bereich macht eine rasche 3-O-Glukosylierung durch die Flavonoid-3-Glukosyltransferase (FGT, E.C. 2.4.1.91) erforderlich. Die FGT aus *Hippeastrum* besteht aus zwei identischen Untereinheiten von 24,5 KDa und akzeptiert Anthocyanidine, Flavonole sowie Dihydroflavonole (Forkmann & Heller, 1999) (**Abb. 4**).

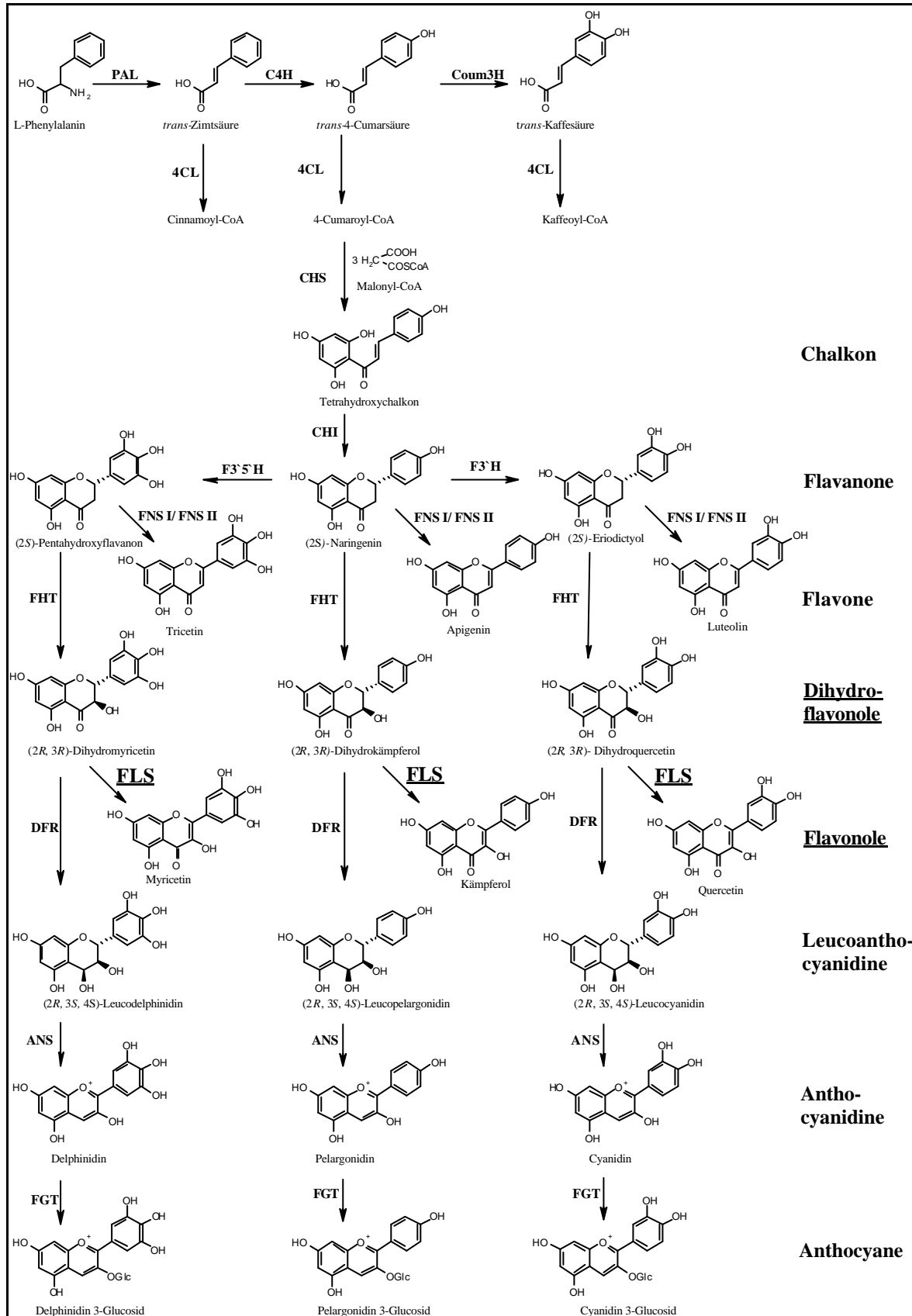


Abb. 4: Grundzüge der Flavonoidbiosynthese.

Die einzelnen Enzyme und Reaktionsschritte sind im Text näher erläutert.

Folgende zusätzliche Abkürzung wurde verwendet: Coum3H: 4-Cumarsäure 3-Hydroxylase

A 4 Klassifikation von Oxygenasen

A 4.1 Allgemeine Unterscheidung von Monooxygenasen und Dioxygenasen

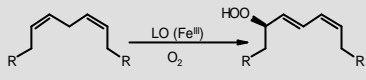
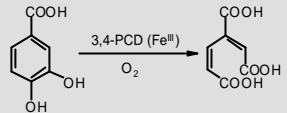
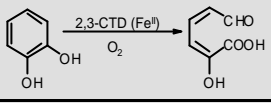
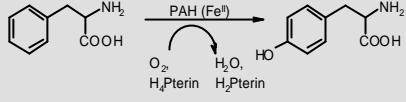
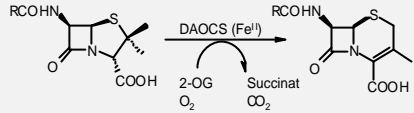
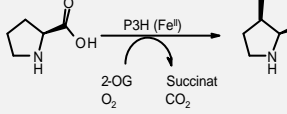
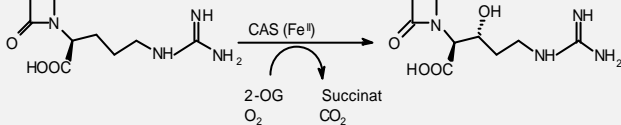
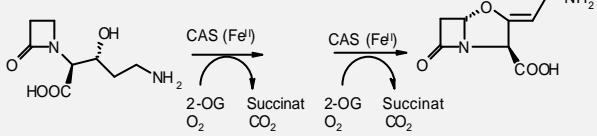
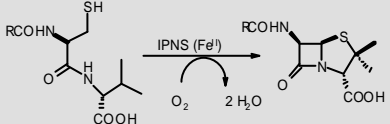
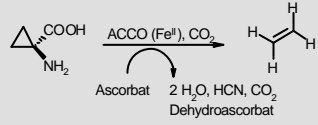
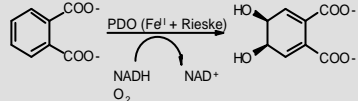
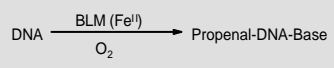
Oxidoreduktasen erfüllen in lebenden Systemen vielfältige Funktionen im Stoffwechsel und in der Energiegewinnung. Sie bilden eine Enzymklasse, die unterteilt wird in Dehydrogenasen, Hydroperoxidasen, Oxidasen und Oxygenasen. Oxygenasen katalysieren die Einführung von Sauerstoff in organische Substrate. Dabei wird unterschieden zwischen Monooxygenasen, die nur ein Sauerstoff-Atom in das Substrat einführen, während das zweite zu Wasser reduziert wird und Dioxygenasen, die beide Sauerstoff-Atome aus O₂ in das Substrat überführen (Stryer, 1999). Um molekularen Sauerstoff, der in paramagnetischem Triplettzustand vorliegt, zu aktivieren, benötigen diese Enzyme Cofaktoren, die in der Lage sind mit dem Sauerstoff einen Komplex zu bilden (Bugg, 2001). Auf diese Weise werden Elektronenwolken "deformiert" und das Spinverbot einer Reaktion von Triplett-Sauerstoff mit dem Singulett-Kohlenstoff des Substrats umgangen. Als Cofaktoren dienen Übergangsmetalle wie z.B. Eisen, Mangan, Kupfer, Kobalt und in Verbindung mit Metallionen organische Cofaktoren wie α -Ketoglutarat, Flavine, oder Pterine. Eine wichtige Rolle sowohl im Elektronentransport membrangebundener Cytochromkomplexe als auch in einigen Dioxygenasen spielt der Rieske-Eisen-Schwefel-Cluster als Cofaktor (Solomon *et al.*, 2000).

Viele Monooxygenasen enthalten als elektronenübertragendes Element das Hämoprotein b und werden als Cytochrom P450 zusammengefasst. Cyt P450-abhängige Enzymsysteme kommen in fast allen lebenden Organismen vor und bilden eine Superfamilie von membrangebundenen Proteinen. Die prosthetische Häm-b-Gruppe kann Kohlenmonoxid binden und zeigt in reduzierter Form eine charakteristische spektrale Absorptionsbande (Soret Bande) bei 450 nm (Mansuy, 1997). Für die Hydroxylierungsreaktion werden assoziierte Proteine benötigt, wie die NADPH-Ferrihämoprotein-Reduktase, die unspezifisch die Elektronen von NADPH in zwei Ein-Elektronen-Schritten über FAD und FMN auf die prosthetische Häm-Gruppe, das Ferriprotoporphyrin IX, überträgt. Der Reaktionsmechanismus der Hydroxylierung der Cyt P450 ist in wesentlichen Zügen aufgeklärt und verläuft über ein resonanzstabilisiertes Häm-gebundenes Oxenradikal [Fe^{IV}-O[•]] (Halkier, 1996).

Unter den Dioxygenasen werden intramolekulare und intermolekulare Dioxygenasen unterschieden, abhängig davon, ob beide Atome eines Sauerstoffmoleküls in ein Substrat eingebaut werden, wie z.B. beim aeroben bakteriellen Abbau aromatischer Verbindungen durch Catechol-1,2-Dioxygenasen oder der Biosynthese von Eicosanoiden durch

Lipoxygenasen der Säuger (Que & Ho, 1996, Prescott, 1996), oder ob die Sauerstoffatome in jeweils anderen Substraten, eines davon meist 2-Oxoglutarat, enden (**Tab. 1**).

Tab. 1: Reaktionen Häm-freier, eisenhaltiger Enzymsysteme.

Reaktionstyp	Enzym	Katalytische Reaktion
Hydroperoxidierung	Lipoxygenase	
Intradiol-Dioxygenierung	Protocatechuat-3,4-Dioxygenase	
Extradiol-Dioxygenierung	Catechol-2,3-Dioxygenase	
Pterin abhängige Hydroxylierung	Phenylalanin-Hydroxylase	
<u>2-Oxoglutarat-abhängige Hydroxylierung</u>	Deacetoxy-cephalosporin C-Synthase	
	Prolin 3-Hydroxylase	
	Clavaminat-Synthase	
	Clavaminat-Synthase	
4e- Oxidativer Ringschluss	Isopenicillin N-Synthase	
Ascorbat-abhängige 2e- Oxidation	1-Amino-cyclopropan-carbonsäure-Oxidase	
cis-Hydroxylierung	Phthalat-Dioxygenase	
H' Abspaltung	Bleomycin	

A 4.2 Pharmazeutische Relevanz 2-Oxoglutarat-abhängiger Dioxygenasen und verwandter Nicht-Häm-Fe (II) Enzyme

2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen katalysieren ein breites Spektrum an oxidativen Reaktionen und haben vor allem in medizinischer und pharmazeutischer Hinsicht in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Einige dieser Enzyme spielen eine wichtige Rolle für die Ätiologie und Pathogenese verschiedener humaner Krankheiten. Als Beispiele zu nennen sind hier die Prolyl 4-Hydroxylase bei fibrösen Krankheitsprozessen von Lunge, Leber und Haut, die Lysylhydroxylase bei einer auf dem Ehlers-Danlos-Syndrom Typ VI beruhenden Kollagendysplasie, die 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase beim Krankheitsbild einer Tyrosinämie und die Phytansäure- α -Hydroxylase im Zusammenhang mit dem Refsum-Syndrom, einer erblichen Lipidstoffwechselstörung. Ein autosomal-rezessiv vererbter Carnitinmangel lässt sich auf den Ausfall entsprechender Dioxygenasen zurückführen und äußert sich in einer Myopathie und Enzephalopathie. Zudem sind Vertreter dieser Enzymklasse an der Synthese pharmazeutisch relevanter Naturstoffe, u.a. Scopolamin, Vinblastin und Vincristin, beteiligt (Prescott & Lloyd, 2000). Dioxygenasen aus der Penicillin-, Cephalosporin-, Cephamycin- und Clavulansäurebiosynthese gelten als potentieller Schlüssel zu neuen Antibiotika oder auch zu optimierten Produktionsverfahren für die Herstellung semi-synthetischer Antibiotika (Lee *et al.*, 2002). In Pflanzen konnten entsprechende Enzyme aus der Ethylen-, Gibberellin-, Alkaloid- und Flavonoidbiosynthese identifiziert werden, von denen man sich u.a. landwirtschaftlichen bzw. ernährungsphysiologischen Nutzen verspricht (Prescott & Lloyd, 2000).

A 4.3 Funktionelle und mechanistische Aspekte von 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen und verwandten Nicht-Häm-Fe (II) Enzymen

A 4.3.1 Penicillin- und Cephalosporin-Biosynthese

Die Biosynthese von β -Lactam-Antibiotika stützt sich auf das Tripeptid L- δ -(α -Aminoadipoyl)-L-cysteinyl-D-Valin (ACV), das zum Isopenicillin durch die Isopenicillin-N-Synthase (IPNS) bityklistriert wird (**Tab.1**). Obwohl die IPNS, abweichend von anderen Häm-freien Oxygenasen keine zusätzlichen Elektronendonatoren benötigt, lässt sie sich aufgrund der engen mechanistischen Verwandtschaft und Homologien in ihrer Aminosäuresequenz der Enzymklasse der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen zuordnen (Prescott, 1993). Die IPNS

ist das erste Enzym dieser Klasse, für das nach Röntgenstrukturanalyse ein Strukturmodell vorgeschlagen werden konnte (Roach *et al.*, 1995). Die Daten stimmen mit spektroskopischen bzw. biochemischen Ergebnissen überein und bestätigen weitgehend den zuvor vorgeschlagenen mehrstufigen Reaktionsmechanismus, der hauptsächlich aus Experimenten mit Substratanaloga und Isotopenmarkierung resultierte (Burzlaff *et al.*, 1999; Baldwin *et al.*, 1984). Die Reaktion beginnt mit der Bindung von ACV an das Eisen(II)-zentrum als Eisen-Thiolat. Unter Sauerstoffeinfluss erfolgt dann die Zyklisierung zum viergliedrigen β -Lactamring, wobei das Substrat an eine hochreaktive Ferrylspezies (Fe(IV)-Oxo-Verbindung) gebunden bleibt und unter Thiazolidinringschluss weiterreagiert (Burzlaff *et al.*, 1999). Elektronendonator für die Umsetzung ist das Substrat selbst, und der Sauerstoff wird nicht in das Produkt eingebaut, sondern unter Abzug von Protonen zu Wasser reduziert. Nach der Epimerisierung des Adipylrests zum Penicillin N, kann die Biosynthese zum Cephalosporin fortgesetzt werden. Die Ringerweiterung zum Deacetoxycephalosporin wird in Eukaryoten durch eine bifunktionelle Deacetoxycephalosporin C-Synthase (DAOCS) katalysiert (Dotzlaw & Yeh, 1987; Scheidegger *et al.*, 1984, Valegård *et al.*, 1999), während in Prokaryoten dafür in getrennten Schritten Deacetoxycephalosporin C-Synthase als Expandase und Deacetylcephalosporin C-Synthase für die anschließende Hydroxylierung benötigt werden (Kovacevic & Miller, 1991). Beide Enzyme gehören zur Familie der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen.

A 4.3.2 Clavulansäure-Biosynthese

Bakterielle Resistenz gegen Penicilline basiert meist auf der Aktivität von Lactamasen.

Clavulansäure ist ein therapeutisch genutzter Inhibitor der Klasse A Serin β -Lactamasen, der in einem mehrstufigen Prozess aus Glycerin und L-Arginin über Proclavamin-, Dihydroclavamin- und Clavaminsäure entsteht. Die Bildung von Proclavaminsäure erfordert die β -Hydroxylierung des Argininrestes, eine oxidative Cyclisierung zum Oxazolidin führt zu Dihydroclavaminsäure, und eine Dehydrogenierung liefert Clavaminsäure. Diese drei Reaktionen werden durch ein Enzym, die Clavaminsynthase (CAS) katalysiert und sind jeweils 2-Oxoglutarat-abhängig (**Tab. 1**) (Salowe *et al.*, 1990). Zwei Isoenzyme der CAS mit hoher Sequenzhomologie konnten aus *Streptomyces clavuligerus* isoliert und kloniert werden. Die Kristallstrukturdaten des Isoenzym CAS 1 wurden kürzlich veröffentlicht (Zhang *et al.*, 2000).

A 4.3.3 Hydroxylierung von Prolinen und Prolylresten

Die Prolyl 4-Hydroxylase (P4H, E.C. 1.14.11.2) katalysiert posttranslational die Hydroxylierung von Prolinresten in α -Pro-Gly-Sequenzen und verwandten Proteinen in Säugetieren. Diese Modifikation spielt eine zentrale Rolle in der Kollagensynthese bzw. für die Anordnung als Triple-Helix. Die P4H aus Säugern stellt ein $\alpha_2\beta_2$ Tetramer dar (Bassuk *et al.*, 1989; Pihlajaniemi *et al.*, 1987). Zwei Isoformen α (I) und α (II) der katalytischen α -Untereinheit konnten identifiziert werden, die in ihren Glykosylierungen stark differieren. Die β -Untereinheit verkörpert ein multi-funktionales Enzym. In monomerer Form ist sie identisch mit der Protein-Disulfid-Isomerase und unterstützt als Untereinheit des mikrosomalen Triglycerid-Transferproteins die Faltung neu-synthetisierter Proteine in Chaperon-ähnlicher Funktion (Kivirikko & Myllyharju, 1998). Eine weitere Familie der P4H hydroxyliert im Cytoplasma Prolylreste in Leu-x-x-Leu-Ala-Pro-Sequenzen und ist in die Regulation des Transkriptionsfaktors HIF α (hypoxia-inducible transcription factor) eingebunden (Bruick & McKnight, 2001). Interessanterweise ist die P4H hier Teil eines Sensorsystems, das den Sauerstoffpartialdruck messen kann und die Transkription entsprechend reguliert.

In Pflanzen sind P4Hs an der Bildung von Glykoproteinen beteiligt wie z.B. Extensin, Arabinogalaktan und Lektin. Überraschend ist die Tatsache, dass eine aus *Arabidopsis thaliana* klonierte monomere Prolyl 4-Hydroxylase entgegen früherer Annahme sehr effizient kollagenartige Peptide und HIF α -Faktor repräsentierende Peptidsequenzen umsetzt (Hieta & Myllyharju, 2002). Weiterhin konnte auch eine virale P4H aus *Paramecium bursaria* Chlorella virus-1 (PBVV-1) kloniert werden (Erikson *et al.*, 1999).

Im Gegensatz zur P4H akzeptieren Prolin 4-Hydroxylase und Prolin 3-Hydroxylase (P3H, E.C. 1.14.11.7) freies Prolin als Substrat (**Tab. 1**). Die stereospezifische Hydroxylierung des Prolins wird von der Lebensmittel- und Pharmaindustrie bereits genutzt (Prescott & Lloyd, 2000). Als erste dieser Hydroxylasen konnte die Prolin 3-Hydroxylase aus *Streptomyces* sp. in ihrer Kristallstruktur aufgeklärt werden (Clifton *et al.*, 2001).

A 4.3.4 Ethylenbiosynthese

Gasförmiges Ethylen besitzt Phytohormoncharakter und beeinflusst u.a. die Samenkeimung, Gewebedifferenzierungen, die Anthocyan synthese, die Seneszenz von Blüten und Blättern, die Fruchtreife, Blatt- sowie Fruchtabscission und wird als Antwort auf Gewebeverletzungen und Pathogenbefall gebildet (Grichko & Glick, 2001). Vorstufe des Ethylens ist Adenosyl-L-methionin, das zu 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) umgesetzt wird. ACC wird durch die ACC Oxidase (ACCO) in Ethylen überführt, und diese Reaktion ist abhängig von Fe(II), Ascorbat und molekularem Sauerstoff (**Tab. 1**). Hier übernimmt Ascorbat die Rolle von 2-Oxoglutarat als Reduktionsmittel. Gleichzeitig fungieren 2-Oxosäuren als kompetitive Hemmstoffe gegenüber Ascorbat (Iturraiaagoitia-Bueno *et al.*, 1996; Brunhuber *et al.*, 2000). Eine Steigerung der ACCO-Aktivität wird durch Kohlendioxid erreicht, wobei der Mechanismus dieser Aktivierung noch ungeklärt ist (Smith & John, 1993). Die Primärsequenz der ACCO ist eng verwandt mit den Sequenzen von 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen.

A 4.4 Flavonolsynthese

Bis heute wurden fünf 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen (Kap. 3.2) aus der Flavonoidbiosynthese identifiziert, wovon die Flavonolsynthese (FLS), die Dihydroflavonole zu Flavonolen umsetzt, im Rahmen dieser Arbeit biochemisch charakterisiert wird.

Der erste Nachweis einer FLS-Aktivität, erfolgte mit Extrakten aus Petersilie-Zellkulturen und später mit Blütenknospenextrakten von *Matthiola incana* (Britsch *et al.*, 1981; Spribille & Forkmann, 1984). Eine FLS cDNA wurde zunächst aus *Petunia hybrida* isoliert und in Hefe exprimiert (Holton *et al.*, 1993). Mittlerweile sind solche cDNA-Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* (Pelletier *et al.*, 1997), *Eustoma grandiflorum*, *Solanum tuberosum* (van Eldik *et al.*, 1997), *Malus domestica* und *Citrus unshiu* (Moriguchi *et al.*, 2002) veröffentlicht worden. Allerdings fehlte eine funktionelle Charakterisierung der Enzyme.

Southern Blot-Analysen der FLS aus *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum* und *Citrus unshiu* deuten auf Multi-Gen-Familien hin (Pelletier *et al.*, 1997; van Eldik *et al.*, 1997, Moriguchi *et al.*, 2002). Eine antisense-Suppression der FLS in *Petunia hybrida* und Tabak führte zu einer signifikanten Reduktion der Flavonolbildung und veränderter Blütenfarbe (Holton *et al.*, 1993). Zudem zeigten FLS-knock-out-Mutanten aus einer *En-1* mutagenisierten *Arabidopsis thaliana* Population eine stark reduzierte Kämpferolbildung (Wisman *et al.*, 1998).

A 4.5 Mechanismus von 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen

Obwohl die individuellen Fe(II)/ 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen unterschiedliche Reaktionen (Hydroxylierung, Desaturierung, Ringexpansion oder Epoxidation) katalysieren, besitzen sie doch strukturelle und mechanistische Gemeinsamkeiten. Beispielsweise werden sie bei Substitution des Fe(II) durch andere zweiwertige Metallionen oder durch Oxoglutarat-Analoga wie 2,4- und 2,5-Pyridindicarbonsäuren kompetitiv gehemmt.

In der Regel wird die katalytische Aktivität *in vitro* durch Reduktionsmittel, u.a. Dithiothreitol und Ascorbinsäure, aber auch durch hohe Dosen an Katalase (1 mg/ml) gesteigert (Prescott 1996; Carolis & De Luca, 1994).

Kinetische Untersuchungen der Prolyl 4-Hydroxylase deuteten auf die sequentielle Bindung von Fe(II), gefolgt von 2-Oxoglutarat, O₂ und schließlich vom Substrat (Kivirikko 1998). Ähnliche Studien an der trifunktionalen Thymin 7-Hydroxylase (TH, E.C. 1.14.11.6) aus dem Nucleinsäureabbau zeigten abweichend die O₂-Bindung nach Substratbindung (Holme 1975; Thornburg *et al.*, 1993).

Solche Unterschiede könnten erklären, dass einige Enzyme aus dieser Klasse wie beispielsweise P4H nicht jedoch TH, in der Lage sind, α -Ketoglutarat in Abwesenheit von Substrat bzw. Substratanaloga zu decarboxylieren. Diese entkoppelte Reaktion führt *in vitro* gewöhnlich zu einer Enzyminaktivierung, die wahrscheinlich auf Oxidation von Fe(II) zu Fe(III) zurückzuführen ist. Durch Ascorbatzugabe lässt sich die Enzymaktivität teilweise wiederherstellen (Myllyla *et al.*, 1984; Min Wu *et al.*, 2000). Die Freisetzung der Produkte erfolgt ebenfalls geordnet in der Reihenfolge CO₂, Succinat und Produkt, jedoch lässt sich abhängig von der Succinatkonzentration auch die umgekehrte Abfolge Produkt-Succinat beobachten (Prescott und Lloyd, 2000). Auf Grundlage der kinetischen Daten der Prolyl 4-Hydroxylase wurde 1982 ein hypothetischer Mechanismus für 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen postuliert (Hanauske-Abel & Günzler, 1982). Dieser Vorschlag wurde im Grunde durch neuere spektroskopische Untersuchungen an der CAS2 (Zhou *et al.*, 1998; Pavel *et al.*, 1998) bzw. kristallographische Studien an der DAOCS (Valegård *et al.*, 1999) bestätigt, und die Vorstellungen wurden wie folgt zusammengefasst (**Abb. 5**) (Schofield & Zhang, 1999; Solomon *et al.*, 2000):

Fe(II) liegt in oktaedrischer Anordnung 6-fach koordiniert im aktiven Zentrum vor \square . Das Kosubstrat 2-Oxoglutarat bindet als zweizähniger Chelatligand über 1-Carboxylat und 2-Carbonyl an das Eisenatom, sodass eine fast planare, fünfgliedrige Ringverbindung resultiert. Das Eisen bleibt dabei gesättigt mit Koordinationszahl 6 und verhält sich gegenüber

Sauerstoff relativ reaktionsträge, was die entkoppelte Reaktion stark eingeschränkt. Die Bindung von Substrat an das Enzym erzeugt einen Wechsel der Fe(II)-Koordination zur 5-fach koordinierten Form, die nun quadratisch-pyramidal ausgerichtet ist —. Der molekulare Sauerstoff kann über die offene Koordinationsstelle an das Fe(II) binden und erlangt durch partiellen Elektronentransfer des Eisens eine Art Superoxidcharakter. Als Folge kann der terminale Sauerstoff nukleophil den Carbonylkohlenstoff (C2), des über die Chelatbrücke mit Fe(II) koordinierten 2-Oxoglutarats, angreifen \wedge . Anschließend Bindungsumordnung des zyklischen Peroxids führt zu einer konzertierten Decarboxylierung des 2-Oxoglutarats und zur heterolytischen Spaltung der O-O-Bindung A , aus der die Bildung eines Oxenradikals $[\text{Fe}^{\text{IV}}-\text{O}^{\text{-II}}]$ resultiert A . Die Freisetzung von CO_2 ist der erste irreversible Schritt und gleichzeitig die treibende Kraft der Reaktion. Die Oxo-Ferrylspezies kann stereospezifisch ein Wasserstoffatom des Substrats durch homolytische Spaltung abstrahieren und anschließend in einem "Rebound"-Mechanismus hydroxylieren. Oder es wird in einem Desaturase-Prozess ein zweites Proton des Substrats abgespalten unter Bildung von H_2O A . Während dieses Vorgangs bleiben CO_2 und Succinat im aktiven Zentrum gebunden.

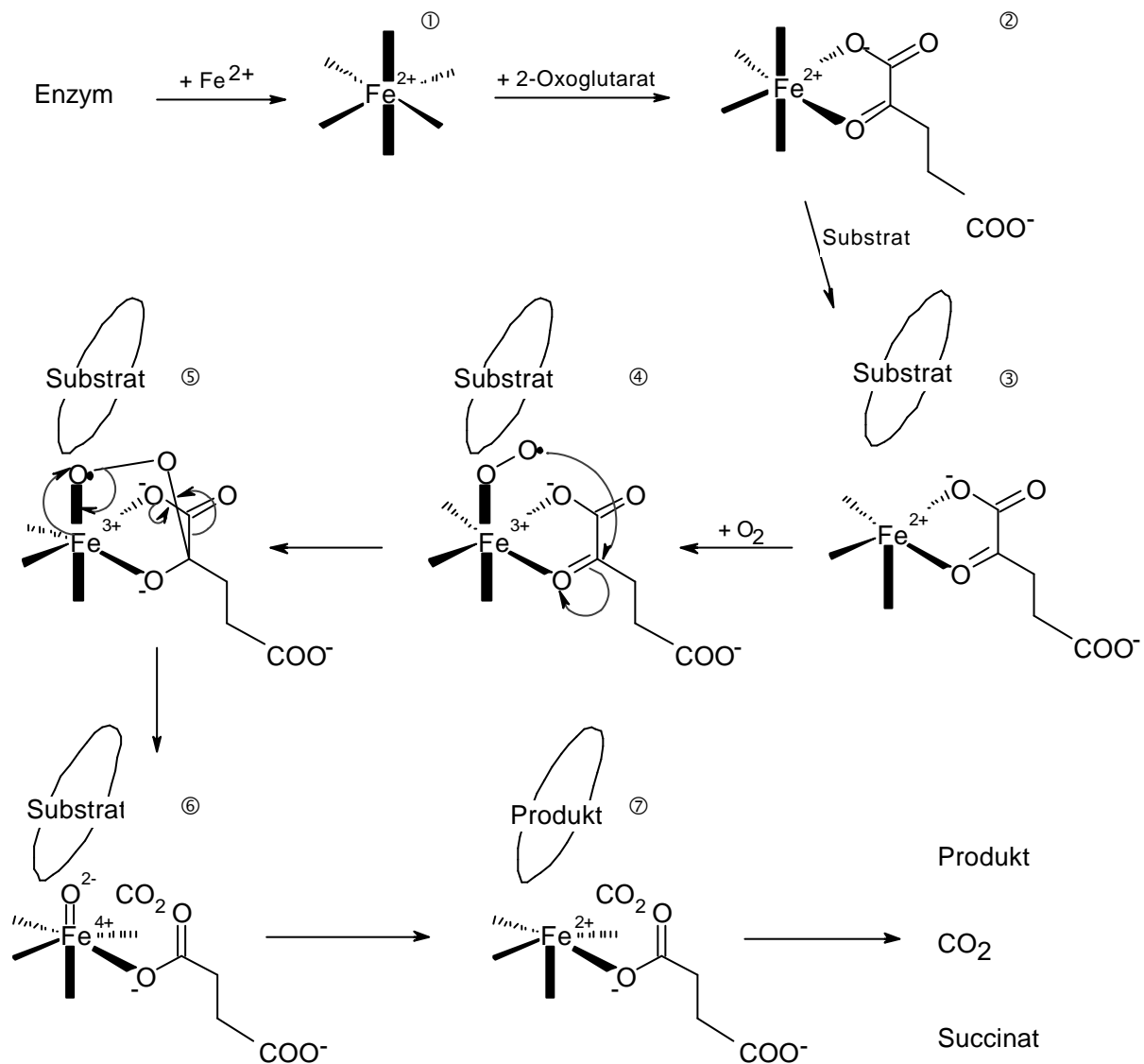


Abb. 5: Hypothetischer Reaktionsmechanismus für 2-Oxoglutarat-abhängige Häm-freie Eisenproteine (nach Solomon *et al.*, 2000).

Umsetzungen von markierten Substraten mit Thymin 7-Hydroxylase bestätigten, dass die Abspaltung des Wasserstoffs nach der Decarboxylierung erfolgt (Thornburg *et al.*, 1993). Hinweise auf eine während der Reaktion auftretende radikalische Substratform lieferten jüngste Untersuchungen der Prolyl 4-hydroxylase (Wu *et al.*, 1999).

Kleine Modifikationen dieses Schemas sind möglich, z.B. wurde im Falle der IPNS nachgewiesen, dass das Substrat direkt über eine Thiolatgruppe an das Eisenatom bindet (Roach *et al.*, 1997). Studien der Kristallstrukturen von DAOCS und IPNS zeigten kürzlich mögliche Produktkomplexe bzw. Reaktionsintermediate (Burzlaff *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001). Eine Beteiligung der Ferrylspezies konnte bisher noch in keinem Fall spektroskopisch

nachgewiesen werden. Studien zur sequenzspezifischen oxidativen Spaltung von DNA durch Bleomycin (**Tab. 1**), ein als Krebstherapeutikum genutztes eisenhaltiges Glykopeptid, sind aufschlussreich für das Verständnis der Sauerstoffaktivierungsschritte und zum Mechanismus der katalytischen Oxidation durch aktivierte einkernige Eisenkomplexe (Solomon *et al.*, 2000).

In allen bisher kristallisierten 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen findet sich ein sog. 'jelly role'-Motiv als charakteristische Supersekundärstruktur, wie sie bereits u.a. aus viralen Capsiden bekannt ist (Stuart, 1993). Diese Sekundärstruktur besteht aus zwei β -Faltblattstrukturen, die wiederum aus je vier Strängen zusammengesetzt sind und bildet eine Art Fass aus, in dem das aktive Zentrum beheimatet ist. Gleichzeitig konnte durch Röntgenstrukturanalyse, spektroskopische Untersuchungen und Mutagenesestudien das Eisenbindungszentrum als streng konserviertes His-x-Asp/Glu...-His Motiv (x bezeichnet hier eine nicht konservierte Aminosäure) identifiziert werden, wobei eine sehr ähnliche Koordination des Eisens in allen bisher veröffentlichten Strukturen einkerniger Nicht-Häm-Eisen-Enzyme vorliegt. Ein weiteres konserviertes Motiv für die Bindung des Kosubstrats bildet das Tripeptid Arg-x-Ser (Schofield & Zhang, 1999; Ryle & Hausinger, 2002).

A 5 Aufgabenstellung

Obwohl die erste FLS cDNA aus *Petunia hybrida* bereits 1993 kloniert wurde und inzwischen 6 weitere FLS cDNA Sequenzen publiziert sind, fehlten wohl auch aufgrund der hohen Labilität flavonoid-spezifischer 2-Oxoglutarat-abhängiger Dioxygenasen (Saito *et al.*, 1999; Lukacin *et al.*, 2000) eingehende biochemische Untersuchungen des Enzyms sowie Kenntnisse seiner Proteinstruktur. Zur biochemischen Charakterisierung stand ein cDNA-Klon aus *Citrus unshiu* zur Verfügung [Genbankeintrag AB011796]. Es galt zunächst die FLS funktionell in *E. coli* zu exprimieren und das rekombinante Enzym mittels FPLC möglichst schonend zur Homogenität zu reinigen. Für das gereinigte Protein wäre dann die Möglichkeit gegeben, die Masse exakt zu bestimmen, ein polyklonales Antiserum herzustellen und sämtliche kinetischen Parameter der Reaktion über HPLC-Analyse zu bestimmen.

Eine CD-Spektroskopie der FLS könnte darüberhinaus erste Aussagen zur Struktur bzw. Strukturverwandtschaft mit anderen Dioxygenasen zulassen.

2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen enthalten neben den bereits in **A 4.4** erwähnten charakteristischen Sequenzbereichen weitere streng konservierte Aminosäuren, deren Bedeutung noch ungeklärt ist (Britsch *et al.*, 1993). Der Beitrag dieser konservierten

Sequenzmotive zur Aktivität oder Stabilität des Enzyms war ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit. Hierzu mußten eine Reihe von Mutationen in die FLS eingeführt und die resultierenden Mutanten nach Expression auf mögliche strukturelle und funktionelle Veränderungen hin untersucht werden.

Die Veröffentlichung der Kristallstrukturen von 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (Roach *et al.*, 1995; Valegård *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000) eröffnet eventuell die Möglichkeit ein FLS-Homologiemodell zu berechnen, damit das aktive Zentrum zu analysieren und die 3-D-Struktur der FLS mit anderen 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen zu vergleichen.

Jüngste Untersuchungen zur Substratspezifität der Anthocyanidinsynthase aus *Arabidopsis thaliana* konnten für das rekombinante Enzym *in vitro* sowohl eine FLS- als auch eine FHT-Aktivität nachweisen (Turnbull *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Naringenin von der ANS *in vitro* zu Dihydrokämpferol und Kämpferol umgesetzt wird. Dihydroquercetin als Substrat führte zur Bildung von Quercetin. Aus diesen Ergebnissen und den Strukturdaten der ANS wurde abgeleitet, dass die ANS-Reaktion möglicherweise über ein geminal in C-3 hydroxyliertes Zwischenprodukt verläuft. In Anbetracht der FLS-Seitenaktivität der rekombinanten ANS aus *Arabidopsis thaliana* und der Homologie zwischen ANS und FLS wurde postuliert, dass auch die FLS-Reaktion über ein intermediäres C3-Diol verlaufen könnte (Turnbull *et al.*, 2000). Daneben wird aber auch die Möglichkeit einer direkten Desaturierung der C2-C3-Bindung als Reaktionsmechanismus für die FLS diskutiert (Heller & Forkmann, 1999). Die unerwartet breite Substratspezifität der ANS hat einen neuen Akzent für die Flavonoidforschung gesetzt und großes Interesse für vergleichende Untersuchungen der FLS, insbesondere mit der ANS, aber auch mit anderen 2-Oxoglutarat-abhängigen Enzymen aus der Flavonoidbiosynthese hinsichtlich ihrer Substratspezifitäten hervorgerufen. Aussagen zur Substratspezifität im Rahmen dieser Arbeit sollten versuchen den Mechanismus der FLS-Reaktion verständlicher machen.

B Material

B 1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid	Roth (Karlsruhe)
Adenosindiphosphat	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
Agarose Ultra-pure	Gibco BRL (Eggenstein)
Ammoniumpersulfat	Sigma (Deisenhofen)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Bacto-Agar	Difco Lab. (Detroit, USA)
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Desoxyribonukleotide	Roche (Basel, Schweiz)
(+)- <i>trans</i> -Dihydrokämpferol	Sammlung des Instituts
(+)- <i>trans</i> -Dihydroquercetin	Roth (Karlsruhe)
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Gene Ruler 1kb DNA Ladder	MBI Fermentas (St.Leon-Rot)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Sigma (Deisenhofen)
Kämpferol	Roth (Karlsruhe)
Naringenin	Sammlung des Instituts
Natriumascorbat	Merck (Darmstadt)
2-Oxoglutarat	Merck (Darmstadt)
Oligonukleotide	Dr.G.Igloi, Universität Freiburg
PEG 6000	Serva (Heidelberg)
Pepton aus Casein	Roth (Karlsruhe)
Ponceau S	Serva, Heidelberg
Quercetin	Roth (Karlsruhe)
Roti [®] -Phenol/Chloroform	Roth (Karlsruhe)
N,N,N'-N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
Trypton	Roth (Karlsruhe)
Tween 20	Sigma (Deisenhofen)
Triton X 100	Roth (Karlsruhe)

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen (Merck, Roche Diagnostic, Roth, Serva, Sigma) in analysenreiner Qualität bezogen.

B 2 Enzyme

<i>dam</i> -Methylase	New England Biolabs (Schwalbach)
Katalase	Roche Diagnostics (Mannheim)
Klenow Polymerase	Roche Diagnostics (Mannheim)
Lysozym	Roth (Karlsruhe)
Restriktionsendonukleasen	Roche Diagnostics (Mannheim)
RNase A	Roche Diagnostics (Mannheim)
T4-Ligase	Roche Diagnostics (Mannheim)
T4-Polynukleotidkinase	Roche Diagnostics (Mannheim)

B 3 Antiseren und Proteine

Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics (Mannheim)
Anti-Rabbit-IgG aus Ziege, gekoppelt an Peroxidase	Sigma (Deisenhofen)
Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V	Serva (Heidelberg)
SDS 7 Protein-Marker	Sigma (München)
Antiseren aus Kaninchen gegen Flavanon 3 β -Hydroxylase (FHT); (K151, Nr. 16-19 vom 11.2.89)	Dr. L. Britsch, Merck, Darmstadt

B 4 Membranen

PVDF-Membran	Schleicher & Schuell (Dassel)
--------------	-------------------------------

B 5 Dünnschichtplatten und Laufmittel

Dünnschicht-Celluloseplatten ohne Fluoreszenzindikator Merck (Darmstadt)

Laufmittel:	H ₂ O/Essigsäure: 85/15 (v/v)
	H ₂ O/Essigsäure: 70/30 (v/v)
	Chloroform/Essigsäure/Wasser (CAW): 50/45/5 (v/v)

B 6 Geräte

Bio Imager FLA-2000	Fuji Photo Film (Tokyo, Japan)/ Software Raytest (Straubenhardt)
Biotrap BT 1000	Schleicher & Schuell (Dassel)
Fast Protein Liquid Chromatography-Anlage	Pharmacia (Freiburg)
High Performance Liquid Chromatography- Anlage (LC-10 AD)	Shimadzu (Tokio, Japan)
PAGE-Apparatur: Miniprotean II 2D Multicell	Biorad (München)
Sorvall® RC 5C Zentrifuge	DuPont (Newton, USA)
Sorvall® RMC 14 Tischzentrifuge	DuPont (Newton, USA)
2K15 Zentrifuge	Sigma (München)
Spektralphotometer UV-1602	Shimadzu (Kyoto, Japan)
Thermomixer 5336 und 5437	Eppendorf (Hamburg)
Ultraschallgerät Sonifier Dr. Hielscher UP 200S	Dr. Hielscher (Teltow)
Western Blot Apparatur Milliblot SDE	Millipore (Eschborn)
Sammy (Semi-dry-Blot) Blot Apparatur	Schleicher & Schuell (Dassel)

B 7 Stämme von *E. coli*

Name	Genotyp	Literaturnachweis
JM109	recA1 endA1 gyr A96 thi hsdR17 supE44 reA1 lambda- ?(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqz ?M15	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
RZ1032	HfrKL16 PO/45 [lysA(61-62)] dut1 ung1 thi1 relA1 Zbd-279: Tn10 supe44	Kunkel (1985)
M15 [pREP4]	NalS StrS rifS lac- ara- gal- mtl- F- recA+ uvr+	Crowe & Henco (1992)

B 8 Vektoren

Vektor	Literatur
pTZ19R	Zagursky & Berman (1984)
pQE6	Crowe & Henco (1992)
pREP4	Crowe & Henco (1992)
M13K07	Vieira & Messing (1987)

B 9 Puffer und Lösungen

B 9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

B 9.1.1 Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

B 9.1.2 Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl pH 6,8

B 9.1.3 5 x SDS-Probenpuffer

0,25 M Tris-HCl pH 6,8
8 % (v/v) Glycerin
6 % (w/v) SDS
0,02 % (w/v) Bromphenolblau

B 9.1.4 5 x Laufpuffer

15 g/l Tris-HCl pH 8,9
72 g/l Glycin
5 g/l SDS

B 9.1.5 Coomassie-Färbelösung

40 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure
0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
in Wasser

B 9.1.6 Entfärber

40 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure
in Wasser

B 9.2 Western-Blot

B 9.2.1 TBS-Puffer

50 mM Tris-HCl pH 8,1
150 mM NaCl

B 9.2.2 Anodenpuffer I

0,3 M Tris-HCl pH 10,4
10 % Methanol (v/v)

B 9.2.3 Anodenpuffer II

25 mM Tris-HCl pH 10,4
10 % Methanol (v/v)

B 9.2.4 Kathodenpuffer

25 mM Tris-HCl pH 9,4
10 % Methanol (v/v)
40 mM Aminohexansäure

B 9.2.5 TBS-Gelatinepuffer

50 mM Tris-HCl pH 8,1
150 mM NaCl
1 % Gelatinelösung

B 9.2.6 TBS-Tweenpuffer

50 mM Tris-HCl pH 8,1
150 mM NaCl
0,5 % Tween 20 (v/v)

B 9.2.7 Farbreaktionspuffer

1 M Tris-HCl pH 8,8
1 mM $MgCl_2$

B 9.2.8 Ponceau S-Lösung

0,2 % (w/v) Ponceau S
0,3 % (w/v) Trichloressigsäure

B 9.3 Puffer für die Säulenchromatographie**B 9.3.1 Aufschlusspuffer**

50 mM Kaliumphosphat pH 5,5
10 mM EDTA
5 mM DTT
15 mM $MgCl_2$

B 9.3.2 Elutionspuffer SEC

50 mM Tris-HCl pH 7,5
5 mM DTT

B 9.3.3 Auftragspuffer DEAE

50 mM Tris-HCl pH 7,5
5 mM DTT

B 9.3.4 Elutionspuffer DEAE

50 mM Tris-HCl pH 7,5
5 mM DTT
1M NaCl

Die angegebene Menge an DTT wurde den Puffern unmittelbar vor ihrer Verwendung zugesetzt. Die filtrierten und entgasten Puffer wurden bei 4°C aufbewahrt.

B 9.4 Sonstige Puffer**B 9.4.1 TE-Puffer pH 8,0**

10 mM Tris-HCl pH 8,0
1 mM EDTA pH 8,0

B 10 Medien**B 10.1 LB-Medium (Luria Bertani)**

10g NaCl
10g Pepton aus Casein
5g Hefeextrakt
1 ml 1M MgSO₄
4 ml 50 % (v/v)Glycerin

mit Aqua bidest. auf etwa 800 ml auffüllen, pH 7,5 mit 1N NaOH einstellen,
auf 1 l auffüllen und autoklavieren.

B 10.2 LB-Agarplatten

Pro Liter LB-Medium wurden 15 g (1,5 %) Bacto-Agar zugesetzt.

C Methoden

C 1 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

C 1.1 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung diente die modifizierte Methode nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951; Sandermann & Strominger, 1972; Bensadoun & Weinstein, 1976), bei der das Protein zunächst durch Zugabe von 24 %iger Trichloressigsäure in Gegenwart von Natriumdesoxycholat gefällt wird. Als Standard wurde BSA in einer Menge von 5 bis 40 µg verwendet.

C 1.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde als "slab"-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) durchgeführt.

Herstellung eines 12,5 %igen Trenngels:

4,1 ml	30 % wässrige Acrylamid-Lösung
400 µl	10 % SDS in Wasser
2,5 ml	Trenngelpuffer (B 9.1.1)
3,0 ml	H ₂ O
16 µl	TEMED
50 µl	10 % Ammoniumpersulfat in Wasser

Herstellung eines 5 %igen Sammelgels:

375 µl	30 % wässrige Acrylamid-Lösung
100 µl	10 % SDS in Wasser
625 µl	Sammelgelpuffer (B 9.1.2)
1,4 ml	H ₂ O
5 µl	TEMED
15 µl	10 % Ammoniumpersulfat in Wasser

Durchführung: Zur Denaturierung der Proteine wurden 20 µl Probe zusammen mit 5 µl Probenpuffer (B 9.1.3) unter Zusatz von DTT (5 mM) 5 min auf 95°C erhitzt und auf das "slab"-Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei konstant 200 V im Puffersystem (B 9.1.4) für ca. eine Stunde. Anschließend wurden die Proteine durch Coomassie Brilliant Blue R 250 (B 9.1.5) angefärbt und nach etwa 20 min mit Entfärberlösung (B 9.1.6) das Gel entfärbt.

Zur Kalibrierung wurde der SDS7-Standard (Sigma) verwendet, der folgende Proteine enthält:

	kDa
Rinderserumalbumin	66
Ovalbumin	45
Carboanhydrase	36
Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase	29
Trypsinogen	24
Trypsininhibitor	20
α -Lactalbumin	14,2

C 1.3 Western-Blot

Die durch SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden in einer Semi-Dry-Blot-Apparatur (Schleicher & Schuell, Dassel) oder einer Milliblot-SDE-Apparatur (Millipore, Eschborn) unter Anlegen einer Spannung auf PVDF-Membranen (Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert (Towbin *et al.*, 1979).

Durchführung: Die Durchführung des Proteintransfers erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit den empfohlenen Puffern (B 9.2) auf 9 x 6 cm PVDF-Membranen, die zuvor in Methanol aktiviert und mit Aqua bidest. gewaschen worden waren. Zum Transfer wurden die Membranen mit 9 x 6 cm Whatman 3MM-Papier unterlegt. Nach Absättigung der PVDF-Membran mit 1%iger Gelatinelösung in 100 ml 1x TBS-Puffer (B 9.2.1) für mindestens 1 h wurde polyklonales Anti-FHT- bzw. Anti-FLS-Serum (Verdünnung 1:10000) zugesetzt und 3 h unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit je 100 ml 1 x TBS-Tweenpuffer (B 9.2.6) 10 min gewaschen. Nachfolgend wurde 10 μ l polyklonales Anti-Rabbit-IgG-Serum aus Ziege, gekoppelt an Alkalische Phosphatase (Sigma), in 40 ml 1 x TBS-Tweenpuffer zugesetzt und für 2 h unter Schütteln bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen unter gleichen Bedingungen wurde die Membran kurz in Aqua bidest. geschwenkt und in 20 ml Entwicklungspuffer (B 9.2.7) überführt. Zur Anfärbung wurden 10 mg BCIP in 300 μ l DMSO zugesetzt. Nach ca. 10 min wurden die hellblau gefärbten Banden der gekoppelten Phosphatase (Diformazanbildung) sichtbar, die die Lage der FHT- bzw. FLS-Antikörperkomplexe wiedergeben. Alle weiteren Proteine wurden mit Ponçeau S-Lösung (B 9.2.8) gegengefärbt.

C 2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Folgende Methoden wurden nach Sambrook *et al.* (1989) oder Firmenangaben durchgeführt:

- Agarosegel-Elektrophorese von DNA
- Isolierung von Plasmid-DNA
- Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren
- Restriktionsendonukleasenverdau
- Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

C 2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurekonzentration wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt. Doppelsträngige Nukleinsäuren liefern bei 50 µg/ml in Wasser eine A_{260} von 1. Zusätzlich wurde das Verhältnis A_{260}/A_{280} ermittelt, das Aufschluss über Kontamination mit Proteinen gibt. Der A_{260}/A_{280} -Quotient von DNA-Lösungen sollte mindestens 1,8 betragen.

C 2.2 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte leicht modifiziert nach Cohen *et al.* (1972). Frisches LB-Medium (B 10.1) (20 ml) wurde mit 1/100 Volumen einer Übernachtskultur des betreffenden Bakterienstammes angeimpft und unter Schütteln bei 37°C bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,6 inkubiert. Die Kultur wurde anschließend in sterilen Corex-Röhrchen zentrifugiert (10 min, 7000 rpm, 4°C) und das Pellet in 5 ml eiskalter 30 mM Calciumchlorid-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, HB6-Rotor 5000 rpm, 4°C) wurde das Sediment in 800 µl eiskalter 30 mM $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen, mit 340 µl Glycerin gemischt und in Aliquots von 150 µl oder 5 µl in sterile Eppendorfgefäße abgefüllt. Die Aliquots wurden bei -70°C eingefroren.

C 2.3 Eine-Minute-Transformation

Die Eine-Minute-Transformation wurde nach Golub (1988) durchgeführt.

C 2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde nach Agarosegel-Elektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und mit der BIOTRAP BT 1000 (Schleicher & Schuell, Dassel) nach den Angaben des Herstellers isoliert und anschließend mit Ethanol gefällt.

C 2.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung von isolierter cDNA erfolgte mit der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (1977). Es wurde dsDNA isolierter Plasmid-DNA in einer Konzentration von 1 µg DNA/ 16 µl H₂O eingesetzt. Durchgeführt wurden die Sequenzierungen von Mitarbeitern aus dem Arbeitskreis Prof. Uwe Maier (Institut für Biologie, Universität Marburg) mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Primern und den Sequenziergeräten „ALF“ bzw. „LICOR“.

C 2.6 Sequenzanalysen

Sequenzanalysen und Datenbankvergleiche wurden mit BLAST der Datenbankorganisation NCBI (National Center for Biotechnology Information) bzw. mit FASTA der Datenbankorganisation EBI (European Bioinformatics Institut) und dem Computerprogramm ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) erstellt.

C 3 *In vitro*-Mutagenese mit Oligonukleotiden

Die *in vitro*-Mutagenese wurde im wesentlichen nach Kunkel (Kunkel 1985; Kunkel *et al.*, 1987) durchgeführt. Das Prinzip der Mutagenese beruht auf der Herstellung einer dUMP-haltigen ssDNA mit Hilfe des Phagen M13K07 aus dem *E. coli*-Stamm RZ1032 mit dem Genotyp *dut*⁻ und *ung*⁻. Als Folge der in diesem Bakterienstamm fehlenden dUTPase- und Uracil-N-Glycosylase-Aktivität wird in geringem Maße die DNA-fremde Base Uracil anstelle von Thymin in die DNA eingebaut und gleichzeitig eine Entfernung des Uracils durch bakterielle Basen-Exzisionsreparaturenzyme vermieden. An die so erhaltene einzelsträngige DNA wird das Oligonukleotid mit den gewünschten Basenaustauschen hybridisiert. Ausgehend von diesem Oligonukleotid werden durch DNA-Polymerase die entsprechenden Komplementärstränge aufgebaut und die freien Enden des Zweitstranges mittels T4-Ligase geschlossen. Da in der resultierenden Heteroduplex-DNA nur der "template"-DNA-Strang methyliert ist, wird der neu synthetisierte Komplementärstrang zum Schutz vor Abbau durch bakterielle Restriktionsendonukleasen durch die *dam*-Methylase methyliert. Nach Transformation in den *E. coli*-Stamm JM109 mit dem Genotyp *dut*⁺ und *ung*⁺ werden die Uracilbasen als "DNA-fremd" erkannt und durch die Uracil-N-Glykosylase entfernt. Die entstehenden Apyrimidinstellen werden durch eine DNA-Polymerase aufgefüllt, wobei der mutierte Gegenstrang als Matrize dient. Der mutierte Sequenzbereich in der DNA bleibt auf diese Art mit großer Wahrscheinlichkeit erhalten. Durch den Einsatz einer dUMP-haltigen

ssDNA als Matrize und die Methylierung der Heteroduplex-DNA lässt sich eine hohe Ausbeute an mutierten Klonen erzielen.

C 3.1 Isolierung dUMP-haltiger Einzelstrang-DNA mit Hilfe von M13K07

Zur Isolierung von Uracil-haltiger ssDNA wurde eine Einzelkolonie transformierter *E. coli* RZ1032-Zellen in 2 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) angezogen bis zur OD₆₀₀ von ca. 0,4-0,5. Die Bakterienkultur (500µl) wurde mit 25 µl der M13K07-Phagensuspension in einen 100 ml Erlenmeyerkolben gegeben und für eine Stunde bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Zur Selektion Phagen-infizierter Bakterien wurden 150 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) und Kanamycin (70 µg/ml) zugegeben und für weitere 18 h geschüttelt. Durch mehrmaliges Zentrifugieren (HB6-Rotor 10000 rpm, 4°C, 10 min) wurden die Bakterien vom Phagenüberstand abgetrennt und die Phagen durch Zugabe von 1/4 Volumen an 20 % PEG, 2.5 M NaCl für eine Stunde auf Eis gefällt. Anschließend wurden die Phagen durch wiederholtes Zentrifugieren unter gleichen Bedingungen sedimentiert und das Pellet in 500 µl TE-Puffer (9.4.1) suspendiert. Die Phagenlyse erfolgte durch die Zugabe von 500 µl Roti[®]-Phenol/Chloroform (Roth, Karlsruhe), 10 min bei Raumtemperatur. Nach Zentrifugation (Sigma, 13000 rpm, 4°C) wurde der wässrige Überstand abgenommen und die Phenol/Chloroformphase ein zweites Mal extrahiert. Die vereinigten wässrigen Überstände wurden wiederum mit Phenol/Chloroform extrahiert. Aus dem daraus hervorgegangenen Überstand wurde die DNA durch Zusatz von 1/10 Volumen 3M Na-Acetat pH 6,0 und 3 Volumen 100% Ethanol über mehrere Stunden bei -70°C gefällt. Das nach der Zentrifugation erhaltene Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in 10 µl TE-Puffer (9.4.1) aufgenommen.

C 3.2 Mutagenese

Kinasierung: Das Oligonukleotid mit den gewünschten Basenaustauschen wurde zunächst mit der T4 Polynukleotidkinase (PNK) in 5' phosphoryliert.

Aqua bidest.	14,0 µl
10 x PNK-Puffer	2,0 µl
10 mM ATP	2,0 µl
Oligonukleotid (12 pmol/µl)	1,5 µl
PNK	<u>0,5 µl</u>
	20,0 µl

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 1 h bei 37 °C inkubiert.

Annealing: Die Hybridisierung des Oligonukleotids an die ssDNA erfolgte durch Zugabe von 1-2 µl (1µg) dUMP-haltiger Einzelstrang-DNA zum Kinasierungsansatz. Nach kurzem Mischen wurde dieser Ansatz für 3 min bei 65°C inkubiert und während 10-20 min bei Raumtemperatur abgekühlt.

Polymerasereaktion und Ligation: Zur Durchführung der beiden Reaktionen wurde der Ansatz nach Kinasierung und Annealing durch folgende Substanzen komplettiert:

10 x Ligase-Puffer	4,0 µl
10 mM ATP	4,0 µl
5 mM dNTPs	4,0 µl
Klenow	1,0 µl
T4-Ligase	<u>4,0 µl</u>
	40,0 µl

Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 5 min bei 5°C im Kryostaten inkubiert. Danach wurde die Temperatur in ca. 20 min bis auf 20°C gesteigert und über Nacht gehalten. Zur Fällung der DNA wurde der Reaktionsansatz im Anschluss mit Phenol/Chloroform extrahiert, die wässrige Oberphase mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 6,0 und 2,5 Volumen Ethanol versetzt und für eine Stunde bei -70°C gelagert. Die DNA wurde 10 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 10 µl TE-Puffer aufgenommen.

Methylierung (Horton & Lord, 1986):

Aqua bidest.	12,5 µl
10 x <i>dam</i> -Puffer	2,0 µl
0,8 mM SAM	2,0 µl
DNA	2,5 µl
<i>dam</i> -Methylase (20 U/µl)	<u>1,0 µl</u>
	20,0 µl

Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl des Methylierungsansatzes zur Transformation von *E. coli* JM109 verwendet (Sambrook *et al.*, 1989).

C 4 Expression der FLS in *E. coli*

Als Ausgangsmaterial diente eine FLS cDNA aus *Citrus unshiu*, inkloniert in +Bluescriptvektor.

Nach Transformation von *E. coli* JM109 mit dem FLS-Bluescriptkonstrukt wurde die Plasmid-DNA isoliert und das Insert durch Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *KPMI* herausgeschnitten. Das FLS-Fragment wurde in den Vektor pTZ19R inkloniert und in *E. coli* JM109 transformiert. pTZ19R besitzt zusätzlich einen Replikationsursprung für filamentöse Phagen und ermöglicht damit die Isolierung einzelsträngiger DNA.

Die Expression der rekombinanten FLS wurde im pQE6/M15[pREP4]-System durchgeführt. Nach Einklonierung des FLS-DNA-Fragments in die *NcoI*-Schnittstelle des Expressionsvektors pQE6 ist die Expression der Flavonolsynthese vom vektoreigenen Start-ATG möglich. Hierfür wurde durch *in vitro*-Mutagenese eine *NcoI*-Schnittstelle am Translationsstart des FLS-Inserts eingeführt.

Tab. 2: Oligonukleotid zur Einführung einer *Nco*I-Schnittstelle ("CCATGG")

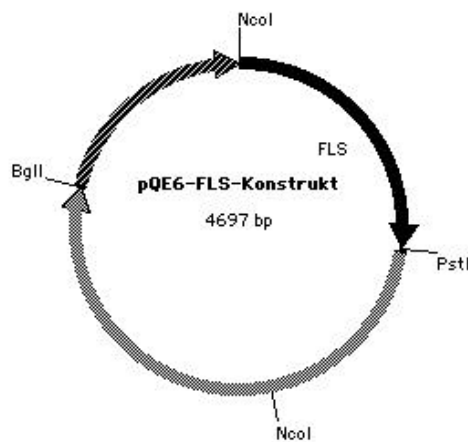
Die *Nco*I-Schnittstelle ist fett gedruckt; die durch *in vitro*-Mutagenese eingeführten Basen sind unterstrichen.

FLS-Originalstrang	5'-GGA AAA TAA AAT TAA TGG AGG TGG AG-3'
Oligonukleotid	5'-CTC CAC CTC CAT <u>GGA</u> TTT TAT TTT CC-3'

Da der Vektor pQE6 über eine weitere *Nco*I-Schnittstelle außerhalb der multiplen Klonierungsstelle verfügt, musste eine Drei-Wege-Klonierung vorgenommen werden. Dazu wurde pQE6 mit *Nco*I/*Bgl*II und *Bgl*II/*Pst*I verdaut, die beiden Fragmente isoliert, mit dem *Pst*I/*Nco*I geschnittenen Insert ligiert und in kompetente *E. coli* JM109 transformiert. Zur Selektion auf pQE6 wird 100 µg Amp/ml Medium zugegeben. Abbildung 6 zeigt den schematischen Aufbau des Expressionsklons. Die Identifizierung positiver Klone erfolgte anhand ihrer Restriktionsmuster und durch anschließende Sequenzierung.

Das über IPTG regulierbare Promotor/Operator-Element des pQE6 Vektors besteht aus einem T5-Promotor des *E. coli* Phagen T5 und zwei lac-Operator Sequenzen. Daran schließt sich eine synthetische Ribosomenbindungsstelle zur effizienten Translation an. Der Promotor unterliegt zudem einer strengen Regulation durch den lacI-Repressor, der bei *E. coli* M15[pREP4] auf dem in hoher Kopienzahl vorhandenen Vektor pREP4 codiert wird. Zur Selektion auf pREP4 werden 25 µg Kanamycin/ml Medium gegeben. Nach Transformation von *E. coli*-M15[pRep4] mit dem pQE6-Konstrukt wurden die Bakterien in LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (25 µg/ml) über Nacht bei 37°C angezogen.

Um eine ausreichende Menge an FLS-Protein zu erhalten, wurden in 2 l Schikanekolben 400 ml frisches LB-Medium (amp/kan) mit 1/100 Volumen dieser Übernachtkultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,6-0,8 erreicht war. Die Induktion erfolgte mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM über 3 h unter gleichen Bedingungen. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (SLA3000-Rotor, 5000 x g, 4°C, 10 min), in 70 mM Tris-HCL Puffer pH 7,5 aufgenommen, erneut zentrifugiert (5000 x g, 4°C, 10 min) und nach Dekantieren in Aliquots mit einem Bakterienfeuchtgewicht von ca. 3-6 g bei -70°C eingefroren.

Abb. 6: Schematischer Aufbau des Expressionsvektors pQE6 nach Einklonierung der FLS.

C 5 Zellaufschluss

Der Aufschluss der induzierten Bakterienzellen erfolgte durch Ultraschall. Dazu wurden die Bakterienpellets in 20 ml Aufschlusspuffer (B 9.3.1) gelöst, dann ca. 90 sec unter Eiskühlung im Sonifier (Cycle 0,6; 100 %) beschallt und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (SS34-Rotor, 30000 x g, 4°C, 10 min) entfernt.

Die Expression der FLS wurde durch SDS-PAGE der Rohextrakte und Coomassie-Färbung (B 9.1.5) verfolgt und die katalytische Aktivität im Enzymtest überprüft.

C 6 Reinigung der heterolog exprimierten FLS

C 6.1 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Der Rohextrakt nach C 5 wurde einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung (0-50 %, 50-60 %) unterzogen. Dazu wurde die entsprechende Menge $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ unter Rühren auf Eiswasser langsam innerhalb 10 bis 15 min zugegeben und nach 50 %iger Sättigung des Rohextraktes mit Ammoniumsulfat zentrifugiert (SS34-Rotor 35000 x g, 4°C, 10 min). Das Präzipitat wurde verworfen und der Überstand bis 60% Ammoniumsulfat gesättigt und zentrifugiert (SS34-Rotor 35000 x g, 4°C, 10 min). Der Niederschlag des letzten Fraktionierungsschrittes wurde in 1 ml Elutionspuffer SEC (B 9.3.2) aufgenommen und für die weiteren Reinigungsschritte eingesetzt.

C 6.2 Chromatographische Methoden zur Proteinreinigung

Alle Puffer wurden vor Verwendung durch Membranfilter (Porengröße: 0,22 µm) filtriert. DTT wurde erst unmittelbar vor der Verwendung der Puffer zugesetzt. Das Elutionsverhalten der Proteine an den verschiedenen Chromatographiematerialien wurde bei einer Absorption von 280 nm verfolgt.

C 6.2.1 Gelpermeations-Chromatographie an Fractogel EMD BioSEC (S)

Material: Fractogel EMD Bio SEC (Merck, Darmstadt), makroporöses partikuläres Polymethylacrylat (Partikelgröße 20-40 µm, Porengröße 500-800 Å), hydrophilisiert durch Umsetzung mit Diethylenglykol, dessen Oberfläche mit aufgepfropften Linierpolymeren aus Methoxyethylacrylamid belegt ist.

Säule: Superperformance (600 x 16 mm), Gelbettvolumen 119 ml.

Durchführung: Die Säule wurde mit 3 Säulenvolumen Puffer (B 9.3.2.) bei einer Flussrate von 1 ml/min äquilibriert. Die Proteinlösung aus der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung wurden über eine 1 ml Proben-schleife direkt auf die Säule gegeben und mit 1 ml/min eluiert. Enzymatisch aktive Fraktionen wurden vereinigt und im nächsten Chromatographieschritt eingesetzt.

C 6.2.2 Anionenaustauschchromatographie an Fractogel EMD DEAE

Material: Fractogel DEAE 650 (S) (Partikelgröße 20-40 µm) (Merck, Darmstadt), basischer Ionen-austauscher mit funktionellen Diethylaminoethylgruppen, die einen pK-Wert > 11 besitzen.

Säule: Superperformance SF (156 x 26 mm, Gelbettvolumen 67,5 ml),

Durchführung: Das Gelmaterial wurde mit 3 Säulenvolumen Auftragspuffer DEAE (B 9.3.3) bei einer Flussrate von 1 ml/min äquilibriert. Die enzymatisch aktiven vereinigten Fraktionen aus C 6.2.1 wurden über den Superloop auf die Säule appliziert und für weitere 20 min unter gleichen Bedingungen nachgewaschen bis die Extinktion wieder die Basislinie erreichte. Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradient [0-1M NaCl, Puffer (B 9.3.4) in Puffer (B 9.3.3)] bei einer Flussrate von 1ml/min innerhalb von 60 min eluiert. Die Fraktionen wurden auf FLS-Aktivität getestet und der Reinheitsgrad mittels SDS-Page und anschließender Färbung mit Coomassie Brilliant Blue (B 9.1.5) überprüft.

C 7 Aminoterninale Sequenzierung

Die aminoterninale, partielle Sequenzierung der apparent homogenen FLS mittels Edmanabbau (Edman & Begg, 1967) wurde in einem gepulsten Flüssigkeitssequenator (Modell 477 A, Applied Biosystems Inc.) von Herrn Dr. Schiltz (Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Freiburg) durchgeführt. Die abgespaltenen Phenylthiohydantoin-Aminosäuren wurden über einen angeschlossenen PTH-Analyser (Modell 477 A) durch Vergleich der Retentionszeiten mit einem Standardchromatogramm der 20 proteinogenen Aminosäuren identifiziert.

C 8 Test auf Flavonolsynthese-Aktivität

Der Enzymtest wurde nach Literatur (Britsch & Grisebach, 1986; Britsch *et al.*, 1993) durchgeführt. Es wurden Stammlösungen der Substrate Dihydroquercetin bzw. Dihydrokämpferol von 1 mM in Ethylacetat angelegt. Pro Inkubation wurden 36 µl dieser Lösung einpipettiert, das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und der Rückstand in folgender Inkubationsmischung aufgenommen:

200 µl 200 mM Natriumacetatpuffer pH 5,0
15 µl 60 mM Na-Ascorbat
15 µl 1mM Ammonium-Eisen(II)-sulfat-Lösung
15 µl Katalasesuspension (0,2 mg; 60000 U/mg)
100 µl der apparent homogen gereinigten FLS (11 µg Protein)*

Durch Zugabe von 15 µl einer 2 mM wässrigen 2-Oxoglutaratlösung wurde die Reaktion gestartet und der Ansatz 7 min bei 37 °C unter ständigem Schütteln im Thermomixer inkubiert. Da die Sauerstoffsättigung der Proben gewährleistet sein muss, wurden die Reaktionsgefäße währenddessen offengehalten. Die Umsetzung wurde durch Zugabe von 15 µl einer gesättigten EDTA-Lösung gestoppt. Für die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Flavonoide wurde nach Reaktionsende zunächst mit 50 und 30 µl Ethylacetat extrahiert und die organische Phase nach zwischenzeitlichem Zentrifugieren (13000 rpm, 3 min, Raumtemperatur) aufgetragen. Für die HPLC-Analyse wurde zweimalig mit 75 µl extrahiert und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert.

*Bei der Verwendung von Enzymrohextrakt wurden die Extrakte zuvor über eine PD10-Säule (Pharmacia, Freiburg) entsprechend den Herstellerangaben filtriert.

C 8.1 Dünnschichtchromatographie

Die organische Phase aus C 8 wurde auf eine Cellulose-Dünnschichtplatte mit einer Glaskapillare aufgetragen. Die im kalten Luftstrom getrocknete Platte wurde in 15 % Essigsäure über Nacht entwickelt. Die Auswertung der getrockneten Dünnschichtplatten erfolgte unter UV₃₆₆ und durch Detektion mit den Farbreagenzien 0,1 % Echtblausalz B-Lösung in 0,2 N NaOH oder 1 %ige methanolische Naturstofflösung. Durch den visuellen Vergleich mit Referenzonen bekannter Substrat bzw. Produktmengen konnte der Umsatz und damit die Enzymaktivität semiquantitativ zugeordnet werden. Die Methode der Dünnschichtchromatographie kam in den Vortests zur Bestimmung der kinetischen Konstanten sowie im Rahmen der Reinigung (C 6) und zur präparativen Gewinnung von Quercetin zum Einsatz (C 9).

C 8.2 HPLC-Analyse

Die Trennung der Dihydroflavonole und Flavonole fand mit der vereinigten organischen Phase aus C 8 über Reversed-Phase HPLC (Shimadzu, Tokyo, Japan) statt. Als stationäre Phase diente eine Nucleosil C18-Säule (125 mm x 3 mm, Partikelgrösse 5 µm; Macherey und Nagel, Düren) und als Lösungsmittel wurde ein Wasser/Methanol-Gradient verwendet. Die Säule wurde mit 20 % wässrigem Methanol äquilibriert. Die Elution der Flavonoide erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min in:

20 % wässriges Methanol für 1 min
Gradient von 20 % bis 100 % Methanol in 3 min
100 % Methanol für 5 min
von 100 % bis 20 % wässriges Methanol in 3 min
Waschen der Säule mit 20 % wässriges Methanol für 5 min

Die eingespritzte Probenmenge betrug 50 µl bei einem Totvolumen von 20 µl. Die Elution wurde sowohl bei 290 nm als auch bei 365 nm verfolgt. Diese Detektionsmethode wurde zur quantitativen Bestimmung der umgesetzten Menge an Substrat eingesetzt.

C 8.3 Quantifizierung ¹⁴C-markierter Reaktionsprodukte

Nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Flavonoide erfolgte die quantitative Auswertung der DC-Platten mit dem Bio Imager FLA-2000 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) unter Verwendung der Software „Tina“ und „AIDA“ (Raytest, Straubenhardt).

C 9 Präparative Gewinnung von Quercetin

Für präparative Zwecke wurden in mehreren Inkubationen (20 x 2 ml in 200 mM Tris-Puffer pH 7,5) insgesamt eingesetzt:

6 mg HPLC gereinigtes Dihydroquercetin
170 µM Natriumascorbat
35 µM Ammoniumeisen (II)-sulfat
70 mM 2-Oxoglutarat
2 mg/ml Katalasesuspension

Die Inkubation wurde bei 37 °C offenstehend unter Schütteln für zwei Stunden durchgeführt, die Flavonoide anschließend mit Ethylacetat extrahiert (2 x je 500 µl pro 2 ml-Inkubation) und auf Cellulose-Dünnschichtplatten in 15 % wässriger Essigsäure über Nacht aufgetrennt. Die Produktbande wurde unter UV₃₆₆-Bestrahlung lokalisiert, ausgekratzt und in Methanol eluiert. Die methanolische Lösung wurde gefiltert, das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und das Produkt massenspektrometrisch überprüft.

C 10 Massenspektroskopie

Das Massenspektrum des Quercetins wurden mit einem Bruker Reflex II MALDI-TOF Massenspektrometer im positiven Reflektormodus bei einer Beschleunigungsspannung von 23 kV über einen Bereich von m/z 50-750 aufgenommen. α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure und 2,5-Dihydroxybenzoesäure dienten zur internen Kalibrierung.

EI-Massenspektren wurden mit einem Finnigan MAT 70 S Massenspektrometer bei einer Beschleunigungsspannung von 6 kV und Einspritztemperaturen von 130°C, 250°C oder 280°C aufgezeichnet.

Zur Bestimmung der Masse der FLS diente gleichermassen ein Bruker Reflex II MALDI-TOF Massenspektrometer. Die Proteinsuspension (100 μ g/300 μ l 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8) wurde zunächst mit dem gleichen Volumen einer Mischung aus 0,1 % TFA:Acetonitril (1:1, v/v) angesäuert, mit dem gleichen Volumen gesättigter Sinapinsäurelösung in 0,1 % TFA:Acetonitril (1:1, v/v) gemischt und in 0,5 μ l-Portionen auf die 'SCOUT[®] target plate' aufgetragen.

C 11 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie von apparent homogener FLS sowie von *trans*-Dihydrokämpferol wurde auf einem Jasco-720 Spektropolarimeter (Jasco Corporation, Tokio, Japan) unter Anleitung von Herrn Dr. U. Pieper (Institut für Biochemie, Justus-Liebig-Universität Gießen) gemessen. Die Schichtdicke der Probenlösung in der zylindrischen Quarzküvette betrug 0,05 cm. Unter Kühlung (5°C) wurde jede Probe 10 mal vermessen. Zur Kalibrierung des Gerätes wurde 0,06 % Ammonium d-10-Camphersulfonat verwendet. Die FLS-Spektren wurden in Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 bei einer Proteinkonzentration von 0,371 mg/ml aufgezeichnet. Die Messung der Dihydrokämpferolenantiomeren fand in Methanol statt. Die Daten wurden unter Verwendung der 'self-consistent method' mit Hilfe des Programms Dichroprot V2.4 (Delage & Geourjon, 1993) ausgewertet.

C 12 FLS-Antiserum

Ein polyklonales Antiserum gegen die FLS wurde von der Firma 'nano Tools' Antikörpertechnik GmbH (Teningen) in Kaninchen gewonnen. Dazu wurde etwa 1 mg der apparent homogenen FLS eingesetzt.

D Ergebnisse und Diskussion

Die 2-Oxoglutarat-abhängige FLS katalysiert im Rahmen der Flavonoidbiosynthese die Oxidation von Dihydroflavonolen zu Flavonolen und ist damit das "Eingangsenzym" zu dieser großen Untergruppe von Flavonoiden. Obwohl in den letzten 10 Jahren sechs FLSs kloniert wurden, fehlt eine biochemische Analyse des Enzyms, und in den meisten Fällen ist nicht einmal die funktionelle Identität durch rekombinante Expression überprüft worden.

Die primäre Zielsetzung der Arbeit bestand deshalb in der biochemischen Charakterisierung einer FLS.

Ausgewählt wurde die FLS aus *Citrus unshiu*, nachdem die entsprechende cDNA Sequenz kurz vor Beginn der Arbeit im Netz publiziert wurde und der Klon im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Dr. Takaya Moriguchi, ('National Institute of Fruit Tree Science' in Japan) zur Verfügung gestellt wurde.

D 1 FLS-Klonierung

Als Ausgangsmaterial diente eine FLS cDNA-Probe [Genbankeintrag AB011796] aus der *Satsuma*-Mandarine (*Citrus unshiu* Marc.), die über eine cDNA-Bank (Lamda ZAP XR[®], Stratagene, USA) aus Epidermisgewebe der Frucht isoliert worden war. Als heterologe Sonde war ein entsprechender EST (expressed sequence tag) Klon [Genbankeintrag 153O10T7] aus *Arabidopsis* verwendet worden (Moriguchi *et al.*, 2002). Die cDNA-Sequenz besitzt einen offenes Leseraster von 1005 bp und codiert für ein Protein von 335 Aminosäuren.

D 2 Heterologe Expression der FLS

Nach Umklonierung des FLS-cDNA Inserts in den Vektor pTZ19R wurde mit Hilfe der ortsspezifischen *in vitro*-Mutagenese-Technik eine *Nco* I-Schnittstelle am Translationsstart der FLS cDNA eingeführt, die eine gerichtete Klonierung in den Expressionsvektor pQE6 ermöglichte (s. C 3 bzw. C 4).

Nach Einklonierung des FLS-DNA-Fragments in die *Nco* I-Schnittstelle von pQE6 und Transformation des *E. coli*-Stammes M15 [pREP4] mit dem FLS-pQE6-Konstrukt war die Expression der Flavonolsynthese vom vektoreigenen Start-ATG möglich. Die Expression

wurde durch Zusatz von IPTG induziert. Als Kontrolle diente eine nicht-induzierte *E. coli* M15 [pREP4]-Kultur, die ebenfalls mit FLS-pQE6-Konstrukt transformiert war. Optimale Expressionsbedingungen konnten bei 37°C und einer Induktionsdauer von 3 h ermittelt werden. Nach Aufschluss der induzierten Bakterienzellen sowie der nicht-induzierten Kontrollzellen wurden die resultierenden Rohextrakte über eine SDS-PAGE aufgetrennt. In dem Rohextrakt der induzierten Bakterien konnte mit Coomassie Brilliant Blue Färbung eine zusätzliche Proteinbande bei 38 kDa detektiert werden, wie sie für die rekombinante FLS aus *Citrus unshiu* zu erwarten war (**Abb. 7**). Eine weniger stark ausgeprägte Bande auf gleicher Höhe fand sich auch in den Gelspuren der nicht-induzierten Kontrollzellen, was darauf schließen lässt, dass ohne IPTG-Zusatz ebenfalls FLS-Protein, wenn auch nur in sehr geringem Umfang, exprimiert wird.

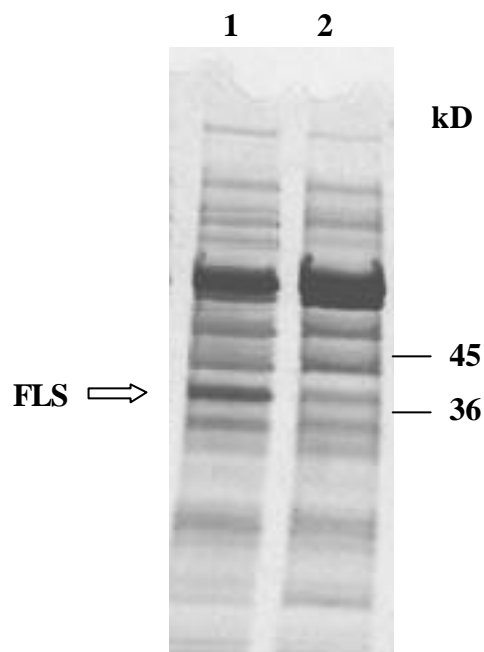


Abb. 7: Expression der FLS in *E. coli* M15 [pREP4].

Die Proteinextrakte (12 µg pro Spur) aus IPTG-induzierten *E. coli* pQE6-FLS (Spur 1) und nicht induzierten *E. coli* pQE6-FLS (Spur 2) wurden in einem 12,5 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Die Zuordnung der Massen (kDa) ist am rechten Rand dargestellt.

D 3 Test auf FLS-Aktivität

Eine vorläufige Bestätigung der funktionellen Expression sollte durch Messung der Enzymaktivität erfolgen, wobei die Umsetzungen dünnschichtchromatographisch verfolgt wurden. Hierfür wurden die Rohextrakte IPTG-induzierter *E. coli*-Zellen (0,25 mg Gesamtproteinmenge pro Ansatz) im Standardenzymtest mit den Substraten Dihydroquercetin oder Dihydrokämpferol 60 min bei pH 7,5 und 37°C inkubiert. Nach DC-Auftrennung der Flavonoide in verschiedenen Fließmitteln konnten die Produkte Quercetin bzw. Kämpferol im Vergleich mit authentischen Referenzsubstanzen identifiziert werden (**Tab. 3**). Die Auswertung der Chromatogramme fand aufgrund der starken Eigenfluoreszenz der Flavonole unter UV-Licht, sowie nach Reaktion mit Sprühreagenzien (Naturstoffreagenz 1 % in Methanol bzw. Echtblausalz 1 % in 0,1 N NaOH) statt (**Tab. 4**).

Tab. 3: Laufverhalten der Flavonole und Dihydroflavonole in verschiedenen Fließmitteln.

Als stationäre Phase diente Celluloseacetat. Laufmittel I: 15% Essigsäure/85 % Wasser; Laufmittel II: 30 % Essigsäure/70 % Wasser; Laufmittel III: 50 % Chloroform/45 % Essigsäure/5 % Wasser.

Flavonoid	Laufmittel I RF	Laufmittel II RF	Laufmittel III RF
(+)- <i>trans</i> -Dihydrokämpferol	0,49	0,64	0,68
(+)- <i>trans</i> - Dihydroquercetin	0,43	0,59	0,31
Kämpferol	0,014	0,08	0,52
Quercetin	0,006	0,04	0,17

Tab. 4: Detektion von Substraten und Reaktionsprodukten.

Unter ultravioletter Bestrahlung (366 nm) zeigten die Flavonole eine intensive gelbe Fluoreszenz, während Dihydroflavonole nur schwach violett erschienen.

Flavonoid	UV (366 nm)	Naturstoffreagenz 1% in Methanol	Echtblausalz 1% in 0,1 N NaOH
(+)- <i>trans</i> -Dihydrokämpferol	kaum Fluoreszenz	keine Reaktion	violett
(+)- <i>trans</i> -Dihydroquercetin	kaum Fluoreszenz	keine Reaktion	violett
Kämpferol	gelb	hellgelb	gelb/bräunlich
Quercetin	gelb	orange/gelb	gelb/bräunlich

D 4 Reinigung der rekombinanten FLS

Für die folgenden biochemischen und strukturellen Untersuchungen sollte die FLS zur apparenten Homogenität gereinigt werden. Anschließend sollte eine erste strukturelle Charakterisierung der gereinigten FLS durch CD-Spektroskopie sowie ein polyklonales Antiserum gewonnen werden.

Ein Problem stellt die Labilität 2-Oxoglutarat-abhängiger Dioxygenasen in Rohextrakten dar, wie sich bei früheren Reinigungen verwandter Enzyme gezeigt hat. Beispielsweise wurde ein schneller proteolytischer Abbau der FHT aus *Petunia hybrida* in pflanzlichen und bakteriellen Extrakten nachgewiesen (Lukacin *et al.*, 2000). Durch Anwendung einer neuen Aufschlussmethode im leicht sauren pH-Bereich und einer kurzen, schonenden Reinigungsprozedur konnte der Abbau der FHT durch Proteasen weitestgehend vermieden werden (Lukacin *et al.*, 2000).

Da bei der Reinigung der FLS mit denselben Schwierigkeiten zu rechnen war, wurde das Verfahren, wie für die FHT verwendet. Während der Reinigungsprozedur wurde die Anreicherung des FLS-Polypeptids mittels SDS-PAGE und Aktivitätsbestimmung verfolgt.

D 4.1 Ammoniumsulfatfällung

Die mit dem FLS-pQE6-Konstrukt transformierten, IPTG-induzierten *E. coli* M15 [pREP4]-Zellen (3,3 g, Nassgewicht) wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und der resultierende Rohextrakt (55 mg Protein/20 ml) einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung bei 0-40 % und 40-50 % Sättigung unterzogen.

D 4.2 Größenausschlusschromatographie an Fractogel EMD BioSEC

Das Prinzip der Gelpermeationschromatographie beruht auf der unterschiedlichen Verteilung von Molekülen zwischen dem Volumen in der Gelmatrix und dem restlichen Fließmittel, wobei eine Auftrennung hinsichtlich Molekülgröße und Form stattfindet. Gleichzeitig wird das Proteineluat entsalzt und die meist niedermolekularen Proteasen entfernt. Das hier verwendete Fractogel EMD BioSEC erlaubt eine Trennung im Bereich zwischen 5 und 1000 kDa. Das Pellet der Ammoniumsulfatfällung von 40-50 % Sättigung wurde in 0,8 ml

Aufschlusspuffer aufgenommen und auf die SEC-Säule aufgetragen. Durch diese Säule konnten bereits 70-80 % der Begleitproteine abgetrennt werden (**Abb. 8**).

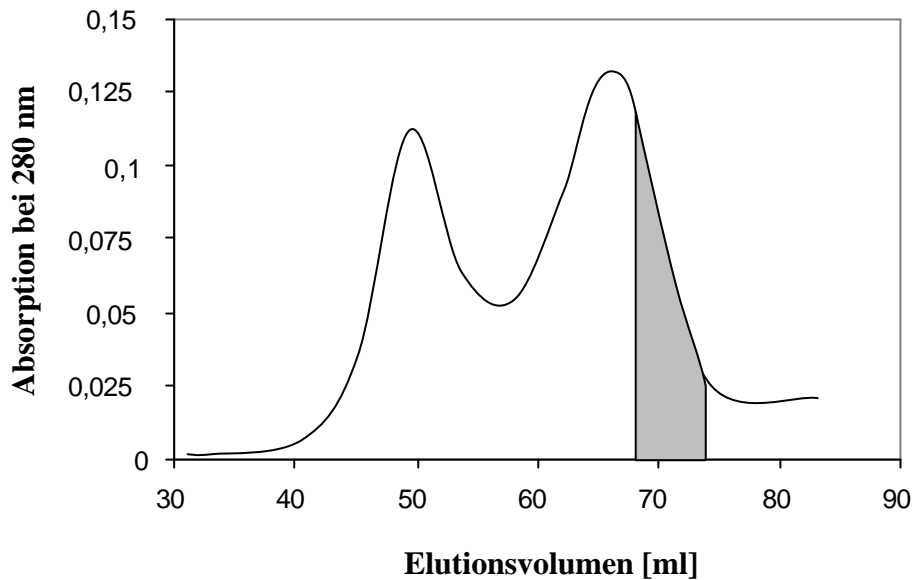


Abb. 8: Fraktionierung der FLS an Fractogel EMD Bio SEC (S).

Elutionsdiagramm der Proteinfraktionierung aus der 40-50 % Ammoniumsulfatfällung. (Die Flussrate betrug 1ml/min und die Fraktionsgröße lag bei 1,5 ml. Der schraffierte Bereich kennzeichnet die Fraktionen mit FLS-Aktivität, die zur weiteren Reinigung verwendet wurden.

D 4.3 Anionenaustauschchromatographie an Fractogel EMD DEAE

Bei der Anionenaustauschchromatographie macht man sich den Sachverhalt zunutze, dass Proteine als Polyelektrolyt oberhalb ihres isoelektrischen Punkts eine negative Nettoladung besitzen und an die fixierten positiven Ladungen der Säulenmatrix reversibel binden können. Das zur FLS-Reinigung verwendete Säulenmaterial Fractogel EMD DEAE besteht aus einem Methacrylat-Polymer, an das über flexible lineare Polymerketten Diethylaminoethylgruppen gebunden sind, die eine gute Anpassung an die native Proteinkonformation ermöglichen (Tentakel-DEAE). Die FLS-aktiven Fraktionen (4,5 ml) aus **D 4.2** wurden über einen Superloop auf eine Fractogel EMD DEAE 650 (S)-Säule aufgetragen. Die Säule wurde zur Entfernung ungebundener Proteine anschließend bei einer Flussrate von 1 ml/min gewaschen bis die Absorption zur Grundlinie zurückkehrte (20 min). Es wurden Fraktionen zu je 1 ml gesammelt. Die Elution erfolgte in einem zweistufigen Gradienten (linear von 0 bis 0,55 M NaCl in Tris-Puffer pH 7,5 über 60 ml; linear von 0,55 bis 1M NaCl in Tris-Puffer pH 7,5 über weitere 13 ml). Aktive und apparent homogene FLS eluierte in einem Bereich zwischen 230-280 mM Natriumchlorid (**Abb. 9**).

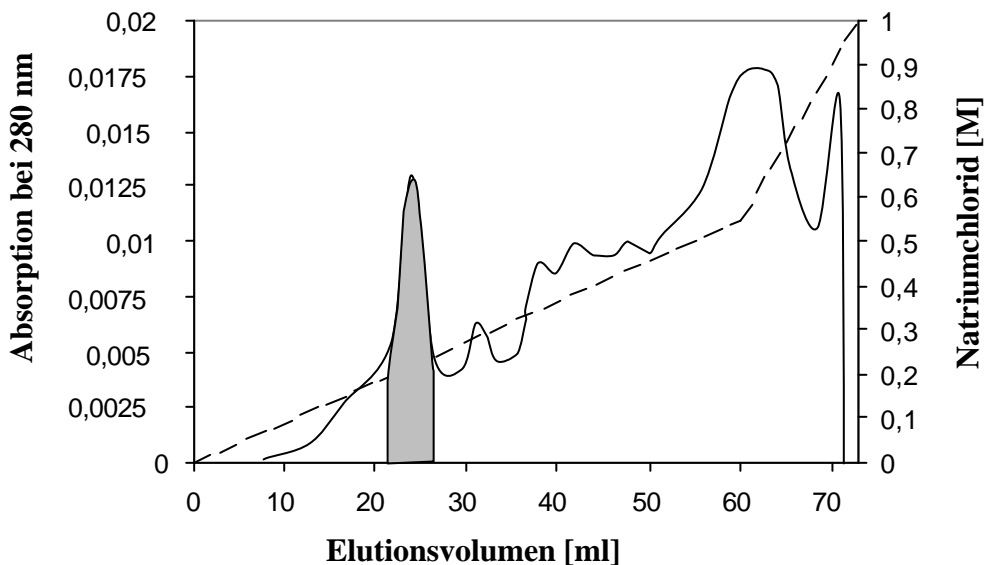


Abb. 9: Elutionsdiagramm der rekombinanten FLS von Fractogel EMD DEAE (S).

Fractionen mit FLS-Aktivität aus der Größenaussschromatographie wurden aufgetragen und in Salzgradienten eluiert. Der schraffierte Bereich kennzeichnet Fraktionen mit apparent homogener FLS.

D 4.4 Reinigungstabelle

Insgesamt wurden in dem Reinigungsprozess aus 3,3 g (Feuchtgewicht) *E. coli* M15[pREP4] 110 µg hochaktive FLS isoliert (**Tab. 5**). Mit dieser Reinigungsprozedur konnte die rekombinante FLS 10-fach angereichert werden. Der im Vergleich zur Reinigung pflanzlicher Enzyme des Sekundärstoffwechsel relativ niedrige Anreicherungsfaktor ist darauf zurückzuführen, dass die überexprimierte FLS bereits einen großen Anteil des löslichen Gesamtproteins von *E. coli* ausmacht. Die Ausbeute betrug etwa 2 %. Die Überprüfung durch SDS-PAGE zeigte, dass die FLS nach dieser zwei-Stufen-Reinigung apparent homogen war (**Abb. 10**).

Tab. 5: Reinigung der rekombinanten FLS 3,3g IPTG-induzierter *E. coli* M15[pREP4]-Zellen.

Für die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten wurde DHQ als Substrat verwendet.

Fraktionierung	Volumen [ml]	Protein [mg]	Spezifische Aktivität [mkat/kg]	Apparente Reinigung [-fach]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	20	55	0,54	1	100
Fractogel EMD Bio SEC (S)	4,5	1,0	1,7	3,1	5,7
Fractogel EMD DEAE 650 (S)	3,0	0,11	5,2	9,6	1,9

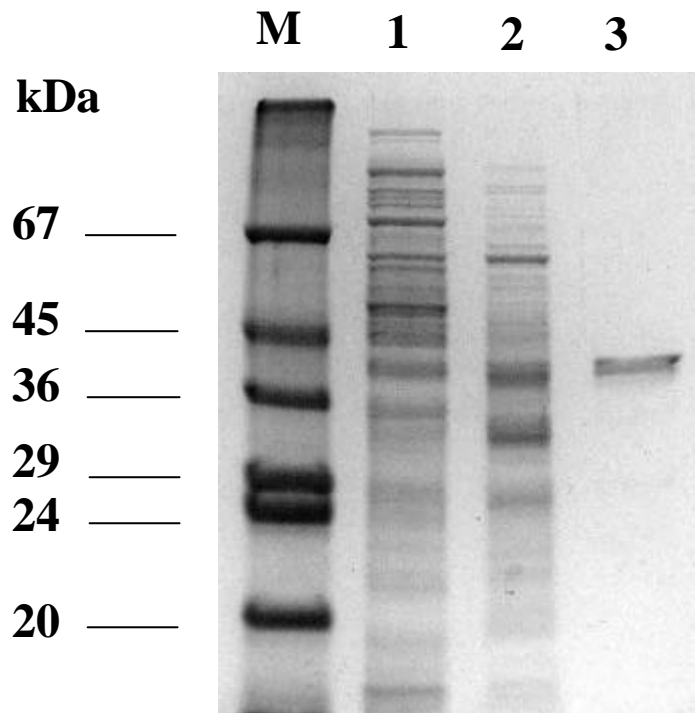


Abb. 10: SDS-PAGE der FLS-Fractionen.

Die Proteine im Rohextrakt aus IPTG-induzierten *E. coli* M15 [pREP4]-Zellen (Spur 1: 7 μ g) sowie nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung und SEC (Spur 2: 2,3 μ g) und nach DEAE-Chromatographie (Spur 3: 0,6 μ g) wurden durch SDS-PAGE (5 %iges Sammelgel, 12,5 %iges Trenngel) aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Als Größenvergleich diente der SDS7-Marker (M). Die Zuordnung der Massen (kDa) ist am linken Rand eingezeichnet.

D 5 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten FLS

Eine wichtige Voraussetzung für die zuverlässige Charakterisierung ist die Integrität des homogenen Proteins. Deshalb wurde das Polypeptid massenspektroskopisch und über eine aminoterminaler Sequenzierung überprüft. Die Aktivität wurde mit Dihydroquercetin als Substrat bestimmt, da es kommerziell erhältlich ist und das vorherrschende Substrat für die Flavonolbiosynthese in *Citrus unshiu* zu sein scheint (Moriguchi *et al.*, 2002). Das Produkt der FLS-Reaktion sollte mit EI-MS und MALDI-TOF-MS eindeutig identifiziert werden. Mit diesem Substrat wurden auch die pH- und Temperatur-Optima sowie die Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) für die einzelnen Kofaktoren ermittelt. Die enzymkinetischen Untersuchungen wurden mit Hilfe der HPLC-Analyse durchgeführt, wobei ausschließlich die homogene FLS eingesetzt wurde.

D 5.1 Polypeptidanalyse

Die apparent homogene FLS zeigte auf dem SDS-Gel eine Bande bei etwa 38 kDa (Abb. 10), was mit der molekularen Masse des translatierten Polypeptids von 37899 Da korreliert. Über MALDI-TOF-MS-Analyse wurde die Masse des Proteins mit m/z 37888 ± 40 ermittelt. Eine in Zusammenarbeit mit Dr. E. Schiltz am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg durchgeführte partielle aminoterminaler Sequenzierung des Polypeptids zeigte, dass der N-Terminus mit dem aus der FLS cDNA translatierten N-Terminus (Met-Glu-Val-Glu-Arg-Val-Gln-Ala-Ile-Ala-Ser-Leu-Ser-His) übereinstimmte und demnach vollständig erhalten war. Der intakte N-Terminus und die ermittelte gesamte Masse zeigen, dass das gereinigte rekombinante Polypeptid der nativen FLS entspricht.

D 5.2 Präparativer Enzymtest

In einem präparativen Enzymtest (Gesamtvolumen 40 ml, etwa 1,1 mg gereinigtes FLS-Protein) wurden 6 mg HPLC-gereinigtes *trans*-Dihydroquercetin (Roth, Karlsruhe) für zwei Stunden bei 37°C und pH 7,5 umgesetzt.

Die Testbedingungen (170 μ M Natriumascorbat, 35 μ M Ammoniumeisen(II)sulfat, 70 μ M 2-Oxoglutarat und 2 mg/ml Katalase) wurden weitgehend aus dem Test auf FHT-Aktivität übernommen (Britsch & Grisebach, 1986). Das Produkt wurde in Ethylacetat extrahiert und

dünnschichtchromatographisch gereinigt. Die Auswertung der DC erfolgte unter UV-Strahlung (366 nm). Die Masse und das Fragmentierungsmuster des aus den Celluloseplatten eluierten Reaktionsprodukts wurden durch EI-MS und MALDI-TOF-MS bestimmt. Dabei wurde ein Molekularion von m/z 302 ermittelt und Quercetin eindeutig als Produkt identifiziert.

D 5.3 HPLC-Analyse

Die Auftrennung von Substrat und Produkt aus den FLS-Aktivitätsmessungen wurde in Anlehnung an eine bereits für die Trennung von Naringenin und Dihydrokämpferol beschriebene Reversed-Phase HPLC-Methode durchgeführt (Lukacin, 1997). Die HPLC-Anlage (Shimadzu, Japan) wurde mir von Prof. Dr. E. Wellmann (Institut für Biologie II, Universität Freiburg) für die Messung zur Verfügung gestellt. Die Inkubationen wurden mit Ethylacetat extrahiert und der Extrakt direkt auf eine Nucleosil RP C18-Säule (Machery und Nagel, Düren) aufgetragen. Anschließend wurde mit einem linearen Gradienten (20 % Methanol/H₂O bis 100 % Methanol) eluiert (**Abb. 12**) und die Elution der Flavonoide gleichzeitig bei einer Wellenlänge von 290 nm (Absorptionsmaximum für DHQ und DHK) und 368 nm (Absorptionsmaximum für Quercetin und Kämpferol) verfolgt (**Abb. 11**). Die Retentionszeiten der einzelnen Signale konnten über einen Vergleich mit entsprechenden Referenzproben den verschiedenen Flavonoiden zugeordnet werden. Für DHQ und DHK wurden Retentionszeiten von 7,6 min bzw. 7,9 min und für Quercetin und Kämpferol wurden Zeiten von 8,5 min bzw. 9,0 min aufgezeichnet .

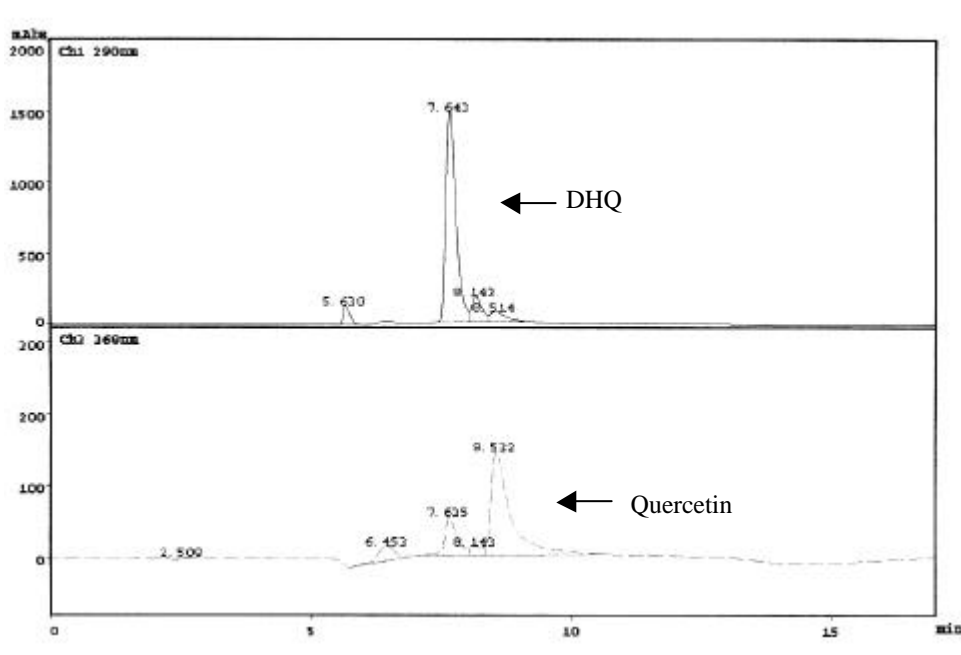


Abb. 11: Original-Diagramm der Elution von Dihydroquercetin und Quercetin.

Die Trennung der Flavonoide erfolgte an einer RP-18 Nucleosil Säule (Machery und Nagel) durch HPLC (Shimadzu, Tokyo, Japan). Als Lösungsmittelsystem wurde ein Methanol/Wasser-Gemisch verwendet. Die Elution wurde bei 290 nm (DHQ-Absorptionsmaximum) und bei 368 nm (Quercetin-Absorptionsmaximum) verfolgt.

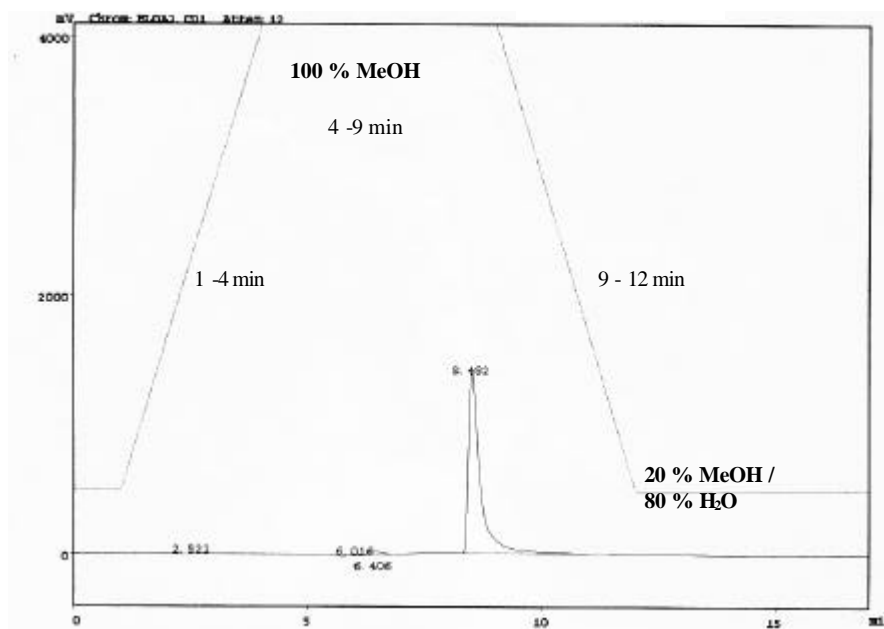


Abb. 12: Original-Diagramm der Elution von Quercetin einschließlich Lösungsmittelgradient.

Ausgehend von 20 % MeOH/80 % H₂O wurde 3 min mit einem linearen Gradienten bis 100 % MeOH eluiert, anschließend 5 min 100 % MeOH gehalten. Die Flussrate betrug 0.5 ml/min.

D 5.4 Zeit- und Proteinlinearität

Die kinetischen Untersuchungen erfordern, dass alle Messungen reproduzierbar unter Bedingungen der Zeitlinearität und Proteinlinearität durchgeführt werden. Dies wurde vorab sichergestellt.

D 5.4.1 Zeitlinearität

Über einen Zeitraum von 0,5 bis 25 min wurden die Tests bei pH 7,5 und 37°C durchgeführt. Jeder Ansatz (Gesamtvolumen 360 μl) enthielt 100 μM Dihydroquercetin, 83 μM 2-Oxoglutarat, 42 μM Ammoniumeisen-(II)-sulfat, 2,5 mM Natriumascorbat und 2 mg/ml Katalase. Die Konzentration von Substrat und Kofaktoren sollte dabei in Sättigung vorliegen. Die eingesetzte Proteinmenge betrug 11 μg . Es zeigte sich, dass ein linearer Verlauf der Umsetzung nur im Bereich von 0,5 bis 10 min gewährleistet war (**Abb. 13**). Für die weiteren Tests wurde eine Zeitdauer von 7 min gewählt.

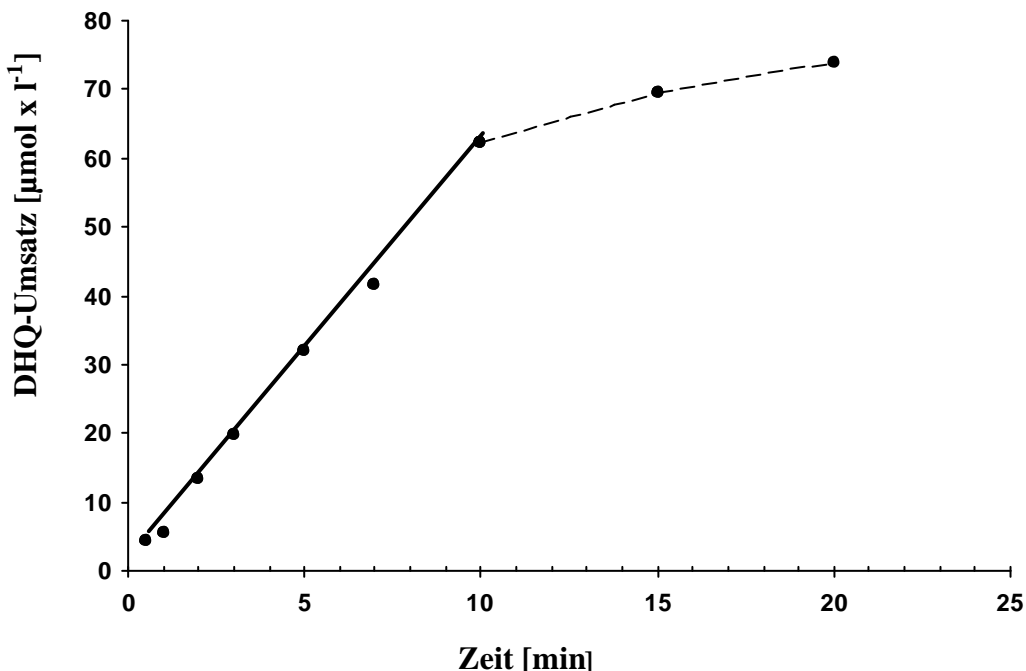


Abb. 13: FLS-Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit.

Unter den gegebenen Umständen verläuft die Umsetzung von Dihydroquercetin in dem zeitlichen Bereich von 0,5-10 min linear.

D 5.4.2 Proteinlinearität

Unter gleichen Testbedingungen, aber mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen, erfolgte die Bestimmung der Proteinlinearität bei einer Inkubation von 7 min. Es konnte gezeigt werden, dass der Enzymtest mit FLS-Mengen von 4,5 bis 22 μg linear verläuft (**Abb. 14**). Nachfolgend wurde in der Enzymreaktion mit der Ausnahme von **D 5.5** jeweils 11 μg FLS-Protein eingesetzt.

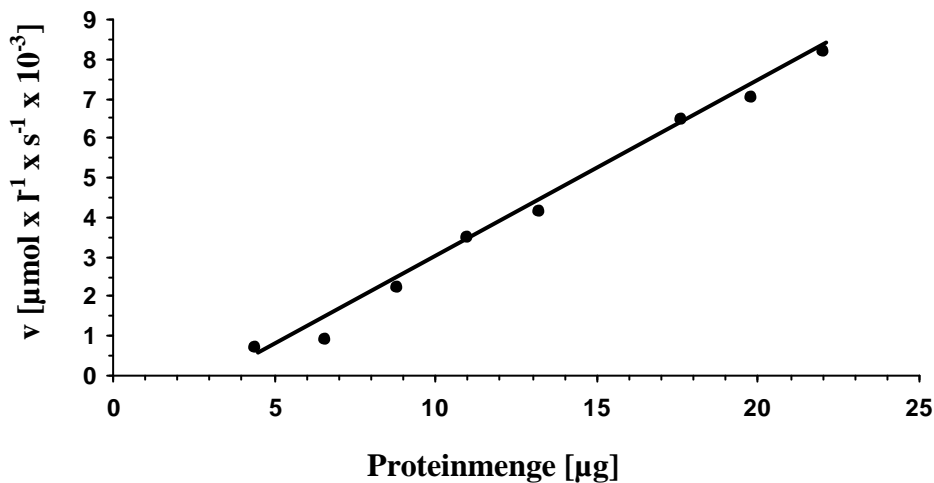


Abb. 14: FLS-Aktivität in Abhängigkeit von der Enzymmenge.

Die Umsatzrate über 7 min stieg linear an mit FLS-Mengen von 4,5-22 μg .

D 5.5 pH-Optimum

Die pH-Abhängigkeit der FLS-Aktivität wurde mit 22 μg FLS-Protein/Inkubation unter 6 verschiedenen Puffersystemen über einen Bereich von pH 2,0-10,0 untersucht. Die Enzymaktivitäten wurden mit einer Proteinmenge von 22 μg pro Ansatz unter den in **D 5.4** beschriebenen Testbedingungen gemessen. Für den sauren bis neutralen pH-Bereich wurden Glycin-, Natriumacetat-, Kaliumphosphat-, Tris- und Bis-Tris-Puffer verwendet, während für alkalische pH-Werte Tris- und Glycinat-Puffer eingesetzt wurden. Das Optimum für die katalytische Umsetzung von Dihydroquercetin zu Quercetin liegt zwischen pH 5 und 6, außerhalb dieses Bereichs nimmt die Aktivität drastisch ab (**Abb. 15**). Der höchste Umsatz wurde in Natriumacetatpuffer pH 5,0 erreicht.

Auch die rekombinante FHT aus *Petunia hybrida* zeigt als Referenz-Dioxygenase zwischen pH 5 und 6 ihre höchste Enzymaktivität (Lukacin, 1997). Für die folgenden Untersuchungen wurde ausschließlich in Natriumacetatpuffer pH 5,0 gearbeitet.

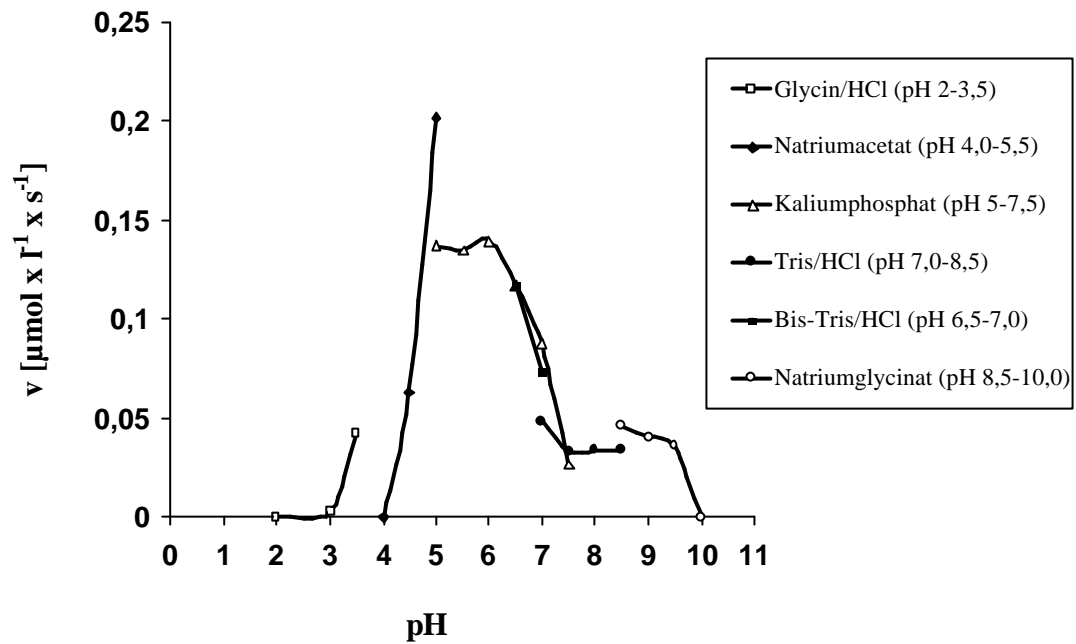


Abb. 15: pH-Abhängigkeit der FLS-Aktivität.

Das pH-Optimum wurde mit homogener FLS (22 µg Protein/Testansatz) in 200 mM Pufferlösungen bei 37°C unter Standardbedingungen bestimmt.

D 5.6 Temperaturoptimum

Die Abhängigkeit der FLS-Umsatzrate von der Temperatur wurde über einen Bereich von 15-50°C in Natriumacetatpuffer pH 5,0 bestimmt. Insgesamt weist die FLS eine hohe Aktivität in einem Temperaturbereich von 30 bis 40°C auf, mit einem Maximum bei 37°C (**Abb. 16**). Temperaturen unter 25°C und über 40°C führten zu einem deutlichen Aktivitätsverlust.

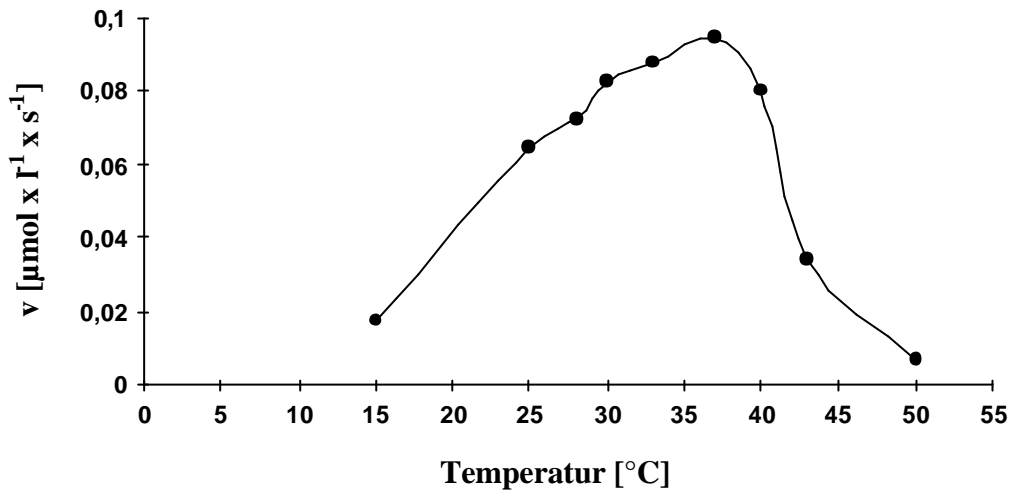


Abb. 16: Temperaturabhängigkeit der FLS-Aktivität.

Die Umsatzrate wurde mit homogener FLS (11 µg/Inkubation) unter Standardtestbedingungen bestimmt.

D 5.7 Kinetische Konstanten für 2-Oxoglutarat und Fe²⁺

Die Michaelis-Konstante K_m stellt eine charakteristische Größe für jedes Enzym dar. Sie gibt für ein bestimmtes Enzym diejenige Substratkonzentration an, die zu halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit ($1/2 \times V_{max}$) führt und ist ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat. Die praktische Bestimmung von K_m und V_{max} wurde nach Lineweaver-Burk durchgeführt. Die Enzymreaktion wurde unter den Bedingungen einer Kinetik pseudo erster Ordnung durchgeführt, da jeweils alle Reaktanden außer 2-Oxoglutarat bzw. Fe²⁺ im Test in Sättigung vorlagen. 2-Oxoglutarat wurde in einer Konzentration von 11-55 µM eingesetzt, und die verwendeten Fe²⁺-Konzentrationen betragen zwischen 8-40 mM. Für die rekombinante FLS wurden auf diese Weise K_m -Werte für 2-Oxoglutarat von 36 µM und für Fe²⁺ von 11 µM bestimmt (**Abb. 17, Abb. 18, Tab. 6**).

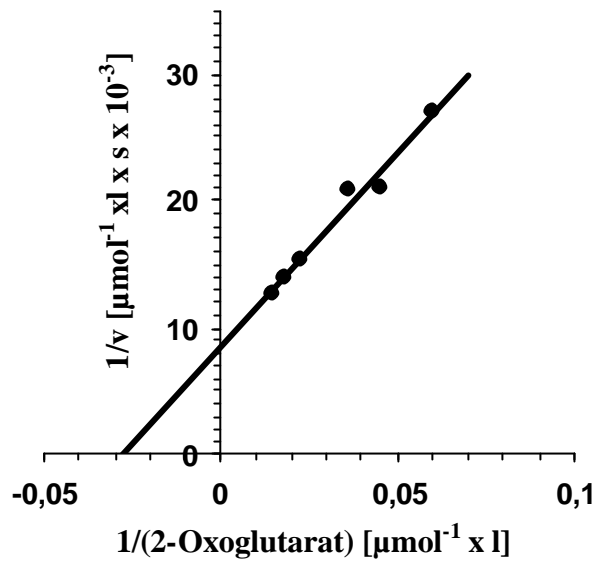


Abb. 17: Apparente Michaelis Konstante der FLS für 2-Oxoglutarat.

Doppelt reziproker Auftrag nach Lineweaver-Burk der FLS-Aktivität gegen die 2-Oxoglutaratkonzentration. Eingesetzt wurden 36 nmol Dihydroquercetin und 15 nmol Fe^{2+} bei einer Inkubationszeit von 7 min und 37°C. Alle Versuchsansätze wurden im Doppel bestimmt.

In Analogie zu früheren Untersuchungen an der FHT (Britsch, 1986) wurde die Kofaktor-Spezifität mit 2-Oxoglutarat- verwandten Verbindungen überprüft. Dazu wurde 2-Oxoglutarat durch 100 μM

Oxalacetat, 2-Oxopentanoat, 2-Ketomalonsäure und 2-Ketoadipinsäure in der Standardinkubation ersetzt und die Umsetzung dünnschichtchromatographisch ausgewertet.

Wie im Falle der FHT konnte auch für die FLS ein geringer Umsatz nur mit 2-Ketoadipinsäure nachgewiesen werden, die um eine Methylengruppe größer ist als 2-Oxoglutarat.

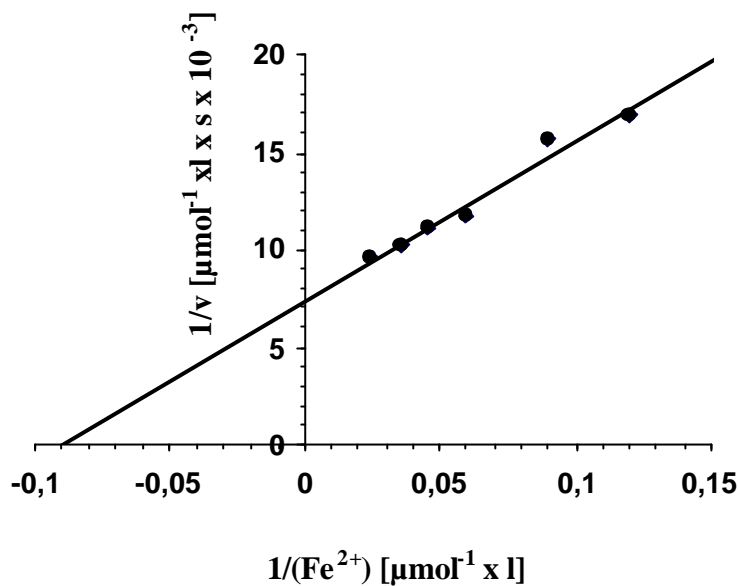


Abb. 18: Apparente Michaelis Konstante der FLS für Fe^{2+} .

Doppelt reziproker Auftrag nach Lineweaver-Burk der FLS-Aktivität gegen die Fe^{2+} -Konzentration. Eingesetzt wurden 36 nmol Dihydroquercetin und 30 nmol 2-Oxoglutarat bei einer Inkubationszeit von 7 min und 37°C . Alle Versuchsansätze wurden im Doppel bestimmt.

D 5.8 Bestimmung der apparenten Michaelis Konstante für DHQ und DHK

Die FLSs sind hinsichtlich ihrer Substratspezifität bisher kaum untersucht worden. Hinweise auf eine höhere Spezifität für Dihydrokämpferol verglichen mit Dihydroquercetin belegen nur ältere Studien für die FLS aus *Matthiola incana* (Spirille & Forkmann, 1984). Diskutiert wird ferner, dass die FLS von einer Genfamilie kodiert wird und demnach möglicherweise FLS-Isoformen mit differierenden Substratspezifitäten in Pflanzen vorkommen (Pelletier & Shirley, 1997; Winkel-Shirley, 2001). Die Tatsache, dass in *Citrus unshiu* Quercetin in Form von Rutin (Quercetin-3-O-rutinosid) das Hauptflavonol bildet, ließ vermuten, dass hier Dihydroquercetin das bevorzugte Substrat der *Citrus*-FLS ist (Moriguchi *et al.*, 2002).

Zur Bestimmung der tatsächlichen Substratspezifität der FLS aus *Citrus unshiu* müssen die K_m -Werte für Dihydroquercetin und Dihydrokämpferol bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden unter Standardbedingungen Inkubationen (jeweils mit 11 μg der homogenen FLS bei 37°C und pH 5,0 für 7 min) durchgeführt mit steigenden Konzentrationen (18-100 μM) von

Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin. Die Ergebnisse (Abb. 19 und Abb. 20) demonstrieren überraschenderweise eine um den Faktor 6 höhere Affinität der FLS für Dihydrokämpferol gegenüber Dihydroquercetin.

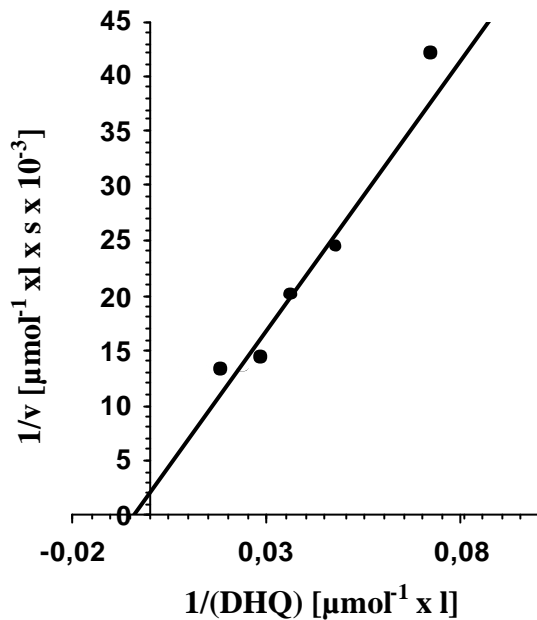


Abb. 19: Apparente Michaelis Konstante der FLS für DHQ.

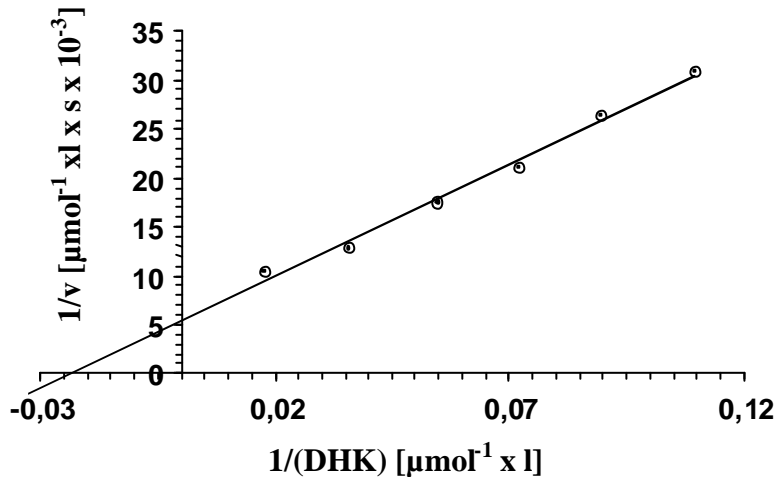


Abb. 20: Apparente Michaelis Konstante der FLS für DHK.

Abb. 19-20: Doppelt reziproker Auftrag nach Lineweaver-Burk der Enzymaktivität gegen die Konzentration an DHQ und DHK. Die Messung der FLS-Aktivität erfolgte unter Standardbedingungen. Alle Versuchsansätze wurden zweifach bestimmt.

Tab. 6: Enzymkinetische Parameter der FLS.

Substrat/Kofaktoren	K_m ($\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$)	V_{max} ($\text{nmol} \times \text{l}^{-1} \times \text{s}^{-1}$)
2-Oxoglutarat	36	0,12
Fe ²⁺	11	0,13
Dihydroquercetin	272	0,54
Dihydrokämpferol	45	0,2

D 6 Datenbankanalyse der FLS

D 6.1 Ermittlung einer FLS-Konsensussequenz

Für vergleichende Betrachtungen wurde über Datenbankanalysen (NCBI-Datenbank) aus den bisher bekannten FLS-Polypeptiden eine Konsensussequenz ermittelt. Veröffentlicht sind die FLS-Sequenzen von *Petunia hybrida* (Holton *et al.*, 1993), *Arabidopsis thaliana* (Pelletier *et al.*, 1997), *Eustoma grandifolium*, *Solanum tuberosum* (van Eldik *et al.* 1997), *Malus domestica* und *Matthiola incana*, die paarweise verglichen wurden. Die resultierende FLS-Konsensussequenz zeigte in Bezug auf die FLS-Primärsequenzen einen hohen Ähnlichkeitsgrad von 85 %, wobei sich dieser Wert aus der Summe der identischen Aminosäurereste und konservierten Austausche der verschiedenen Sequenzen zusammensetzt. Die Anzahl an identischen Aminosäuren lag bei 158, was einem Anteil von 47 % der Gesamtsequenz entspricht. Generell konnte festgestellt werden, dass Sequenzunterschiede überwiegend im N-terminalen Bereich (38 % Aminosäureidentität) vorliegen, während im C-terminalen Sequenzbereich von Aminosäure 200-335 mit 62 % jeweils die höchste Übereinstimmung zu finden ist (**Abb. 21**).

	1	11	21	31	41	50
FLS-Cit	MEVERVQAIA	SLSHSN-GTIP	AEFIRPEKEQ	PASTTYHGPA	PEIPTIDLD-	-DPVQDRLVRS
FLS-Pet	MEVARVQAIA	SLSKCM-DTIP	SEYIRSENEQ	PAATTLHGTV	LQVPVIDLR-	-DPDENKMKVL
FLS-Eus	MEVQRVQEIA	SLSKVI-DTIP	AEYIRSENEQ	PVISTVHGTV	LEVVIDLS-	-DSDEKIVGL
FLS-Mal	MG---VESVE	RERESNEGTIP	AEFIRSENEQ	PGITTVHGTV	LEVPIIDFS-	-DPDEEKLIVQ
FLS-Sol	MEVARVQAIS	SITKCM-DTIP	SEYIRSENEQ	PAATTLQGVV	LEVVIDISN	VDDDEEKLIVKE
FLS-Ara	MEVERVQDIS	SSSLT-EAIP	LEFIRSEKEQ	PAITTFRGPT	PAIPVVVDS-	-DPDEESVRR
	*. * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
FLS-KONS.	MEVxRVQxIA	SLS	DTIP AE IRSENEQ	PAITT HGVV	LEVVIDLS	DPDEEKLIV
	60	70	80	91	101	111
FLS-Cit	IAEASREWGI	FQVTNHGIPS	DLICKLQAVGK	EFFE-LPQEEK	EVYSRPAK	DVQGYGTKLQ
FLS-Pet	IADASKEWGI	FQLINHGIPD	EAIADLQKVGK	EFFEHVPQEEK	ELIAKTPGSN	DIEGYGTSLQ
FLS-Eus	VSEASKEWGI	FQVNVHGIPN	EVIRKLQEVGK	HFFE-LPQEEK	ELIAKPEGSQ	SIEGYGTRLQ
FLS-Mal	ITEASSNWGM	YQIVNHGIPS	EVISKLQAVGK	EFFE-LPQEEK	EAYAKPPDSA	SIEGYGTRKLF
FLS-Sol	IVEASKEWGI	FQVINHGIPD	EVIENTLQKVGK	EFFEVPQEEK	ELIAKPPGAQ	SIEGYGTSLQ
FLS-Ara	VVKASEEWGL	FQVVNHGIPT	ELIRRLQDVGR	KFFE-LPSSEK	ESVAKPEDSK	DIEGYGTKLQ
	. * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
FLS-KONS.	I EASKEWGI	FQVNVHGIPx	EVI KLQ V GK	EFFE LPQEEK	ELIAKPPxS	xIEGYGTRKLF
	121	128	137	147	157	167
FLS-Cit	KEVEG---KK	SWVDHLFHR	VWPPSSINR	FWPKNPPSYR	AVNEEYAKYM	REVVDKLFY LS
FLS-Pet	KEVEG---KK	GWVDHLFHK	IWPPSAVNYR	YWPKNPPSYR	EANEYKGRM	REVVDRIKFS LS
FLS-Eus	KEVDG---KK	GWVDHLFHK	IWPPSAINYQ	FWPKNPPAYR	EANEYAKRL	QLVVDNLFKY LS
FLS-Mal	KEIEGDTTKK	GWVDNLFNK	IWPPSVVNYQ	FWPKNPPSYR	EANEYAKHL	HNVVEKLFRL LS
FLS-Sol	KEIEG---KK	GWVDHLFHK	IWPPSAINYR	YWPKNPPSYR	EANEYAKWL	RKVADGIFRS LS
FLS-Ara	KDPEG---KK	AWVDHLFHR	IWPPSCVNYR	FWPKNPPEYR	EVNEEYAVHV	KKLSETLLGI LS
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
FLS-KONS.	KEVEG	KK GWVDHLFHK	IWPPSAINYR	FWPKNPPSYR	EANEYAK L R	VVD LF LS
	179	189	199	209	219	229
FLS-Cit	LGLGVEGGVL	KEAAGGDDIE	YMLKINYYPP	CPRPDALGV	VAHTDLSALT	VLVPNEVPGL
FLS-Pet	LGLGLEGHEM	IEAAGGDEIV	YLLKINYYPP	CPRPDALGV	VAHTDMSYIT	ILVPNEVQGL
FLS-Eus	LGLDLENSF	KDAGGDDLV	YLMKINYYPP	CPRPDALG-	VAHTDMSAIT	VLVPNEVPGL
FLS-Mal	LGLGLEGQEL	KKAAGGDNLE	YLLKINYYPP	CPRPDALGV	VAHTDMSTVT	ILVPNDVQGL
FLS-Sol	LGLGLEGHEM	MEAAGSEDIV	YMLKINYYPP	CPRPDALGV	VAHTDMSYIT	LLVPNEV---
FLS-Ara	DGLGLKRDAL	KEGLGEMAE	YMMKINYYPP	CPRPDALGV	PAHTDLSGIT	LLVPNEVPGL
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
FLS-KONS.	LGLGLEG EL	KEAAGGDDI	Y LKINYYPP	CPRPDALGV	VAHTDMS IT	LVPNEV GL
	239	249	259	271272	282	292
FLS-Cit	QVFKDDRWDI	AKYIPNALVI	HIGDQIEILSNGK	YKAVLHRTTV	NKDKTRMSWP	VFLEPPADTV
FLS-Pet	QVFKDGHWDY	VKYIPNALIV	HIGDQVEILSNGK	YKSVYHRTTV	NKDKTRMSWP	VFLEPPSEHE
FLS-Eus	QVYKDGHWYD	CKYIPNALIV	HIGDQVEIMSNGK	YKSVYHRTTV	NKEKTRMSWP	VFLEPPDHE
FLS-Mal	QACKDQRWYD	VKYIPNALVI	HIGDQMEIMSNGK	YTSVLHRTTV	NKDKTRISWP	VFLEPPADHV
FLS-Sol	QVFKDGHWDY	VNYIPNAIIV	HIGDQVEILSNGK	YKSVYHRTTV	NKYKTRMSWP	VFLEPPSEHE
FLS-Ara	QVFKDDHWFD	AEYIPSAVIV	HIGDQILRLSNGR	YKNVLHRTTV	DKEKTRMSWP	VFLEPPREKI
	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *
FLS-KONS.	QVFKDGHWDY	VKYIPNALIV	HIGDQVEILSNGK	YKSVLHRTTV	NKDKTRMSWP	VFLEPP EHE
	302	312	322	335		
FLS-Cit	VGPLPQLVDD	ENPPKYKAKK	FKDYSYCKLNKLP-Q			
FLS-Pet	VGPIPLLSKE	ANPPKFKTKK	YKDYVYCKLNKLP-Q			
FLS-Eus	VGPIPKLVNE	ENPAKFKTKK	YKDYAYCKLNKLP-Q			
FLS-Mal	VGPHPQLVNA	VNQPKYKTKK	YGDYVYCKINKLP-Q			
FLS-Sol	VGPIPNLINE	ANPPKFKTKK	YKDYVYCKLNKLP-Q			
FLS-Ara	VGPLPELTGD	DNPPKFKPFPA	FKDYSYRKLKLPD			
	* * * * *	* * * * *	* * * * *			
FLS-KONS.	VGPIP LVNE	NPPKFKTKK	YKDYVYCKLNKLP Q			

Abb. 21: FLS-Konsensussequenz .

Verglichen wurden Flavonolsynthesen aus *Citrus unshiu* [Genbankeintrag AB011796], *Petunia hybrida* [Genbankeintrag Z22543], *Arabidopsis thaliana* [Genbankeintrag U7263], *Eustoma grandifolium* [Genbankeintrag AAF64168], *Solanum tuberosum* [Genbankeintrag X92178], *Malus domestica* [Genbankeintrag AAD26261] und *Matthiola incana* [Genbankeintrag O04395]. Sterne (*) kennzeichnen identische Aminosäuren, Punkte (.) häufig vorkommende Aminosäuren mit konservierten Austauschungen und der Buchstabe (x) Aminosäuren mit ähnlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften.

D 6.2 Aminosäuresequenzanalysen

Vergleiche der Polypeptide von insgesamt 59 unterschiedlichen 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen, einschließlich der FLS-Sequenzen und verwandter Enzyme des Primär- und Sekundärmetabolismus aus Pflanzen, Pilzen und Bakterien, zeigten eine geringe Sequenzähnlichkeit von nur durchschnittlich etwa 30 % (Britsch *et al.*, 1993, Lukacin 1997). Eine auffallend hohe Homologie lässt sich allerdings zwischen FLS- und ANS-Sequenzen feststellen. Die Ähnlichkeit der ANS aus *Perilla frutescens* [Genbankeintrag AB003779] bzw. der ANS aus *Matthiola incana* [Genbankeintrag AF026058] mit der FLS aus *Citrus unshiu* liegt bei 61 % , die Identität bei 42%.

In allen 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen und verwandten Enzymen waren 8 Aminosäuren, lokalisiert in drei Regionen, strikt konserviert (Britsch *et al.*, 1993). Spektroskopische Daten, *in vitro*-Mutagenesestudien, Experimente mit histidin-modifizierenden Reagenzien und nicht zuletzt die Kristallstrukturen belegten eine Beteiligung des Sequenzmotiv H-x-D...H (x kennzeichnet eine nicht konservierte Aminosäure) an der Bindung des Eisens (Myllylae *et al.*, 1992; Lukacin *et al.*, 1997; Britsch *et al.*, 1993, Borovok *et al.*, 1996; Schofield & Zhang, 1999). Das Motiv H-x-D... H ist in allen bisher publizierten 2-Oxoglutarat abhängigen-Dioxygenasen enthalten, wobei die Clavaminsynthase aus *Streptomyces clavuligerus* eine Ausnahme darstellt, da hier eine Gluataminsäure den Asparaginsäurerest ersetzt. Im Abstand von etwa 10 Aminosäuren zum zweiten Histidin des Motivs H-x-D... H befindet sich ein weiteres streng konserviertes Motiv R-x-S (Abb. 22), das als Teil der 2-Oxoglutaratbindungsstelle identifiziert werden konnte (Britsch *et al.*, 1993; Lukacin *et al.*, 1997; Roach *et al.*, 1995). Eine Variation dieses Motivs liegt indes in der Sequenz der Clavaminsynthase aus *Streptomyces clavuligerus* vor, in der der Serinrest fehlt und funktionell wahrscheinlich durch einen ausserhalb des Motivs liegenden Threoninrest ersetzt wird (Zhang *et al.*, 2000). Ergänzend sind in dem Zusammenhang die Lysylhydroxylase und die Prolyl 4-Hydroxylase zu nennen, die anstelle des Serins ein Isoleucin bzw. Valin enthalten (Myllylae *et al.*, 1991; Helaakoski *et al.*, 1994). Den weiteren vier streng konservierten Aminosäuren konnte bisher keine detaillierte Funktion zugeordnet werden (**Abb. 22**).

M E V x R V Q x I A S L S D T I P A E I R S E N E Q P A I T T H G V V L E
 V P V I D L S D P D E E K L V I E A S K E W G I F Q V V N H G I P x E V I
 K L Q V G K E F F E L P Q E E K E L I A K P P x S x I E G Y Y T K L Q K E
 V E G K K G W V D H L F H K I W P P S A I N Y R F W P K N P P S Y R E A
 N E E Y A K L R V V D L F L S L G L G L E G E L K E A A G G D D I Y L K
 I N Y Y P P C P R P D L A L G V V A H T D M S I T L V P N E V G L Q V F
 K D G H W Y D V K Y I P N A L I V H I G D Q V E I L S N G K Y K S V L H
R T T V N K D K T R M S W P V F L E P P E H E V G P I P L V N E N P P K
 F K T K K Y K D Y V Y C K L N K L P Q

Abb. 22: FLS-Konsensussequenz.

Unterstrichen sind die drei konservierten Motive, die in allen 2-Oxoglutarat-abhängigen und verwandten Enzymen enthalten sind. Rot und Grün gekennzeichnet sind die an der Bindung des Eisens bzw. 2-Oxoglutarats beteiligten Aminosäuren und grau hervorgehoben sind die streng konservierten Aminosäuren deren Funktion noch unklar ist.

D 7 *In vitro*-Mutagenesestudien

Der Vergleich der FLS-Sequenz von *Citrus unshiu* mit weiteren Polypeptidsequenzen intermolekularer Dioxygenasen (D 6.2) identifizierte auch hier vier streng konservierte Aminosäuren, über deren Bedeutung bisher nichts bekannt ist. Zu diesen durchgehend konservierten Resten gehören ein Histidin an der Position 75, zwei Glycine in den Positionen 68 und 261, außerdem ein Prolin in Position 207. Punktmutationen an der *Citrus*-FLS sollten zeigen, welche funktionelle Bedeutung diese Aminosäuren gegebenenfalls haben. FLS-Mutanten mit einem deutlichen Aktivitätsverlust sollten dann, sofern eine vollständige Reinigung in ausreichender Menge realisierbar wäre, CD-spektroskopisch vermessen werden, um etwaige Strukturveränderungen aufzuzeigen. Auf die Untersuchung der vierten Aminosäure einem Histidinrest an der Position 75 wurde verzichtet, da diesem Aminosäurerest bereits für die FHT aus *Petunia hybrida* keine essentielle Funktion bei der enzymatischen Katalyse zugeordnet werden konnte (Lukacin, 1997).

Glycine werden häufig am Carboxylende von α -Helices gefunden und sorgen für Flexibilität in der Kette. Alanin und Glycin ähneln sich in ihrer Grösse, wobei Alanin aufgrund der zusätzlichen Methylgruppe in der Kette nicht in gleichem Maße drehbar ist. Beide Aminosäuren gelten als relativ hydrophob, und man findet sie überwiegend im Inneren und

anderen hydrophoben Umgebungen von Proteinen. Es bot sich deshalb an, zunächst die beiden konservierten Glycine durch Alaninreste zu ersetzen.

Außerdem sollten die beiden Glycine gegen Prolinreste ausgetauscht werden. Proline gelten als sog. Strukturbrecher und sind oft an Faltungs- oder Knickstellen von Peptidketten zu finden. In umgekehrter Richtung sollte das konserviert vorliegende Prolin an der Position 207 zum Glycin mutagenisiert werden. Die zur *in vitro*-Mutagenese eingesetzten Oligonukleotide wurden anhand der Nukleotidsequenz der FLS entworfen und sind in **Tab. 7** zusammengefasst. Die Einführung der einzelnen Mutationen wurde mittels DNA-Sequenzierung verifiziert.

Tab. 7: Zur *in vitro*-Mutagenese eingesetzte Oligonukleotide.

Gezeigt ist die Nukleotidsequenz des kodierenden Stranges des Originalgens im Mutationsbereich und das jeweilige zur Mutagenese verwendete komplementäre Oligonukleotid. Das zu verändernde Kodon ist durch Fettdruck hervorgehoben, und die ausgetauschten Basen sind zusätzlich unterstrichen.

Enzym-Mutante	Oligonukleotide	Verändertes Kodon
Gly68Ala	5'-CGGGAGTGGGGGATTTTCCAG-3' 3'-GCCCTCACCCGCTAAAAGGTC-5'	GGG→GCG
Gly68Pro	5'-CGGGAGTGGGGGATTTTCCAG-3' 3'-GCCCTCACCGGCTAAAAGGTC-5'	GGG→CCG
Gly261Ala	5'-CATCCACATCGGGGACCAGATC-3' 3'-GTAGGTGTAGCGCCTGGTCTAG-5'	GGG→GCG
Gly261Pro	5'-CATCCACATCGGGGACCAGATC-3' 3'-GTAGGTGTAGGGCCTGGTCTAG-5'	GGG→CCG
Pro207Gly	5'-GATTAATTATTATCCGCCATGCCC-3' 3'-CTAATTAATAATACCCGGTACGGG-5'	CCG→GGG

D 7.1 Expression der FLS-Mutanten

Nach der Mutagenese erfolgte die Expression der mutierten FLS-cDNA analog zur Wildtyp-FLS über den Expressionsvektor pQE6 in *E. coli* M15 [pREP4].

Der Austausch von ein oder mehreren Basen innerhalb der kodierenden Sequenz eines Gens kann die katalytische Aktivität und/ oder die Struktur des translatierten Enzyms verändern. Veränderungen in der Struktur mutierter Proteine können sich in einer abnehmenden Löslichkeit im Bakterium äußern, bis hin zur Akkumulation in Einschlusskörperchen (inclusion bodies) im Cytosol oder Periplasma. Die relative Proteinmenge im Überstand und Pellet von Rohextrakten kann demnach ein Hinweis auf eine veränderte Proteinstruktur sein. Zur Überprüfung dieses Sachverhaltes wurden äquivalente Proteinmengen (15 µg/Spur) der löslichen sowie der unlöslichen Fraktion des jeweiligen Zellaufschlusses aufgetragen und einer Western-Blot Analyse unterzogen (**Abb. 23**).

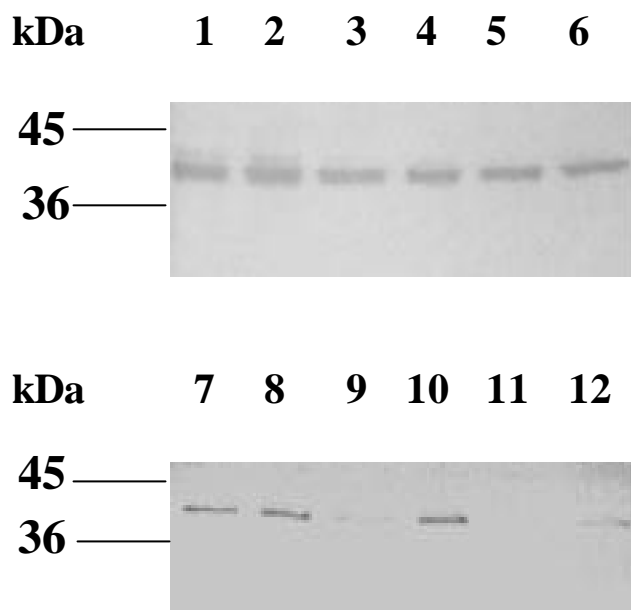


Abb. 23: Western-Blot-Analyse von Wildtyp-FLS und Mutanten-FLS in Rohextrakten.

Extrakte aus induzierten *E. coli* (Überstand oder solubilisiertes Pellet) wurden über eine PD-10-Säule gereinigt und nach Auftrennung durch SDS-PAGE und Übertragung auf PVDF-Membranen auf FLS-Expression überprüft. Der immunologische Nachweis erfolgte mit FLS-Antiserum (Verdünnung 1:10000) aus Kaninchen in einer gekoppelten Reaktion mit Anti-Kaninchen IgG aus Ziege und 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat als chromogenes Substrat. Die Zuordnung der Molekularmasse (kDa) ist am linken Rand eingezeichnet. Aufgetragen wurden je 15 µg Protein der löslichen Fraktionen in Spur 1: Wildtyp FLS ; Spur 3: Pro207Gly-Mutante; Spur 5: Gly261Ala; Spur 7: Gly68Ala; Spur 9: Gly68Pro; Spur 11: Gly261Pro und in gleicher Anordnung die solubilisierten Pellet-Fraktionen in Spur 2: Wildtyp und mutierte FLS-Proteine (Spur 4, 6, 8, 10, 12).

Der Western-Blot zeigt, dass Wildtyp-FLS und die FLS-Mutanten Pro207Gly, Gly261Ala und Gly68Ala (**Abb. 23 Spuren 1-8**) in vergleichbarer Menge löslich im Überstand und im Pellet des Zellaufschlusses vorhanden sind. Gly68Pro-FLS konnte in ähnlicher Menge nur im Pellet nachgewiesen werden, während das lösliche Protein dagegen kaum im Überstand nachweisbar war (**Abb. 23 Spur 9 und 10**). Für Gly261Pro konnten nur Spuren an löslichem Protein festgestellt werden und auch im Bakterienpellet ließen sich nur sehr geringe Proteinmengen erkennen (**Abb. 23 Spur 11 und 12**). Unter den Bedingungen der denaturierenden SDS-Gelelektrophorese zeigten Wildtyp und alle FLS-Mutanten ein übereinstimmendes Laufverhalten und damit keine Veränderung in der molekularen Masse. Weiterführende Untersuchungen sollten ein mögliches Vorliegen von Strukturmutanten belegen.

D 7.2 Reinigung der FLS-Mutanten

Eine vorläufige Abschätzung von größeren Änderungen in der Sekundär- und Tertiärstruktur ist durch die CD-Spektroskopie möglich, die Hinweise auf den relativen Anteil von Helixbereichen geben kann. Für diesen Zweck und für die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität müssen die Enzyme in gereinigter Form vorliegen.

Bei der Reinigung von Proteinen macht man sich deren physikalische Eigenschaften wie Molekülgröße, Löslichkeit, und elektrische Ladung als Trennkriterien zunutze. Mutationen, die zu Konformationsveränderungen von Proteinen führen, können sich auch auf das chromatographische Elutionsverhalten auswirken.

Der Aufschluß IPTG induzierter Bakterienzellen sowie die säulenchromatographische Reinigung der FLS-Mutanten erfolgte analog zur Wildtyp-FLS. Die Anreicherung aus den FLS-Mutanten wurde in allen Reinigungsschritten mit Western-Blots überprüft. Die Auswertung der einzelnen Chromatographieschritte ergab folgendes Bild.

Die Elutionsprofile von Pro207Gly-, Gly261Ala- oder Gly68Ala-FLS entsprachen der Wildtyp-FLS vollständig, und alle drei Mutanten ließen sich bis zur apparenten Homogenität reinigen. Einschränkend ist zu bemerken, dass die Ausbeuten für Gly68Ala-FLS und insbesondere für Gly261Ala-FLS aus der löslichen Fraktion sehr gering ausfielen. Eine Erhöhung der Proteinausbeuten konnte durch Variationen der Reinigungsprozedur, wie beispielsweise eine veränderte Ammoniumsulfatfällung, nicht erreicht werden.

Aufgrund der Tatsache, dass mit steigender Temperatur sowohl die Faltungsgeschwindigkeit als auch in Konkurrenz zur produktiven Faltung eine unerwünschte Aggregation zunimmt (Schein & Noteborn, 1988), wurde auch versucht über eine Reduktion der Temperatur von 37 auf 30°C für das Bakterienwachstum und die Induktion die Proteinausbeute zu erhöhen. Eine Zunahme an löslichem Protein konnte allerdings nicht festgestellt werden.

Eine Reinigung der Gly68Pro- und Gly261Pro-FLS-Mutanten war aufgrund der geringen Menge an löslichem Protein nicht möglich, wobei Detergenzien wie Triton-X-100 und Tween 20 in Konzentrationen oberhalb der kritischen Mizellkonzentration die Proteinausbeute geringfügig erhöhen konnten (Daten nicht gezeigt).

D 7.3 Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der FLS-Mutanten

Die Bestimmung der Aktivitäten der verschiedenen FLS-Mutanten, erfolgte unverzüglich nach Zellaufschluss mit Enzymrohextrakten, die zuvor über eine PD10-Säule (Pharmacia, Freiburg) filtriert wurden. Durch die Gelfiltration der Extrakte konnte für den Wildtyp eine signifikante Aktivitätssteigerung erzielt werden. Die Aktivitäten von Wildtyp und mutierten FLSn wurden durch Umsetzung unter Standardbedingungen und Quantifizierung der Produkte mit Hilfe der HPLC-Analyse gemessen. Die eingesetzte Proteinmenge der Extrakte und die relative Expression der FLSn für Wildtyp und die Mutanten war vergleichbar. Das Ergebnis zeigte für die Mutanten Gly68Ala und Gly261Ala eine im Vergleich zur Wildtyp-FLS deutliche Verringerung der katalytischen Aktivität, wohingegen sich für Gly68Pro und Gly261Pro keine Enzymaktivität mehr detektieren ließ (**Tab. 8**). Auch bei einer Erhöhung der Proteinkonzentrationen bis auf 3 mg/ml und einer zeitlichen Ausweitung des Tests auf 60 min konnte für die Mutanten Gly68Pro und Gly261Pro keine Aktivität nachgewiesen werden. Interessanterweise blieb der Austausch des Prolinrests an der Position 207 gegen einen Glycinrest ohne nennenswerten Einfluss auf die Funktion des Enzyms (**Tab. 8**). Verglichen mit Wildtyp-FLS konnten bei keiner der Mutanten auffällige Veränderungen in der Substratspezifität bezüglich DHK und DHQ festgestellt werden (**Tab. 8**). Zusammenfassend lässt sich aus diesen Resultaten (**D 7.1-7.3**) eine essentielle Bedeutung der Aminosäurereste Gly68 und Gly261 für die Tertiärstruktur der FLS ableiten. Aufgrund der bei der Reinigung aufgetretenen Schwierigkeiten (**D 7.2**) musste auf eine weitergehende CD-spektroskopische Untersuchung der FLS-Mutanten hinsichtlich möglicher Konformationsänderungen in der Proteinstruktur verzichtet werden.

Tab.8: Relative spezifische Aktivitäten von Wildtyp- und mutierter FLS mit DHQ oder mit DHK als Substrat.

Für die Wildtyp-Flavonolsynthase wurde eine spezifische Aktivität von 0,47 mkat/kg für DHQ bzw. 0,54 mkat/kg für DHK bestimmt. Wildtyp und Mutanten mit Ausnahme von Gly68Pro und Gly261Pro wurden in vergleichbarem Ausmaß exprimiert. Die Quantifizierung der Produkte erfolgte durch HPLC.

^a Das solubilisierte Bakterienpellet wies bei Proteinkonzentrationen von bis zu 3 mg/ml im Enzymtest keine messbare Enzymaktivität auf.

FLS	Relative spezifische Aktivität mit:		eingesetzte Proteinmenge µg
	Dihydroquercetin %	Dihydrokämpferol %	
Wildtyp	100	100	288
Gly68Ala	3.8	6	396
Gly68Pro	0 ^a	0 ^a	360
Gly261Ala	7.5	10	252
Gly261Pro	0 ^a	0 ^a	288
Pro207Gly	83.7	70	360

D 8 Strukturelle Charakterisierung der FLS

D 8.1 CD-Spektrum der FLS

Die CD-Spektren der IPNS aus *Streptomyces clavuligerus* (Durairaj *et al.*, 1996) und *Streptomyces jumonjinensis* (Borovok *et al.*, 1996) sowie der gereinigten FHT (Lukacin, 1997) weisen trotz ihrer geringen Aminosäuresequenzähnlichkeit von etwa 30 % auffallende Übereinstimmungen auf. Auch für andere 2-Oxoglutarat-abhängige und verwandte Enzyme wird ein ähnliches Muster der CD-Spektren vermutet. Die vergleichende CD-spektroskopische Messung der Flavonolsynthase aus *Citrus unshiu* sollte deshalb eine erste Aussage zur Sekundärstruktur zulassen und unter Bezug auf die FHT die strukturelle Verwandtschaft innerhalb der Enzymklasse belegen.

Das Prinzip des Circular dichroismus (CD) beruht auf der Wechselwirkung von polarisiertem Licht mit optisch aktiven Chromophoren und wird zur Abschätzung der verschiedenen Sekundärstrukturanteile von Proteinen eingesetzt. CD-Spektren im fernen Ultraviolettbereich

sind empfindlich für die Konformation der Proteinhauptkette. Informativ sind dabei die Wellenlängen von 170 bis 240 nm, wo sich die Absorptionsbanden der peptidischen Amidgruppe vielfach überlappen. In Proteinen prägt besonders die Peptidbindung die Form des CD-Spektrums. Der Anteil von α -Helices und β -Faltblättern im untersuchten Protein wird aus einer Linearkombination von Referenz-CD-Spektren berechnet, die entweder aus Modell-Makromolekülen mit nur einer einzigen, definierten Sekundärstruktur bestehen, wie z.B. Poly-L-Lysin oder auf Spektren von Proteinen mit bekannter Struktur bestehen (Pingoud & Urbanke, 1997). Eine α -Helix zeigt beispielsweise ein Minima bei 208 und 222 nm und ein Maximum bei 192 nm. Eine zufällig gefaltete Polypeptidkette dagegen weist ein Minimum bei 190 nm auf.

Das CD-Profil der apparent homogen gereinigten FLS zeigt ein charakteristisches Doppelminimum (negativer Circular dichroismus) bei 222 nm und 208-210 nm und ein Maximum bei 191-193 nm, was auf ausgeprägte α -helikale Bereiche, die von β -Faltblattstrukturen unterbrochen sind, hindeutet (Abb. 24). Der Verlauf des Spektrums ist mit dem der FHT vergleichbar, wobei der Peak bei 222 nm bei der FLS weniger ausgeprägt ist als bei der FHT.

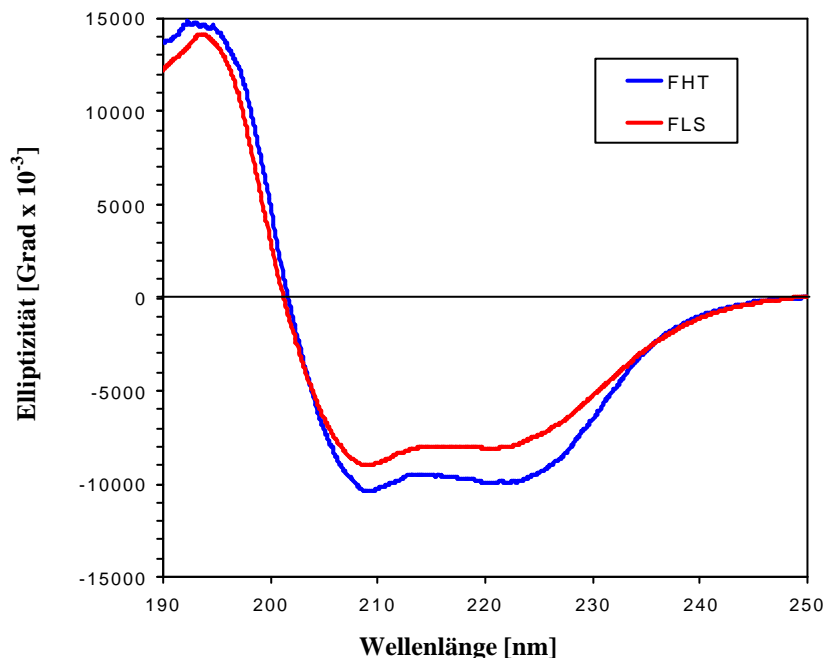


Abb. 24: CD-Spektrenvergleich rekombinanter FLS aus *Citrus unshiu* und rekombinanter FHT aus *Petunia hybrida*.

Gereinigte FLS (0,371 mg/ml) bzw. FHT (0,3 mg/ml) wurden in 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,8 im fernen Ultraviolettbereich (190-250 nm) aufgenommen.

D 8.2 Serologische Verwandtschaften der FLS

Um Antikörper gegen ein Protein zu erzeugen, immunisiert man üblicherweise Kaninchen. Zwei bis drei Wochen nach dem "Boostern" kann ihnen Blut entnommen und das polyklonale Antiserum gewonnen werden.

Das polyklonale Antiserum enthält eine heterogene Molekülpopulation mit unterschiedlichen Spezifitäten, die sich zum qualitativen und quantitativen Nachweis des Antigens und evtl. verwandter Proteine eignen. Die Kreuzreaktion einer Antikörperpopulation (eines Antiserums) mit einem Fremdantigen erfolgt nur dann, wenn das homologe und das Fremdantigen zumindest partiell die gleichen Determinanten besitzen.

Die hohe Sequenzhomologie zwischen FLS- und ANS-Polypeptide (**D 6.2**) lässt eine vergleichende serologische Untersuchung beider Enzyme sinnvoll erscheinen.

Die Spezifität des FLS-Antiserums wurde im Vorfeld der Untersuchungen mittels Western-Blot-Analysen von unterschiedlich gereinigten FLS-Extrakten unter Beweis gestellt.

Zur Überprüfung, ob das polyklonale FLS-Antiserum mit der ANS aus *Gerbera hybrida* kreuzhybridisiert, wurden die FLS- und ANS-Rohextrakte über eine SDS-PAGE aufgetrennt und einer Western-Blot-Analyse unterworfen. In der Spur des ANS-Extrakts war eine deutliche Bande auf gleicher Höhe mit der FLS-Bande zu erkennen (**Abb. 25**), wobei die Anfärbung beider Enzyme zeitgleich nach etwa 15 min einsetzte.

Auch andere 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen aus der Flavonoidbiosynthese wurden daraufhin auf die gleiche Weise untersucht. Dabei lieferten auch nach längerer Inkubation weder die FHT aus *Petunia hybrida* noch die FNS I aus *Petroselinum crispum* positive Signale. Auch umgekehrt konnte mit den Antiseren gegen FHT und FNS I keine Kreuzreaktion gegenüber dem FLS-Protein festgestellt werden. FHT und FNS I scheinen nach jüngsten Kenntnissen eine abgegrenzte Gruppe von 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen zu bilden (Martens *et al.*, 2001), sodass die fehlende Kreuzreaktion erwartet werden konnte.

Hinzuzufügen ist, dass das polyklonale Antiserum gegen *Citrus*-FLS auch mit heterologen Flavonolsynthasen aus *Petunia hybrida* oder *Osteospermum hybrida* kreuzreagierte (Daten nicht gezeigt).

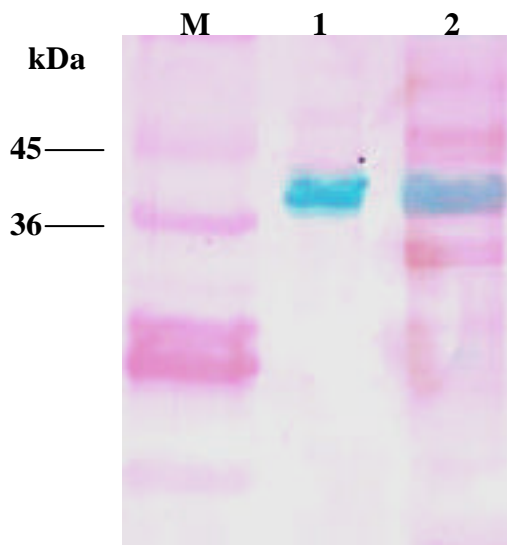


Abb. 25: Kreuzreaktion des FLS-Antiserums.

Zur Western-Analyse der Flavonolsynthese aus *Citrus unshiu* und der Anthocyanidinsynthese aus *Gerbera hybrida* wurden Rohextrakte der rekombinanten FLS aus IPTG-induzierten *E. coli* M15[pREP4]/pQE6 sowie Rohextrakte der in Hefe exprimierten ANS durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (Schleicher und Schuell, Dassel) übertragen. Die Membran wurde mit dem polyklonalen FLS-Antiserum (Verdünnung 1:10000) inkubiert und die kreuzreagierenden Proteine mittels Farbreaktion detektiert. Anschließend wurden alle weiteren Proteine mit Ponceau S-Lösung gegengefärbt.

Spur 1: FLS-Rohextrakt (10 µg Protein), Spur 2: ANS-Rohextrakt (20 µg Protein), M: SDS7-Marker. Die Zuordnung der Massen ist am linken Rand eingezeichnet.

D 9 Strukturvorhersage der FLS

Proteine mit einem relativ hohen Grad an Sequenzhomologie sind in den meisten Fällen auch in ihrer Tertiärstruktur und Funktion sehr ähnlich. Die Beziehung zwischen der Primärsequenz eines Proteins und seiner dreidimensionalen Struktur ergibt auch ohne strukturelle Daten aus NMR- oder Röntgenmessungen eine Vorstellung der räumlichen Struktur, soweit Strukturen für homologe Proteine bekannt sind. Durch komparative Modellbildung ist es möglich, die gesuchte Proteinfunktion zu berechnen. Der homologiebasierte Ansatz zum Erstellen von Modellen umfasst vier aufeinander folgende Schritte. Der erste Schritt besteht darin, mit Hilfe von Internetwerkzeugen wie z.B. BLAST bekannte Proteine auszuwählen, die eine zu der Zielsequenz verwandte Sequenz aufweisen. Daraufhin werden die potentiellen Matrizen vergleichend mit der Zielsequenz ausgerichtet, um die am nächsten verwandte Matrize zu identifizieren. Eine grundlegende Voraussetzung für die Generierung eines zufrieden stellenden 3D-Stukturmodells ist, dass die Sequenzidentität zwischen der Vorlagesequenz und der verwendeten Zielsequenz nicht unter 30 %

liegt. Im dritten Schritt berechnet man ein Modell der Zielsequenz, wobei von der am besten geeigneten Matrize ausgegangen wird. Der vierte Schritt besteht schließlich in einer Bewertung des Proteinmodells anhand einer Reihe von Kriterien (z.B. Energetik etc.) (Rashidi & Bühler, 2001).

Die Erstellung eines derartigen Strukturmodells sollte am Beispiel der FLS aus *Citrus unshiu* durchgeführt werden. Als Software für die Strukturvorhersage und Modellbildung wurde der Deep View Swiss Pdb Viewer (Glaxo Smith Kline R&D/ Swiss Institute of Bioinformatics) gewählt (Guex & Peitsch, 1997).

Durch Kristallstrukturanalysen 2-Oxoglutarat-abhängiger Dioxygenasen und verwandter Enzyme ist es gelungen, gemeinsame strukturell konservierte Regionen zu identifizieren (Roach *et al.*, 1995; Valegård *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000; Clifton *et al.*, 2001; Wilmouth *et al.*, 2002). Alle fünf bisher veröffentlichten Strukturen dieser Enzymklasse beinhalten eine charakteristische 'jelly-roll' Topologie. Das 'jelly-roll' Motiv stellt eine achtsträngige Supersekundärstruktur dar, bestehend aus zwei β -Faltblattstrukturen, die ihrerseits aus je vier Strängen zusammengesetzt sind (**Abb. 26**). Dieses Motiv wurde erstmals in viralen Capsiden gefunden (Stuart, 1993).

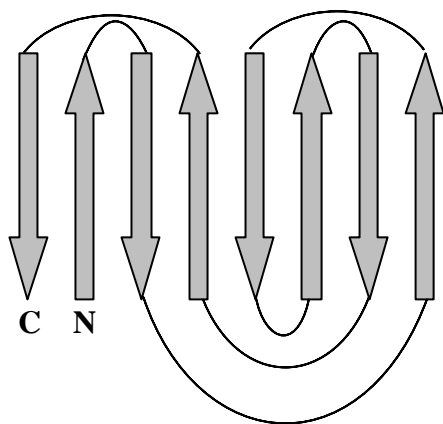


Abb. 26: Aufbau eines 'jelly roll' Motivs.

Die 'jelly roll'-Struktur besteht aus zwei miteinander verbundenen sog. 'greek key'-Motiven, die aus jeweils vier antiparallel angeordneten β -Strängen zusammengesetzt sind.

Diese zylindrische Struktur differiert zwar in den bekannten Kristallstrukturen in ihrer Ausdehnung, beheimatet jedoch in allen Fällen, wie in einer Art Fassung, das aktive Zentrum in einer hydrophoben Umgebung.

Einzig in der CAS 1 wird das 'jelly-roll'-Motiv durch weitere α -Helices und β -Faltblattstrukturen unterbrochen (Zhang *et al.*, 2000). Ein Unterschied besteht in der ANS

bezüglich drei zusätzlich, die 'jelly-roll'-Struktur umschliessenden α -Helices, die in der IPNS, CAS, DAOCS und P-3-H nicht zu finden sind (Wilmouth *et al.*, 2002).

Ein weiteres konserviertes Strukturmotiv, das in der ANS, IPNS, CAS 1 und DAOCS identifiziert wurde, umfasst zwei parallel zu einer α -Helix angeordnete β -Faltblattstrukturen. Am N-terminalen Ende der 'jelly-roll' befindet sich in der ANS, IPNS und DAOCS eine lange α -Helix, die als strukturelles Rückgrat des Proteins fungiert.

Am C-Terminus der ANS und IPNS folgt auf eine flexible 'loop'-Struktur eine α -Helix, die sich möglicherweise als Deckel über das aktive Zentrum legt und die Katalyse so von der Umwelt abschirmt. In der DAOCS und CAS 1 könnten entsprechende 'loop'-Strukturen diese Deckelfunktion einnehmen. Gleichzeitig scheint der C-Terminus für die korrekte Ausrichtung des Substrats im katalytischen Zentrum von Bedeutung zu sein (Lee, 2001). In der Kristallstruktur der ANS konnten vier C-terminale Aminosäuren identifiziert werden, die möglicherweise in die Bindung von Dihydroquercetin involviert sind (Wilmouth *et al.*, 2002). Der C-terminale Bereich der P-3-H weicht von diesen Strukturen ab mit fünf in der unmittelbaren Nähe des aktiven Zentrums lokalisierten α -Helices (Clifton *et al.*, 2001). Die beschriebenen Strukturelemente sind in den Strukturbildern (**Abb. 27-31**) gekennzeichnet.

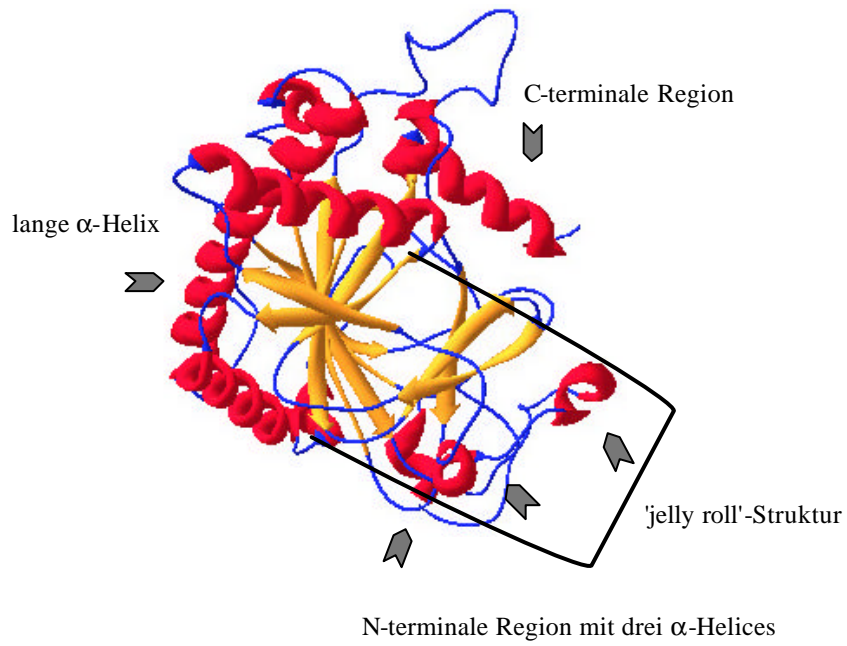


Abb. 27: Tertiärstruktur der ANS aus *Arabidopsis thaliana*.

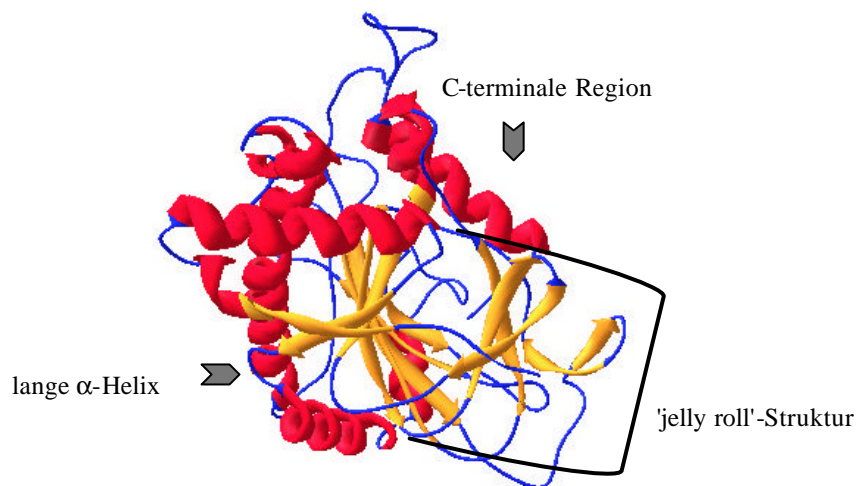


Abb. 28: Tertiärstruktur der IPNS aus *Aspergillus nidulans*.

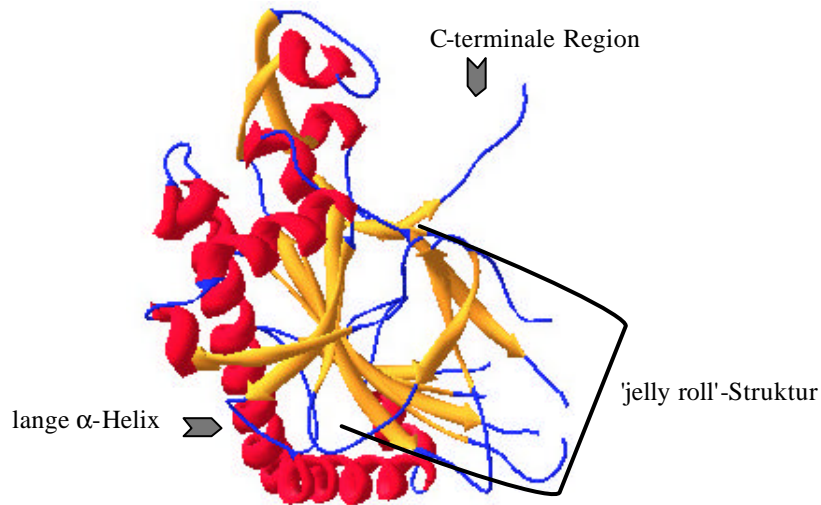


Abb. 29: Tertiärstruktur der DAOCS aus *Streptomyces clavuligerus*.

Insertstrukturen der 'jelly roll'

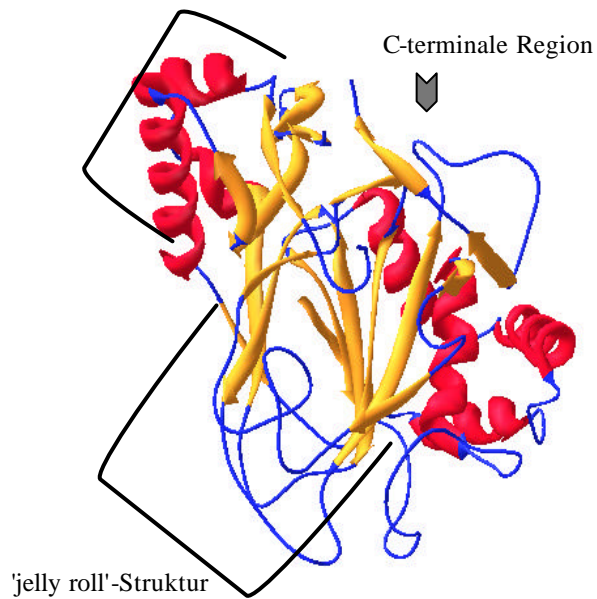


Abb. 30: Tertiärstruktur der CAS 1 aus *Streptomyces clavuligerus*.

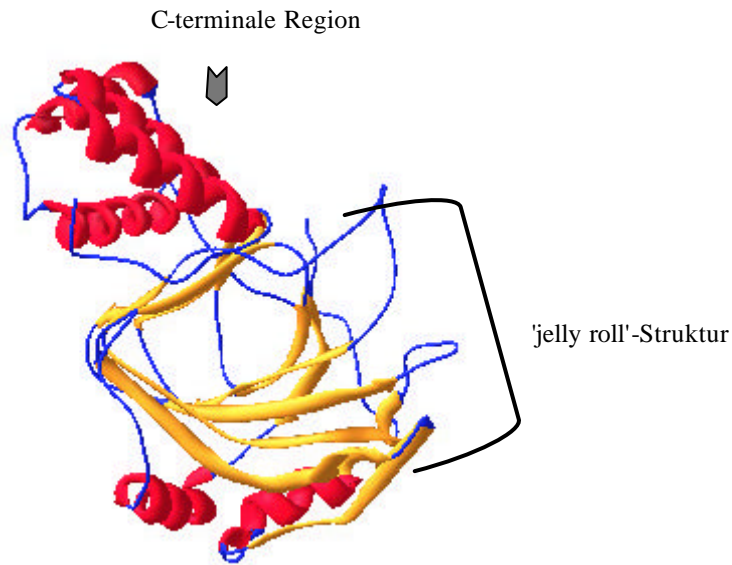


Abb. 31: Tertiärstruktur der P-3-H aus *Streptomyces sp.*

Abb. 27-31: Tertiärstrukturen 2-Oxoglutarat-abhängiger Dioxygenasen und verwandter Enzyme.

Die Modellstrukturen von ANS, IPNS, DAOCS, CAS1 und P-3-H wurden aus den Daten der Röntgenbeugung berechnet. Die α -helicalen Bereiche sind rot, β -Faltblatt- und 'loop'-Strukturen sind gelb bzw. blau gekennzeichnet. Die Beschriftung im Einzelnen ist im Text näher erläutert.

(Quelle: PDB-Datenbank)

Aufgrund der hohen Homologie der FLS- und ANS-Polypeptide ist es möglich ein Strukturmodell der FLS basierend auf den Kristallstrukturdaten der ANS zu erstellen. Bereiche mit geringer Sequenzübereinstimmung lassen keine Aussagen zur Struktur zu und werden im Proteinmodell demnach nicht berücksichtigt. Für die FLS aus *Citrus unshiu* bedeutet dies, dass sich das Homologiemodell auf den Sequenzbereich von Aminosäure 44 bis 335 stützt (**Abb. 32**).

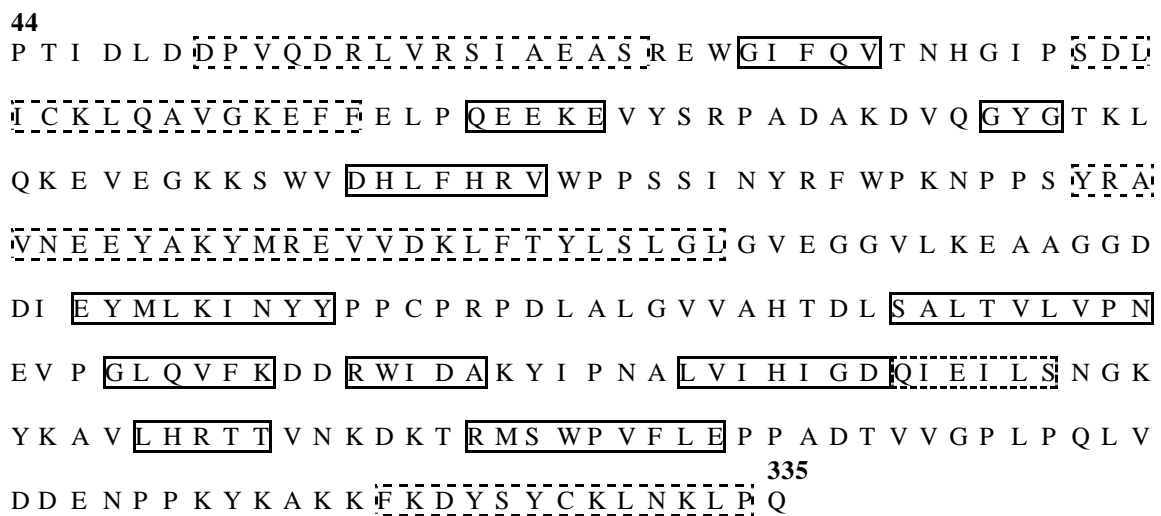


Abb. 32: Zuordnung von Sekundärstrukturen im Homologiemodell der *Citrus*-FLS.

Die gestrichelt umrahmten Bereiche stellen helikale Regionen dar, die geschlossen umrahmten Bereiche bilden β -Faltblattstrukturen.

Die aus dem Homologievergleich resultierende Modellstruktur der FLS (**Abb. 33**) besitzt eine sehr hohe strukturelle Ähnlichkeit mit der ANS aber auch mit der IPNS (**Abb. 27, 28**). So weist das Modell neben der zu erwartenden charakteristischen 'jelly roll'-Topologie auch eine lange α -Helix (Aminosäure 154-181) am N-terminalen Ende dieses Motivs auf, wie in ANS, IPNS und DAOCS (**Abb. 27, 28, 29**). Am C-Terminus folgt, ähnlich der ANS und der IPNS, eine α -helikale Struktur (**Abb. 27, 28**) auf eine ausgedehnte flexible 'loop'-Struktur. Die N-terminale Aminosäuresequenz konnte wegen niedriger Homologie in dieses Modell nicht einbezogen werden.

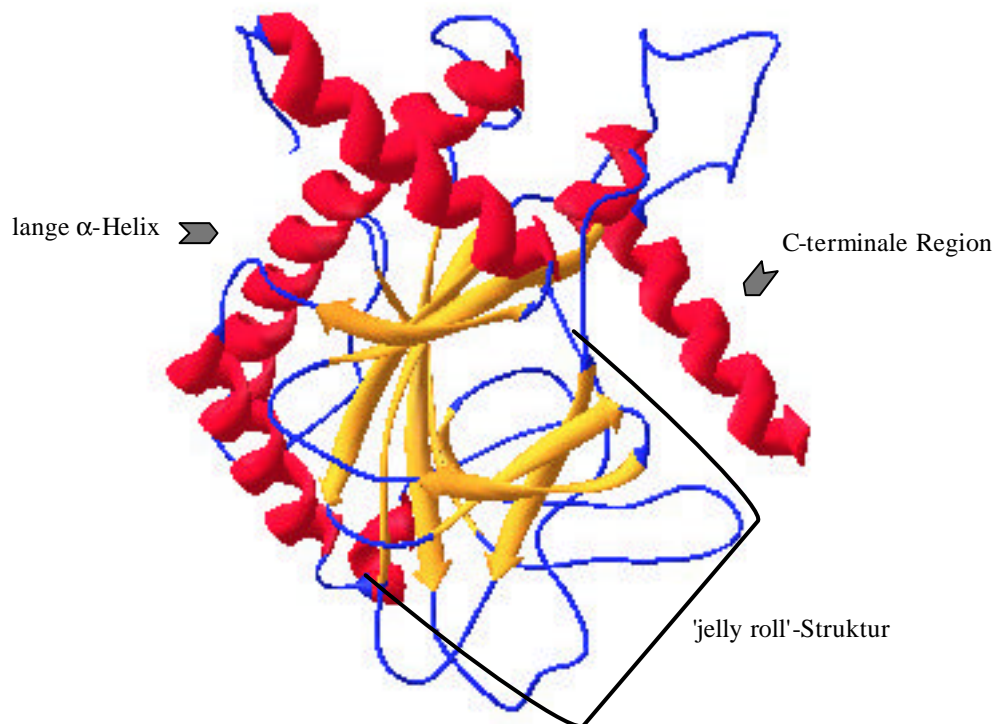


Abb. 33: Homologiestrukturmodell der FLS.

Als Matrize diente die ANS aus *Arabidopsis thaliana*. Das Modell wurde mit dem Deep View Swiss Pdb Viewer (Glaxo Smith Kline R&D /Swiss Institute of Bioinformatics) erstellt.

Die Bewertung der konformativen Qualität des Tertiärmodells kann über den Ramachandran-Plot erfolgen. Der Ramachandran-Plot beurteilt die Torsionswinkel Ψ und Φ des Proteins nach favorisierten, erlaubten und sterisch verbotenen Konformationen im Modellvorschlag. Danach nehmen fünf Aminosäuren (Asp 47, Lys 67, Glu 147, Ala 149 und Glu 191) eine sterisch verbotene Position ein (Daten nicht gezeigt). Auf eine Energieoptimierung des generierten Modells wurde im Hinblick auf mögliche Strukturveränderungen verzichtet.

D 10 Charakterisierung des aktiven Zentrums des FLS-Proteinmodells

Das Homologiemodell der FLS ermöglicht eine detaillierte Voraussage der räumlichen Struktur des katalytischen Zentrums (**Abb. 34**). In Übereinstimmung mit bereits bekannten Kristallstrukturen 2-Oxoglutarat-abhängiger Dioxygenasen ist das zweiwertige Eisenion koordinativ in nahezu oktaedrischer Anordnung mit den drei Aminosäureliganden Histidin (Position 221 und 227) und Aspartat (Position 223) verbunden. Die Sauerstoffatome der Carboxylatgruppe (C-1) und der benachbarten Carbonylgruppe (C-2) des 2-Oxoglutarats nehmen die äquatorialen Koordinationsstellen ein. Die sechste Position wird in der Kristallstruktur der ANS durch ein Wassermolekül besetzt (Wilmouth *et al.*, 2002), was auch durchaus für die FLS zutreffen könnte. Die endständige Carboxylatgruppe (C-5) des 2-Oxoglutarats wird durch Arginin-287 über eine Salzbrücke sowie über eine Wasserstoffbindung mit Serin (Position 289) stabilisiert. Eine Charakterisierung der Substratbindungsstelle erweist sich ungleich schwerer, da hier die der Berechnung des FLS-Proteinmodells zugrunde liegenden Kristallstrukturdaten der ANS mit Unsicherheiten behaftet sind. Infolge der hohen chemischen Instabilität, die das Leucoanthocyanidin als das eigentliche native Substrat der ANS aufweist, wurde im Kristallisationsansatz auf das stabile *trans*-Dihydroquercetin ausgewichen. Diese Verfahrensweise ist begründet, weil die ANS *in vitro* *trans*-Dihydroquercetin zu Quercetin umsetzt (Welford *et al.*, 2001). In der Kristallstruktur der ANS fanden sich nun interessanterweise zwei Moleküle *trans*-Dihydroquercetin im aktiven Zentrum wieder (Wilmouth *et al.*, 2002). Unabhängig dessen, ob tatsächlich zwei Substratmoleküle gleichzeitig gebunden vorliegen oder dieser Befund als kristallographisches Artefakt zu bewerten ist, wurden für beide Bindungsstellen spezifische Interaktionen belegt. Vor diesem Hintergrund lassen sich für die FLS kaum fundierte Aussagen hinsichtlich der Substratbindungsstelle ableiten.

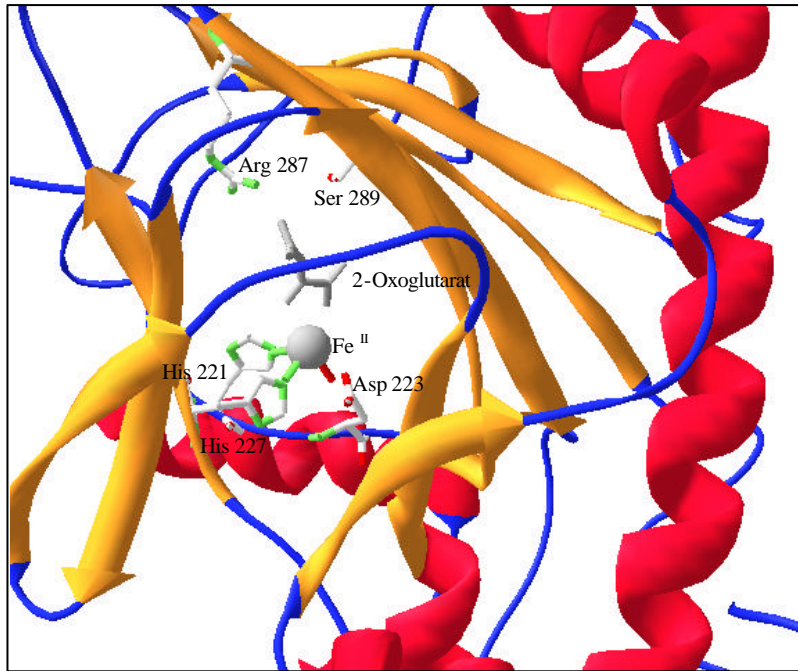


Abb. 34: Katalytisches Zentrum im Homologiemodell der *Citrus*-FLS.

Die Koordination von Fe^{II} und 2-Oxoglutarat im aktiven Zentrum wurde vergleichbar in allen Strukturmodellen 2-Oxoglutarat-abhängiger Dioxygenasen identifiziert.

Die Abbildung wurde mit dem Deep View Swiss Pdb Viewer (Glaxo Smith Kline R&D/ Swiss Institute of Bioinformatics) erstellt.

D 11 Funktionelle Charakterisierung der FLS

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen eine tiefergehende funktionelle Abgrenzung der FLS aus *Citrus unshiu* von ANS und FHT notwendig erscheinen. Dies ist wichtig vor dem Hintergrund der vielen Gemeinsamkeiten, wie die auffallende strukturelle Ähnlichkeit der FLS zur FHT in der CD-Spektroskopie (**D 8.1**) oder die Kreuzreaktion von ANS mit FLS-Antiserum (**D 8.2**) und die hohe Homologie der Modellstrukturen von FLS und ANS (**D 9, D 10**).

Überdies werfen jüngste Untersuchungen zur Anthocyanidinsynthese aus *Arabidopsis thaliana* die Frage nach der Substratspezifität der FLS auf:

- *In vitro* wurde nachgewiesen, dass die ANS (\pm)-Naringenin unter anderem zum Dihydroflavonol (Dihydrokämpferol) umsetzt (Welford *et al.*, 2001).
- Der Einsatz von Leucocyanidin führte unter den Testbedingungen zur Bildung von Dihydroflavonolen und geringen Mengen an Cyanidin (Turnbull *et al.*, 2000).
- Die ANS ist in der Lage, *in vitro* aus (+)-*trans*-Dihydroquercetin Quercetin zu bilden (Turnbull *et al.*, 2000).

D 11.1 Überprüfung der FLS auf ANS-Aktivität

Aus den dargelegten Gründen sollte im Vorfeld der kinetischen Untersuchungen nachgewiesen werden, ob es sich bei der FLS aus *Citrus unshiu* auch tatsächlich um eine Flavonolsynthase im engeren Sinne handelte und nicht etwa um eine ANS mit FLS-Aktivität. Der Nachweis der katalytischen Umsetzung von Leucoanthocyanidinen zu den entsprechenden Anthocyanidinen erweist sich *in vitro* als äußerst problematisch (**Abb. 35**). Leucoanthocyanidine sind in enantiomer-reiner Form nur unter großem Aufwand zu synthetisieren und zudem chemisch instabil. Abhilfe konnte ein gekoppelter Test schaffen, bei dem radioaktiv markiertes (+)-*trans*-Dihydrokämpferol durch die Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) stereospezifisch zu (2*R*, 3*S*, 4*R*)-Leucopelargonidin umgesetzt wird (**Abb. 35**). Anschließend wurden *Citrus*-FLS sowie die zusätzlich für die Umsetzung benötigten Kofaktoren zugegeben und die Produkte nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung mit einem Bio-Imager (Fuji, Tokyo) ausgewertet. Der Test zeigte, dass die FLS aus *Citrus unshiu* keine ANS-Aktivität besitzt (Daten nicht gezeigt). Auch die für die ANS beschriebene Umsetzung von Leucocyanidin zu DHQ bzw. Quercetin (Welford, 2001), die zu einer Zunahme

von detektierbarem Flavonol führen müsste, konnte für die FLS nicht beobachtet werden. Die ANS aus *Gerbera hybrida* diente als Positiv-Kontrolle.

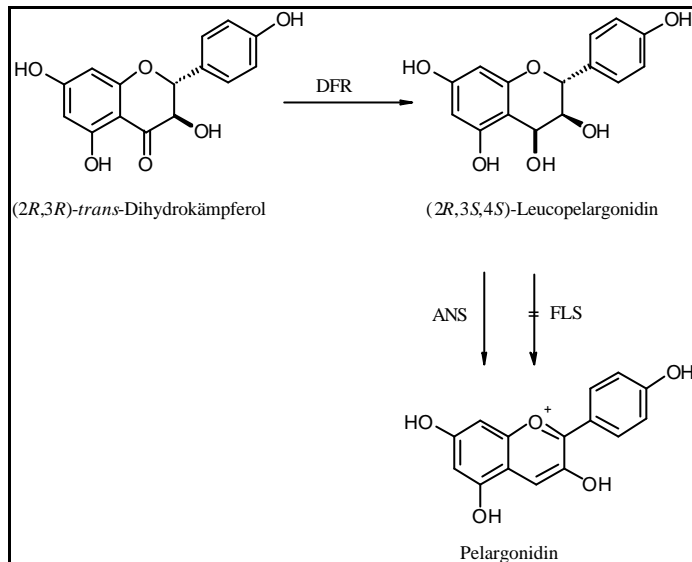


Abb. 35: Herstellung und Umsetzung von (2R, 3S, 4S)-Leucoanthocyanidin durch ANS bzw. FLS.

D 11.2 Überprüfung der FLS auf FHT-Aktivität

Für die ANS aus *Arabidopsis thaliana* wurde gezeigt, dass (\pm)-Naringenin zu (-)-*cis*-DHK und *trans*-DHK in einem Verhältnis von 4:1 neben Spuren von Apigenin und Kämpferol umgesetzt wird (Welford *et al.*, 2001). Bei diesen Untersuchungen wurde auf eine Bestimmung der absoluten Stereochemie von *trans*-DHK verzichtet und stattdessen die physiologische (+)-Form als vermeintliches Entstehungsprodukt angenommen (Welford *et al.*, 2001).

Der Nachweis, ob sich die FLS analog zur oben beschriebenen ANS-Reaktion verhält und ebenfalls in der Lage ist, Flavanone umzusetzen, wurde mittels Standardenzymtest und dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Produkte überprüft. Als Substrat wurde zunächst stereochemisch reines (2S)-Naringenin eingesetzt. Das Hauptprodukt wurde durch Co-Chromatographie mit der authentischen Referenzsubstanz als Kämpferol identifiziert (Abb. 36, Bande A), und eine weitere Bande konnte *trans*-DHK (Bande B) zugeordnet werden. Abweichend von der ANS-Reaktion ließen sich mit der *Citrus*-FLS weder Apigenin noch *cis*-DHK als Produkte nachweisen.

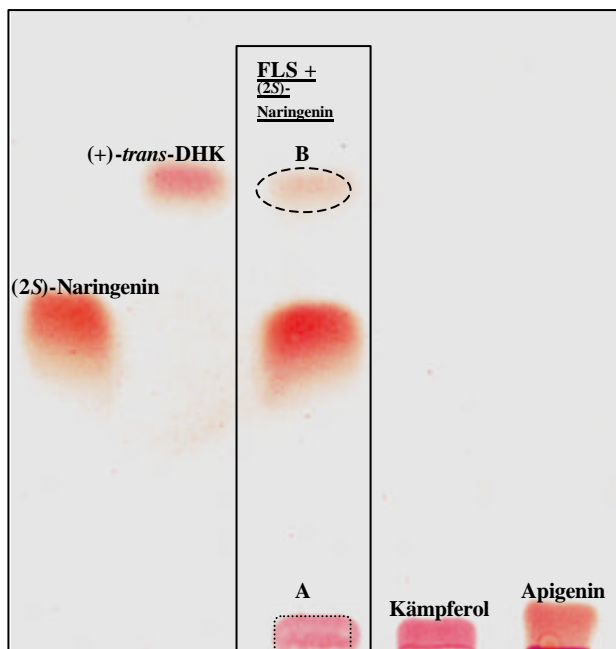


Abb. 36: Flavonoidmuster nach Umsetzung von (2S)-Naringenin mit FLS aus *Citrus unshiu*.

Die FLS-Inkubationen wurden unter Standardbedingungen durchgeführt, wobei die Inkubationszeit auf 30 min ausgeweitet wurde. Die extrahierten Flavonoide wurden auf Cellulose-Dünnschichtplatten in 15 % wässriger Essigsäure aufgetrennt und anschließend unter UV₃₆₆-Einstrahlung bzw. mit 1 % Echtblausalzlösung in verdünnter NaOH detektiert. Aus der FLS-Reaktion ließen sich durch RF-Wert-Vergleich mit authentischen Referenzsubstanzen die Produkte (A) Kämpferol (Startlinie) und (B) *trans*-DHK zuordnen. Apigenin und *cis*-DHK (erwarteter RF-Wert 0,4) wurden nicht beobachtet.

Aufgrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob das als Nebenprodukt aufgetretene putative *trans*-DHK (Abb. 36, Bande B) möglicherweise eine Zwischenstufe für die Bildung von Kämpferol darstellt. Zur Überprüfung wurde die entsprechende Bande B aus Abb. 36 in präparativem Maßstab isoliert und wiederum als Substrat im FLS-Enzymtest eingesetzt.

Die dünnschichtchromatographische Auswertung zeigte, dass die Inkubation mit der isolierten Substanz nur äußerst geringe Mengen an Kämpferol lieferte (Abb. 37, Bande C). Im Ergebnis stellt die Substanz in Bande B kein Zwischenprodukt auf dem Weg zum Kämpferol dar. Für eine eindeutige Identifizierung der Substanz wäre die Aufklärung der Struktur mittels Kernspinresonanz- und CD-Spektroskopie erforderlich gewesen, worauf angesichts der geringen Ausbeute verzichtet werden musste.

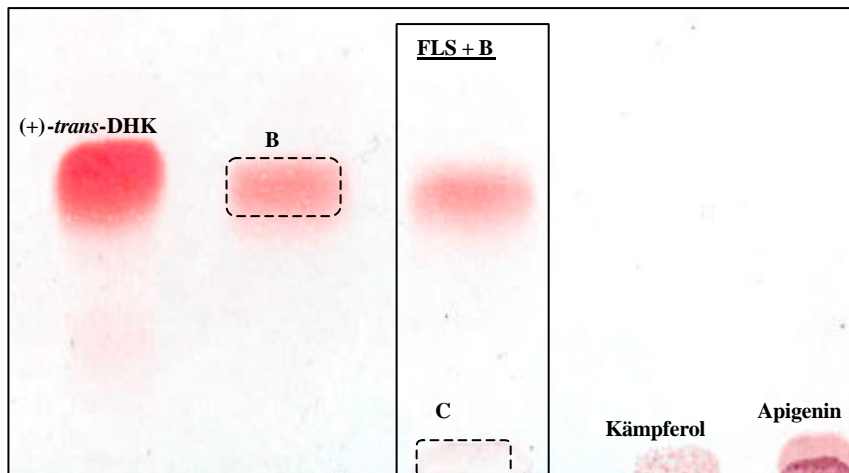


Abb. 37: Wiederholte Inkubation des Nebenproduktes aus der Reaktion der Citrus-FLS mit (2S)-Naringenin.

Das Nebenprodukt der FLS-Inkubation mit (2S)-Naringenin (Bande B, Abb. 36), das vorläufig als *trans*-Dihydrokämpferol identifiziert war, wurde in präparativem Maßstab isoliert und erneut mit FLS inkubiert. Diese Inkubation lieferte in äußerst kleiner Menge ein Produkt C, dessen Struktur nicht näher untersucht wurde. Das Substrat (aus Bande B) sowie (+)-*trans*-DHK, Kämpferol und Apigenin dienen zum chromatographischen Vergleich.

D 11.3 Stereospezifität der FLS für Flavanon-Substrate

Im Falle der FHT wurde bereits früher die Spezifität für die (2S)-Konfiguration der Substrate nachgewiesen (Britsch *et al.*, 1986). Entsprechende Versuche sollten auch mit der FLS durchgeführt werden. In einem Reaktionsansatz wurde sauberes (2R)-Naringenin unter Standardbedingungen eingesetzt und die Produkte wie üblich durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennt.

Das Ergebnis der Dünnschichtchromatographie fiel überraschend aus, da sich auf der Höhe des *trans*-DHK eine Bande (**Abb. 38**, Fleck D) anfärben ließ, gleichzeitig aber kein Kämpferol detektiert werden konnte.

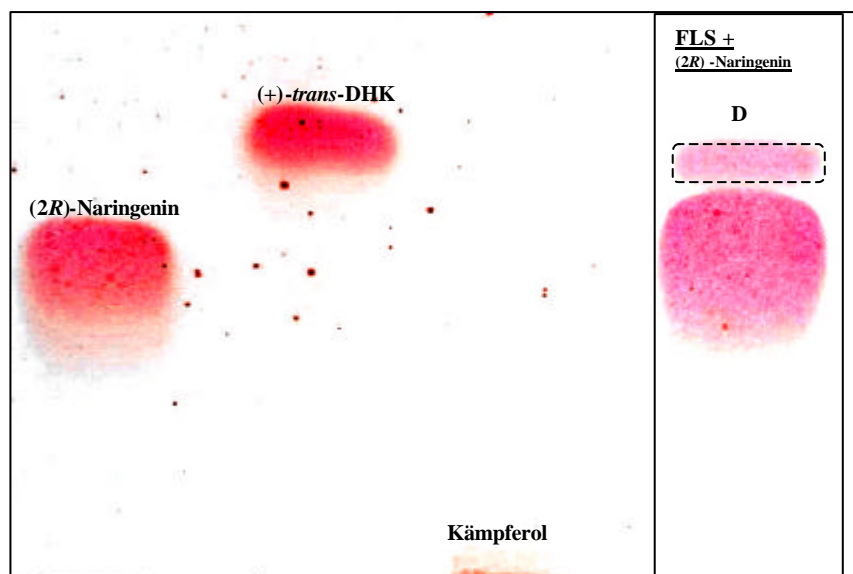


Abb. 38: Umsetzung von (2R)-Naringenin durch die FLS aus *Citrus unshiu*.

Die FLS-Inkubationen wurden unter Standardbedingungen bei einer Inkubationszeit von 30 min durchgeführt. Die extrahierten Flavonoide wurden auf Cellulose-Dünnschichtplatten in 15 % wässriger Essigsäure aufgetrennt und anschließend unter UV₃₆₆-Einstrahlung bzw. mit 1 % Echtblausalzlösung in verdünnter NaOH detektiert. Aus der FLS-Reaktion ließ sich durch RF-Wert-Vergleich mit der authentischen Referenzsubstanz das Produkt (D) *trans*-DHK zuordnen.

Zur Identifizierung des Produktes (Abb. 38, Bande D) wurde in präparativer Inkubation etwa 1 mg der unbekanntes Substanz mittels Dünnschichtchromatographie isoliert und ein ¹H-NMR-Spektrum aufgenommen. Das Resonanzmuster entsprach vollständig dem des *trans*-DHK (Daten nicht gezeigt). Um das isolierte und als *trans*-DHK identifizierte Produkt weiter umzusetzen, wurde es erneut mit der FLS unter Standardbedingungen inkubiert. Da diese Inkubation nur in einem äußerst geringen Umfang zu Kämpferol führte (Abb. 39, Bande E), liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dieser Substanz wahrscheinlich um die (-)-Form des *trans*-DHK handelte.

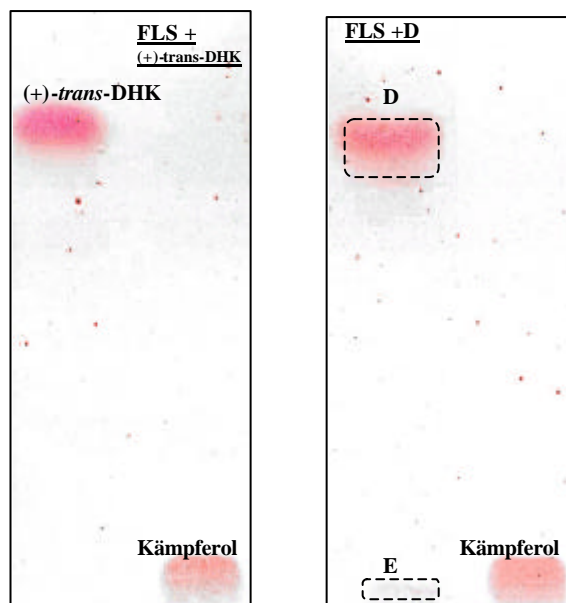


Abb. 39: Umsetzung durch FLS von physiologischem (+)-*trans*-DHK (links) sowie des durch FLS aus (2R)-Naringenin gebildeten Produktes (rechts).

Das Produkt der FLS-Inkubation mit (2R)-Naringenin (Bande D, Abb. 38), das über $^1\text{H-NMR}$ als *trans*-Dihydrokämpferol identifiziert worden war, wurde in präparativem Maßstab isoliert und erneut mit FLS unter Standardbedingungen inkubiert. Diese Inkubation lieferte in äußerst kleiner Menge ein Produkt E, dessen Struktur nicht näher untersucht wurde (rechte Platte). Die linke Platte zeigt die Vergleichsreaktion mit natürlichem (+)-*trans*-DHK.

Eine Bestätigung sollte schließlich durch die CD-Spektroskopie erbracht werden. Das CD-Spektrum der Verbindung wies die entgegengesetzte Elliptizität zum (+)-*trans*-DHK auf (Abb. 40) und bestätigt somit wie angenommen das (-)-Enantiomer.

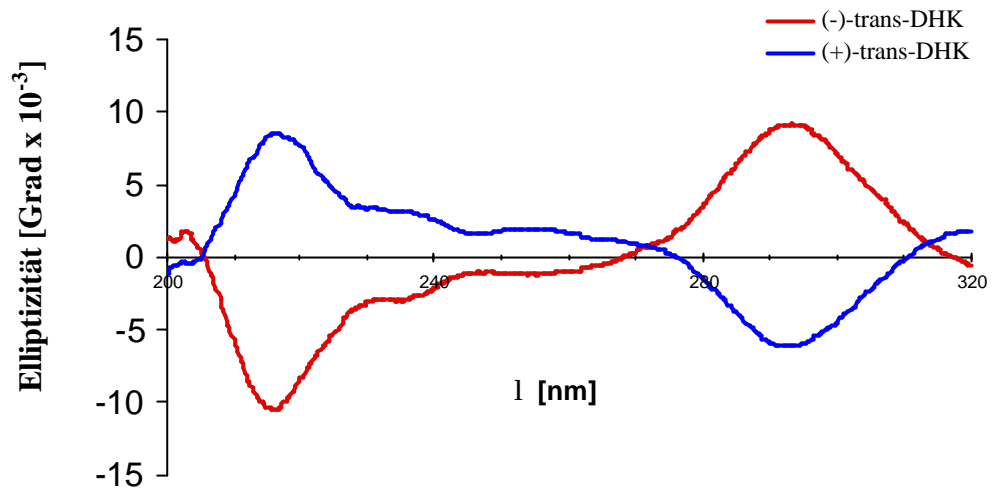


Abb. 40: CD-Spektrum von authentischem (+)-*trans*-DHK sowie (-)-*trans*-DHK aus der Umsetzung von (2*R*)-Naringenin mit FLS

Beide Verbindungen wurden jeweils in Methanol gelöst und auf eine Konzentration von etwa 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Das Spektrum wurde in einem Wellenlängenbereich von 200-320 nm aufgenommen. Die Elliptizität ist in Milligrad aufgetragen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die *Citrus*-FLS in der Lage ist (2*S*)-Naringenin zu Kämpferol umzusetzen, wobei wahrscheinlich zunächst in einer FHT-ähnlichen Reaktion (+)-*trans*-DHK entsteht, dass als solches jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. Daneben entsteht in sehr kleiner Menge auch (-)-*trans*-DHK (**Abb. 41**). Außerdem kann die FLS auch das unphysiologische (2*R*)-Naringenin zu (-)-*trans*-DHK umsetzen (**Abb. 42**). Dieses Produkt wird nicht weiter umgesetzt.

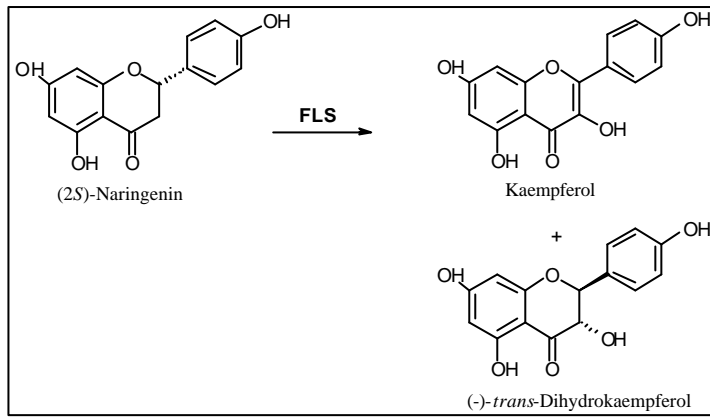


Abb. 41: Umsetzungsreaktion der FLS aus mit (2*S*)-Naringenin.

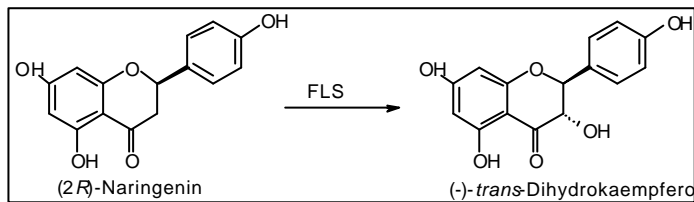


Abb. 42: Umsetzungsreaktion der FLS mit (2*R*)-Naringenin.

E Schlussbetrachtung

Die Flavonolsynthese setzt verschiedene Dihydroflavonole zu den entsprechenden Flavonolen um und ist eine typische 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase. Diese Reaktion stellt einen zentralen Schritt in der Flavonoidbiosynthese dar. Mitglieder dieser Enzymfamilie weisen trotz oftmals geringer Sequenzhomologien auffallende mechanistische und strukturelle Ähnlichkeiten auf. Insbesondere wird innerhalb der Flavonoidbiosynthese eine enge Verwandtschaft hinsichtlich der Struktur und des Reaktionsmechanismus zwischen ANS, FHT und FLS postuliert (Wilmouth *et al.*, 2002). Bisher ist über die Biochemie der FLSs und die Struktur dieser Enzyme nur wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine Flavonolsynthese allgemein biochemisch charakterisiert und strukturell untersucht. Dazu wurde aus *Citrus unshiu* eine FLS-cDNA heterolog in *E. coli* exprimiert und für die anstehenden Untersuchungen vollständig gereinigt. Über *in vitro*-Mutagenese konnte der Einfluss der Substitution konservierter Aminosäuren auf die Struktur bzw. Aktivität des Enzyms gezeigt werden.

E 1 Klonierung und Expression der FLS

Die Klonierung einer FLS aus einer *Citrus*-cDNA-Bank war kurz vor Beginn der Arbeit von der Gruppe von Dr. Takaya Moriguchi ('National Institute of Fruit Tree Science' in Japan) durchgeführt worden. Im Rahmen dieser Arbeiten ergaben sich interessante Resultate aus der Southern-Blot-Analyse der genomischen DNA aus Blättern der *Satsuma*-Mandarine. Demnach scheinen mehrere FLS-Gene oder zumindest eng verwandte Sequenzen im *Citrus*-Genom vorhanden zu sein (Moriguchi *et al.*, 2002). Entsprechende Studien für die FLS aus *Solanum tuberosum* (van Eldik *et al.*, 1997) und *Arabidopsis thaliana* (Pelletier *et al.*, 1997) führten zu gleichen Ergebnissen. Zudem äußerte sich die Expression eines FLS-antisense-Konstrukts in *Petunia hybrida* und Tabak in einer signifikanten Reduktion der Flavonolbildung und veränderten Blütenfarbe, ohne jedoch die Flavonolproduktion in den transgenen Linien völlig zu unterdrücken (Holton *et al.*, 1993). Dies könnte einerseits ein Hinweis darauf sein, dass möglicherweise nicht alle Isoenzyme durch die antisense-Suppression erfasst wurden. Bisher konnte die Rolle der FLS-Isoformen nicht aufgeklärt werden. Es wird diskutiert, dass über eine unterschiedliche Substratspezifität dieser Isoformen eine Kontrolle des Flavonoltyps bzw. der Flavonolmenge in den einzelnen Geweben stattfinden könnte (Pelletier *et al.*, 1997).

Auch denkbar wäre, dass andere flavonoidspezifische 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen die Funktion der FLS *in vivo* partiell übernehmen können. Untersuchungen in dieser Richtung sind noch nicht ausreichend durchgeführt worden.

Die Expression der FLS fand in dem heterologen System *E. coli* M15 [pREP]/pQE6 statt.

Um die Aggregation von Proteinen zu unterdrücken und damit die Ausbeute der nativ gefalteten Spezies zu verbessern, bietet sich die Möglichkeit an, die Bakterien bei suboptimalen Bedingungen d.h. unterhalb von 37°C zu kultivieren oder die Konzentration des Induktors zu verringern (Kopetzki *et al.* 1989). Das Absenken der Wachstums- und Induktionstemperatur und damit die verlangsamte Protein-Syntheserate führte aber nicht wie für eine Reihe anderer rekombinanter Häm-freier Eisen (II) Enzyme beobachtet wurde zu einer Steigerung der FLS-Expression wie z.B. bei Clavaminsynthase (Busby *et al.*, 1995), 2,4-Dichlorphenoxyacetat/ α -Ketoglutarat Dioxygenase (Fukumori & Hausinger, 1993) und FHT (Britsch *et al.*, 1993), sondern zu einer deutlichen Abnahme an Ausbeuten.

E 2 Reinigung der rekombinanten FLS

Pflanzliche 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen sind meist sehr labile Enzyme, was eine effiziente Reinigung und funktionelle Charakterisierung sehr schwierig erscheinen lässt (Saito *et al.*, 1999; Lukacin *et al.*, 2000). Einerseits erfolgt rascher proteolytischer Abbau in Rohextrakten von Pflanzen bzw. nach Expression in Bakterien, andererseits verlieren auch die gereinigten Enzyme in Lösung relativ schnell ihre Aktivität. Untersuchungen an rekombinanter FHT aus *Petunia hybrida* führten zu der Annahme, dass der unmittelbar nach dem Zellaufschluss einsetzenden Proteolyse der FHT zelleigene Proteasen vom Typ der Metalloproteinasen und PMSF-(Phenylmethansulfonylfluorid)-insensitiven Serinproteasen zugrundeliegen. Die primäre Schnittstelle konnte dabei mit einer Genauigkeit von ± 100 Da bei Leucin 338 lokalisiert werden (Lukacin *et al.*, 2000). Die Entwicklung einer neuen Reinigungsmethode zielte darauf ab, die initiale Proteaseaktivität bei Zellaufschluss und fraktionierter Ammoniumsulfatfällung durch einen niedrigen pH-Wert des Aufschlusspuffers zu unterdrücken und die vermutlich niedermolekularen Proteasen unmittelbar durch eine Gelfiltration abzutrennen (Gröning, 2000). Dieses Protokoll wurde für die Reinigung der FLS weitgehend übernommen und erwies sich als äußerst effektiv, weil bei Aufschluss im sauren Puffer bereits ein großer Teil des Fremdproteins entfernt wird. Die FLS scheint allerdings

auch weniger empfindlich als die FHT zu sein, da nach rekombinanter Expression kaum proteolytischer Abbau in Rohextrakten beobachtet wurde. Es ist anzunehmen, dass die Unterschiede im C-terminalen Bereich von FHT und FLS dafür verantwortlich sind. Auch im Falle der ANS aus *Perilla frutescens* wurde kein proteolytischer Abbau des rekombinanten Enzyms beobachtet, sondern die höchste Aktivität in Rohextrakten bei neutralem pH gemessen (Saito *et al.*, 1999).

Die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung wurde für die FLS-Reinigung mit engen Fällungsgrenzen von 40-50 % optimiert und lieferte in Verbindung mit der nachfolgenden Fraktionierung über Fractogel bereits eine weitgehend saubere Präparation. Das Elutionsverhalten der FLS bei der Größenausschluss-Chromatographie (Fractogel EMD Bio SEC) war identisch zu demjenigen der FHT (Gröning, 2000). Dies konnte erwartet werden, da beide Enzyme eine Größe von etwa 38 kDa und ähnliche Molekülform besitzen. Auch in der anschließenden Anionenaustausch-Chromatographie (Fractogel EMD DEAE) ähnelte sich das Elutionsprofil der beiden Enzyme (FLS : 230-280 mM Natriumchlorid; FHT: 210-260 mM NaCl) (Gröning, 2000). Im Vorfeld der Reinigung wurde für die FLS durch isoelektrische Fokussierung ein pI von 5,0-5,5 bestimmt (Daten nicht gezeigt), im Vergleich zu rekombinanter FHT mit einem pI von 5,1-5,2 (Britsch *et al.*, 1993). Deshalb sollten im schwach alkalischen Bereich (pH 7,5) beide Enzyme eine ähnliche negative Oberflächen-Nettoladung besitzen. Mit diesem Reinigungsschritt war die FLS bereits apparent homogen. Das Verfahren erlaubt die schnelle Isolierung größerer Mengen von hochaktiver FLS (oder FHT) und dürfte universell zur Reinigung von 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen aus der Flavonoidbiosynthese geeignet zu sein.

Diese Fragestellung wird gegenwärtig bearbeitet anhand der Reinigungen von ANS und FNS I.

E 3 Biochemische Charakterisierung

Die rekombinante, hochaktive FLS erlaubte erstmalig enzymkinetische Parameter, sowie Daten zur Temperatur- und pH-Abhängigkeit für ein solches Enzym zu bestimmen. Die FLS zeigt eine hohe Aktivität im Temperaturbereich von 30 bis 40°C. Das breite Temperatur-optimum könnte als eine Anpassung des Enzyms an die Temperaturgegebenheiten in der subtropischen Heimat der Citrusgewächse gewertet werden.

Ungewöhnlich sind die Ergebnisse zur pH-Abhängigkeit der Aktivität mit einem Optimum zwischen pH 5,0 und 6,0. Für die rekombinante FHT aus *Petunia hybrida* wurde ein pH-

Optimum von 6,0 neben einem zweitem Maximum bei pH 8,0 ermittelt (Lukacin, 1997). Ein solches Maximum ließ sich für die FLS nicht nachweisen. Das Auftreten von zwei pH-Optima der FHT könnte darauf hindeuten, dass das Enzym *in situ* in unterschiedlichen Geweben mit differierenden pH-Bedingungen aktiv ist. Das niedrige pH-Optimum der FLS (und auch der FHT) würde eine Lokalisation des Enzyms in sauren Kompartimenten vermuten lassen und weniger für einen an der zytosolischen Seite des rauen ER verankerten Multienzymkomplex sprechen, wie er für Flavonoidenzyme allgemein postuliert wird (Burbulis *et al.*, 1999). Auch für die ANS aus *Gerbera hybrida* konnte die Enzymaktivität durch ein Absenken des pH-Wertes auf pH 6,0 erheblich gesteigert werden (eigene nicht gezeigte Daten), abweichend vom Optimum bei pH 7,0 wie für die ANS aus *Perilla frutescens* beschrieben (Saito *et al.*, 1999).

Die kinetischen Parameter für die Kofaktoren Fe^{2+} und 2-Oxoglutarat der FLS lagen in der Größenordnung, wie sie auch für die meisten anderen 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen aus Mikroorganismen, Pflanzen, und Säugern bestimmt wurden (Britsch & Grisebach, 1986; De Carolis & De Luca, 1993; Fukumori & Hausinger, 1993; De Carolis & De Luca, 1994; Lukacin, 1997; Myllyharju *et al.*, 1997; Eriksson *et al.*, 1999; Hieta *et al.*, 2002). Zu den Ausnahmen zählt die ANS aus *Perilla frutescens*, für die eine hohe K_m für 2-Oxoglutarat von 59,5 mM bestimmt wurde, was aber möglicherweise auf eine hohe Instabilität sowohl von Substrat (Leucocyanidin) als auch Enzym zurückzuführen ist (Saito *et al.*, 1999). Bei früheren Untersuchungen zur Kosubstratspezifität der FHT hatte sich gezeigt, dass 2-Oxoglutarat im Enzymtest nicht durch strukturell homologe Verbindungen ersetzt werden kann (Britsch & Grisebach, 1986). Eine Ausnahme stellt 2-Oxoadipinsäure dar, mit der ein geringer Umsatz nachgewiesen wurde (Lukacin 1997). Gleiche Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit für die FLS erzielt werden. Unter Voraussetzung, dass 2-Oxoadipat an der 2-Oxoglutarat-Bindestelle bindet, kann für FLS und FHT eine sehr ähnliche Topologie der Bindestelle angenommen werden.

Die Bestimmung der apparenten Michaelis Konstante der FLS für die Substrate (+)-*trans*-Dihydroquercetin und (+)-*trans*-Dihydrokämpferol führte zu überraschenden Ergebnissen. Trotz der Tatsache, dass *Citrus unshiu* Quercetin-3-O-rutinosid (Rutin) als Hauptflavonol enthält und demnach Dihydroquercetin das bevorzugte Substrat der *Citrus*-FLS darstellen sollte, zeigte die FLS eine etwa 6-fach höhere Affinität zu (+)-*trans*-Dihydrokämpferol, wobei das Enzym mit einem K_m -Wert für Dihydrokämpferol von 45 μM eine deutlich geringere Substrataffinität aufweist als beispielsweise die FHT aus *Petunia hybrida*, für die ein K_m -Wert von 7 μM für (2*S*)-Naringenin bestimmt wurde (Britsch & Grisebach 1986).

Dieses Ergebniss steht in guter Übereinstimmung zu neuesten Untersuchungen an der *Satsuma*-Mandarine, in denen mittels Northern-Blot-Analyse die Expressionsprofile in verschiedenen Fruchtgeweben (Fruchtschale und Epidermis der Fruchtsegmente) bei unterschiedlichen Entwicklungsstadien gemessen wurden, wobei sich zeigte, dass insbesondere während der Reifung in der Fruchtschale auffallend hohe Mengen an FLS-Transkript gebildet werden und im Gegensatz dazu die Expression von CHS, CHI und FHT stark abnimmt. Eine *in vitro*-Inkubation der genannten Gewebe mit Dihydroquercetin führte nicht zu einer signifikanten Steigerung des Flavonolgehaltes, was als Hinweis darauf gedeutet wurde, dass die FLS aus *Citrus unshiu* eine größere Affinität zu anderen Substraten besitzen könnte (Moriguchi *et al.*, 2002). Daneben könnte diese Beobachtung auch die Tatsache widerspiegeln, dass die Flavonoidbiosynthese in einem Multienzymkomplex abläuft und gesteuert wird (Winkel-Shirley, 1999). Da in den Geweben weitere FLS-Isoformen zu erwarten sind, wäre die Kenntnis der individuellen Substratspezifitäten von besonderem Interesse, um Rückschlüsse auf die physiologische Bedeutung solcher Isoformen ziehen zu können.

Vorläufige Ergebnisse zur Substratspezifität weiterer Flavonolsynthasen aus anderen Pflanzen scheinen auf unterschiedliche Affinitäten zu DHQ und DHK hinzudeuten. So fiel auf, dass beispielsweise die FLS aus *Osteospermum hybrida* DHQ für die Umsetzung bevorzugt, und DHK dagegen kaum umsetzt (eigene nicht gezeigte Daten).

E 4 Datenbankanalyse und Strukturvorhersage der FLS

Alle bisher publizierten FLS-Polypeptide weisen eine hohe Sequenzhomologie auf. Eine Stammbaumanalyse konnte für die *Citrus*-FLS eine besonders enge phylogenetische Beziehung zur FLS aus *Malus domestica* belegen (Moriguchi *et al.*, 2002). Die höchste Homologie der FLSs ist jeweils im C-terminalen Sequenzbereich zu finden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in der Funktion des C-Terminus liegen. Eine durch *in vitro*-Mutagenese induzierte Verkürzung des C-Terminus hatte im Falle der IPNS und der DAOCS drastische Aktivitätsverluste zur Folge (Sami *et al.*, 1997; Valegård *et al.*, 1998). Neuere kinetische und kristallographische Untersuchungen an C-terminal-mutagenisierter DAOCS deuten darauf hin, dass der C-Terminus eine funktionelle Bedeutung für die korrekte Orientierung des Substrats zur Oxidation, sowie zusätzlich für die Freisetzung von Succinat und/ oder 2-Oxoglutarat besitzt (Lee *et al.*, 2001). Gleiches könnte für alle 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen und verwandte Enzyme zutreffen.

Eine auffallende Homologie (60 % Sequenzähnlichkeit) ließ sich zwischen FLS- und ANS-Polypeptiden feststellen, während die Homologie zu FHT-Polypeptiden mit etwa 30 % deutlich geringer ist. Die Veröffentlichung der Struktur der *Arabidopsis*-ANS war entscheidend für die Erstellung eines homologiebasierten FLS-Strukturmodells. Obwohl das generierte Modell nicht das vollständige FLS-Polypeptid umfasst, enthält es neben dem 'jelly-roll'-Motiv, das das aktive Zentrum beheimatet, auch eine charakteristische lange α -Helix (Aminosäure 154-181), die das strukturelle Rückgrat der FLS bilden könnte. Die C-terminale Region wird wie in der ANS von einer α -helikalen Struktur gebildet. Im Falle der ANS wurde gezeigt, dass sich im N-terminalen Bereich vier Helices befinden, die die 'jelly-roll'-Struktur bzw. das aktive Zentrum zusätzlich umschließen. Eine entsprechende Struktur wurde auch für andere pflanzliche Dioxygenasen vorausgesagt (Wilmouth *et al.*, 2002).

Für diesen Bereich konnte aufgrund fehlender Sequenzhomologien keine Struktur zum FLS-Modell berechnet werden. Ein Aminosäuresequenzvergleich beider Enzyme zeigt auffällige Unterschiede im N-terminalen Bereich. So fehlt in der FLS-Sequenz insbesondere der als α 4-Helix bezeichnete Sequenzabschnitt der ANS (**Abb. 43**).

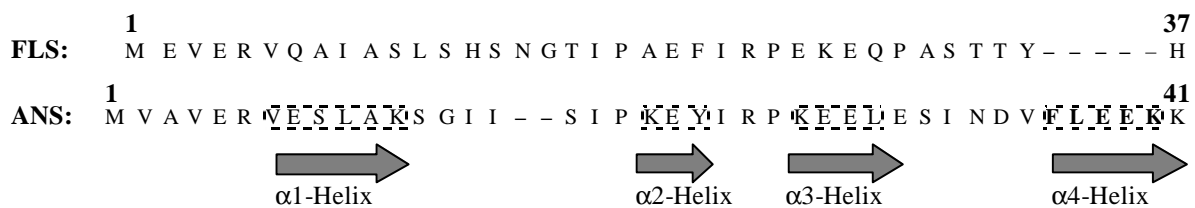


Abb. 43: Vergleich der N-Termini der Polypeptide von der ANS aus *Arabidopsis thaliana* und der FLS aus *Citrus unshiu*.

Die Kristallisation einer Flavonolsynthase ist nötig, um die Struktur des N-terminalen-Bereichs des Enzyms endgültig aufzuklären.

E 5 *In vitro*-Mutagenese

Aus Proteinsequenzvergleichen Häm-freier Eisen (II)-Enzyme ließen sich 4 konservierte Aminosäuren identifizieren, die für die Bindung des Eisens und des 2-Oxoglutarats von Bedeutung sind. Daneben fielen weitere drei streng konservierte Aminosäuren (Glycin 68, Glycin 261, Prolin 207) auf, denen eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung von Sekundärstrukturen zugeschrieben wird (Britsch *et al.*, 1993), die aber bis heute nicht daraufhin

untersucht wurden. Mit Hilfe der *in vitro*-Mutagenese wurde nun am Beispiel der FLS die Bedeutung dieser Aminosäuren im Einzelnen untersucht. Dazu wurden die Glycine an der Position 68 und 261 jeweils gegen Alanin und in einem zweiten Ansatz gegen Prolin ausgetauscht. Außerdem wurde das streng konservierte Prolin 207 zu einem Glycin mutagenisiert. Da Glycin eine raumfüllende Seitenkette fehlt, ist es sterisch weit weniger eingeschränkt als alle übrigen Aminosäurereste. Ein Austausch der beiden konservierten Aminosäurereste Glycin 68 und Glycin 261 gegen Alanin lässt in erster Linie eine Zunahme der sterischen Hinderung durch die zusätzliche Methylgruppe des Alanins erwarten.

Die erzeugten FLS-Mutanten (Gly68Ala; Gly261Ala) zeigten eine drastische Verringerung der spezifischen Aktivität für DHK und DHQ auf unter 10 %. Durch Austausch beider Glycinreste gegen Prolin sollte der Einfluss auf den Faltungsprozess der FLS deutlicher beeinflusst werden. Erwartungsgemäß zeigten diese FLS-Mutanten (Gly68Pro; Gly261Pro) keinerlei Aktivität mehr. Eine Erklärung ist in der konformativen Eigenschaft von Prolin zu sehen. So ist der Torsionswinkel ϕ in Prolin als Folge des fünfgliedrigen Ringes mit $-65^\circ \pm 15^\circ$ annäherungsweise konformativ fixiert.

Nach dem Strukturhomologiemodell der FLS liegen sowohl Glycin 68 als auch Glycin 261 im Inneren des Proteins. Glycin 68 ist danach in einem β -Strang lokalisiert, der Teil eines charakteristischen Motivs ist (Aminosäure 44-72). Dieses Motiv wurde auch in anderen Dioxygenasen nachgewiesen (Roach *et al.*, 1997; Valegård *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000), wobei die funktionelle Bedeutung des Motivs noch ungeklärt ist (**Abb. 44**). Das Motiv besteht aus zwei zueinander parallel angeordneten β -Faltblattstrukturen, die über eine α -Helix verbunden sind. Es ist denkbar, dass Glycin 68 für die strukturelle Aufrechterhaltung dieses Motivs bedeutsam ist.

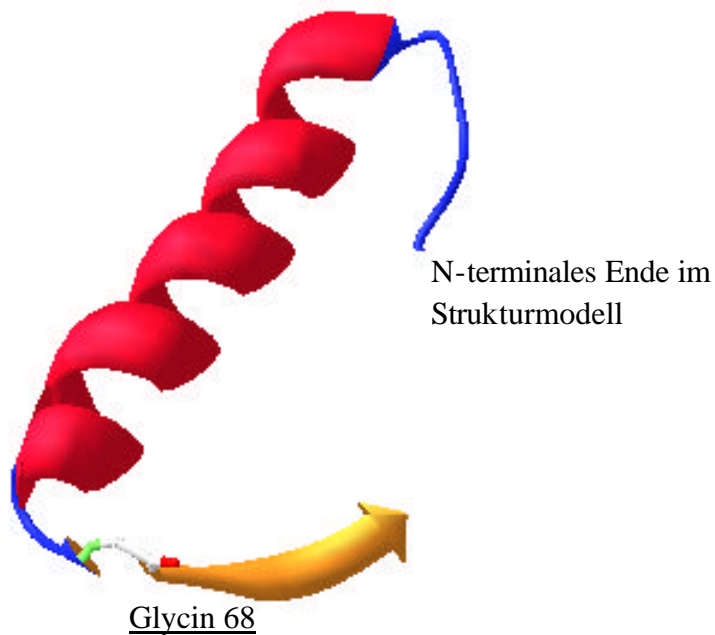


Abb. 44: Anordnung von Glycin 68 im Strukturhomologiemodell der FLS.

Dem errechneten Modell zufolge ist der Gly68-Rest in einer β -Faltblattstruktur lokalisiert, die Teil eines konservierten Motivs darstellt (Wilmouth *et al.*, 2002). Das Motiv besteht in der ANS aus zwei zueinander parallel angeordneten β -Strängen, die über eine α -Helix verbunden sind. Die N-terminale β -Struktur des FLS-Modells wurde nicht als solche berechnet, ist aber in ihrer Aminosäuresequenz der ANS-Sequenz identisch.

Glycin 261 liegt den Berechnungen zufolge am C-terminalen Ende des β 6-Faltblatts im 'jelly roll'-Motiv unmittelbar vor einer α -helikalen Struktur (**Abb. 45**). Da sich innerhalb der 'jelly roll' das aktive Zentrum befindet, ist damit zu rechnen, dass Mutationen, die diese strukturelle Einheit beeinflussen, sich auch auf die Funktion des Enzyms auswirken können. In dem FLS-Modell ist die Position des Glycin 261 zwischen zwei Sekundärstrukturen durch Raumbegrenzung charakterisiert und kaum durch einen Prolinrest zu ersetzen. Es ist daher anzunehmen, dass der entsprechende Austausch die Konformation der 'jelly roll' und damit möglicherweise des katalytischen Zentrums entscheidend verändert.

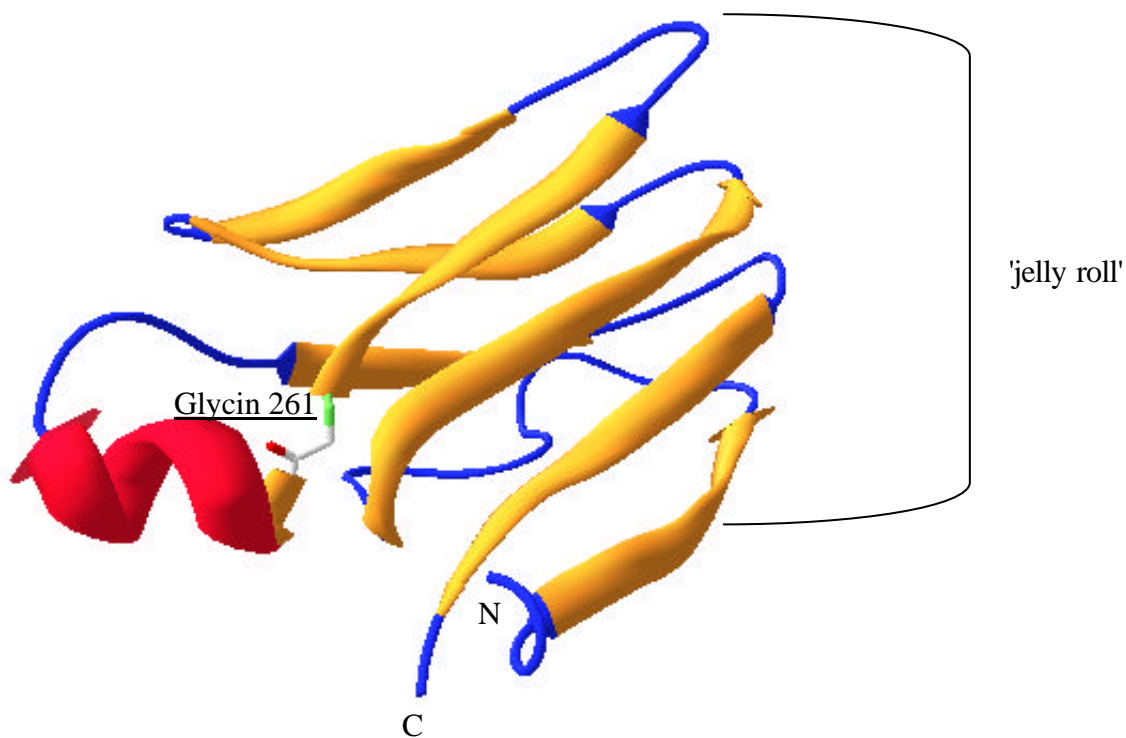


Abb. 45: Anordnung von Glycin 261 im Strukturhomologiemodell der FLS.

Dem errechneten Modell zufolge befindet sich der Gly261-Rest in einer β 6-Faltblattstruktur des 'jelly roll' Motivs unmittelbar vor einer kurzen α -helikalen Unterbrechung. Die Buchstaben N und C bezeichnen den N- bzw. C-terminalen Bereich der Strukturen.

Der konservierte Prolinrest an der Position 207 wurde gegen einen Glycinrest ausgetauscht (Pro207Gly). Überraschenderweise beeinflusste die Zunahme der strukturellen Freiheit durch das eingeführte Glycin die Funktion des Enzyms kaum. Vorstellbar wäre, dass der Prolinrest in einer β -Schleife lokalisiert ist. β -Schleifen sind ein häufiges Strukturmerkmal globulärer Proteine, um durch Richtungsänderungen ihrer Polypeptidketten eine kompakte Gestalt zu erreichen. Oftmals verbinden sie antiparallele β -Faltblattstränge. Das dreidimensionale Homologiemodell bestätigt diese Annahme. Danach ist Prolin 207 an der Moleküloberfläche in einer Schleifenstruktur am C-terminalen Ende des β 1-Faltblattstranges der 'jelly roll'-Struktur lokalisiert (**Abb. 46**). In der Knickstelle der Peptidkette befinden sich drei weitere Prolinreste, die in allen bisher publizierten Flavonolsynthesesequenzen ebenfalls konserviert vorliegen. Proline können durch die dargelegte konformative Restriktion β -Schleifen stabilisieren. Mit Glycin steht dagegen eine Vielzahl von Konformationen offen und es ermöglicht auch Polypeptid-Schleifenstrukturen auszubilden. Ein Glycinrest könnte infolgedessen Pro207 funktionell ersetzen. Das errechnete FLS-Computermodell, sowie auch die Kristallstrukturdaten der ANS (Wilmouth *et al.*, 2002) widersprechen damit früheren Vorhersagen für die FHT, nach denen der konservierte Prolinrest das N-terminale Ende eines helikalen Segments bilden sollte (Chou *et al.*, 1978; Garnier *et al.*, 1978; Britsch *et al.*, 1993). Der zukünftige Austausch von weiteren Prolinresten würde sich anbieten, um die strukturelle Bedeutung des konservierten Motivs aufzuklären.

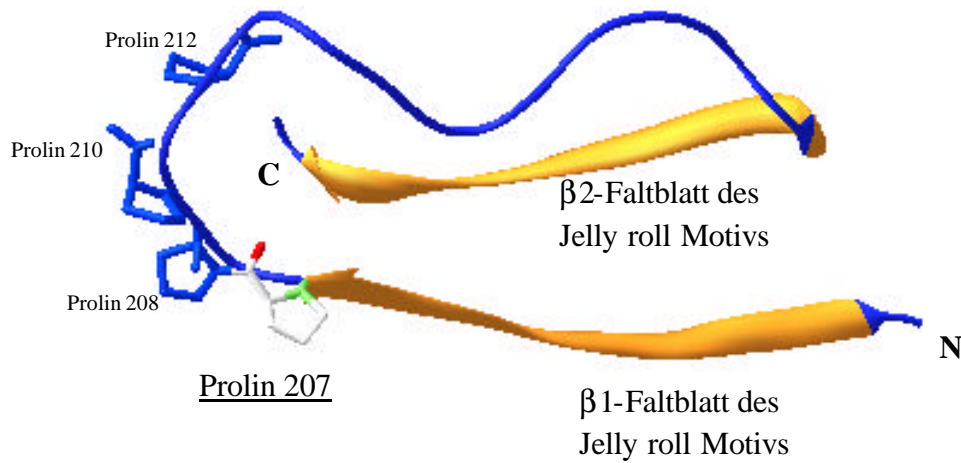


Abb. 46: Anordnung von Prolin 207 im Strukturhomologiemodell der FLS.

Dem errechneten Modell zufolge befindet sich der Prolinrest in einer Schleifenstruktur innerhalb des 'jelly roll' Motivs. Die beiden antiparallel angeordneten β -Faltblatt-Stränge $\beta 1$ und $\beta 2$ werden durch eine Schleife verbunden. Die Kehre ist durch die Anwesenheit von drei weiteren Prolinresten in unmittelbarer Nähe von Prolin 207 gekennzeichnet. Die Buchstaben N und C bezeichnen den N- bzw. C-terminalen Bereich der Strukturen.

CD-spektroskopische Untersuchungen der Mutanten auf mögliche konformative Veränderungen im Gesamtprotein konnten aufgrund der zu geringen Reinigungsausbeuten nicht durchgeführt werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass insbesondere der Austausch von Glycin 68 und 261 durch jeweils einen Prolinrest die Struktur des Enzyms entscheidend verändert. Beide Mutanten scheinen im Bakterium nicht mehr in löslicher Form, sondern vielmehr mit dem Cytoskelett assoziiert oder möglicherweise in 'inclusion bodies' zu akkumulieren.

E 6 Strukturelle Untersuchungen der FLS

Die Struktur der apparent homogen gereinigten FLS wurde CD-spektroskopisch untersucht. Das Profil des CD-Spektrums weist auf die Anwesenheit hoher Anteile α -helikaler Sekundärstrukturen im Enzymmolekül hin. Ein sehr ähnliches Spektrum mit einem charakteristischen Doppelminimum bei 222 nm und zwischen 208-210 nm, sowie einem Maximum im Bereich von 195 nm wurde u.a. für FHT und IPNS gezeigt (Durairaj *et al.*, 1996; Lukacin *et al.*, 2000). Ein Vergleich des FHT- mit dem FLS-Spektrum lässt aufgrund des geringer ausgeprägten Minimums bei 222 nm einen kleineren alpha-helikalen Anteil für die FLS vermuten. Es ist anzumerken, dass diese Methode nicht geeignet ist, um detaillierte Unterschiede beider Enzyme aufzuzeigen. Der Anteil an β -Strukturen kann beispielsweise aus CD-Spektren nur ungenau abgeschätzt werden, da β -Strukturen weniger regelmässig sind als α -Helices und in geringerem Ausmaß zum CD-Spektrum beitragen. Zudem beeinflussen äußere Faktoren, wie z.B. die Pufferkonzentration den Verlauf maßgeblich.

Insgesamt lässt die strukturelle Verwandtschaft innerhalb dieser Enzymklasse auch für die übrigen 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen und verwandten Enzymen vergleichbare CD-Spektren vermuten.

Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse wurde die immunologische Verwandtschaft von FLS, ANS, FHT und FNS I untersucht. Ein polyklonales Antiserum, das gegen rekombinante FLS aus *Citrus unshiu* hergestellt wurde, kreuzreagierte mit FLSs anderer Spezies wie *Petunia hybrida* und *Osteospermum hybrida*, sowie mit der ANS aus *Gerbera hybrida* (eigene nicht gezeigte Daten), nicht jedoch mit der FHT aus *Petunia hybrida* und FNS I aus *Petroselinum crispum* (Lukacin *et al.*, 2001). Antiseren gegen FNS I und FHT kreuzreagierten ebenfalls nicht mit FLS-Protein. Die Western-Analyse deutet darauf hin, dass sich die antigenen Strukturen von FLS und ANS ähnlich sind, aber zur FHT und FNS I strukturell differieren.

Da im Western-Blot denaturierte Proteine vorliegen, ist es notwendig die Kreuzreaktion auch als Immuntitration mit nativem Enzym zu überprüfen. Um auszuschließen, dass nicht etwa Hefe-Proteine aus dem ANS-Rohextrakt für diese Kreuzreaktion verantwortlich sind, müssten diese Ergebnisse nochmals mit gereinigter ANS verifiziert werden.

E 7 Substratspezifität der FLS

Aus der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass die FLS aus *Citrus unshiu in vitro* keine enge Spezifität aufweist, da neben den Dihydroflavonolen auch Flavanone umgesetzt werden. Aufgrund der hohen Sequenzidentität der FLS-Proteine untereinander ist anzunehmen, dass auch FLSs aus anderen Spezies eine breite Substratspezifität aufweisen. Mittlerweile konnten Untersuchungen der FLS aus *Arabidopsis thaliana* diese Annahme bestätigen (Prescott *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die Flavonoid-3'-Hydroxylase, eine Cytochrom-P450-Monooxygenase aus der Flavonoidbiosynthese, ebenfalls Naringenin und Dihydrokämpferol als Substrat umsetzt (Schoenbohm *et al.*, 2000). Die Tatsache, dass eine FLS Flavanone als Substrate akzeptiert, erscheint bei Betrachtung der geringen Aminosäuresequenzhomologie von etwa 30 % zwischen FHT- und FLS-Enzymen zwar ungewöhnlich, könnte aber mechanistische Gründe haben. Nach den gezeigten Ergebnissen setzt die *Citrus*-FLS *in vitro* (2*S*)-Naringenin zu Kämpferol um. Das bei der Inkubation der FLS mit (2*S*)-Naringenin als Nebenprodukt beobachtete, putative (-)-*trans*-DHK scheint dabei kein Zwischenprodukt für die Kämpferol-Bildung darzustellen, zumal es, in isolierter Form der FLS angeboten, nur sehr gering zu Kämpferol umgesetzt wurde.

Interessant ist die Tatsache, dass die Umsetzung von Flavanonen durch die FLS, entgegen der FHT-Reaktion, nicht stereospezifisch stattfindet (Britsch & Grisebach, 1986). Im Enzymtest eingesetztes nicht-physiologisches (2*R*)-Naringenin konnte von der FLS aus *Citrus unshiu* zu (-)-*trans*-Dihydrokämpferol umgewandelt werden, wobei gleichzeitig Kämpferolspuren detektiert wurden. Weitere Produkte ließen sich dabei nicht nachweisen.

Nach vorläufigen dünnschichtchromatographischen Untersuchungen ist die ANS aus *Gerbera hybrida* ebenfalls in der Lage (2*R*)-Naringenin zu (-)-*trans*-Dihydrokämpferol umzusetzen (eigene nicht gezeigte Daten). Diese Beobachtung würde das Auftreten von signifikanten Mengen an (-)-*trans*-Dihydrokämpferol nach der Inkubation der ANS aus *Arabidopsis thaliana* mit (±)-Naringenin neben einer möglichen nicht-enzymatischen C-2 Epimerisierung (**Abb. 47**) erklären (Welford *et al.*, 2001).

Eine große Schwierigkeit bei diesen Untersuchungen liegt in der hohen Instabilität von Substraten und Produkten. Über die Öffnung des Pyron-Rings (Ring C) kann eine *cis-trans*-Isomerisierungsreaktion zwischen (-)-*cis*-DHK und (-)-*trans*-DHK bzw. (+)-*cis*-DHK und (+)-*trans*-DHK auftreten, wobei allgemein die Bildung der *trans*-Form thermodynamisch begünstigt ist. Eine Keto-Enol-Reaktion zwischen der (+)-*cis*- und der (-)-*trans*-Form bzw. der (-)-*cis*- und der (+)-*trans*-Form scheint von untergeordneter Bedeutung sein (Welford *et al.*,

2001) (**Abb. 47**). Auch für die Substrate (2*S*)- und (2*R*)-Naringenin läßt sich eine Isomerisierung beobachten.

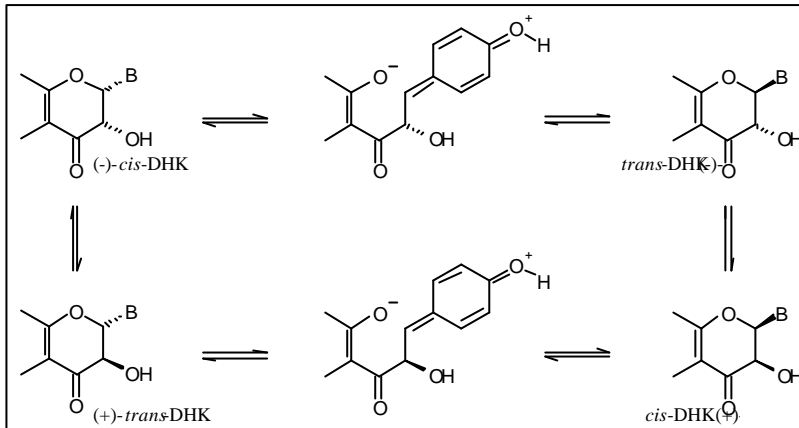


Abb. 47: Mögliche Isomerisierungsreaktionen der Dihydroflavonole.

Demnach könnten die kleinen Mengen an (-)-*trans*-DHK, die aus der Inkubation der FLS mit (2*S*)-Naringenin gefunden wurden, auch das Umsetzungsprodukt von (2*R*)-Naringenin darstellen, das seinerseits durch Isomerisierung von (2*S*)-Naringenin entstanden ist. Nach der gleichen Überlegung könnten die nachgewiesenen Kämpferolspuren aus der Inkubation mit (2*R*)-Naringenin unter Umständen aus der Umsetzung von nicht-enzymatisch gebildetem (2*S*)-Naringenin stammen. Aus diesem Zusammenhang heraus ist es kaum möglich endgültige mechanistische Aussagen zu treffen.

Bisher wurde für den Reaktionsmechanismus der FLS sowohl eine initiale Hydroxylierung der Dihydroflavonole an C2 oder C3 mit einer anschließenden Eliminierung von Wasser, als auch eine mögliche direkte Desaturierung (**Abb. 48**) der C2-C3-Bindung diskutiert (Britsch, 1990; Heller und Forkmann, 1993). Deuterisierungsversuche konnten zudem für die ANS eine Hydroxylierung an C4 ausschließen (Welford *et al.*, 2001).

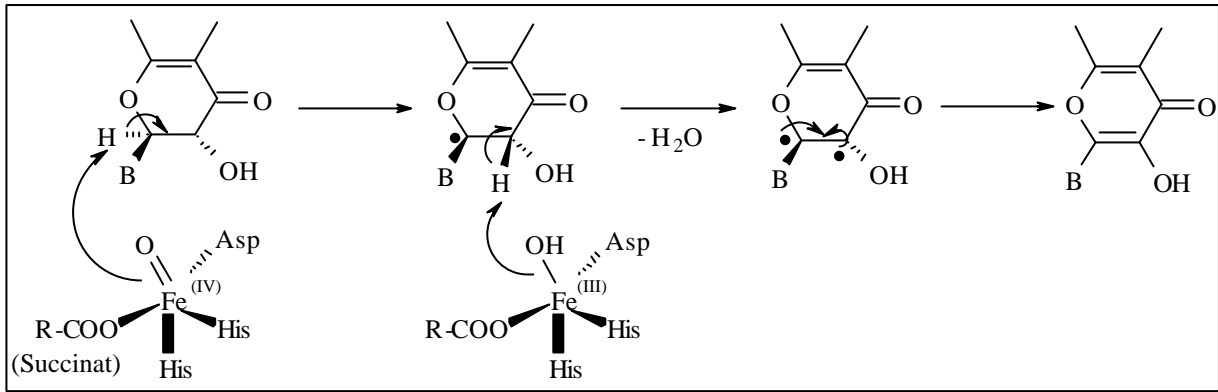


Abb. 48: Postulierter Desaturase-Mechanismus für die Bildung von Flavonolen (Britsch, 1990).

Danach abstrahiert die Oxo-Ferrylspezies (s. auch A 4.5, Abb. 5) durch homolytische Spaltung das Proton an C2 unter Bildung eines benzyl-stabilisierten, radikalischen Intermediats. Die Abspaltung eines zweiten Protons an C3 führt nach intramolekularer Rekombination des Diradikals zum desaturierten Produkt.

Aus den jüngsten Untersuchungen der ANS aus *Arabidopsis thaliana* wurde für die Flavonolbildung durch die ANS eine stereoselektive *cis*-Hydroxylierung (*cis* in Bezug auf den B-Ring) an C3 abgeleitet und gleichermaßen für die FLS postuliert (Welford *et al.*, 2001; Wilmouth *et al.*, 2002). Danach wird ein intermediäres, geminales Diol an C3 als Zwischenstufe vorgeschlagen, das nach *trans*-Eliminierung von Wasser zum Flavonol führt (**Abb. 49**).

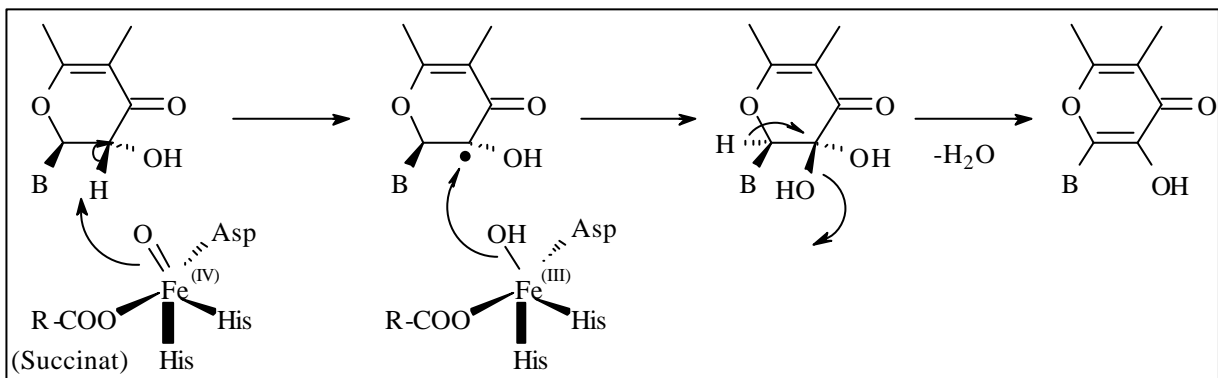


Abb. 49: Postulierte C3-*cis*-Hydroxylierung für die Bildung von Flavonolen (Wilmouth *et al.*, 2002).

Nach Vorschlag der Autoren spaltet die Oxo-Ferrylspezies (s. auch A 4.5, Abb. 5) in einer ersten Reaktion ein Proton an C2 ab und hydroxyliert anschließend in einem "Rebound"-Mechanismus an C3. Die *trans*-Eliminierung von Wasser führt dann zum Flavonol.

Für eine C-3-Hydroxylierung spricht insbesondere die Tatsache, dass im FLS-Aktivitätstest eingesetztes (2*S*)-Naringenin sowie (2*R*)-Naringenin zur Bildung von Dihydroflavonolen führte. Ein Nachweis für die Bildung von *cis*-DHK nach Inkubation mit (2*S*)-Naringenin konnte indes durch die FLS aus *Citrus unshiu* nicht erbracht werden, und unsere Ergebnisse widersprechen den kürzlich für die FLS aus *Arabidopsis thaliana* veröffentlichten Daten, nach denen (-)-*cis*-DHK und Kämpferol in etwa gleicher Menge, sowie in geringerem Ausmaß (-)-*trans*-DHK als Produkte entstehen sollen (Prescott *et al.*, 2002). Zur Kontrolle wurde nach Welford *et al.*, (2001) (±)-Naringenin in präparativem Maßstab mit der ANS aus *Gerbera hybrida* inkubiert und auf diese Weise (-)-*cis*-DHK hergestellt, das über ¹H-NMR-Analyse identifiziert wurde (Daten nicht gezeigt). Dieses Dihydroflavonol wurde nur sehr gering von der *Citrus*-FLS umgesetzt und dürfte infolgedessen kein Zwischenprodukt für die Kämpferolbildung darstellen. Aus den dargelegten Gründen erscheint eine stereospezifische *cis*-Hydroxylierung an C3 als möglicher FLS-Mechanismus wenig wahrscheinlich.

In den durchgeführten Experimenten konnte die Bildung von physiologischem (+)-*trans*-DHK nicht belegt werden. Trotzdem wäre es vorstellbar, dass die Umsetzung von (2*S*)-Naringenin zum Kämpferol über (+)-*trans*-DHK verläuft, das unmittelbar nach Bildung weiter zum Flavonol umgewandelt wird und aus diesem Grund nicht detektiert werden kann.

Für die Umsetzung der Dihydroflavonolen zu den entsprechenden Flavonolen kann weiter ein Desaturase-Mechanismus nicht ausgeschlossen werden (Britsch, 1990; Heller & Forkmann, 1999).

Auch der Weg einer C2-Hydroxylierung zur Einführung der C2-C3-Doppelbindung der Flavone und Flavonole wäre denkbar. Allerdings sprechen frühere Untersuchungen der FNS I aus Petersilie, in denen chemisch synthetisiertes 2-Hydroxynaringenin als Substrat angeboten wurde, gegen diese Annahme (Britsch, 1990). Für FLSs wurden bisher keine entsprechenden Experimente durchgeführt.

Aus den Kristallstrukturdaten der ANS wurden zwei potentielle Bindungsstellen für Dihydroquercetin vorgeschlagen, über die (2*R*, 3*R*)-*trans*-Dihydroflavonol sowie das (2*S*, 3*S*)-Enantiomer durch spezifische Interaktionen stereoselektiv gebunden werden könnten (Wilmouth *et al.*, 2002). Die Beobachtung von zwei gleichzeitig im aktiven Zentrum vorliegenden DHQ-Molekülen scheint ein Artefakt darzustellen, zumal die Produktfreisetzung durch ein weiteres Substrat im aktiven Zentrum behindert werden würde. Entsprechende *in vitro*-Mutagenesestudien könnten möglicherweise Aufschluss darüber geben, ob ANS und unter Umständen auch FLS tatsächlich zwei stereospezifische Bindungsmöglichkeiten bzw. eventuell Umsetzungsmöglichkeiten besitzen.

Unbeantwortet ist auch die Frage, welche Aminosäuresequenz- bzw. Strukturunterschiede zwischen ANS und FLS, die eigentliche Anthocyanidinsynthaseaktivität ausmachen. Die Generierung entsprechender Enzymchimären könnte zur Klärung dieser Frage beitragen.

Außerdem scheint die Kristallisation der FLS unerlässlich, um exakte Aussagen über Struktur und Mechanismus von Flavonolsynthasen treffen zu können.

Bisherige Untersuchungen deuten nicht darauf, dass die FLS auch *in vivo* als FHT funktioniert. In *En-1*-Mutanten von *Arabidopsis thaliana* führte eine Blockade der FHT zur vollständigen Unterdrückung der Flavonoidsynthese. Dies lässt vermuten, dass die FLS die FHT *in vivo* nicht funktionell ersetzen kann und würde für eine Organisation der Flavonoidenzyme in einem Multienzymkomplex sprechen. Andererseits geben neueste Ergebnisse zu bedenken, dass die FLS aus *Arabidopsis thaliana*, entgegen den hier vorgestellten Daten für die FLS aus *Citrus unshiu*, (2*R*)-Naringenin deutlich dem physiologischen (2*S*)-Enantiomer für die katalytische Umsetzung bevorzugt (Prescott *et al.*, 2002). Das Vorkommen von signifikanten Mengen an *R*-konfigurierten Dihydroflavonolen in Pflanzen erscheint allerdings eher unwahrscheinlich. Die Chalkonisomerase (CHI) katalysiert die Zyklisierung des Chalkons mit einer Präferenz von 100.000 :1 für das *S*-Isomer gegenüber dem *R*-Isomer. Die Umsetzungsrate der CHI für die Umwandlung von 6'-Desoxychalkon übertrifft die spontane Bildungsrate deutlich (Jez *et al.*, 2000). Die im Flavonoidbiosyntheseweg nachfolgende FHT setzt stereospezifisch die (2*S*)-Flavanone zu (2*R*, 3*R*)-Dihydroflavonolen um (Britsch & Grisebach 1986). (2*R*)-Flavanone sollten somit *in vivo* der FLS bzw. ANS kaum für eine enzymatische Umsetzung zur Verfügung stehen.

Die Bildung von 2,3-*cis*-Dihydroflavonolen durch die ANS und eventuell FLS könnte *in vivo* durchaus von Bedeutung sein. So findet sich im Pflanzenreich in der (-)-Epicatechin-Familie der Proanthocyanidine eine 2,3-*cis*-Stereochemie wieder. Über die Biosynthese dieser Naturstoffgruppe ist bisher nur wenig bekannt. Eine enzymatische Bildung von 2,3-*cis*-Dihydroflavonolen könnte *in vivo* eine Vorstufe im Biosyntheseweg der 2,3-*cis*-Proanthocyanidine sein. Bisher wurde postuliert, dass möglicherweise eine C-3-Epimerase 2,3-*trans* Dihydroflavonole in die 2,3-*cis*-Form umwandelt (Stafford, 1983).

Die breite Substratspezifität von FLS und ANS könnte eine unfertige Evolution der Selektivitäten oder einen Weg beider Enzyme zur Entwicklung redundanter Spezifitäten widerspiegeln. Dagegen konnte kürzlich in unserer Arbeitsgruppe für die FHT und FNS I eine enge Substratspezifität belegt werden (unpublizierte Ergebnisse). Dies lässt die Überlegung zu, eine allgemeine Unterteilung 2-Oxoglutarat-abhängiger Dioxygenasen der

Flavonoidbiosynthese zu treffen, in Enzyme enger Substratspezifität, wie FHT bzw. FNS I und in Enzyme breiter Substratspezifität, wie ANS und FLS.

F Zusammenfassung

Flavonole sind im Pflanzenreich weit verbreitete Sekundärmetaboliten und erfüllen eine Reihe wichtiger Funktionen u.a. als Pigmente, UV-Schutzfaktoren, Phytoalexine und Signalmoleküle. Bestimmte Flavonole, wie z.B. Quercetin sind aufgrund ihrer vielfältigen pharmakologischen Wirkungen von großem medizinischen Interesse (Harborne, 2000). Flavonole entstehen durch oxidative Desaturierung von (2*R*, 3*R*)-Dihydroflavonolen. Diese Reaktion wird katalysiert durch eine Fe^{II}/2-Oxoglutarat-abhängige Flavonolsynthase (FLS) in Gegenwart von molekularem Sauerstoff. Enzyme dieser Klasse der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen sind an verschiedenartigen Reaktionen in Pflanzen, Mikroorganismen und Säugern beteiligt und weisen untereinander auffällige mechanistische und strukturelle Ähnlichkeiten auf (Ryle, 2002).

- Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine FLS-cDNA aus *Citrus unshiu* zunächst funktionell in *E. coli* exprimiert und das Enzym anschließend bis zur apparenten Homogenität gereinigt werden. Die sequentielle Anwendung von Größenausschluss- und Anionenaustausch-chromatographie erwies sich als äußerst effektiv und lieferte aus 3,3 g Bakterien (Feuchtwicht) 110 µg apparent homogenes Enzym. Diese Methode bietet sich auch für die Isolierung weiterer 2-Oxoglutarat-abhängiger Dioxygenasen aus der Flavonoidbiosynthese an.
- Mit dem vollständig gereinigten Enzym konnte erstmalig mittels HPLC-Analyse eine FLS kinetisch und biochemisch charakterisiert werden. Es wurde ein breites Temperaturoptimum zwischen 30 und 40°C° nachgewiesen. Das pH-Optimum lag mit pH 5,0 ungewöhnlich niedrig. Die apparenten Michaelis Konstanten wurden für die Kofaktoren Fe²⁺ und 2-Oxoglutarat mit 11 bzw. 36 µM, für die Substrate Dihydroquercetin und Dihydrokämpferol mit 272 bzw. 45 µM bestimmt. Damit konnte gezeigt werden, dass Dihydrokämpferol das bevorzugte Substrat darstellt, obgleich *Citrus unshiu* hauptsächlich Quercetin-3-*O*-rutinosid akkumuliert.
- Durch Sequenzvergleiche mit anderen 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen und verwandten Enzymen konnten neben den Kofaktor-bindenden Resten auch drei streng konserviert auftretende Aminosäuren (Glycin 68, Glycin 261, Prolin 207) identifiziert werden, deren Funktion bisher noch unklar ist. Mit Hilfe der *in vitro*-Mutagenese wurde der strukturelle Beitrag dieser Aminosäurereste untersucht: Danach sind Glycin 68 und Glycin 261 offensichtlich bedeutsam für eine korrekte Faltung des Proteins. Prolin 207

konnte ohne Aktivitätsverlust durch einen Glycinrest ausgetauscht werden und ist demnach für die Funktion und die Struktur des Enzyms wahrscheinlich nicht relevant.

- Eine auffallend hohe Homologie konnte zwischen Anthocanidinsynthase (ANS) und FLS festgestellt werden. Die kürzliche Veröffentlichung der ANS-Kristallstruktur (Wilmouth *et al.*, 2002) lieferte die Grundlagen zur Berechnung eines homologiebasierten FLS-Modells mit sehr hoher struktureller Ähnlichkeit zur ANS.
- Ergänzende CD-spektroskopische Untersuchungen konnten Gemeinsamkeiten zwischen der hier untersuchten FLS und der Flavanon 3 β -Hydroxylase (FHT) aus *Petunia hybrida* aufzeigen und somit die hohe strukturelle Verwandtschaft innerhalb der Klasse der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen bestätigen.
- Western-Blot-Analysen belegen eine immunologische Verwandtschaft zwischen der *Citrus*-FLS und der ANS aus *Gerbera hybrida*, wobei polyklonales Antiserum gegen rekombinante FLS mit der ANS kreuzreagierte. FHT aus *Petunia hybrida* und Flavonsynthase I (FNS I) aus *Petroselinum crispum* reagierten nicht. Antiserum gegen FNS I oder FHT zeigte ebenfalls keine Reaktion mit der *Citrus*-FLS.
- Für die ANS aus *Arabidopsis* wurde eine überraschend geringe Substratspezifität beschrieben, da auch Reaktionen vom FHT- und FLS-Typ katalysiert werden (Welford *et al.*, 2001), was entsprechende Untersuchungen zur Substratspezifität der FLS interessant erscheinen ließ. Trotz der hohen strukturellen und mechanistischen Verwandtschaft beider Enzyme konnte für die FLS keine ANS-Aktivität gemessen werden. Es stellte sich heraus, dass die FLS analog zur ANS *in vitro* in der Lage ist, (2*S*)-Naringenin zu Kämpferol umzusetzen, wobei sich zusätzlich Spuren von (-)-*trans*-Dihydrokämpferol detektieren ließen. Überraschend ist der Befund, dass auch das nicht physiologische (2*R*)-Naringenin von der FLS als Substrat akzeptiert und zu (-)-*trans*-Dihydrokämpferol umgesetzt wird, wohingegen z.B. die FHT spezifisch (2*S*)-Flavanone umsetzt. Als mögliches Zwischenprodukt der FLS-Reaktion wurde (-)-*trans*-Dihydrokämpferol isoliert, das aber bei erneuter Inkubation mit der FLS nur Spuren von Kämpferol lieferte. Diese Ergebnisse charakterisieren die FLS als multifunktionelles Enzym, wobei die physiologische Relevanz dieser Eigenschaften zu klären bleibt. Zum Reaktionsmechanismus des Enzyms sind letzte Aussagen bisher nicht möglich. Die Resultate sprechen jedoch gegen die kürzlich vorgeschlagene intermediäre *cis*-Hydroxylierung an C3 (Wilmouth *et al.*, 2002).

G Literaturverzeichnis

Ahmed M.S., Ramsh V., Nagaraja V., Parish J.H. & Hadi S.M. (1994); Mode of binding of quercetin to DNA. *Mutagenesis* **9**, 193-197.

Anzellotti D. & Ibrahim R.K. (2002); Novel flavonol 2-oxoglutarate dependent dioxygenase: Affinity purification, characterization and kinetic properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **15**, 161-172.

Baldwin J.E., Adlington R.M., Moroney S.E., Field L.D. & Ting H.H. (1984); Stepwise ring closure in penicillin biosynthesis. Initial beta-lactam formation. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **2**, 984-986.

Bassuk J.A., Kao W.W.-Y. Herzer P., Kedersha N.L., Seyer J., De Martino J.A., Daugherty B.L., Mark GE. & Berg R.A. (1989); Prolyl 4-hydroxylase: molecular cloning and the primary structure of the α -subunit from chicken enzyme. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 7382-7386.

Bensadoun A. & Weinstein B. (1976); Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* **70**, 201-250.

Beggs, C.J. & Wellmann, E. (1985) Analysis of light-controlled anthocyanin formation in coleoptiles of *Zea mays* L.: the role of UV-B, blue, red and far-red light. *Photochemistry and Photobiology* **41**, 481-486.

Beggs, C.J., Kuhn, K., Böcker, R. & Wellmann, E. (1987) Phytochrome-induced flavonoid biosynthesis in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons. Enzymic control and differential regulation of anthocyanin and quercetin formation. *Planta* **172**, 121-126.

Beggs, C.J. & Wellmann, E. (1994) Photocontrol of flavonoid biosynthesis. In: Photomorphogenesis in Plants, 2nd Ed. (R.E. Kendrick & G.H.M. Kronenberg, eds.), *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*, 733-751.

Blount J.W., Korth K.L.; Masoud S.A.; Rasmussen S., Lamb C. & Dixon R.A. (2000); Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology* **122**, 107-116.

Bolwell G.P., Bell J.N., Cramer C.L., Schuch W., Lamb C.J. & Dixon R.A. (1985); L-Phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris*. Characterisation and differential induction of multiple forms from elicitor-treated cell suspensions cultures. *Eur. J. Biochem.* **149**, 411-9.

Bolwell G.P., Cramer C.L., Schuch W., Lamb C.J. & Dixon R.A. (1986); L-Phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris*: modulation of the levels of active enzyme by trans-cinnamic acid. *Planta* **169**, 97-107.

Borovok I., Landman O., Kreisberg-Zakarin R., Aharonowitz Y. & Cohen G. (1996); Ferrous active site of isopenicillin N-synthase: Genetic and sequence analysis of the endogenous ligands. *Biochemistry* **35**, 1981-1987.

Britsch L., Heller W. & Grisebach H. (1981); Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley. *Z. Naturforsch.* **36**, 742-750.

Britsch L. & Grisebach H. (1986); Purification and characterization of (2S)-flavanone 3-hydroxylase from *Petunia hybrida*. *Eur. J. Biochem.* **156**, 569-577.

- Britsch** L. (1990); Purification and characterization of flavone-synthase I, a 2-oxoglutarate-dependent desaturase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **282**, 152-160.
- Britsch** L., Ruhnau-Brich B & Forkmann G. (1992); Molecular cloning, sequence analysis, and *in vitro* expression of flavanone 3 β -hydroxylase from *Petunia hybrida*. *J. Biol. Chem.* **267**, 5380-5387.
- Britsch** L., Dedio J., Saedler H. & Forkmann G. (1993); Molecular characterization of flavanone 3 β -hydroxylases: Consensus sequence, comparison with related enzymes and the role of conserved histidine residues. *Eur. J. Biochem.* **217**, 745-754.
- Bruick** R.K. & McKnight S.L. (2001); A conserved family of Prolyl-4-hydroxylase that modify HIF. *Science* **294**, 1337-1340.
- Brunhuber** N.M.W., Mort J.L., Christoffersen R.E. & Reich N.O. (2000); Steady-state kinetic mechanism of recombinant Avocado ACC oxidase: Initial velocity and inhibitor studies. *Biochemistry* **39**, 10730-10738.
- Buchholz** G., Ehmann B. & Wellmann E. (1995) Ultraviolet light inhibition of phytochrome-induced flavonoid biosynthesis and DNA photolyase formation in mustard cotyledons. *Plant Physiology* **108**, 227-234.
- Bugg** T.D.H. (2001); Oxigenases: mechanisms and structural motifs for O₂ activation. *Current Opinion in Chemical Biologie* **5**, 550-555.
- Burblis** I.E. & Winkel-Shirley B. (1999); Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavanoid pathway. *PNAS* **96** (22), 12929-12934.
- Busby** R.W., Chang M.D.-T., Busby R.C., Wimp J. & Townsend C.A. (1995); Expression and purification of two isozymes of clavaminase synthase and initial characterization of the iron binding site: General error analysis in polymerase chain reaction amplification. *J. Biol. Chem.* **270**, 4262-4269.
- Burzlaff** N. I., Rutledge P.J., Clifton I.J., Hensgens C.M.H., Pickford M., Adlington R.M., Roach P.L. & Baldwin J.E. (1999); The reaction cycle of isopenicillin N-synthase observed by X-ray diffraction. *Nature* **401**, 721-724.
- Carolis** E. De & De Luca V. (1994); 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenase and related Enzymes: Biochemical characterisation. *Phytochemistry* **36** : 1093-1107.
- Cheun** A.Y. (1996); Pollen-pistil interactions during pollen-tube growth. *TRENDS in Plant Science* **1**, 45-51.
- Cho** K.H., Pezzuto J.M., Bolton J.L., Steel V.E., Kelloff G.J., Lee S.K. & Constantinou A. (2000); Selektion of cancer chemopreventive agents based on inhibition of topoisomerase II activity. *European Journal of Cancer* **36**, 2146-2156.
- Christensen** A.B., Gregersen P.L., Schröder J. & Collinge D.B. (1998); A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light or fungal elicitor. *Plant Mol. Biol.* **37**, 849-857.
- Clifton** I.J., Hsueh L-C., Baldwin J.E., Harlos K. & Schofield C.J. (2001); Structure of proline 3-hydroxylase : Evolution of the family of 2-oxoglutarate dependent oxygenases. *Eur. J. Biochem.* **268**, 6625-6636.
- Cohen** S.N., Chang A.C.Y. & Hsu L. (1972); Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria. Genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2110-2114.

- Constantiou** A., Mehta R., Runyan C., Rao K, Vaughan A. & Moon R. (1995); Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *J. Natural Products* **58**, 217-225.
- Cooper-Driver** G. (2001); Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry* **56**, 229-236.
- Crowe** J. & Henco K. (1992); *The QIAexpressionist*, Quiagen Inc., Chatsworth, California, USA.
- Csokay** B., Prajda N., Weber G. & Olah E. (1997); Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sciences* **60**, 2157-2163.
- Cullimore** J.V., Ranjeva R. & Bono J-J. (2001); Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *TRENDS in Plant Science* **6**, 24-30.
- Divi** R.L. & Doerge D.R. (1996); Inhibition of thyroid peroxidase by dietary flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 16-23.
- Dixit** R. & Gold B. (1986); Inhibition of *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced mutagenicity and DNA methylation by ellagic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8039-8043.
- Dixon** R. A. & Steele L. (1999); Flavonoids and isoflavonoids -a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Sciences* **4**, 394-400.
- Dotzlaw** J.E. & Yeh W.K. (1987); Copurification and Characterization of Deacetoxycephalosporin C synthase/ hydroxylase from *Cephalosporium acremonium*. *J. Bacteriol.* **169**, 1611-1618.
- Duell-Pfaff** N. & Wellmann E. (1982) Involvement of phytochrome and a blue light photoreceptor in UV-B induced flavonoid synthesis in parsley (*Petroselinum hortense* Hoffm.) cell suspension cultures. *Planta* **156**, 213-217.
- Durairaj** M., Leskiw B.K. & Jensen S.E. (1996); Genetic and biochemical analysis of the cysteinyl residues of Isopenicillin N-Synthase from *Streptomyces clavuligerus*. *Can. J. Microbiol.* **42**, 870-875.
- Ehltng** J., Shin J.K. & Douglas C.J. (2001); Identification of 4coumarate: coenzyme A-ligase (4CL) substrate recognition domains. *The Plant Journal* **27**, 455-465.
- Ferguson** L.R., (2001); Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research* **475**, 89-111.
- Ferrer** J.-L., Jez J.M., Bowmann M.E., Dixon R.A. & Noel J.P. (1999); Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 775-784.
- Figueiredo** P. & Brouillard R. (1996); New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular co-pigmentation as means for color loss? *Phytochemistry* **41**, 301-309.
- Fisher** R.F. & Long S.R. (1992); *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature* **357**, 655-660.
- Formica** J.V. & Regelson W. (1995); Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Fd Chem. Toxic* **33**, 1061-1080.
- Forkmann** G. & Heller W. (1999); Biosynthesis of flavonoids. in: Comprehensive Natural Products Chemistry. ed Barton D., Nakanishi K., Elsevier, p. 713.
- Foyer** C.H., Lelandais, M. & Kunert, K.J. (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* **92**, 696-717.

- Fritsch** H. & Griesebach H. (1975); Biosynthesis of cyanidin in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Phytochemistry* **14**, 2437-2442.
- Fujiwara** H. & Kusumi T. (1998); cDNA cloning, gene expression and subcellular localization of anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora*. *Plant J.* **16**, 421-431.
- Fukumori** F. & Hausinger R.P. (1993); Purification and characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetate/ α -ketoglutarate dioxygenase. *J. Biol. Chem.* **268**, 24311-24317.
- Gäbler** G., Graefe E.U., Struck F., Veit M. & Gebhardt R. (2002); Comparison of antioxidative capacities and inhibitory effects on cholesterol biosynthesis of quercetin and potential metabolites. *Phytomedicine* **9**, 33-40.
- Gatto** M. T., Falcocchio S., Grippa E., Mazzanti G., Battinelli L., Nicolosi G., Lambusta D. & Saso L (2002). Antimicrobial and anti-lipase activity of Quercetin and its C2-C16 3-O-acyl-esters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **10**, 269-272.
- Gee** M.J., Dupont S.M., Rhodes C.J.M. & Johnson T.I. (1998); Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radical Biology & Medicine* **25**, 19-25.
- Grichko** V.P. & Glick B.R. (2001); Ethylene and flooding stress in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **39**, 1-9.
- Griffiths** L.A. (1982); Mammalian metabolism of flavonoids. In *Harborne J, Mabry T, eds. The Flavonoids: Advances in Research. London: Chapman and Hall, 1982: 681-718.*
- Gröning** I., (2000); Flavanon β -Hydroxylase aus *Petunia hybrida*. Charakterisierung der Sekundärstruktur und Inhibitorstudie. Dissertation, Marburg/Lahn.
- Guex** N. & Peitsch M.C. (1997); Swiss-Model and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.
- Hahlbrock** K. & Scheel D. (1989); Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**, 347-369.
- Halkier** B.A. (1996); Catalytic reactivities and structure/function relationships of cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry* **43**, 1-21.
- Harborne** J. (2000); Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504.
- Helaakoski** T., Veijola J., Vuori K., Rehn M., Chow L.T., Taillon-Miller P., Kivirikko K. & Pihlajaniemi T. (1994); Structure and expression of the human gene for the α -subunit of prolyl 4-hydroxylase: The two alternatively spliced types of mRNA correspond to two homologous exons the sequences of which are expressed in a variety of tissues. *J. Biol. Chem.* **269**, 27847-27854.
- Heller** W. & Forkmann G., (1993); Biosynthesis of flavonoids. In: *Harborne J.B., The Flavonoids-Advances in Research Since 1986, Chapman & Hall, London, p. 527.*
- Herbert** D., Price L.J., Alban C., Dehaye L., Job D., Cole D.J., Pallett K.E. & Harwood J.L. (1996); Kinetic studies on two isoforms of acetyl-CoA carboxylase from maize leaves. *Biochem. J.* **318**, (997-1006).
- Hertog** M.G.L., Feskens E.J.M., Hollmann P.C.H., Katan M.B. & Kromhout D. (1993); Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* **342**, 1007-1011.
- Hieta** R. & Myllyharju J. (2002); Cloning and Characterization of a Low Molecular Weight Prolyl 4-Hydroxylase from *Arabidopsis thaliana*. *J.Biol.Chem.* **26**, 23965-23971.

- Hodek** P., Trefil P. & Stiborova M. (2002); Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions* **139**, 1-21.
- Hollmann** P.C.H., de Vries J.H.M., van Leeuwen S.D., Mengelers M.J.B. & Katan M.B. (1995); Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**, 1276-1282.
- Hollmann** P.C.H., Gaag V.D.M., Mengelers M.J.B., van Trijp J.M.P., de Vries J.H.M. & Katan M.B. (1996); Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radical Biology & Medicine* **21**, 703-707.
- Hollmann** P.C.H. & Katan M.B. (1997^a); Absorption metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed & Pharmacother* **51**, 305-310.
- Hollmann** P.C.H., van Trijp J.M.P, Buysman N.C.P., Gaag V.D.M., Mengelers M.J.B, de Vries J.H.M. & Katan M.B. (1997^b); Relative bioavailability of antioxidant flavanoid quercetin from various foods in man. *FEBS* **418**, 152-156.
- Holme** E. (1975); A kinetic study of thymine 7-hydroxylase from *Neurospora crassa*. *Biochemistry* **14**, 4999-5003.
- Holton** T.A., Brugliera F. & Tanaka Y. (1993); Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*. *Plant J.* **4**, 1003-1010.
- Horton** R.D. & Lord S.T. (1986); *In vitro* methylation doubles the efficiency of oligonucleotide-directed mutagenesis. *Nucleic Acid Res.* **14**, 5112.
- Hrazdina** G. & Wagner G.J. (1985); Metabolic pathways as enzyme complexes: Evidence for the synthesis of phenylpropanoids and flavanoids on membrane-associated enzyme complexes. *Arch. Biochem. Biophys.* **237**, 88-100.
- Hrazdina** G. & Jensen R.A. (1992); Spatial organization of enzymes in plant metabolic pathways. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* **43**, 241-267.
- Iturraizagoitia-Bueno** T., Gibson E.J., Schofield C.J. & John P. (1996); Inhibition of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by 2-oxoacids. *Phytochemistry* **43**, 343-349.
- Jez** J.M., Ferrer J.-L., Bowmann M.E., Dixon R.A., Schröder J. & Noel J.P (2000); Structural control of a polyketide formation in plant specific polyketide synthases. *Chem. Biol.* **7**, 919-930.
- Jez** J.M., Ferrer J.-L., Bowmann M.E., Dixon R.A & Noel J.P (2000); Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase. *Natur Structural Biology* **7**, 786-791.
- Johnson** K. M. & Loo G. (2000); Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutation Research* **459**, 211-218.
- Kivirikko** K.I. & Myllyharju J. (1998); Prolyl 4-hydroxylase and their protein disulfide isomerase subunit. *Matrix Biol* **16** : 357-368.
- Kivirikko** K.I. & Pihlajaniemi T. (1998); Collagen hydroxylases and the Protein disulfide isomerase subunit of prolyl 4-hydroxylases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **2**, 325-400.
- Kondo** N. & Kawashima M. (2000); Enhancement of tolerance to oxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by UV-B irradiation: possible involvement of phenolic compounds and antioxidative enzymes. *Journal of Plant Research* **113**, 311-317.

- Kopetzki** E., Schumacher G. & Buckel P. (1989); Control of formation of active soluble or inactive insoluble baker's yeast alpha-glucosidase PI in *Escherichia coli* by induction and growth conditions. *Mol. Gen. Genet.* **216** (1), 149-155.
- Kumar** A. & Ellis B. (2001); The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression, and evolution. *Plant Physiology* **127**, 230-239.
- Kunkel** T.A. (1985); Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 488-492.
- Kunkel** T.A., Roberts J.D. & Zakour R.A. (1987); Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* **154**, 367-382.
- Kuo** S.M. & Leavitt P.S. (1999); Genistein increases metallothionein expression in human intestinal cells, caco-2. *Biochem. Cell Biol.* **77**, 79-88.
- Laemmli** U.K. (1970); Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-684.
- Larson**, R.A. (1988) The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* **27**, 969-978.
- Lee** H.-J., Lloyd M.D., Harlos K., Clifton I.J., Baldwin J.E. & Schofield C.J. (2001); Kinetic and crystallographic studies on deacetoxycephalosporin C synthase (DAOCS). *J. Mol. Biol.* **308**, 937-948.
- Lee** H., Schofield C.J. & Lloyd D.M. (2002); Active site mutations of recombinant deacetoxycephalosporin C Synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **292**, 66-70.
- Lin** J.K., Liang Y.C. & Lin-Shiau S.Y. (1999); Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signals transduction blockade. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 911-915.
- Lindermayr** C., Möllers B., Fliegmann J., Uhlmann A., Lottspeich F., Meimberg H. & Ebel J. (2002); Divergent members of soybean (*Glycine max* L.) 4-coumarate: coenzyme A ligase gene family. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1304-1315.
- Liu** Q., Bonness M.S., Liu M., Seradge E., Dixon R.A. & Mabry T.J. (1995); Enzymes of B-ring-deoxy flavonoid biosynthesis in elicited cell cultures of old man cactus (*Cephalocereus senilis*). *Arch. Biochem. Biophys.* **321** (2), 397-404.
- Logemann** E., Parniske M. & Hahlbrock K. (1995); Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5905-5909.
- Lowry** O.H., Roesbrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951); Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lukacin** (1997); Molekulare und Strukturelle Charakterisierung der Flavanon 3 β -Hydroxylase aus *Petunia hybrida*, einer 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenase der Flavonoidbiosynthese. Dissertation. Universität Freiburg.
- Lukacin** R. & Britsch L. (1997); Identification of strictly conserved histidine and arginine residues as part of the active site in *Petunia hybrida* flavanone 3 β -hydroxylase. *Eur. J. Biochem.* **249**, 748-757.
- Lukacin** R., Urbanke C., Gröning I. & Matern U. (2000); The monomeric polypeptide comprises the functional flavanone 3 β -hydroxylase from *Petunia hybrida*. *FEBS* **467**, 353-358.

- Lukacin** R., Gröning I., Schiltz E., Britsch L. & Matern U. (2000); Purification of recombinant flavanone 3 β -hydroxylase from *Petunia hybrida* and assignment of the primary site of proteolytic degradation. *Arch. Biochem. Biophys* **375**, 364-370.
- Lukacin** R., Gröning I., Pieper U. & Matern U. (2000); Site-directed mutagenesis of the active site serine 290 in flavanone 3 β -hydroxylase from *Petunia hybrida*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 853-860.
- Lukacin** R., Matern U., Junghanns K.T., Heskamp M-L., Britsch L., Forkmann G. & Martens S. (2001); Purification and antigenicity of flavone synthase I from irradiated parsley cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **393**, 177-183.
- Lukacin** R., Schreiner S. & Matern U. (2001); Transformation of acridone synthase to chalcone synthase. *FEBS Letters* **508**, 413-417.
- Mansuy** D. (1997); The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C* **121**, 5-14.
- Manthey** J.A., (2000); Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirculation* **6**, 29-34.
- Markham** K.R., Tanner G.J., Caasi-Lit M., Whitecross M.I., Nayudu M. & Mitchell K.A. (1998); Possible protective role for 3', 4'-dihydroxyflavones induced by enhanced UV-B in a tolerant rice cultivar. *Phytochemistry* **49**, 1913-1919.
- Markham** K., Gould K., Winefield C., Mitchell K., Bloor S. & Boase M. (2000); Anthocyanic vacuolar inclusions -their nature and significance in flower colouration. *Phytochemistry* **55**, 327-336.
- Marrs** K.A., Walbot V. (1995); A glutathion S-transferase involved in vacolar transfer encoded by maize gene Bronze-2. *Nature* **375**, 397-400.
- Martens** S. & Forkmann G. (1999); Cloning and expression of flavone synthase II from *Gerbera* hybrids. *The Plant Journal* **20**, 611-618.
- Martens** S., Forkmann G., Matern U. & Lukacin R. (2001); Cloning of parsley flavone synthase I. *Phytochemistry* **58**, 43-46.
- Meng** H. & Chambell W.H. (1996); Facile enzymatic synthesis of caffeoyl-CoA. *Phytochemistry* **4**, 605-608.
- Middleton** E.J. & Kandaswami C. (1994); The Impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: *Harborne J.B., The Flavonoids-Advances in Research Since 1986, Chapman & Hall, London*, p.621-622.
- Moriguchi** T., Kita M., Ogawa K., Tomono Y., Endo T. & Omura M. (2002); Flavonol synthase gene expression during citrus fruit development. *Physiologia Plantarum* **114**, 251-258.
- Mo** Y., Nagel C. & Taylor L.P. (1992); Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proc. Natl. Sci. USA* **89**, 7213-7217.
- Mol** J., Grotewold E. & Koes R. (1998); How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Sciences*. **3**, 212-217.
- Murphy** A., Peer W.A. & Taiz L. (2000); Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta* **211**, 315-324.

- Myllyla** R., Majamaa K., Gunzler V., Hanauske-Abel H.M. & Kivirikko K.I. (1984); Ascorbate is consumed stoichiometrically in the uncoupled reactions catalyzed by prolyl 4-hydroxylase and lysyl hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **259**, 5403-5405.
- Myllylae** R., Pihlajaniemi T., Pajunen L., Turpeenniemi-Hujanen & Kivirikko K. (1991); Molecular cloning of chick lysylhydroxylase: Little homology in primary structure to the two types of subunit of prolyl 4-hydroxylase. *J.Biol.Chem.* **266**, 2805-2810.
- Myllylae** R., Gunzler V., Kivirikko K. & Kaska K. (1992); Modification of vertebrate and algae prolyl 4-hydroxylase by diethylpyrocarbonate. Evidence for histidine residues in the catalytic site of 2-oxoglutarate coupled dioxygenases. *Biochem. J.* **286**, 923-927.
- Nardini** M., Pisu P., Gentili V., Natella F., Di Felice M., Piccolella E. & Scaccini C. (1998); Effect of caffeic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in U937. *Free Radical Biology & Medicine* **25**, 1098-1105.
- Packer** L., Rimbach G. & Virigili F. (1999); Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radical Biology & Medicine* **27**, 704-724.
- Pagonis** C., Tauber A. I., Pavlotsky A. & Simon E. R. (1986); Flavonoid impairment of neutrophil response. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 237-245.
- Pavel** E.G., Zhou J., Busby R.W., Gunsior M., Townsend C.A. & Solomon E.I. (1998); Circular dichroism and magnetic circular dichroism spectroscopic studies of the non-heme ferrous active site in clavaminic synthase and its interaction with α -ketoglutarate cosubstrate. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 743-753.
- Pelletier** M.K., Murrell J.R. & Shirley B.W. (1997); Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **113**, 1437-1445.
- Pihlajaniemi** T., Helaakoski T., Tasanen K., Myllylä R., Huhtala M.-L. Koivu J. & Kivirikko K.I. (1987); Molecular cloning of the β -subunit of human prolyl 4-hydroxylase. This subunit and protein disulphide isomerase are products of the same gene. *Embo J.* **6**, 643-649.
- Pihlajaniemi** T. (1994); Structure and expression of the human gene for the alpha-subunit of prolyl 4-hydroxylase. *J.Biol.Chem.* **269**, 27847-27854.
- Pingoud** A. & Urbanke C. 1997; Arbeitsmethoden der Biochemie. *Walter de Gruyter & Co., Berlin*
- Prescott** A.G. (1993); Adilemma of dioxygenases (or where biochemistry and molecular biology fail to meet). *J. Expt. Bot.* **44**, 849-861.
- Prescott** A.G. & John P. (1996); Dioxygenases: Molecular structure and role in plant metabolism. *Annu. Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 245-271.
- Prescott** A.G. & Lloyd D.M. (2000); The iron and 2-oxoacid-dependent dioxygenases and their role in metabolism. *Nat.Prod. Rep.* **17**, 367-383.
- Prescott** A.G., Stamsford N.P.J., Wheeler G. & Firmin J.L. (2002); In vitro properties of a recombinant flavonol synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **60**, 589-593.
- Que** L.Jr. & Ho R.Y.N. (1996); Dioxygen activation by enzymes with mononuclear non-heme iron active sites. *Chem.Rev.* **96**, 2607-2624.
- Rashidi** H. & Bühler L.K. (2001); Grundriss der Bioinformatik. *Spektrum Akademischer Verlag*

- Reed** D.J., Vimmerstedt J., Jerina D.M. & Daly J.W. (1973); Formation of phenols from aromatic substrates by plant and animal mono-oxygenases: the effect of adjacent deuteriums on the magnitude of the NIH shift of tritium. *Arch. Biochem. Biophys.* **154** (2), 642-647.
- Reimold** U., Kroeger M., Kreuzaler F. & Hahlbrock K. (1983); Coding and 3' non-coding nucleotide sequence of chalcone synthase mRNA and assignment of amino acid sequence of the enzyme. *EMBO J.* **2**, 1801-1805.
- Renaud** S. & de Lorgeril M. (1992); Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **339**, 1523-1526.
- Reuber** S., Bornmann J.F. & Weissenböck G. (1996); Phenylpropanoid compounds in primary leaf tissues of rye (*Secale cereale*). Light response of their metabolism and the possible role in UV-B protection. *Physiologia Plantarum* **97**, 160-168.
- Rice-Evans** C., Miller N.J. & Paganda G. (1996); Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology & Medicine* **20**, 933-956.
- Roach** P.L., Clifton I.J., Fülöp V., Harlos K., Barton G.J., Hajdu J., Andersson I., Schofield C.J. & Baldwin J.E. (1995); Crystal structure of isopenicillin N-synthase is the first from a new structural family of enzymes. *Nature* **375**, 700-704.
- Ryle** M.J. & Hausinger R.P. (2002); Non-heme iron oxygenases. *Current Opinion in Chemical Biology* **6**, 193-201.
- Röther** D., Poppe L., Morlock G., Viergutz S. & Rétey J. (2002); An active site homology model of phenylalanine ammonia-lyase from *Petroselinum crispum*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 3065-3075.
- Saito** K., Kobayashi M., Gong Z., Tanaka Y. & Yamazaki M. (1999); Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: molecular cloning and functional expression of cDNA from a red form of *Perilla frutescens*. *The Plant Journal* **17** (2), 181-189.
- Salowe** S.P., Marsh E.N. & Townsend C.A. (1990); Purification and characterization of clavaminic synthase from *Streptomyces clavuligerus*: An unusual oxidative enzyme in natural product biosynthesis. *Biochemistry* **29**, 6499-6508.
- Solomon** E.I., Brunold T.C., Davis M.I., Kemsley J.N., Lee S-K., Lehnert N., Neese F., Skulan A.J. & Yang Y-S., Zhou J. (2000); Geometric and electronic structure/ function correlations in non-heme iron enzymes. *Chem. Rev.* **100**, 235-349.
- Sambrook** J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989); Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*
- Sami** M., Brown T.J.N., Roach P.L., Schofield C.J. & Baldwin J.E. (1997); Glutamine-330 is not essential for activity in Isopenicillin N-synthase from *Aspergillus nidulans*. *FEBS Lett.* **405**, 191-194.
- Sandermann** H. & Strominger L. (1972); Purification and properties of C₅₅-isoprenoid alcohol phosphokinase from *Staphylococcus aureus*. *J.Biol.Chem.* **247**, 5123-5131.
- Sanger** F., Nicklen S. & Coulson A.R. (1977); DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Scheidegger** A., Kuenzi M.T. & Nuesch J. (1984); Partial purification and catalytic properties of a bifunctional enzyme in the biosynthetic pathway of beta-lactams in *Cephalosporium acremonium*. *J. Antibiot.* **37**, 522-531.

- Schein** C. H. & Noteborn M. H. M. (1988); Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperatures. *Bio/Technology* **6**, 291-294.
- Schittko** U., Burghardt F., Fiedler K., Wray V. & Proksch P. (1999); Sequestration and distribution of flavonoids in the common blue butterfly *Polyommatus icarus* reared on *Trifolium repens*. *Phytochemistry* **51**, 609-614.
- Schoenbohm** C., Martens S., Eder C., Forkmann G. & Weisshaar B. (2000); Identification of the *Arabidopsis thaliana* flavonoid 3'-hydroxylase gene and functional expression of encoded P450 enzyme. *Biol. Chem.* **381**, 749-753.
- Schofield** C.J. & Zhang Z. (1999); Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Current Opinion in Structural Biology* **9**, 722-731.
- Schorrosh** B.S., Dixon R.A. & Ohlrogge J.B. (1994); Molecular cloning, characterization, and elicitation of acetyl-CoA carboxylase from *alfalfa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 4323-4327.
- Schröder** J., Raiber S., Berger T., Schmidt A., Schmidt J., Soares-Sello A. M., Bardshiri E., Strack D., Simpson T.J., Veit M. & Schröder G., (1998); Plant polyketide synthase: A chalcone synthase-type enzyme which performs a condensation reaction with methylmalonyl-CoA in the biosynthesis of C-methylated chalcones. *Biochemistry* **37**, 8417-8425.
- Schuster** B. & Retey J. (1995); The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase: the role of prosthetic dehydroalanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (18), 8433-8437.
- Schwede** T.F., Retey J & Schulz G.E. (1999); Crystal structure of histidine ammonia-lyase revealing a novel polypeptide modification as the catalytic electrophile. *Biochemistry* **38**, 5355-5361.
- Skibola** C.F. & Smith M.T. (2000); Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology & Medicine* **29**, 375-383.
- Smith** J.J. & John P. (1984); Activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by bicarbonate/ carbon dioxide. *Phytochemistry* **32**, 1381-1386.
- Spirille** R., Forkmann G. (1984); Conversion of dihydroflavonols to flavonols with enzyme extracts from flower buds of *Matthiola incana*. *Zeitung für Naturforschung* **39c**, 714-719.
- Springob** K., Lukacin R, Ernwein C., Gröning I. & Matern U. (2000); Specificities of functionally expressed chalcone and acridone synthases from *Ruta graveolens*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6552-6559.
- Springob** K. (2001); Polyketidsynthesen aus *Ruta graveolens* L. Molekulare Charakterisierung und Aspekte der Evolution. Dissertation, Marburg/Lahn
- Stafford** H.A. (1983); Enzymic regulation of procyanidin biosynthesis; lack of a flav-3-en-ol intermediate. *Phytochemistry* **22**, 2643-2646.
- Stryer** L. (1999); Biochemie . *Spektrum Akademischer Verlag*: 4. Auflage.
- Stuart** D., (1993); Viruses. *Curr. Opin., Struct., Biol.* **3**, 167-174.
- Thompson** M. & Williams C.R. (1976); Stability of flavonoid complexes of copper (II) and flavonoid antioxidant activity. *Anal. Chim. Acta* **197**, 375-381.
- Thompson**, W.F. & White, M.J. (1991) Physiological and molecular studies of light-regulated nuclear genes in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**, 423-466.

- Thompson** J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. & Higgins D.G. (1997); The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res.* **24**, 4876-4882.
- Towbin** H., Staehelin T. & Gordon J. (1979); Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Turnbull** J.J., Sobey W.J., Aplin R.T., Hassan A., Firmin J.L., Schofield C.J. & Prescott A.G. (2000); Are anthocyanidins the immediate products of anthocyanidin synthase? *Chem. Commun.* 2473-2474.
- Valegård** K., Terwisscha v. Scheltinga A.C., Lloyd M.D., Hara T., Ramaswamy S., Perrakis A., Thompson A, Lee H.J, Baldwin J.E., Schofield C.J., Hajdu J. & Andersson I. (1998); Structure of a cephalosporin synthase. *Nature* **394**, 805-809.
- Van Eldig** G.I., Reijnen W.H., Ruiters R.K., van Herpen M.M.A., Schrauwen J.A.M. & Wullems G.I. (1997); Regulation of flavonol biosynthesis during anther and pistil development, and during pollen tube growth in *Solanum tuberosum*. *Plant J.* **11**, 105-113
- Viera** J. & Messing J. (1987); Production of single-stranded plasmid DNA, *Methods Enzymol.* **153**, 3-11.
- Wade** H.K., Bibikova, T.N., Valentine, W.J. & Jenkins, G.I. (2001); Interactions within a network of phytochrome, cryptochrome and UV-B phototransduction pathways regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* leaf tissue. *Plant Journal* **25** (6), 675-685.
- Walgren** R.A., Walle U.K. & Walle T. (1998); Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biochemical Pharmacology* **55**, 1721-1727.
- Wasmann** C.C. & Van Etten H.D. (1996); Transformation-mediated chromosome loss and disruption of a gene for pisatin demethylase decrease the virulence of *Nectria haematococca* on pea. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**, 317-326.
- Welford** R.W.D., Turnbull J.J., Claridge T.D.W., Prescott A.G. & Schofield C.J. (2001); Evidence for oxidation at C-3 of the flavanoid C-ring during anthocyanin biosynthesis. *Chem. Commun.* 1828-1829.
- Wellmann** E. (1975); UV dose-dependent induction of enzymes related to flavonoid biosynthesis in cell suspension cultures of parsley. *FEBS Letters* **51** (1), 105-107.
- Wellmann** H., Kaltschmidt B. & Kaltschmidt C. (2001); Retrograde transport of transcription factor NF-kappa B in living neurons. *J. Biol. Chem.* **276**, 11821-11829.
- Wilmouth** R.C., Turnbull J.J., Welford R.W.D., Clifton I.J., Prescott A.G. & Schofield C.J. (2002); Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Structure* **10**, 93-103.
- Winkel-Shirley** B. (1999); Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiol. Plant.* **107**, 142-149.
- Winkel-Shirley** B. (2001); Flavonoid Biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol.* **126**, 485-493.
- Wisman** E., Hartman U., Sagasser M., Baumann E., Palme K., Hahlbrock K., Saedler H. & Weisshaar B. (1998); Knock-out mutants from an *En-1* mutagenized *Arabidopsis thaliana* population generate phenylpropanoid biosynthesis phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 12432-12437.

Wu M., Moon H.S. & Begley T.P.(1999); Mechanism-based inactivation of the human prolyl-4-hydroxylase by 5-oxaproline-containing peptides: Evidence for a prolyl radical intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 587-588.

Wu M., Moon H-S, Pirskanen A., Myllyharju J., Kivirikko K.I. & Begley T.P. (2000); Mechanistic studies on prolyl-4-hydroxylase: The vitamin C requiring uncoupled oxidation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **10**, 1511-1514.

Yanisch-Perron C., Viera J. & Messing J. (1985); Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.

Zagursky R.J. & Bermann M.L. (1984); Cloning vectors that yield high levels of single-stranded DNA for rapid DNA sequencing. *Gene* **33**, 183-191.

Zhang Z.H, Ren J.S., Satmmers D.K., Baldwin J.E., Harlos K. & Schofield C.J. (2000); Structural origins of the selectivity of the trifunctional oxygenase clavaminic acid synthase. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 127-133.

Zhou J., Gunsior M., Bachmann B.O., Townsend C.A. & Solomon E.I. (1998); Substrate binding to the α -ketoglutarate-dependent non-heme iron enzyme clavamate synthase 2: Coupling mechanism of oxidative decarboxylation and hydroxylation. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 13539-13540.

Danksagung

Zuallererst danke ich Herrn Professor Dr. Ulrich Matern für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und insbesondere für die zahlreichen hilfreichen Diskussionen, die das Projekt vorangetrieben haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Richard Lukacin für die Überlassung des Forschungsthemas. Unter seiner Federführung entstanden die experimentellen Resultate und mit großem persönlichen Einsatz begleitete er das Entstehen dieser Dissertation.

Herrn Professor Dr. Eckard Wellmann, Institut für Biologie II, Universität Freiburg, danke ich für die Nutzungsmöglichkeit einer HPLC-Anlage, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Dr. S. Martens danke ich für die konstruktive und kooperative Zusammenarbeit sowie die Bereitstellung verschiedener Enzympräparationen und Überprüfung der FLS auf ANS-Aktivität.

Herrn Prof. Dr. A. Batschauer danke ich für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur.

Herrn Dr. L. Britsch (Merck, Darmstadt) danke ich für die Durchführung der MALDI-TOF- und NMR-Analysen.

Herrn Dr. E. Schiltz, Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Freiburg, danke ich für die Durchführung der N-terminalen Sequenzierung der FLS.

Herrn Dr. U. Pieper, Institut für Biochemie, Justus-Liebig-Universität Gießen, sei für die Möglichkeit gedankt, die CD-Spektren aufzunehmen.

Mein Dank gilt selbstverständlich auch Herrn Dr. Takaya Moriguchi, National Institute of Fruit Tree Science, Japan, der den FLS-Klon aus *Citrus unshiu* freundlicherweise zur Verfügung stellte.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Olga Lezrich für die engagierte, kompetente, ausdauernde und zuvorkommende technische Assistenz bedanken.

Desweiteren danke ich allen Mit-Doktorandinnen und Doktoranden sowie Praktikanten des Arbeitskreises Matern für die freundliche Unterstützung und die angenehme Labor-Atmosphäre und allen Mitarbeitern des Instituts und des Arbeitskreises von Frau Prof. Dr. Petersen für die gute Zusammenarbeit.

Unschätzbare Dank gebührt ferner meiner Freundin Michaela Müller und meinen Eltern und Geschwistern.

Lebenslauf

Geboren	17.8.1972 in Freiburg i. Breisgau
Abitur	1992, Faustgymnasium Staufen
Pharmaziestudium	Herbst 1992 - Sommer 1994, Universität Freiburg/ Herbst 1994 - Frühjahr 1997, Universität Regensburg
1. Staatsexamen	September 1994 in Freiburg i. Breisgau
2. Staatsexamen	April 1997 in Regensburg
Praktische Ausbildung	Mai 1997 - Oktober 1997, University of Hawaii at Manoa, USA: Screening Hawaiianischer Heilpflanzen auf anticarcinogene Wirkung. November 1997 - April 1998, Pestalozzi- Apotheke Lörrach
3. Staatsexamen	Juli 1998 in München
Berufstätigkeit	Oktober 1998 - März 2000, Schwarzwald-Apotheke Todtnau
Promotion	Ab 1.3.2000 Promotion unter Leitung von Prof. Dr. U. Matern am Institut für pharmazeutische Biologie der Philipps- Universität Marburg

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation "Molekulare und strukturelle Charakterisierung der Flavonolsynthese aus *Citrus unshiu*" selbstständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den

(Frank Wellmann)