

**Technische Universität München**  
**Institut für Landwirtschaftlichen Gärtnerischen Pflanzenbau**  
**Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, Lehrgebiet Pflanzenzüchtung**

**Genetische, biochemische und  
molekularbiologische Untersuchungen der  
Flavonbiosynthese bei *Gerbera* Hybriden**

**2000**

**Stefan Martens**

Technische Universität München  
Institut für Landwirtschaftlichen und Gärtnerischen Pflanzenbau  
Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, Lehrgebiet Pflanzenzüchtung

**Genetische, biochemische und molekularbiologische  
Untersuchungen der Flavonbiosynthese bei *Gerbera* Hybriden**

Stefan Martens

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften (Dr. agr.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender : Univ.-Prof. Dr. G. Wenzel  
Prüfer der Dissertation : 1. Univ.-Prof. Dr. G. Forkmann  
2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 02.05.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau am 29.05.2000 angenommen.

**„Was wir wissen,  
ist ein Tropfen,  
was wir nicht wissen,  
ein Ozean.“**

(Isaac Newton)

**Aus der vorliegenden Arbeit gingen folgende Veröffentlichungen hervor :**

MARTENS, S. und FORKMANN, G., 1998. Genetic Control of Flavone Synthase II Activity in Flowers of *Gerbera* Hybrids. *Phytochemistry* **49**, 1953-1958.

MARTENS, S. und FORKMANN, G., 1999. Cloning and Expression of Flavone Synthase II from *Gerbera* Hybrids. *The Plant Journal*, **20** (5), 611-618.

MARTENS, S. und FORKMANN, G., 2000. Enzymology and Genetics of Flavonoid Biosynthesis in *Gerbera*-Hybriden. *Acta Horticulturae* **508**, 39-44.

MARTENS, S. und FORKMANN, G., 2000. Flavonoid Biosynthesis in *Gerbera*-Hybriden : Genetic and Enzymology of Flavones. *Acta Horticulturae* **521**, 67-71.

**Beiträge zum Thema der vorliegenden Arbeit wurden von mir bei folgenden Fachkongressen in Form eines Posters oder Vortrages präsentiert :**

„19<sup>th</sup> International EUCARPIA Symposium on Improvement of Ornamental Plants”, Angers, Frankreich, 27.-30. Juli 1998.

„25<sup>th</sup> International Horticultural Congress”, Brüssel, Belgien, 2.-7. August 1998.

„19<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols”, Lille, Frankreich, 1.-4. September 1998.

„Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e.V.”, Hamburg, Deutschland, 5.-8. September 1999.

# Inhaltsverzeichnis

		Seite
		Inhaltsverzeichnis
		Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen
<b>A</b>		<b>Einleitung</b> <b>1</b>
	<b>1</b>	<b>Pflanzenpigmente</b> <b>3</b>
	1 1	Flavonoidbiosyntheseweg 5
	1 2	Flavonoidbiosynthese in <i>Gerbera</i> Hybriden 7
	1 3	Flavonbiosynthese 9
	1 4	Verschiedene Bedeutungen von Flavonen 10
	<b>2</b>	<b>Cytochrom P450 Enzyme (Cyt P450)</b> <b>14</b>
	2 1	Allgemeine Eigenschaften und Funktionsmechanismus 14
	2 2	Pflanzliche Cyt P450 18
	<b>3</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> <b>21</b>
<b>B</b>		<b>Material und Methoden</b> <b>23</b>
	<b>1</b>	<b>Abkürzungen</b> <b>23</b>
	<b>2</b>	<b>Material</b> <b>25</b>
	2 1	Pflanzenmaterial und Bestäubungstechnik 25
	2 2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien 27
	2 3	Radiochemikalien 28
	2 4	Enzyme und Proteine 28
	2 5	Reaktionssysteme und Kits 29
	2 6	Substrate und Cosubstrate 29
	2 7	Hemmstoffe 29
	2 8	Referenzsubstanzen 29
	2 9	Bakterien- bzw. Hefestämme und Vektoren 30
	2 10	Puffer und sonstige Lösungen 32
	2 11	Medien 34
	2 11 1	Bakterienmedien 34
	2 11 2	Hefemedien 34
	<b>3</b>	<b>Gewebekultur</b> <b>35</b>
	<b>4</b>	<b>Biochemische Methoden</b> <b>37</b>
	4 1	Extraktion und Identifizierung der Flavonoide 37
	4 2	Chromatographiesysteme 37
	<b>5</b>	<b>Enzymologische Methoden</b> <b>38</b>
	5 1	Synthese von radioaktiv markiertem Naringenin und Eriodictyol 38
	5 2	Flavonsynthese II Tests 38
	5 2 1	Aufarbeitungsmethode 38
	5 2 2	Standardenzymtest 39
	5 2 3	Charakterisierung der FNS II 39
	5 3	Berechnung der spezifischen Enzymaktivität der FNS II 40
	5 4	Nachweis der Aktivität der CPR in Hefe Mikrosomen 40
	5 5	Bestimmung des Gesamtproteingehaltes 40
	<b>6</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> <b>41</b>
	6 1	Allgemeine molekularbiologische Methoden 41
	6 2	RNA-Isolierung und Northern Blot Analyse 41
	6 2 1	Isolierung von Gesamt-RNA 41

6	2	2	Aufreinigung der mit DNA kontaminierten RNA	42
6	2	3	Isolierung von poly(A) <sup>+</sup> RNA	42
6	2	4	Northern Blot Analyse	42
6	2	5	Markierung von DNA-Fragmenten mit radioaktiven Nukleotiden	43
6	2	6	Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten	43
6	3		Isolierung von genomischer DNA und Southern Blot Analyse	44
6	3	1	Isolierung von genomischer DNA aus <i>Gerbera</i>	44
6	3	2	Southern Blot Analyse	44
6	4		Reverse Transkription	44
6	5		Polymerase Ketten Reaktion	45
6	5	1	Oligonukleotide	45
6	5	2	Standard-PCR	45
6	5	3	Cyt P450 spezifisches Differential Display	46
6	5	4	5'-RACE	48
6	5	5	RT-PCR	49
6	6		Präparation von Plasmid-DNA	49
6	7		Enzymkatalysierte Reaktionen	49
6	7	1	Restriktionsverdau	49
6	7	3	Terminale Transferase	49
6	7	4	Ligation	49
6	8		DNA-Sequenzanalyse	50
6	9		Heterologe Hefeexpression	51
6	9	1	Klonierung in Hefe Expressionsvektoren	51
6	9	2	Transformation von Hefezellen	52
6	9	3	Anzucht und Induktion	52
6	9	4	Isolierung von Mikrosomen	52
<b>7</b>			<b>Sonstiges</b>	<b>53</b>
7	1		Radioaktivitätsmessungen	53
<b>C</b>			<b>Ergebnisse</b>	<b>54</b>
<b>1</b>			<b>Vorarbeiten</b>	<b>54</b>
1	1		Synthese von <sup>14</sup> C-markiertem Naringenin und Eriodictyol	54
<b>2</b>			<b>Chemogenetische und enzymologische Charakterisierung des</b>	<b>55</b>
			<b><i>Gerbera</i>-Materials</b>	
2	1		Aktivitätsnachweis	55
2	2		Mikrosomale Lokalisierung und Kofaktorenabhängigkeit	56
2	3		Zeit-, Proteinlinearität, Temperatur- und pH-Optimum	57
2	4		Stabilität des Enzyms	58
2	5		Sauerstoffabhängigkeit	60
2	6		Substratspezifität	60
2	7		Hemmstoffe	61
2	8		Aktivität über die Blütenentwicklung und Flavonakkumulation	63
2	9		Genetische Kontrolle	64
<b>3</b>			<b>Genetische Studien</b>	<b>65</b>
3	1		Selbstungsexperimente definierter Genotypen	65
3	2		Biochemische Charakterisierung der Nachkommenschaft (147-1..)	65
3	3		Enzymologische Charakterisierung der Nachkommenschaft (147-1..)	66
3	4		Selbstung von verschiedenen, ausgewählten 147iger Linien	67
<b>4</b>			<b>Molekularbiologische Untersuchungen</b>	<b>71</b>

4	1	Strategie zur Isolierung der FNS II cDNA aus <i>Gerbera</i>	71
4	2	Isolierung von <i>Gerbera</i> cDNA Fragmenten, die für differentiell expremierte Cyt P450 Proteine kodieren	72
4	3	Expression des <i>Gerbera</i> Klon CypDDd7a	74
4	4	Isolierung des entsprechenden full-length cDNA Klon zu CypDDd7a	75
4	5	Sequenzanalyse des <i>Gerbera</i> Cyt P450 cDNA Klon	76
4	6	Expression der <i>Gerbera</i> CYP93B2 cDNA in Hefe	80
4	7	Northern-und Southern-Blot Analyse mit CYP93B2	81
<b>D</b>		<b>Diskussion</b>	<b>84</b>
	<b>1</b>	<b>Biochemische Charakterisierung der FNS II</b>	<b>85</b>
	<b>2</b>	<b>Genetische Untersuchungen zur Vererbung des Gens <i>Fns</i></b>	<b>88</b>
	<b>3</b>	<b>Isolierung der FNS II aus chemogenetisch definierten <i>Gerbera</i> Linien</b>	<b>89</b>
	<b>4</b>	<b>Biotechnologische Verwendung</b>	<b>96</b>
	<b>5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>100</b>
<b>E</b>		<b>Zusammenfassung - Summary</b>	<b>102</b>
<b>F</b>		<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>106</b>
<b>G</b>		<b>Anhang</b>	<b>119</b>
	<b>A1</b>	<b>Übersicht des in die Versuche miteinbezogenen Pflanzen- materials</b>	<b>119</b>
	a	chemogenetisch definierte Sorten und Linien	119
	b	biochemisch charakterisierte Selbstungsnachkommenschaft von „Th 58“ (147-1..)	120
	c	biochemisch charakterisierte Selbstungsnachkommenschaft von „147-120“ (147-2..)	122
	d	biochemisch charakterisierte Selbstungsnachkommenschaft von „147-125“ (147-3..)	123
	e	biochemisch charakterisierte Selbstungsnachkommenschaft von „147-114“ (147-4..)	124
	<b>A2</b>	<b>Übersicht der verwendeten Primer</b>	<b>125</b>
	<b>A3</b>	<b>Nukleinsäuresequenzen mit abgeleiteter Aminosäuresequenz der verschiedenen erhaltenen PCR-Fragmente</b>	<b>126</b>
	a	Differential Display Fragment CypDDd7a	126
	b	5'-RACE Fragment CypTÁBATA	127
	c	CYP93B2, vollständige cDNA Sequenz	128
	<b>A4</b>	<b>Beschreibungen und Referenzen verwendeter Cyt P450 Danksagung und Lebenslauf</b>	<b>129</b> 130

## Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1 : Grundgerüst der Flavonoide	4
Abb. 2 : Darstellung des allgemeinen Flavonoidbiosyntheseweges mit Strukturformeln der wichtigsten Flavonoidklassen	6
Abb. 3 : Flavonoidbiosyntheseweg in Blüten von <i>Gerbera</i> Hybriden	9
Abb. 4 : Struktur des Flavons Isoetin	11
Abb. 5 : Wechselwirkung benachbarter Hydroxylgruppen im Flavonoidgerüst	14
Abb. 6 : Ferriprotoporphyrin IX (Häm)	15
Abb. 7 : Lokalisierung der Cyt P450 in den Membranen und die Elektronentransportkette	16
Abb. 8 Katalytischer Zyklus der Cyt P450 Reaktion	17
Abb. 9 : Sequenzstruktur pflanzlicher Cyt P450	21
Abb. 10 : Verschiedene Blütenstadien bei der <i>Gerbera</i> Sorte „Regina“	26
Abb. 11 : Hefe Expressionsvektor pYeDP60	31
Abb. 12 Hefe Expressionsvektor pYES2	32
Abb. 13 : Abgeleitete Primer für ein Cyt P450 spezifisches Differential Display	46
Abb. 14 : Enzymatische Bildung von Flavonen aus verschiedenen Flavanonen	55
Abb. 15 : Flavonbildung in Abhängigkeit von der Proteinmenge bzw. der Zeit	57
Abb. 16 : Flavonbildung in Abhängigkeit vom pH-Wert des Testpuffers bzw. der Temperatur	58
Abb. 17 : Stabilität der FNS II bei verschiedenen Vorinkubationstemperaturen	58
Abb. 18 : Stabilität der FNS II Aktivität bei Lagerung der frisch geernteten Petalen oder des Rohextraktes mit verschiedenen Zusätzen	59

Abb. 19 :	Abhängigkeit der FNS II Aktivität von molekularem Sauerstoff	60
Abb. 20 :	Wirkung von verschiedenen Fe-II Konzentrationen auf die Aktivität der FNS II	62
Abb. 21 :	Darstellung der Enzymaktivität der FNS II und der Apigenin Akkumulation während der Blütenentwicklung	63
Abb. 22 :	Enzymatische Reaktionen mit Proteinextrakt verschiedener Genotypen	64
Abb. 23 :	Unterschiedliche Anthocyanengehalte in flavonfreien und flavonhaltigen <i>Gerbera</i> Blüten aus Selbstungsnachkommenschaft 147-1..	65
Abb. 24 :	Phänotypen der verschiedenen Selbstungsnachkommenschaften	69
Abb. 25 :	Phänotypen der verschiedenen Selbstungsnachkommenschaften	70
Abb. 26 :	Cyt P450 spezifische DD-RT-PCR mit den Decamer-Primern 6 und 7	73
Abb. 27	Northern-Blot Analyse des <i>Gerbera</i> Cyt P450 Fragments	74
Abb. 28 :	Amplifizierte PCR-Fragmente in Verlauf der Klonierung	75
Abb. 29 :	Sequenzalignment von CYP93B1 und CYP93B2	77
Abb. 30 :	Phylogenetische Analyse von pflanzlichen Cyt P450	79
Abb. 31 :	Test der FNS II mit Mikrosomen aus transformierten Hefezellen	81
Abb. 32 :	Northern Blot mit verschiedenen Genotypen und Laub	82
Abb. 33 :	Transkript Menge, FNS II Aktivität und Flavonakkumulation in der <i>Gerbera</i> Sorte „Regina“	82
Abb. 34 :	Genomische Southern Blot Analyse von <i>Gerbera</i> mit dem kompletten cDNA Klon	83
Abb. 35 :	Postuliertes Reaktionsschema zur Monooxygenierung und Dehydrogenierung von Flavanonen, katalysiert durch die F2H bzw. FNS II	97

## Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1 :    Verwendete Radiochemikalien	28
Tab. 2 :    Verwendete Hefestämme	30
Tab. 3 :    Verwendete cDNA Sonden und deren Herkunft	43
Tab. 4 :    R <sub>f</sub> -Werte der verwendeten Substrate und der resultierenden Produkte auf Cellulose TLC-Platten	56
Tab. 5 :    Mikrosomale Lokalisierung und Kofaktorenabhängigkeit der FNS II Aktivität in <i>Gerbera</i> Blüten	57
Tab. 6 :    Substratspezifität der FNS II aus <i>Gerbera</i>	61
Tab. 7     Wirkung von verschiedenen Zugaben zum FNS II Test auf die Enzymaktivität	62
Tab. 8 :    Mischexperiment mit Rohextrakten aus „Th 58“ und den drei definierten Mutanten	65
Tab. 9 :    Aufspaltung der flavonhaltigen Typen in der Selbstungsnachkommenschaft der Sorte „Th 58“	67
Tab. 10 :   Aufspaltung der flavonhaltigen Typen in der Selbstungsnachkommenschaft der Sorte „147-3.“	68
Tab. 11 :   Vergleich der Aminosäurereste der Distal Helix von ausgewählten Cyt P450	78



## **A Einleitung**

Die leuchtenden Farben von Blüten, Früchten und Blättern haben die Aufmerksamkeit von Wissenschaftlern aus den verschiedensten Bereichen erlangt. Sowohl Genetiker, als auch Chemiker und Biochemiker und seit kurzem auch Molekularbiologen beschäftigen sich mit der Entstehung und den natürlichen Funktionen der Pflanzenfarben. Die Färbung verschiedener Pflanzenteile besitzt aber auch einen nicht zu unterschätzenden ästhetischen Wert für den Menschen. Sie ist ein wichtiges Element bei der Auswahl von verschiedenen Zierpflanzenarten, aus dem auf dem Markt angebotenen, ständig wachsenden Sortiment. Bei den meisten wirtschaftlich wichtigen Zierpflanzen ist das Farbspektrum jedoch nur auf einige wenige verschiedene Typen begrenzt oder es fehlen besondere Farbtöne wie z.B. blau oder gelb bei Pelargonien bzw. Cyclamen. Daraus läßt sich ein wichtiges Ziel der gartenbaulichen Pflanzenzüchtung ableiten : Die Entwicklung von neuen Farbtypen bei verschiedenen blühenden Zierpflanzen aber auch bei Blattpflanzen.

Neben der Einführung von unterschiedlichen, dekorativen Pflanzenarten, der Selektion und Erhaltung von Farbmutanten, wurden in der Vergangenheit mit Hilfe von klassischen Züchtungsmethoden eine Reihe von verschiedenen Farben bei vielen wirtschaftlich wichtigen Zierpflanzen etabliert. Jedoch schränkt der Genpool der einzelnen Arten die Möglichkeiten solcher Ansätze natürlicherweise ein. Aus diesem Grund gibt es bis heute nur wenige Pflanzenarten, die das gesamte Farbspektrum besitzen. Außerdem kann durch klassische Züchtungsmethoden keine präzise Veränderung erzielt werden, da andere Faktoren, die sowohl den ästhetischen Wert einer Blüte (z.B. Form, Duft und Farbe) als auch physiologische und morphologische Eigenschaften (z.B. Blütezeit, Wuchs u.a.) betreffen können, ebenfalls beeinflusst werden. Eine Veränderung eines dieser Faktoren durch Kreuzung kann in der Regel nur auf Kosten von ähnlichen, anderen wichtigen Merkmalen erzielt werden. Zudem führt dieser Weg nur mit einem sehr hohen zeitlichen und finanziellen Aufwand zum Ziel. Aus diesen Gründen muß ein effektiverer Weg zu neuen Sorten gesucht und genutzt werden.

Die gezielte Einführung neuer Blütenfarben und Formen mittels „genetic engineering“ ist eine erfolgversprechende Möglichkeit, klassische Züchtungsmethoden zu unterstützen und neue Produkte für einen Markt zu entwickeln, der einen hohen Produkt-Turnover besitzt und wo Neuheit ein wichtiger Marktfaktor und äußerst schnell vergänglich ist. In vielen Blüten und

Pflanzenteilen, wie Blättern und Früchten, sind die weitverbreiteten und sehr gut untersuchten Flavonoide, besonders die farbigen Anthocyane, aber auch weitere Flavonoidklassen, wie Chalkone, Aurone, Flavone und Flavonole, für die Farbgebung verantwortlich. Dagegen werden Verbindungen aus den Klassen der Flavanone, Dihydroflavonole und Leucoanthocyanidin nur selten, z.B. in Mutanten, akkumuliert.

Die einfachste Veränderung der Blütenfarbe ist direkt abhängig von dem Vorkommen, der Intensität oder der Konzentration der Anthocyane. Andere Faktoren, wie z.B. der pH-Wert der Vakuole oder die Flavonoidzusammensetzung im Ganzen, können die Blütenfarbe zusätzlich beeinflussen. So korreliert eine blaue Blütenfarbe in der Regel mit dem Vorhandensein von bestimmten Anthocyan Derivaten. Einige wichtige und bekannte Zierpflanzenarten, besonders innerhalb der Familie der *Asteraceae*, produzieren diese Pigmentgruppe jedoch nicht und es fehlen daher blaue Farben. Dies kann durch die Einführung eines entsprechenden Gens, das für das fehlende Protein kodiert, mit biotechnologischen Methoden erreicht werden und wird derzeit bei *Rosa*, *Dianthus* und *Dendranthema* vorbereitet bzw. durchgeführt (ELOMAA und HOLTON, 1994). Die Entwicklung von blaublühenden Sorten bei diesen und weiteren wichtigen Schnittblumenarten, wie *Lilium*, *Tulipa* und *Gerbera*, würde einen wesentlichen Marktvorteil auf dem Schnittblumenmarkt mit sich bringen. Ähnliches gilt auch für entsprechende Neuentwicklungen auf dem Topfpflanzenmarkt, wie z.B. blaue *Pelargonium* oder *Cyclamen*, bei denen darüber hinaus auch gelbe Blütenfarben fehlen. Dies haben sowohl Zuchtbetriebe als auch Biotechnologie Firmen bzw. Forschungseinrichtungen erkannt und ihre Aufmerksamkeit auf diesen Bereich ausgerichtet. Basierend auf den umfangreichen Informationen zur Genetik, Biochemie und Molekularbiologie der Flavonoidbiosynthese ist die Aussicht auf eine erfolgreiche Anwendung der bekannten Technologien in diesem Bereich sehr Erfolg versprechend (FORKMANN, 1993).

Die bereits erwähnten Flavonoide besitzen sowohl für die Pflanze als auch für den Menschen verschiedene wichtige Funktionen bzw. Eigenschaften. So wurde z.B. gezeigt, dass bestimmte Flavonole, eine verbreitete Flavonoidklasse, für das Pollenschlauchwachstum einiger Pflanzen erforderlich sind. Wird die Akkumulation der Flavonole durch eine Blockierung des Biosyntheseweges unterdrückt, erhält man sterile Pollen (TAYLOR and JORGENSEN, 1992). Zudem ist die Flavonoidzusammensetzung in einzelnen Pflanzenteilen zusammen mit anderen Merkmalen, wie z.B. dem Duft, wichtig für die Erkennung als Wirtspflanze durch

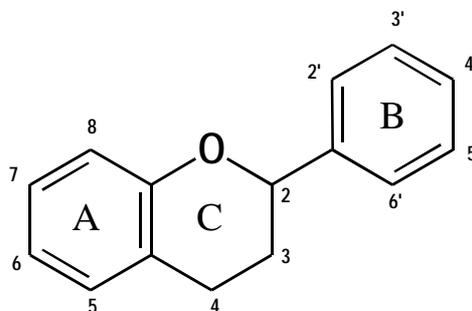
verschiedene Tiere, aber auch entscheidend für den Menschen, der Pflanzen als Dekoration oder zur Ernährung verwendet (HARBORNE und GRAYER, 1994). Die Expression und die daraus resultierende Flavonoidakkumulation kann sowohl durch biotische als auch durch abiotische Signale während der Interaktion der Pflanze mit ihrer Umwelt induziert werden. So führt z.B. eine UV-Bestrahlung zu einer Akkumulation von Flavonolen und Flavonen. Dies wird durch die Induktion der Transkription verschiedener Flavonoidbiosynthese-Gene wie z.B. PAL, CHS, CHI und DFR (Abb. 2), erreicht und ist vermutlich als prophylaktischer Schutzmechanismus der Pflanzen gegenüber Pathogenen und UV-Licht zu deuten (KUBASEK et al., 1992). Andere Stressfaktoren wie Verwundung, extreme Temperaturschwankungen und Wasserstress können die Flavonoidakkumulation und/oder Genexpression in verschiedenen Pflanzenarten bzw. -geweben ebenfalls induzieren (HRAZDINA, 1982).

## **A1 Pflanzenpigmente**

Drei unterschiedliche Typen von Pigmenten haben sich während der Evolution entwickelt und sind für die Farbausprägungen in verschiedenen Pflanzenteilen verantwortlich : Betalaine, Carotinoide und Flavonoide. Betalaine sind stickstoffhaltige Pigmente, die in der Vakuole lokalisiert sind. Das Vorkommen dieser Pigmentgruppe ist nur auf Pflanzen einiger Familien der Ordnung *Caryophyllales* (*Centrospermae*) begrenzt, z.B. *Cactaceae*, *Nyctaginaceae* (*Bougainvillea*; *Mirabilis*) und *Mesembryanthaceae*. Darüber hinaus wurden sie auch in einigen Pilzen, z.B. *Amanita muscaria* (Fliegenpilz), gefunden. Betalaine kommen nie zusammen mit Anthocyanen, wohl aber mit anderen, farblosen Flavonoiden in diesen Pflanzen vor. Sie können gelbe, orange, rote und violette Farben hervorrufen (siehe CLEMENT et al., 1994 und Referenzen darin). Bei den Carotinoiden handelt es sich um hydrophobe, lipidlösliche Pigmente, deren Struktur auf einer 40-Kohlenstoffkette basiert, die aus dem allgemeinen Isoprenoid Stoffwechsel hervorgeht. Nahezu 600 natürlich vorkommende Carotinoide sind bislang isoliert und identifiziert worden (PFANDER, 1997). Die Hauptfunktion der Carotinoide ist der Schutz des photosynthetisch aktiven Gewebes vor Photooxidation. Sie können aber auch in Blüten (z.B. *Rosa*, *Narcissus*, *Tulipa*, *Gerbera* und *Lilium*) und Früchten für orange oder gelbe Farben verantwortlich sein. In Blüten werden die Carotinoide in Chromoplasten synthetisiert und gelagert. Chromoplasten sind spezialisierte Plastiden, die sich von den Chloroplasten und anderen nicht-photosynthetisch aktiven Plastiden unterscheiden

(siehe BARTLEY und SCOLNIK, 1995 und Referenzen darin). In vielen wichtigen Zierpflanzenarten kommen sie zusammen mit den wasserlöslichen Flavonoiden, den wichtigsten und am weitesten verbreiteten Blüten- bzw. Pflanzenpigmenten, vor. In dieser Kombination können orange, gelbe, rote und bronze Blütenfarben entstehen. Flavonoide, die wie die Betalaine in den Vakuolen vorliegen, wurden bislang in verschiedenen Geweben, wie Blüten, Blättern oder Wurzeln nachgewiesen (WOLLENWEBER, 1994) und gehören zu einer der am besten charakterisierten Gruppe von Verbindungen aus dem Sekundärstoffwechsel der Pflanze. Sie wurden, basierend auf dem Grad der Oxidierung des C-Ringes, in verschiedene Unterklassen eingeordnet, die sowohl unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften als auch verschiedene biologische Bedeutungen bzw. Funktionen, wie z.B. als Pigmente, Signalsubstanzen oder Phytoalexine, besitzen. Die einzelnen Aglyka innerhalb der jeweiligen Unterklassen werden durch das Ausmaß der Hydroxylierung oder anderer Substitutionen, wie Glykosylierungen, Acylierungen, Methylierungen und Sulphatierungen, des A- bzw. B-Ringes definiert (siehe Abb. 1; DAVIES und SCHWINN, 1997). Über 4000 verschiedene Flavonoide, die diesen unterschiedlichen Unterklassen zugeordnet wurden, sind bisher identifiziert worden. Neben allgemein verbreiteten Verbindungen sind auch viele, eher selten vorkommende Flavonoide, beschrieben worden (siehe verschiedene Kap. in HARBORNE, 1994; FORKMANN und HELLER, 1999).

Diese große Pigmentgruppe lässt sich hinsichtlich der Blütenfarbe grob in die farbgebenden Anthocyane und die in der Regel farblosen übrigen Flavonoide, wie z.B. Flavone und Flavonole, unterteilen. Unterschiedliche Anthocyane können dabei verschiedene Farbtöne produzieren. Die drei Grundanthocyane, Derivative des Pelargonidins (Pg), Cyanidins (Cy) und Delphinidins (Dp), decken mit orange, pink, rot, violett, blau bis blau-schwarz einen sehr



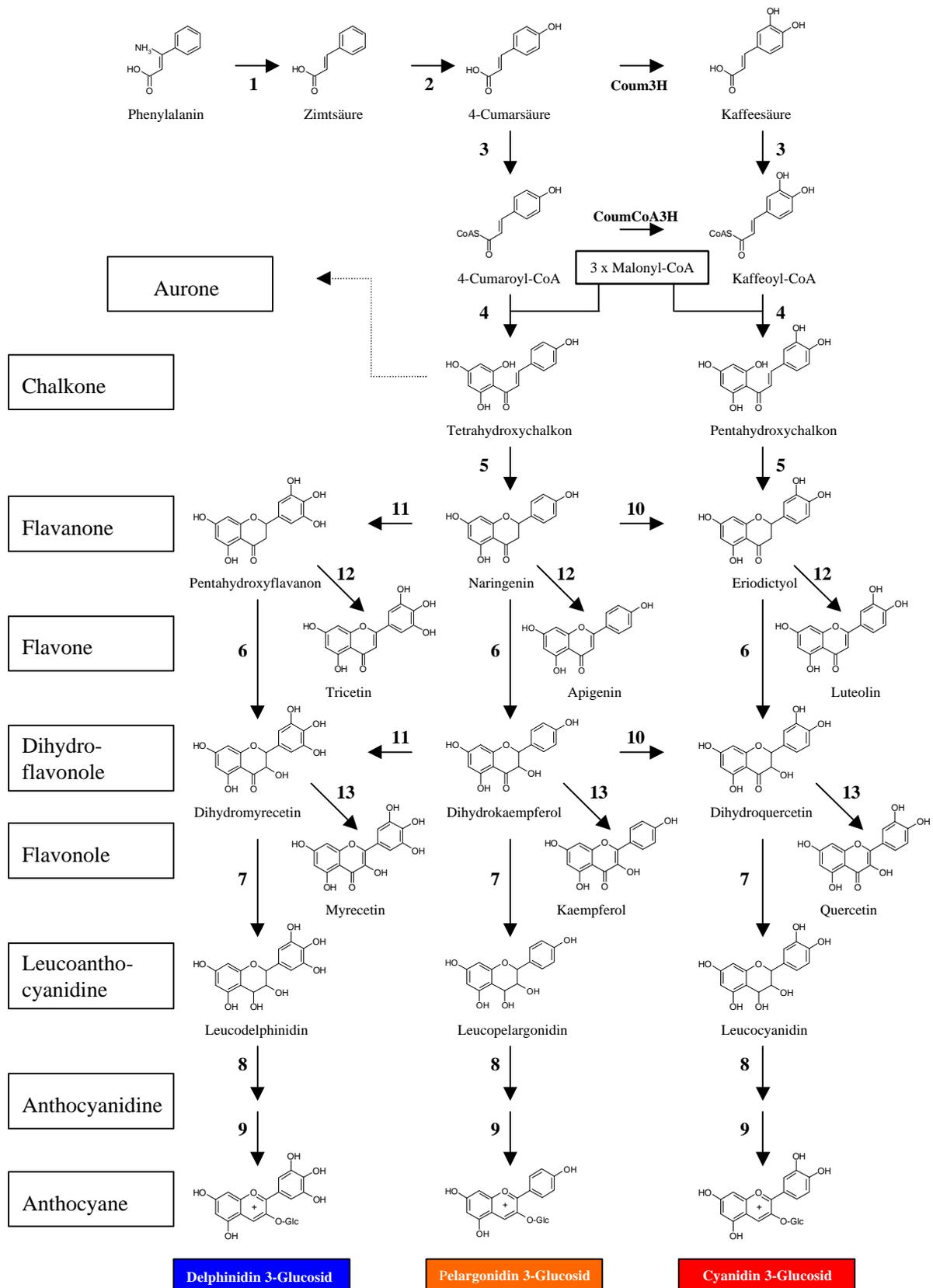
**Abb. 1. Grundgerüst der Flavonoide : Aromatische Ringe A bzw. B und Heterozyklus C (Pyranring).**

großen Farbbereich ab. Die Ausprägung der Blütenfarbe durch Anthocyane wird dabei wesentlich vom Sauerstoffgehalt der molekularen Umgebung der Pigmente sowie vom pH-Wert der Vakuole, der Pigmentmenge, der Komplexierung mit Metallen und dem Glykosylierungs- bzw. Acylierungsmuster beeinflusst (FORKMANN, 1991; DAVIES und SCHWINN, 1997). Ein weiterer wichtiger Faktor für die Entstehung von verschiedenen Blütenfarben ist die Kopigmentierung der Anthocyane mit den erwähnten farblosen Flavonoiden oder auch Tanninen (SCOTT-MONCRIEFF, 1936).

### **A1.1 Flavonoidbiosyntheseweg**

Über Jahre hinweg wurden Untersuchungen zur Genetik und Biochemie der einzelnen enzymatischen Schritte der Flavonoidbiosynthese intensiv vorangetrieben und in den letzten Jahren durch die Arbeiten auf der molekularbiologischen Ebene ergänzt. Die in die Biosynthese der Flavonoide verwickelten Enzyme konnten in verschiedenen Pflanzenarten nachgewiesen und charakterisiert werden. Außerdem sind viele entsprechende genetische Loci bekannt (FORKMANN, 1991). Genomische und/oder cDNA Klone sind für beinahe alle Schritte der Flavonoidbiosynthese, einschließlich verschiedener modifizierender Schritte, und diverser Regulatorgene kloniert und auf molekularer Ebene charakterisiert worden. Aus dem Hauptweg fehlen bislang lediglich die Flavonsynthase I bzw. II (FNS I; FNS II) (DAVIES und SCHWINN, 1997). Ein ausführlicher Review wurde kürzlich veröffentlicht (FORKMANN und HELLER, 1999).

Die Grundstruktur der Flavonoide besteht aus zwei aromatischen Ringen (A und B) sowie einem zentralen Heterozyklus (C), einem Pyranring. Sie bilden ein C<sub>15</sub>-Gerüst (Abb. 1). In Pflanzen werden sie ausgehend vom L-Phenylalanin über den Phenylpropanoid-Weg gebildet. Durch die enzymatischen Reaktionen der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL; E.C. 4.3.1.5; Schritt **1** in Abb. 2), der Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H; E.C. 1.14.13.11; **2**) und der 4-Cumarsäure : CoA Ligase (4CL; E.C. 6.2.1.12; **3**) wird 4-Cumaroyl-CoA gebildet, aus dem durch Kondensation mit 3 Molekülen Malonyl-CoA Tetrahydroxychalkon entsteht (HAHLBROCK und SCHEEL, 1989). Diese Reaktion, bei der auch andere Hydroxyzimtsäure-CoA Ester (z.B. Kaffeoyl-CoA) mit Malonyl-CoA kondensieren können, wird vom Enzym Chalkonsynthase (CHS; E.C. 2.3.1.74; **4**), einem wichtigen Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese, katalysiert (Abb. 2). Eine Isomerisierung, die unter Umständen auch



**Abb. 2. Darstellung des allgemeinen Flavonoidbiosyntheseweges mit Strukturformeln der wichtigsten Flavonoidunterklassen.**

Die einzelnen Enzyme, die die verschiedenen Schritte katalysieren, sind im Text näher erklärt. Folgende zusätzlichen Abkürzungen wurden verwendet : Coum3H : 4-Cumarsäure 3-Hydroxylase; CoumCoA3H : 4-Cumaroyl-CoA 3-Hydroxylase.

spontan ablaufen kann, aber in der Regel von der Chalkonisomerase (CHI; E.C. 5.5.1.6; **5**) katalysiert wird, führt zum Naringenin (NAR) oder abhängig von der Hydroxylierung der eingebauten Zimtsäure zu anderen Flavanonen. Diese Flavonoidgruppe fungiert als Substrat für drei verschiedene Enzyme. Die Flavanon 3-Hydroxylase (FHT; E.C. 1.14.11.9; **6**) überführt die Flavanone in die entsprechenden Dihydroflavonole, aus denen im weiteren Verlauf der Anthocyanbiosynthese durch die Wirkung der Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR; E.C. 1.1.1.219; **7**), der Anthocyanidinsynthase (ANS; **8**) und der UDP-Glucose : Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase (UFGT; E.C. 2.4.1.91; **9**) sowie der hydroxylierenden Flavonoid 3' bzw. 3',5'-Hydroxylase (F3'H und F3',5'H; **10** + **11**) die verschiedenen Anthocyan 3-O-Glucoside hervorgehen. Die Glykosylierung der Anthocyanidine ist wichtig für die Stabilisierung der Moleküle und erhöht zusätzlich deren Wasserlöslichkeit. Die zwei erwähnten Flavonoid Hydroxylasen (E.C. 1.14.13.21; **10** + **11**) können sowohl Flavanone als auch Dihydroflavonole als Substrate verwenden und in einigen Fällen konnte auch eine entsprechende Hydroxylierung von Flavonen, Flavonolen und Leucoanthocyanidinen gezeigt werden. Das Hydroxylierungsmuster des B-Ringes spielt dabei eine Schlüsselrolle in Bezug auf die Farbausprägung des gebildeten Anthocyans (STAFFORD, 1990). Auf einem Seitenweg katalysieren die FNS I oder die FNS II (**12**) die Bildung der Flavone. Auf diese Flavonoidklasse soll in einem späteren Kapitel näher eingegangen werden. Die enzymatische Reaktion der Flavonolsynthase (FLS; **13**) führt auf Dihydroflavonolebene zum gleichen Ergebnis wie die der FNS I bzw. II, nämlich zur Einführung einer Doppelbindung zwischen C2 und C3. Die so entstandenen Flavonole bilden zusammen mit den Flavonen eine wichtige Klasse von Kopigmenten und sind funktionell sehr vielfältig (FORKMANN und HELLER, 1999).

## **A1.2 Flavonoidbiosynthese in *Gerbera* Hybriden**

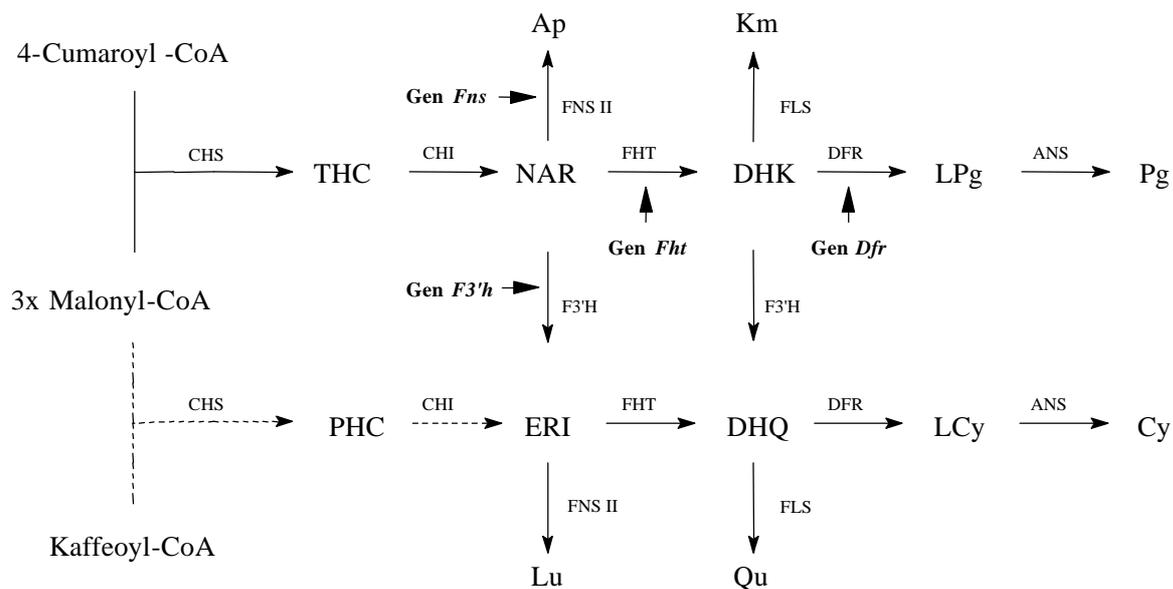
Nur wenige Arbeiten haben sich in der Vergangenheit mit der Aufklärung der Pigmentzusammensetzung bzw. der Flavonoidbiosynthese in *Gerbera* Hybriden beschäftigt (ASEN, 1984; TYRACH, 1995; TYRACH und HORN, 1997). In diesen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die Blütenfarben bei *Gerbera* in erster Linie auf das Vorkommen von Anthocyanen zurückzuführen sind. Darüber hinaus enthalten die Blüten aber auch unterschiedliche Mengen der gelben Carotinoide bzw. verschiedene Glykoside verbreiteter farbloser Flavonoide. Anthocyane bzw. die übrigen Flavonoide, die als Kopigmente fungieren,

können sowohl einfach in der 4'-Position aber auch in der 3'-Position des B-Ringes oder in beiden hydroxyliert sein (siehe Abb. 1 und 2). Als Grundgerüste konnten die Anthocyanidine Pelargonidin (Pg) und Cyanidin (Cy) bzw. die Flavone, Apigenin (Ap) und Luteolin (Lu) und die Flavonole Kaempferol (Km) und Quercetin (Qu) nachgewiesen werden. Ein aufgrund chemogenetischer Untersuchungen postulierter Biosyntheseweg (TYRACH, 1995; TYRACH und HORN, 1997) konnte enzymatisch weitgehend bestätigt werden (Abb. 3). Dabei wurden die sechs wichtigsten enzymatischen Schritte in sieben chemogenetisch definierten Linien bzw. Sorten mit unterschiedlicher Flavonoid-Zusammensetzung nachgewiesen und teilweise charakterisiert (MARTENS, 1995; MARTENS und FORKMANN, 1996).

Verschiedene Gene, die definierte Schritte in der Flavonoidbiosynthese in unterschiedlichen Pflanzen kontrollieren, sind bislang beschrieben worden (FORKMANN, 1991; MARTIN und GERATS, 1993a, b; FORKMANN und HELLER, 1999). Analytische Arbeiten bei *Gerbera* Hybriden ergaben, dass Blocks zweier unterschiedlicher Schritte zu farblosen Blüten führen. Das Gen *Fht* betrifft dabei die FHT und das Gen *Dfr* die DFR. Beide Enzymaktivitäten konnten nachgewiesen und charakterisiert werden. Die FHT, eine 2-oxoglutarat-abhängige Dioxygenase, konnte sowohl in Linien mit dominantem Allel *fht*<sup>+</sup> und überraschenderweise auch in Linien mit rezessiven Allelen (*fht fht*) nachgewiesen werden. Mikroskopische Untersuchungen von Epidermisabzügen, die mit Naturstoffreagenz A behandelt wurden, zeigten bei einer Wellenlänge von 480 nm eine leuchtend gelbe Fluoreszenz der Schließzellen. Dies deutet auf die Anwesenheit von Flavonolglykosiden hin und veranlasst zu der Hypothese, dass die FHT Aktivität in Genotypen mit rezessiven Allelen ausschließlich in diesem Gewebe lokalisiert ist. Bezüglich der DFR und einem weiteren Enzym, der F3'H, konnte eine eindeutige Kontrolle durch das Gen *Dfr* bzw. *F3'h* nachgewiesen werden. Die enzymatische Bildung von Leucoanthocyanidinen konnte nur mit Enzymextrakt aus Linien mit dominantem Allel *dfr*<sup>+</sup>, nicht aber aus rezessiven Linien (*dfr dfr*) nachgewiesen werden. Analog konnte die F3'H Aktivität nur in Rohextrakten und Mikrosomen von Linien mit dominantem Allel *f3'h*<sup>+</sup> gezeigt werden (MARTENS, 1995; MARTENS und FORKMANN, 1996). Die chemogenetischen Studien ergaben auch deutliche Hinweise darauf, dass die Bildung von Flavonen durch ein Gen, das *Fns* benannt wurde, kontrolliert wird (TYRACH und HORN, 1997). In Genotypen mit dominantem Allel (*fns*<sup>+</sup>) waren Flavone vorhanden, wohingegen in Blüten mit rezessiven Allelen (*fns fns*) keine Flavone nachgewiesen werden konnten. Vorversuche im Rahmen einer

Diplomarbeit zeigten, dass in Linien mit dominantem *fns*<sup>+</sup> Allel die Aktivität der FNS II vorhanden ist (MARTENS, 1995).

Gene, die für FNS I oder FNS II kodieren, sind bislang noch nicht kloniert worden. In *Antirrhinum majus* wurde der Locus *daphne* beschrieben, die FNS II zu kodieren. Rezessive Loci für *daphne* sind ebenfalls bekannt (Luo et al., 1991). In *Gerbera* Hybriden korreliert der Locus *Fns* mit dem Flavongehalt in den Blüten. Eine genetische Kontrolle der Enzymaktivität mit diesem Gen wurde jedoch bislang noch nicht beschrieben.



**Abb. 3. Flavonoidbiosyntheseweg in Blüten von *Gerbera* Hybriden.**  
Gestrichelt : Möglicher Nebenweg.

### A1.3 Flavonbiosynthese

Ausgehend von den oben beschriebenen Ergebnissen sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die Flavonbiosynthese in *Gerbera* Blüten aufzuklären. Wie bereits erwähnt, werden die Flavone auf einem Seitenweg durch die FNS I oder die FNS II gebildet. Dabei handelt es sich um einen der seltenen Fälle, in denen das gleiche Produkt von zwei unterschiedlichen enzymatischen Reaktionssystemen gebildet werden kann. Diese Tatsache kann besonders bei der Betrachtung der Evolution der Flavonoidbiosynthese in Pflanzen von großer Bedeutung sein (BRITTSCH et al., 1981). Das lösliche flavon-bildende Enzymsystem, FNS I, wurde bislang nur in UV-bestrahlten Petersilie (*Petroselinum hortense*)

Zellsuspensionskulturen nachgewiesen. Das Enzym benötigt molekularen Sauerstoff sowie 2-Oxoglutarat, Fe<sup>2+</sup>-Ionen und Ascorbat als Kofaktoren und wurde daher in die Klasse der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (EC 1.14.11) eingeordnet (BRITSCH et al., 1981). Im Gegensatz dazu werden Flavone in den meisten anderen flavonhaltigen Pflanzenarten und in osmotisch gestressten Sojabohnen Zellen (*Glycine max*) von einem NADPH-abhängigen Enzymsystem gebildet (STOTZ und FORKMANN, 1981; STOTZ et al., 1984; FORKMANN und STOTZ, 1984; STICH und FORKMANN, 1987; KOCHS und GRISEBACH, 1987), das in der mikrosomalen Fraktion lokalisiert ist und als FNS II bezeichnet wurde. Die Aktivität des Enzyms konnte durch spezifische Cytochrom P450 (Cyt P450) Hemmstoffe, wie z.B. Tetcyclacis, Ketokonazol und Ancymidol beeinflusst werden. Aufgrund dieser und anderer charakteristischer Eigenschaften wurde die FNS II in die Klasse der Cyt P450-abhängigen Monooxygenasen eingeordnet.

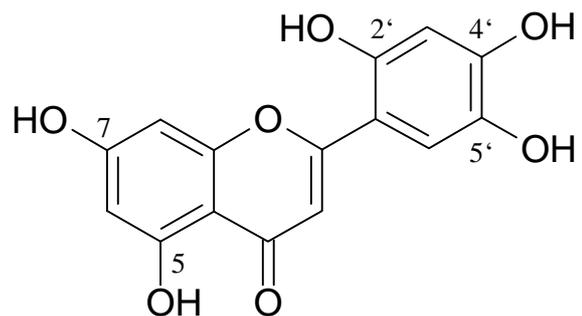
Die Flavonsynthesen verwenden verschiedene Flavanone, wie z.B. NAR oder Eriodictyol (ERI) als Substrat, um die entsprechenden Flavone Ap und Lu zu synthetisieren. Dabei wird, wie in Abb. 2 dargestellt, zwischen der C2- und der C3-Position eine Doppelbindung eingefügt. Die so gebildeten Flavone können in der Pflanze in glykolysierter oder auch methylierter, acylierter und prenylierter Form (vgl. Anthocyane) vorliegen.

#### **A1.4 Verschiedene Bedeutungen von Flavonen**

Flavone gehören einer weit verbreiteten Klasse der Flavonoide an, die eine Vielzahl von Funktionen in lebenden Organismen übernehmen. In den meisten Fällen liegen sie als Glykosid vor. Eine wichtige Funktion, besonders aus Sicht des Zierpflanzenzüchters, ist die Kopigmentierung von Anthocyanen durch Flavone. Wie bereits einleitend erwähnt, resultiert das Vorkommen von bestimmten Anthocyan Derivaten, Delphinidin (Dp), allein nicht zwangsläufig in blauer Blütenfarbe. In *Tulipa*, *Impatiens*, *Cyclamen*, *Eustoma* und *Pelargonium* wurden verschiedene Dp-Derivate nachgewiesen, aber diese Arten besitzen keine wirklich blauen Blüten. Chemische Untersuchungen zeigten, dass neben Dp noch andere Faktoren für die Entstehung von blauen Blüten wichtig sind. Dazu zählen der pH-Wert der Vakuole, Selbst-Assoziierung, intra- und intermolekulare Kopigmentierung und die Assoziierung mit Metallionen (GOTO und KONDO, 1991; BROUILLARD und DANGLES, 1994). Das

Vorkommen von intermolekularer Kopigmentierung zwischen Anthocyanen und Flavonen, ist schon früh beschrieben worden (ROBINSON und ROBINSON, 1931). So können Anthocyane, die mit Flavonen kopigmentiert sind, verschiedene Farben annehmen, die von der Konzentration und der Grundstruktur des Anthocyanins bzw. Flavons abhängen, und zwischen purpurrot und blau variieren können. In blau blühenden *Centaurea cyanus* Sorten wurde z.B. ein Ap 4'-O-Glucosid 7-O-Glucuronid als Kopigment des Pigmentkomplexes identifiziert (ASEN und HOROWITZ, 1974). ASEN et al. (1986) zeigten auch, dass die Substitution der üblichen Flavonol Kopigmente in *Eustoma* mit Flavon C-Glykosiden die Farbe einer entsprechenden Lösung mit Dp-Pigmenten von purpur zu blau verschob. Flavon C-glykoside sind auch in verschiedenen anderen Pflanzenarten an der Entstehung der blauen Blütenfarbe beteiligt, wie z.B. in *Limonium* (ASEN et al., 1973), *Iris* (ASEN et al., 1970), *Centaurea* und *Commelina communis* (GOTO und KONDO, 1991).

Andere Flavone, wie z.B. das Isoetin (5, 7, 2', 4', 5'-Pentahydroxyflavon; Abb. 4), sind als gelbe Blütenpigmente oder im Laub unterschiedlicher Arten der Familie der *Cichoriaeae* identifiziert worden. Gleichzeitig kommen in der Regel auch Ap, Lu oder Scutellarein (6-Hydroxyapigenin) Derivate in diesen Pflanzen vor (HARBORNE, 1978). Ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von gelben Chromophoren aus allgemein farblosen Flavonen, ist eine zusätzliche Hydroxylierung in der 6- oder 8-Position bzw., wie beim Isoetin, in der 2'-Position des B-Ringes.



**Abb. 4. Struktur des Flavons Isoetin.**

Neben ihrem Beitrag zur Blütenfarbe besitzen Flavone, noch weitere biologische Eigenschaften und Wirkungen. Sie wurden bei einigen Pflanzen als Fraßstimulanz für monophage und oligophage Insekten gefunden (HARBORNE und GRAYER, 1994). In den meisten Fällen zeigen die Glykoside dabei eine bei weitem höhere Wirkung als die entsprechenden Aglyka, was vermutlich auf die bessere Löslichkeit der Glykoside zurückzuführen ist.

Außerdem können die Insekten zwischen verschiedenen Zuckerresten unterscheiden, wodurch eine weitere Differenzierung der aktiven Komponenten gegeben ist. Auch die Grundstruktur der Aglyka kann zu unterschiedlichen Wirkungen führen. Im Vergleich zu vielen anderen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen haben die Flavonoide aber offensichtlich keine sehr toxische Wirkung auf Insekten. Trotzdem gibt es einige Flavone, die schon bei geringen Konzentrationen als Abschreckung für Fraßinsekten fungieren oder das Wachstum der Tiere erheblich hemmen können. Ein Einfluß der Glykosylierungsart konnte hier nicht gezeigt werden, wohl aber der Hydroxylierungs- bzw. Methoxylierungsart des Flavons (HARBORNE und GRAYER, 1994).

Flavone stimulieren auch Schmetterlinge zur Eiablage auf bestimmten Pflanzen. Es wurde gezeigt, dass die Tiere erst nach dem Erkennen des Stimulus ihre Eier ablegen. Zu solchen stimulierenden Substanzen gehören z.B. die Flavone Vicenin-2 und verschiedene Lu-Derivate.

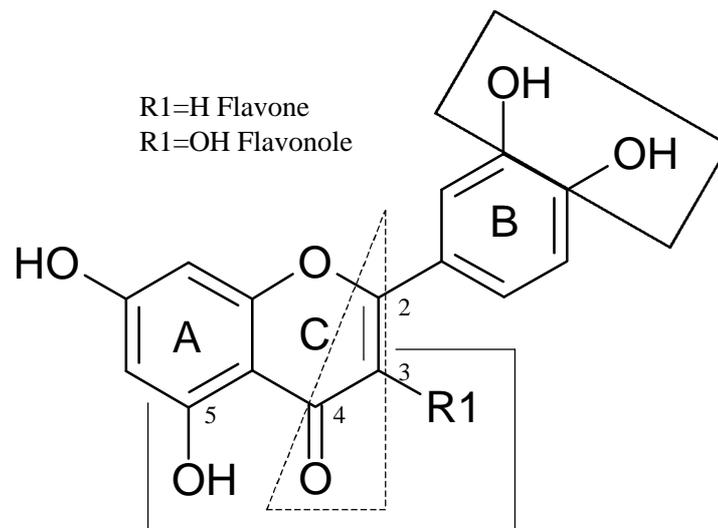
Eine weitere wichtige biologische Eigenschaft der Flavone betrifft die Aktivierung der Nodulationsgene in verschiedenen *Rhizobium*-Arten und steht damit im Kontrast zur Funktion verschiedener Flavonoide als Abwehrstoffe. Rhizobien infizieren Leguminosen (z.B. *Medicago*, *Glycine*, *Glycyrrhiza*, *Lotus*, *Phaseolus*, *Pisum*, *Vicia*) und tragen zur Bildung von stickstofffixierenden Wurzelknöllchen bei. Die von der Wirtspflanze produzierten und abgesonderten Flavone fungieren dabei als "Signalstoff", wodurch die Bakterien den Infektionsprozess einleiten. Dabei wird die Expression der bakteriellen Nodulationsgene (z.B. *nodABCDEF*), die für die Wirt-Symbiont-Signalkette erforderlich sind, induziert. Zu diesen pflanzenspezifischen, aktiven Verbindungen gehören verschiedene Flavone, wie z.B. Ap und Lu. Dabei konnte gezeigt werden, dass mindestens in der 4'-Position und zur vollständigen Aktivität auch an der 3'-Position des B-Ringes eine Hydroxylierung erforderlich ist (vgl. Abb. 1). Dementsprechend zeigte Chrysin (5, 7-Dihydroxyflavon) keine induzierenden Eigenschaften (PETERS et al., 1986; FIRMIN et al., 1986; REDMOND et al., 1986).

Innerhalb der Pflanze beeinflussen verschiedene, natürlich vorkommende Flavone, wie z.B. das Ap, den Auxin-Transport in unterschiedlichen Pflanzengewebe und Transportsystemen. Auxine beeinflussen als pflanzeneigene Wachstumsregulatoren die Zellstreckung, Zellteilung, Apikaldominanz, Wurzel- und Sprossneubildung sowie die Parthenokarpie. Flavone mit spezifischen strukturellen Eigenschaften verhalten sich dabei ähnlich wie synthetische Transportinhibitoren (z.B. Naphthylphthalaminsäure, NPA), binden an den entsprechenden

Rezeptor und beeinträchtigen so den Auxin-Transport. Für diese NPA-ähnliche Wirkung sind Hydroxylierungen am A- und B-Ring von großer Bedeutung. Hydroxylgruppen am Pyranring besitzen nur einen geringen Einfluß auf die Aktivität. Auch Verbindungen mit ungesättigter Bindung zwischen C2 und C3 oder eine fehlende Glykosylierung zeigt gegenüber den gesättigten Formen bzw. den Glykosiden eine höhere Aktivität. Aufgrund der weiten Verbreitung der Flavone in Pflanzen, auch als freie Aglyka, und deren Wirkung schon in mikromolaren Konzentrationen, sowie die Stimulation der Biosynthese durch verschiedene Umweltfaktoren, wie Licht und Verwundung, legt die Vermutung nahe, dass sie als natürliche Regulatoren des Auxin-Transportes agieren können (JACOBS und RUBERY, 1988).

In den letzten Jahren wurden auch die Eigenschaften von verschiedenen sekundären Pflanzenstoffen, wie den Flavonoiden, hinsichtlich möglicher protektiver Einflüsse auf chronische Erkrankungen, z.B. Krebs, HIV, Herzkranzgefäß Erkrankungen und Arteriosklerose, intensiv untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass neben den Flavonolen und Anthocyanen, die in Nahrungspflanzen sehr weit verbreitet sind, auch die Flavone, die unter anderem charakteristisch für Doldengewächse (*Umbelliferae*; z.B. *Apium spec.*, *Daucus spec.* und verschiedene Gewürzkräuter wie Koriander, Petersilie, Fenchel oder Pimpinelle) sind, als bioaktive Substanzen eine nicht unbedeutende Rolle bei der menschlichen und tierischen Ernährung spielen. Die wesentliche Bedeutung liegt dabei in der antioxidativen Aktivität, die vor allem im Abfangen von freien Sauerstoffradikalen besteht. Diese Fähigkeit beruht auf der Tatsache, dass Flavonoide durch die Abgabe von Wasserstoffatomen aus den phenolischen OH-Gruppen radikalische, reaktive Sauerstoffspezies abfangen können. Als wesentliche strukturelle Voraussetzungen dieser Eigenschaft sind am Flavonoidgrundgerüst angeordnete orthoständige Hydroxylgruppen des B-Ringes, die Doppelbindung zwischen den C-Atomen 2 und 3 des C-Ringes (siehe Flavone und Flavonole; Abb. 1 und 2) im Zusammenhang mit der Carbonylgruppe am C-Atom 4 und deren Wechselwirkung mit den benachbarten Hydroxylgruppen in den Positionen 3 und 5 identifiziert worden (Abb. 5). Auch andere positive Eigenschaften, wie z.B. antiallergische, antibakterielle, antivirale, proliferations-reduzierende und anticancerogene Wirkungen, wurden schon seit längerem auch verschiedenen Flavonen zugesprochen. Zwischen tödlich verlaufenden Herzinfarkten und dem Umfang der Flavonidaufnahme konnte eine eindeutig Beziehung nachgewiesen werden, die in den letzten Jahren verstärkt auf verschiedenen Ebenen untersucht und diskutiert wurde. Dagegen konnte bislang in nur wenigen Studien eine negative

Korrelation zwischen der Flavonoidaufnahme und der Erkrankung an Krebs nachgewiesen werden (BÖHM et al., 1998). Auch ein Einfluß auf den menschlichen und tierischen Stoffwechsel und das hochkomplexe Immunsystem ist beschrieben worden. Die Flavone beeinflussen in diesem Zusammenhang eine große Anzahl verschiedener Enzyme (z.B. die Hyaluronidase- oder Aldose-Reduktase), sie chelatieren verschiedene Metallkationen und beeinflussen auch die zelluläre Proteinphosphorylierung (MIDDLETON und KANDASWAMI, 1994).



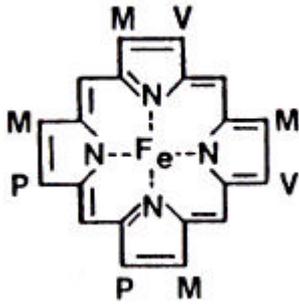
**Abb. 5. Wechselwirkung benachbarter Hydroxylgruppen im Flavonoidgerüst.**

Die umrandeten Teile des Flavonoidgerüsts sind für das Abfangen freier Radikale wesentlich (aus BÖHM et al., 1998).

## A2 Cytochrom P450 Enzyme (Cyt P450)

### A2.1 Allgemeine Eigenschaften und Funktionsmechanismus

Cyt P450-abhängige Enzymsysteme kommen in fast allen lebenden Organismen vor und bilden eine große, stark divergente Gen-Superfamilie von membran-gebundenen Häm-enthaltenen Proteinen, die als terminale Bestandteile einer kurzen Elektronentransportkette fungieren. Tatsächlich sind bis heute über 500 verschiedene Cyt 450 kloniert ( $M_r$  45.000 bis 65.000) und sequenziert worden (MANSUY, 1998). Sie sind in verschiedene Gen-Familien, Unterfamilien und Gruppen mit Allelvariationen, basierend auf Sequenzhomologien der entsprechenden Gene, eingeordnet worden. Aminosäuresequenzen innerhalb einer einzelnen Cyt P450

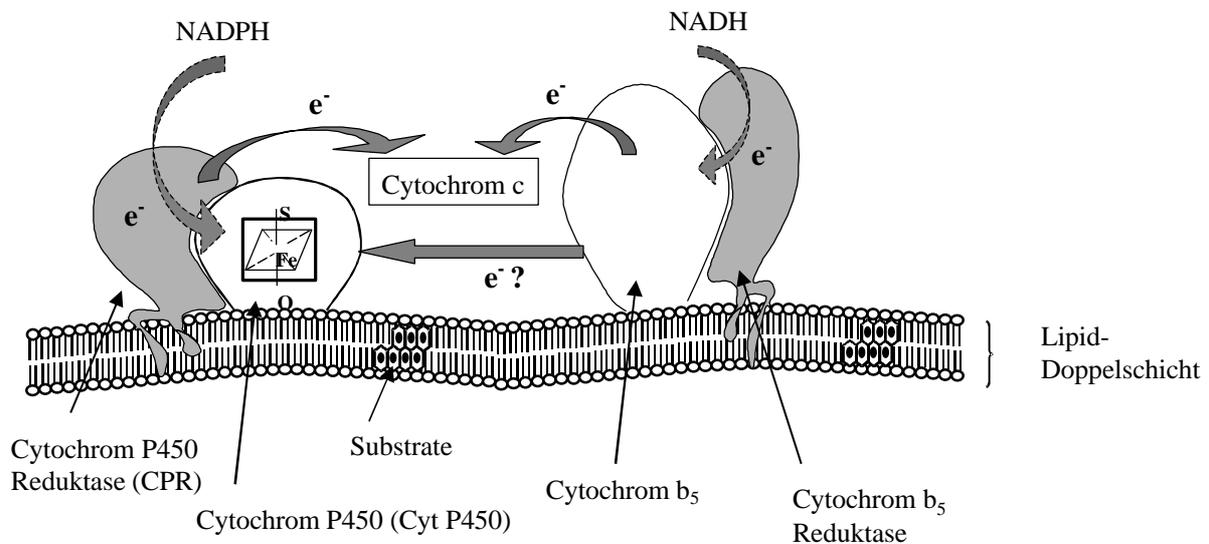


**Abb. 6. Ferriprotoporphyrin IX (Häm).**

Genfamilie besitzen eine Homologie von über 40%, innerhalb der einzelnen Unterfamilien liegt die Homologie bei über 55%. Bei einer Homologie von größer 97% spricht man von einer allelischen Variante (Zugriff auf Sequenzen und weitere Informationen u.a. auf folgender Webpage : <http://drnelson.utmem.edu/nelsonhomepage.html>). Für ihre Aktivität benötigen sie assoziierte Proteine, wie die NADPH : Cyt P450 Reduktase (CPR;  $M_r$  72.000 bis 84.000; E.C. 1.6.2.4), die unspezifisch Elektronen von NADPH über FAD und FMN zur

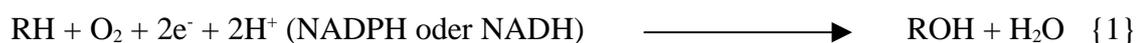
prostethischen Häm-Gruppe, dem Ferriprotoporphyrin IX (Abb. 6), der Cyt P450 Proteine überträgt. Von hier werden die Elektronen in den meisten Fällen auf Sauerstoff ( $O_2$ ) übertragen, wobei das Substrat oxygenisiert wird. Das Flavoprotein (CPR) und das Hämprotein (Cyt P450) sind dabei über einen Cysteinrest kovalent miteinander verbunden und in der Pflanze und anderen Eukaryonten als Membranproteine über N-terminale, negative geladene Aminosäuren gefolgt von hydrophoben Segmenten, bestehend aus 17 bis 29 Aminosäuren, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), Mitochondrien oder Peroxisomen verankert (AHN et al., 1993; MURAKAMI et al., 1994). Bei der Lokalisierung ist sowohl die Ladung der den hydrophoben Segmenten vorangehenden AS, als auch die Länge dieser Bereiche für die Funktion entscheidend (SATO et al., 1990). Die CPR ist dabei für die Reaktion zwingend erforderlich, die Substratspezifität der Reaktionen ist jedoch ausschließlich auf die Cyt P450's zurückzuführen. Außerdem kann eine CPR mehrere unterschiedliche Cyt P450's mit Elektronen versorgen. Die Tatsache, dass die Zugabe von NADH die Cyt P450 abhängigen Reaktionen stimuliert, deutet zudem daraufhin, dass der Elektronentransfer unter Umständen auch durch Cytochrom  $b_5$  (Cyt  $b_5$ ) geschehen kann. *In vivo* erhält das pflanzliche Cyt  $b_5$  die Elektronen von der NADH : Cyt  $b_5$  Reduktase (Abb. 7; DONALDSON und LUSTER, 1991).

Eine typische Cyt P450 katalysierte Reaktion baut eines der zwei Sauerstoffatome aus einem  $O_2$ -Molekül in eine Vielzahl verschiedener Substrate ein. Gleichzeitig wird das andere Sauerstoffatom um zwei Elektronen reduziert und  $H_2O$  freigesetzt (ORTIZ DE MONTELLANO, 1986). Der Oxidant  $O_2$  erhält bei dieser Reaktion Reduktionsäquivalente von zwei verschiedenen Reduktanten, vom Substrat und über die CPR vom NADPH. Die



**Abb. 7. Lokalisierung der Cyt P450 in den Membranen und die Elektronentransportkette (modifiziert nach GONZALES, 1994).**

entsprechenden Enzymsysteme werden als mischfunktionelle Monooxygenasen (Reaktionsgleichung {1}) bezeichnet. Demgegenüber inkorporieren Dioxygenasen beide Sauerstoffatome in das Substrat {2} und Oxidasen reduzieren den Sauerstoff lediglich, bauen ihn aber nicht in das Substrat ein {3}. Bei einer klassischen Monooxygenase Reaktion, die typisch für pflanzliche Cyt P450 ist, erfolgt eine Inkorporation von molekularem Sauerstoff in das Substrat, und die Reaktion ist abhängig vom Elektronentransfer über Flavoproteine. Nicht klassische Formen der Monooxygenasen, bauen entweder keinen molekularen Sauerstoff in das Endprodukt ein, wie z.B. die Berbamunin Synthase (KRAUSS und KUTCHAN, 1995), oder sie benötigen kein Flavoprotein für die Aktivierung von O<sub>2</sub>, was bedeutet, dass diese Enzyme weder an eine CPR noch an ein Cyt b<sub>5</sub>/NADH-abhängiges Cyt b<sub>5</sub> Reduktase System gebunden sind, wie z.B. die Allenoxid Synthase (SONG et al., 1993).





**Abb. 8. Katalytischer Zyklus der Cyt P450 Reaktion (nach GROVES und HAN, 1995).**

- (1) Bindung des jeweiligen Substrates (S).
  - (2) Reduktion des Eisen (III); Eisen (II) Stadium des Cyt P450 erreicht.
  - (3) Bindung des molekularen Sauerstoffes; ein Cyt P450-Dioxygen Komplex entsteht.
  - (4) Transfer des zweiten Elektrons; ein Peroxoisen (III) Komplex entsteht.
  - (5) Protonierung und Spaltung der O-O Bindung; es entsteht H<sub>2</sub>O und eine reaktive Eisen-oxo Spezies.
  - (6) Transfer des Sauerstoffatoms aus Oxo-Komplex auf das gebundene Substrat.
  - (7) Dissoziierung des Produktes.
- (A) (C) seltene Reaktionswege.  
(B) „Peroxide shunt“; NADPH und molekularer Sauerstoff können durch andere Elektronen- bzw. Sauerstoffdonoren, wie Alkyl Hydroperoxide, Hydrogenperoxid, Peroxysäuren, NaIO<sub>4</sub>, NaClO<sub>2</sub> und Iodosylbenzen, ersetzt werden (CORREIA und ORTIZ DE MONTELLANO, 1993)

## **A2.2 Pflanzliche Cyt P450**

Nachdem Ende der sechziger Jahre die ersten Veröffentlichungen über Cyt P450's in Membranfraktionen von höheren Pflanzen erschienen (MURPHY und WEST, 1969; FREAR et al., 1969) sind die Kenntnisse in Bezug auf die Beteiligung von Cyt P450 in die unterschiedlichsten Reaktionen des Sekundärstoffwechsels der Pflanzen stark angestiegen.

Da Cyt P450 in Tieren und niederen Eukaryonten eine wichtige Rolle im Stoffwechsel von Xenobiotika, Pheromonen, Drogen und toxischen Chemikalien, aber auch von endogenen Substanzen, wie Sterolen, Fettsäuren und Prostaglandinen spielen, sind sie in der Vergangenheit bereits gut untersucht worden (GUENGERICH, 1991). Dagegen stellte sich die Reinigung von pflanzlichen Cyt P450, die im Vergleich zu tierischen eine weitaus höhere Vielfalt an Reaktionen katalysieren und sehr viel spezifischer sind, als wesentlich schwieriger heraus. In Pflanzen sind Cyt P450 an der Biosynthese von Fettsäuren, Phenylpropanoiden, Flavonoiden, Furanocumarinen, Phytoalexinen, Lignin-Intermediaten, Sterolen, Terpenoiden, Alkaloiden, Phytohormonen (z.B. Gibberellinsäure) und anderen Produkten des Sekundärstoffwechsels beteiligt. Die entsprechenden Biosyntheseprodukte übernehmen in der Pflanze unterschiedliche, zum Teil lebenswichtige Funktionen, wie z.B. Membranbildung, Lignifizierung, Pathogenabwehr, Schutzpigmente gegenüber UV-Strahlung, ätherische Öle und Farbpigmente. Außerdem sind sie in der Lage toxische Herbizide oder Insektizide, allelopathische Substanzen und andere Xenobiotika zu detoxifizieren (DONALDSON und LUSTER, 1991; SIMINSZKY et al., 1999).

Durch die Aktivität von Cyt P450's innerhalb der verschiedenen Biosynthesewege in Pflanzen entsteht eine hohe Diversität der gebildeten Endprodukte. Die Bildung der jeweiligen Intermediate wird durch eine Reihe verschiedener Faktoren, wie z.B. Licht, chemische Verbindungen, pilzliche Elicitoren sowie Verwundungen und auch durch das Entwicklungsstadium gesteuert. Die Höhe und der zeitliche Verlauf der Induktion von Cyt P450 Enzymen in diesen Biosynthesewegen variiert stark in Abhängigkeit vom Induktionsmechanismus und dem Gewebe. In Sämlingen, die eine große Vielzahl verschiedener Zelltypen enthalten, ist zudem das Entwicklungsstadium der jeweiligen Zelle von Bedeutung. So werden spezifische Cyt P450 in Pflanzen nur unter ganz bestimmten Bedingungen, z.B. durch Verwundungen oder Pathogenbefall, induziert. Andere werden nur in spezifischen Geweben oder auch nur in einzelnen Zellen zu wiederum nur bestimmten Zeiten exprimiert. In allen Fällen ist jedoch das Induktionsprofil spezifisch für ein einzelnes Enzym oder eine Gruppe verschiedener Cyt P450's und ist nicht das Ergebnis einer allgemeinen Cyt P450 Induktion (siehe Übersichten in DONALDSON und LUSTER, 1991; BOLWELL, 1994; DURST und O'KEEFE, 1995; SCHULER, 1996).

Nur wenige Cyt P450 Gene aus Pflanzen, im wesentlichen die weit verbreitete C4H (Abb. 2), konnten bislang erfolgreich durch Klonierungsstrategien, die auf Sequenzinformationen aus Protein-Reinigungen basieren, kloniert werden (MIZUTANI et al., 1993; TEUTSCH et al., 1993; KOCH et al., 1995). Dies ist zum einen auf das allgemein niedrige Level der meisten Proteine, zum anderen auf die allgemeine Instabilität der Cyt P450 in pflanzlichen Extrakten, die mit deren Anordnung an der cytoplasmatischen Oberfläche der mikrosomalen Membranen und dem hohen Protease-Anteil im Pflanzengewebe zusammenhängt, zurückzuführen. Außerdem sind hohe mechanische Kräfte erforderlich, um die pflanzlichen Zellwände aufzuschließen und die Anwesenheit von Pigmenten, Phenolen und anderen Enzymhemmstoffen beeinträchtigt die Aufreinigung zusätzlich (F. DURST, persönliche Mitteilung). Durch diese Umstände wird eine Rekonstitution der gelösten Komponenten zum enzymatisch aktiven Komplex wesentlich erschwert, wenn nicht sogar in einigen Fällen unmöglich gemacht. Antikörper gegen gereinigte pflanzliche Proteine allgemein oder gegen Cyt P450 Enzyme speziell hybridisierten häufig mit mehreren verschiedenen Polypeptiden (VETTER et al., 1992). Dagegen konnten in molekular-genetischen Experimenten durch T-DNA Tagging oder PCR-Techniken, verschiedene pflanzliche Cyt P450's aus dem Biosyntheseweg von Gibberellinen (WINKLER und HELENTJARIS, 1995), Brassinosteroiden (SZEKERES et al., 1996), noch nicht identifizierten

Hormonen (KIM et al., 1998), Phenylpropanoiden (MEYER et al., 1996) und Flavonoiden (HOLTON et al., 1993a; MEIJER et al., 1993) identifiziert werden. Dabei wurde im allgemeinen die Notwendigkeit einer Proteinreinigung durch den Einsatz von PCR gestützten Methoden umgangen. Hierzu wurden degenerierte Oligonukleotide aus verschiedenen hoch konservierten Bereichen der Cyt P450 Enzyme abgeleitet und zur Amplifikation von Sequenzen, ausgehend von cDNA der entsprechenden Pflanzengewebe, verwendet. Mit den so erhaltenen putativen Cyt P450 Sequenzen wurden die entsprechenden full-length Klone anschließend aus cDNA Genbanken isoliert. Die weitere Identifizierung erfolgte durch Expression der entsprechenden Gene in Hefen oder Insektenzellen und einer folgenden Darstellung der Enzymaktivität, sowie durch transgene Komplementation geeigneter Mutanten (z.B. HOLTON et al., 1993a; HOTZE et al., 1995; AKASHI et al., 1997; SCHOPFER und EBEL, 1998; BRUGLIERA et al., 1999).

Die pflanzliche Cyt P450 Sequenzen enthalten nur wenige konservierte Sequenzbereiche (Abb. 9). Das am stärkste konservierte Element befindet sich in der Nähe des C-Terminus und besitzt das hoch konservierte Motiv [PFGxGRRxCxG] mit dem Cysteinrest, der als Thiolat-Ligand zur prosthetischen Häm-Gruppe fungiert. Eine Ausnahme bildet die Allenoxid Synthase aus *Linum usitatissimum*, in der nur der Cysteinrest konserviert ist (SONG et al., 1993). Weitere hoch konservierte Aminosäuren (AS) sind im Bereich der mutmaßlichen I-Helix, der Sauerstoffbindungsstelle, mit der Konsensussequenz [(A/G)GX(D/E)T(T/S)] identifiziert worden (DURST und NELSON, 1995; SCHULER, 1996). Die lokale Umgebung der Sauerstoffbindung und -aktivierung in der Distal Helix (Helix I) ist relativ einfach, mit meistens hydrophoben Proteinresten und den für die Bildung der Sauerstoffbindungstasche wichtigen AS-Resten Alanin/Glycin gefolgt von einem weiteren Glycin und einem einzelnen Threonin, das für die katalytische Wirkung einiger Cyt P450 essentiell ist (GROVES und HAN, 1995). Die genannten AS entsprechen den Positionen 248, 249 bzw. 252 in P450<sub>cam</sub>, einer gut untersuchten Cyt P450 Monooxygenase aus *Pseudomonas*-Bakterien (POULOS et al., 1985). Darüber hinaus ist noch ein Bereich mit basischen AS am N-Terminus der Signal-Anchor Sequenz und eine darauf folgende prolinreiche Sequenz in pflanzlichen Cyt P450 hoch konserviert. Die überwiegend aus hydrophoben AS bestehende Membran-Anchor Sequenz fungiert vermutlich als Signal für die Insertion in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER), während der prolinreiche Abschnitt die Verbindung zum cytoplasmatischen Rest des Proteins darstellt. Abgesehen von diesen gut konservierten AS Sequenzen in den Cyt P450's ist die strukturelle Vielfalt zwischen den Cyt P450 Proteinen sehr hoch.



werden. Zur letztendlichen funktionellen Identifizierung entsprechender cDNA Klone kann ein für die funktionelle Expression von Cyt P450's optimiertes Hefesystem genutzt werden. Das hierzu erforderliche enzymatische Testsystem kann aus der biochemischen Charakterisierung der FNS II Aktivität aus *Gerbera*-Blüten übernommen werden.

## B Material und Methoden

### B 1 Abkürzungen

2-HIS	2-Hydroxyisoflavonsynthase
A	Adenin
Abb.	Abbildung
acc.	Zugangsnummer ( <b>accession number</b> )
ANS	Anthocyanidinsynthase
AOS	Allenoxid Synthase
Ap	Apigenin
AS	Aminosäure
BS	Berbamunin Synthase
BSA	Rinderserumalbumin ( <b>B</b> ovine <b>S</b> erum <b>A</b> lbumin)
C	Cytosin
C4H	Zimtsäure 4-Hydroxylase
CAM	Camphor 5-exo-Monooxygenase
CAW	Chloroform-Eisessig-Wasser
cDNA	komplementäre ( <b>copy</b> ) Desoxyribonukleinsäure
CHI	Chalkonisomerase
CHS	Chalkonsynthase
CoA	Coenzym A
CPR	Cytochrom P450-Reduktase
Cy	Cyanidin
Cyt b <sub>5</sub>	Cytochrom b <sub>5</sub>
Cyt c	Cytochrom c
Cyt P450	Cytochrom P450
D6aH	Dihydroxypterocarpan 6a-Hydroxylase
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin 5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin 5'-triphosphat
DD-RT-PCR	<b>D</b> ifferential <b>D</b> isplay - <b>R</b> everse <b>T</b> ranscription - <b>P</b> olymerase <b>C</b> hain <b>R</b> eaction
DFR	Dihydroflavonol 4-Reduktase
DHK	Dihydrokaempferol
DHQ	Dihydroquercetin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
dpm	Zerfälle pro Minute
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
E.C.	Enzyme Commission Number
ER	<b>E</b> ndoplasmatisches <b>R</b> etikulum
ERI	Eriodictyol
F2H	Flavanon 2-Hydroxylase
F5H	Ferulat 5-Hydroxylase
F3'H	Flavonoid 3'-Hydroxylase
F3',5'H	Flavonoid 3',5'-Hydroxylase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FG	Freiheitsgrad
FHT	Flavanon 3-Hydroxylase

FLS	Flavonolsynthase
FMN	Flavinmononukleotid
FNS II	Flavonsynthase II
G	Guanin
GSP	<b>g</b> ensspezifischer <b>P</b> rimers
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
kDa	kilo Dalton
Lu	Luteolin
mRNA	Boten ( <b>m</b> essenger) Ribonukleinsäure
NAD <sup>+</sup>	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid
NADH	reduzierte Form des NAD <sup>+</sup>
NADP <sup>+</sup>	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotidphosphat
NADPH	reduzierte Form des NADP <sup>+</sup>
NAR	Naringenin
NPA	Naphthylphthalaminsäure
OD <sub>600</sub>	Absorptionsstärke bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	<b>O</b> pen <b>R</b> eading <b>F</b> rame = offener Leserahmen
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PAGE	<b>P</b> olyacrylamidgелеlektrophorese
PCR	<b>P</b> olymerase <b>C</b> hain <b>R</b> eaction = Polymerase Ketten Reaktion
Pg	Pelargonidin
PSL	<b>P</b> hoto <b>S</b> timulated <b>L</b> umineszenz
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Qu	Quercetin
RACE	<b>R</b> apid <b>A</b> mplification of <b>c</b> DNA <b>E</b> nds
RE	Rohextrakt
RS	Restriktion
R <sub>f</sub>	Retentionszeit
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
T	Thyosin
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TES	N-Tris[hydroxymethyl]methyl-2-aminoethan Hydrogensulfit
U	Unit Enzymaktivität (µmol Substratumsatz/min)
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen

Die Abkürzungen für physikalische Einheiten und deren Vorsatzzeichen entsprechen dem internationalen Einheitensystem und sind nicht gesondert aufgeführt.

## **B 2 Material**

### **B 2.1 Pflanzenmaterial und Bestäubungstechnik**

Zu Beginn dieser Arbeit standen am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau chemogenetisch definierte *Gerbera*-Klonsorten und -Linien zur Verfügung (TYRACH, 1995). Dieses Sortiment konnte in flavon-produzierende Typen (Genotyp *fns*<sup>+</sup> .) und flavonfreie Mutanten (Genotyp *fns fns*) unterteilt werden. Die verschiedenen Klone unterschieden sich zudem in der Zusammensetzung anderer Flavonoide und im Gehalt an Carotinoiden. Für weitere Pigmentanalysen, enzymologische und molekularbiologische Untersuchungen wurden zusätzlich aktuelle Schnittgerbera-Sorten der Firma Terra Nigra (DeKwakel, Niederlande), Topfgerbera-Sorten der Firma Bock Pflanzenexport KG (Bremen) sowie Sorten, Zuchtmaterial und verschiedene Wildgerbera-Arten von Peter Ambrosius (Marbach am Neckar) mit einbezogen. Ein großer Teil der aktuellen *Gerbera*-Sorten wurden sowohl in Gewebekultur als auch in Substratkultur gehalten (siehe Kap. B 3). Eine detaillierte Beschreibung des gesamten Pflanzenmaterials ist im Anhang A1a bis A1e zu finden.

Selbstungen wurden innerhalb eines Blütenstandes oder zwischen den Blütenständen der gleichen Pflanze durchgeführt. Ein kontrolliertes Abblühen wurde durch über die Blüten gezogene Pergamintüten erreicht. Die Bestäubungen wurden im Idealfall bis zu viermal in täglichen Abständen wiederholt. Weitere Hinweise zu Bestäubungsmethoden und Blütenbau bei *Gerbera* sind bei MAURER (1967) zu finden.

Die Selbstungsnachkommenschaften der Sorte „Th 58“ wurden durchgehend als 147-100 bis 163 und die weiteren Selbstungen aus diesen Linien mit 147-200 bis 216 (für 147-120 x S), 147-300 bis 325 (für 147-125 x S) und 147-400 bis 431 (für 147-114 x S) bezeichnet.

Aussaat und Kultur der *Gerbera* im Gewächshaus wurde unter praxisüblichen Bedingungen durchgeführt (HORN und LANGE, 1996).

*Gerbera* Blüten wurden zu verschiedenen Entwicklungsstadien, die wie folgt in Anlehnung an HELARIUTTA et al. (1995) definiert wurden, geerntet (Abb. 10) :

- Stadium 1 : Knospe geschlossen, Petalen kleiner als 5 mm.
- Stadium 2 : Strahlenblüten sichtbar, 5 - 10 mm lang.
- Stadium 3 : Strahlenblüten 10 - 15 mm lang.
- Stadium 4 : Beginn der Pigmentierung, Länge 15 -23 mm.
- Stadium 5 : Ligula der Strahlenblüten pigmentiert, 23 - 26 mm lang.
- Stadium 6 : Strahlenblüten 26 - 35 mm lang.
- Stadium 7 : Infloreszenz halb geöffnet, 35 - 40 mm lang.
- Stadium 8 : Infloreszenz vollständig geöffnet, 40 - 50 mm lang.
- Stadium 9 : Strahlenblüten 50 - 55 mm lang.
- Stadium 10 : Strahlenblüten 55 - 60 mm lang.
- Stadium 11 : seneszente Infloreszenz, 55 - 60 mm lang.



**Abb. 10. Verschiedene Blütenstadien bei der *Gerbera* Sorte „Regina“**

## B 2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle nicht aufgelisteten Chemikalien und Lösungsmittel wurden in der jeweiligen Qualität von den Firmen SIGMA (Deisenhofen), MERCK (Darmstadt) oder FLUKA (Neu-Ulm) bezogen.

Acrylamid	Promega, Mannheim
Agar-Agar	Merck
Ampicillin	Sigma
Bromphenolblau	Merck
Casaminoacids	Difco, Detroit, USA
Cellulose Dünnschichtplatten G1440	Schleicher & Schüll, Dassel
DNA-Größenstandards	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
dNTPs	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ficoll 400	Fluka
Formaldehyd, 37%	Fluka
Immobilion-Ny+	Millipore, Eschborn
IPTG	Sigma
Glas Beads 425-600µM	Sigma
Glykogen für die Molekularbiologie	Boehringer, Mannheim
Heringssperma DNA	Promega
Hybond-NX	Amersham, Braunschweig
IPTG	Roth, Karlsruhe
PEG 4000	Fluka
Pepton	Fluka
Phenol, gesättigt mit 0.1 M Citrat-Puffer	Sigma
Polyacrylamid-Gebrauchslösung	Promega
PVPP	Fluka
Rinderserum Albumin Fraktion V	Fluka
RNA-Längenstandard III	Boehringer, Mannheim
Seesand, gegläht	Merck
Sephadex G-50	Sigma
TEMED	Promega
TES	Sigma
Triton X-100	Fluka
Tryptophan	Fluka
Yeast-Extrakt	Fluka
Yeast Nitrogen Base	Difco
Xylencyanol	Merck
X-Gal	Sigma

## B 2.3 Radiochemikalien

*Tabelle 1. Verwendete Radiochemikalien*

Substanz	spezifische Aktivität	Quelle
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] dCTP	~ 3.000 Ci/mmol	ICN, Meckenheim
[ $\alpha$ - <sup>35</sup> S] dATP	~ 1.000 Ci/mmol	ICN, Meckenheim
[ <sup>14</sup> C] 2-Malonyl-CoA	55 mCi/mmol	ARC, ST. Louis, USA
[ <sup>14</sup> C] Naringenin	200 dpm/ $\mu$ l	eigene Synthese (Kap. 5.1)
[ <sup>14</sup> C] Eriodictyol	100 dpm/ $\mu$ l	eigene Synthese (Kap. 5.1)
[ <sup>14</sup> C]-Liquiritigenin	1000 dpm/ $\mu$ l	K. STICH, Wien

## B 2.4 Enzyme und Proteine

Glucose Oxidase (E.C. 1.1.3.4)	Merck, Darmstadt
Katalase (E.C. 1.11.1.6)	Boehringer, Mannheim
DNase I, RNase-frei (E.C. 3.1.21.1; 10 U/ $\mu$ l)	Boehringer, Mannheim
Replitherm Polymerase	Epicentre, Madison, USA
Taq DNA Polymerase (E.C. 2.7.7.7)	Promega, Mannheim
T4 DNA Ligase (E.C. 6.5.1.1)	Boehringer, Mannheim
Terminale Transferase (E.C. 2.7.7.31)	Boehringer, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	
Bam HI	Promega, Mannheim
Eco RI	Promega, Mannheim
Eco RV	Amersham, Braunschweig
Hind III	Promega, Mannheim
Kpn I	Amersham, Braunschweig
Sca I	Amersham, Braunschweig
Xho I	Promega, Mannheim
RNase A (E.C. 3.1.27.5)	Boehringer, Mannheim
RNase H	Boehringer, Mannheim
Superscript Reverse Transcriptase II	Gibco/BRL, Eggenstein

## **B 2.5 Reaktionssysteme und Kits**

„Sequenase Version 2.0“ Kit	USB, Cleveland, USA
„Plasmid Miniprep - Quantum Prep“ Kit	Biorad, München
„Plasmid Purification Midi Prep“ Kit	Qiagen, Hilden
„Oligotex-dT mRNA“ Kit	Qiagen, Hilden
„QUIAEX II DNA Gel Extraktions“ Kit	Qiagen, Hilden
„High Pure PCR Product Purification“ Kit	Boehringer, Mannheim
„Titan One Tube RT-PCR“ Kit	Boehringer, Mannheim
„Expand™ High Fidelity PCR System“	Boehringer, Mannheim
„T/A Cloning“ Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande
„5'-RACE“ Kit	Gibco/BRL, Eggenstein
„Rediprime™ DNA Labelling System“	Amersham, Braunschweig

## **B 2.6 Substrate und Cosubstrate (nicht radioaktiv markiert)**

4-Cumaroyl-CoA	W. Heller, GSF Neuherberg
Kaffeoyl-CoA	W. Heller, GSF Neuherberg
Cytochrom c aus Pferdeherz	Roth, Karlsruhe
NADPH	Boehringer, Mannheim
NADP	Sigma, Deisenhofen

## **B 2.7 Hemmstoffe**

Human placental RNase I Inhibitor (1 U/μl)	Boehringer, Mannheim
Tetcyclacis	W. Rademacher, BASF, Limburger Hof
Ketokonazol	W. Rademacher, BASF, Limburger Hof
Ancymidol	Sigma, Deisenhofen
Metyrapon	Aldrich, Deisenhofen

## **B 2.8 Referenzsubstanzen**

NAR, ERI, Ap, Lu, Km, Qu und DHQ wurden bei Roth (Karlsruhe) bezogen. DHK, Pg und Cy stammten aus der Sammlung des Labors.

## B 2.9 Bakterien- bzw. Hefestämme und Vektoren

### *Escherichia coli*

TOP10 *FmcrA*  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$   $\Phi80lacZ\Delta M15$   $\Delta lacX74$   
*deoR recA1 araD139*  $\Delta(ara-leu)7697$  *galU galK rpsL endA1*  
*nupG* (Invitrogen).

### *Saccharomyces cerevisiae*

Aus dem Hefestamm W303-1B (*MATa*; *ade 2-1*; *his 3-11*; *leu 2-3*, *ura 3-1*; *trp 1*; *can<sup>R</sup>*; *cyr<sup>+</sup>*), der als W(N) beschrieben ist, wurden durch die Veränderung des YRED-Locus die Stämme WAT 11 und WAT 21 abgeleitet. Diese beiden Stämme überexpressieren ATR1 und ATR2, die für die CPR aus *Arabidopsis thaliana* (Acc. Nr. X66016 bzw. X66017) kodieren (TRUAN et al., 1993; URBAN et al., 1997). Der Wildtyp W(N) enthält nur die endogene CPR Aktivität der Hefen.

Außerdem wurde der kommerzielle Hefestamm INVSc1 (*MATa*, *his 3- $\Delta$ 1*; *leu 2*; *trp 1-289*; *ura 3-52*; Invitrogen, Leek, Niederlande) verwendet. Dieser Stamm besitzt wie W(N) nur eine endogene CPR Aktivität.

Die Stämme W(N), WAT11 und WAT21 wurden von P. Urban und D. Pompon (Gif-sur-Yvette, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 2. Verwendete Hefestämme.**

Stamm	CPR-Promotor	CPR-ORF
W(N)	Wildtyp	Wildtyp
INVSc1	Wildtyp	Wildtyp
WAT11	GAL10-CYC1	ATR1
WAT21	GAL10-CYC1	ATR2

## Vektoren

*Escherichia coli* :

pCR2.1                      besitzt komplementäre T-Überhänge  
(„T/A-Cloning“ Kit, Invitrogen)

*Saccharomyces cerevisiae* : (Hefeexpressionsvektoren)

pYeDP60                      Expressionskassette : GAL10-CYC1 Hybrid Promotor  
(galaktose-induzierbar), PGK Terminator; Komple-  
mentationsmarker : URA3, ADE2 (Uracil und Adenin).  
(Abb. 11; URBAN et al., 1990; POMPON et al., 1996)

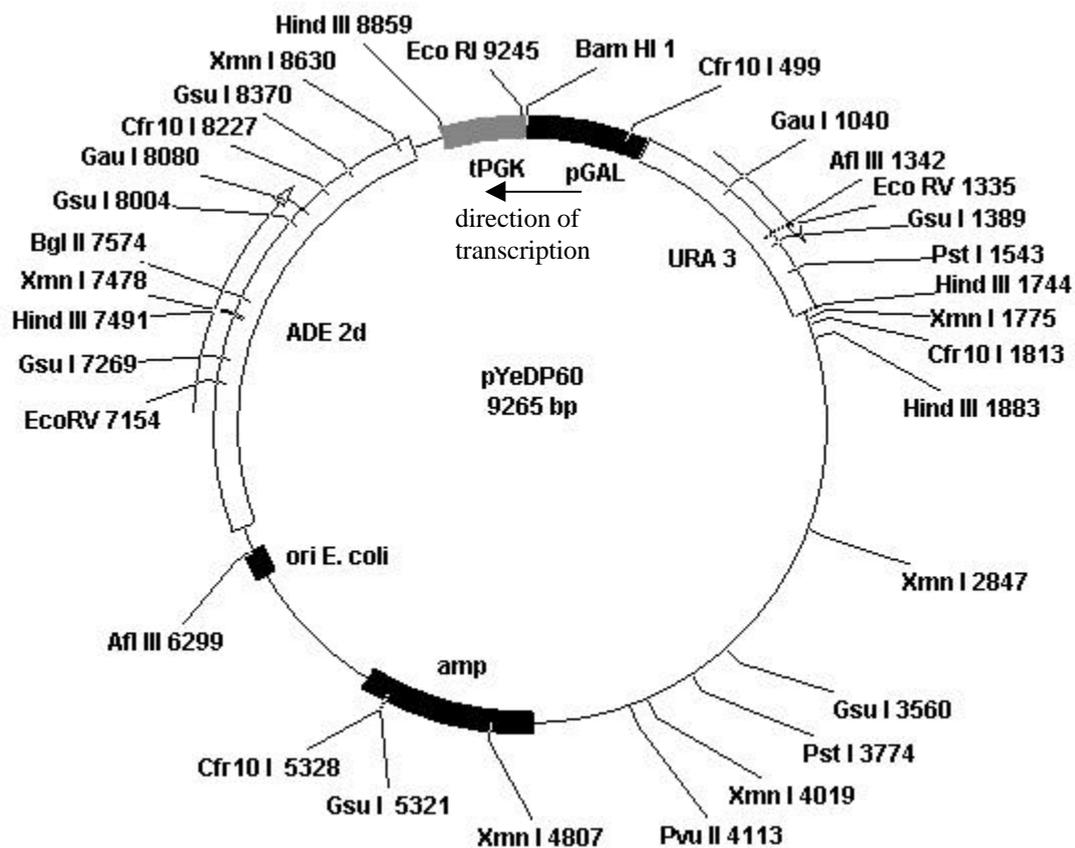


Abb. 11. Hefeexpressionsvektor pYeDP60 (POMPON et al., 1996).

pYES2

Expressionskassette : GAL1 Teil des divergenten GAL1/GAL10 Promotor (galaktose-induzierbar), CYC1 Terminator; Komplementationsmarker : URA3; Polylinker. (Abb. 12; Invitrogen)

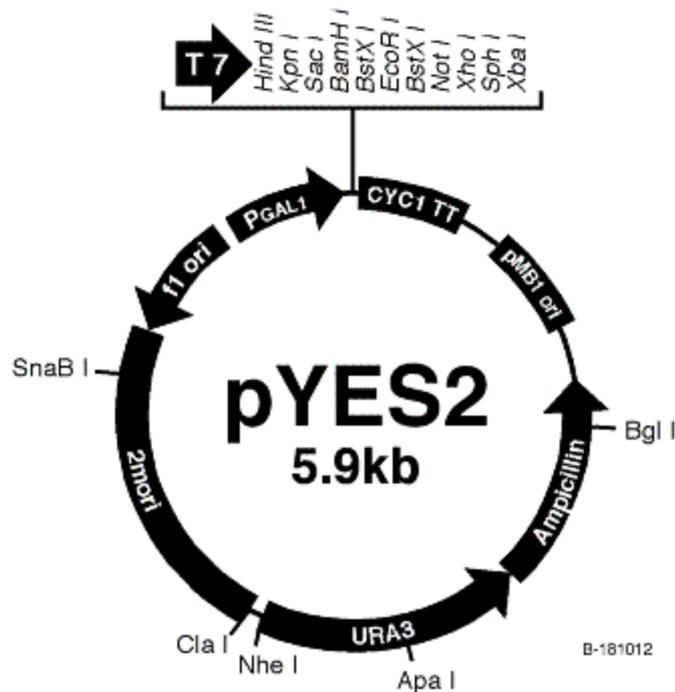


Abb. 12. Hefeexpressionsvektor pYES2 (Invitrogen).

## B 2.10 Puffer und sonstige Lösungen

Zur Herstellung der Puffer und sonstigen Lösungen wurde deionisiertes Wasser verwendet. Lösungen sowie Glas- und Kunststoffgeräte für die Molekularbiologie wurden falls nicht anders angegeben vor Gebrauch bei 121 bzw. 135°C sterilisiert.

### Enzymologie

Puffer 1 : 0.1 mol/l Tris-HCl inklusive 28 mmol/l 2-Mercaptoethanol und 10 mmol/l Natriumascorbat, pH 7.5

Puffer 2 : 0.1 mol/l Tris-HCl, pH 7.5

Puffer 3 : 0.05 mol/l Tris-HCl inklusive 28 mmol/l 2-Mercaptoethanol und 10 mmol/l Natriumascorbat, pH 7.5

Puffer 4 : Britton-Robinson-Puffer II, pH 5.0 bis 10.0

## Molekularbiologie

# 10 x TE pH 8.0	0.01 mol/l Tris-HCl, 0.01 mol/l EDTA, pH 8.0
# 10 x TBE	0.45 mol/l Tris, 0.45 mol/l Borsäure, 0.01 mol/l EDTA
# 20 x SSPE	3.6 mol/l NaCl, 0.2 mol/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.02 mol/l EDTA, pH 7.4
# 20 x SSC	3 mol/l NaCl, 0.3 mol/l Na <sub>3</sub> Citrat, pH 7.0
# 50 x Denhardt's	1 % (w/v) BSA, 1 % (w/v) Ficoll, 1 % (w/v) PVP
# 10 x MOPS-Puffer	0.2 mol/l MOPS, 0.05 mol/l Na-Acetat, 0.01 mol/l Na <sub>2</sub> -EDTA, pH 7.0
# 10% SDS	100 g pro Liter, pH 7.2
# Waschlösung I	2 x SSPE, 0.1 % (w/v) SDS
# Waschlösung II	1 x SSPE, 0.1 % (w/v) SDS
# Ladebuffer DiffDis	80 % Formamid, 10 mmol/l EDTA, pH 8.0, 1 mg/ml Xylen Cyanol FF, 1 mg/ml Bromphenolblau
# deionisiertes Formamid (SAMBROOK et al., 1989)	
# Extraktionspuffer für Gesamt-RNA (nach GIULIANO et al., 1993)	
für 100 ml :	50 g Guanidinium Thiocyanat, 5 ml 3 mol/l Natriumacetat, pH 5.3, 2 ml 10 % Natrium-Sacrosinat (N-Lauroylsacrosin Na-Salz)
# Extraktionspuffer für genomische DNA (nach DELLAPORTA et al., 1983)	
	0.1 mol/l Tris-HCl, pH 8.0, 0.05 mol/l EDTA, 0.5 mol/l NaCl, 0.02 mol/l 2-Mercaptoethanol
# Probenpuffer für Northern-Blot	
für 10 ml :	830 µl Formaldehyd, 37 %, 2500 µl deionisiertes Formamid, 500 µl 10 x Gelpuffer, 100 µl Ethidiumbromid, 6070 µl steriles Wasser, je eine Spatelspitze Xylenblau bzw. Bromphenolblau
TES	560 mmol/l TES, 240 mmol/l HCl, 100 mmol/l MgCl <sub>2</sub>
TEK	50 mmol/l Tris-HCl, pH 7.4, 1 mmol/l EDTA, 0.1 mol/l KCl
TES-B*	50 mmol/l Tris-HCl, pH 7.4, 1 mmol/l EDTA, 0.6 mol/l Sorbitol, 2 mmol/l DTT
TEG*	50 mmol/l Tris-HCl, pH 7.4, 1 mmol/l EDTA, 2 mmol/l DTT, 20 % (v/v) Glycerin

## **B 2.11 Medien**

Zur Herstellung der Medien wurde deionisiertes Wasser verwendet. Lösungen sowie Glas- und Kunststoffgeräte wurden falls nicht anders angegeben vor Gebrauch bei 121 bzw. 135°C sterilisiert. Für die Herstellung der jeweiligen Festmedien wurden 15 g Agar pro Liter zugegeben.

### **B 2.11.1 Bakterienmedien**

# LB-Medium	10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 0.58 g/l NaCl, pH 7.0
# LB/Amp100-Medium	LB-Medium + 100 mg/l Ampicillin
# LB/Kan100-Medium	LB-Medium + 100 mg/l Ampicillin
# SOC	20 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 0.6 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1 g/l MgCl <sub>2</sub> , 3.5 g/l Glucose

### **B 2.11.2 Hefemedien**

# SGI	1 g/l Bactocasaminoacids, 6.7 g/l Yeast Nitrogen Base, 0.02 g/l Tryptophan, 20 g/l Glucose
# YPGA	10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton, 20 g/l Glucose, 0.2 g/l Adenin
# YPGE	10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton, 5 g/l Glucose, 3 % Ethanol

### B 3 Gewebekultur

Von den Firmen Terra Nigra (De Kwakel, Niederlande) und Bock Pflanzenexport KG (Bremen) wurden neben Jungpflanzen auch in-vitro Plantlets einiger Sorten bezogen (siehe Tabelle I; Anhang).

Medium für Sprosssubkultur :

- a. MS I für *Gerbera* (10fach; verändert nach MURAHIGE und SKOOG, 1962) :

	mg/l
Ammoniumnitrat	5.500 <sup>b</sup>
Kaliumnitrat	19.000
Calciumnitrat <sup>a</sup>	1.300
Magnesiumsulfat	3.700
Kaliumdihydrogenphosphat	5.100 <sup>c</sup>

- <sup>a</sup> anstelle von Calciumchlorid  
<sup>b</sup> 1/3 des Originalprotokolls  
<sup>c</sup> 3fache Menge des Originalprotokolls

- b. MS II (100fach; nach MURAHIGE und SKOOG, 1962) :

	mg/l
Mangansulfat	1.690
Zinksulfat	860
Borsäure	620
Kaliumjodid	83
Natriummolybdat	25
Kupfersulfat	2,5
Kobaltchlorid	2,5

- c. weitere Zusätze (aus entsprechenden Stammlösungen) :

	mg/l (final)
NaFe-EDTA	36,7
Inosit	1.000
Thiamin	0,4
Glycin	2
Pyridoxin	0,5
Nicotinsäure	0,5

d. Phytohormone

	mg/l (final)
Kinetin	3
Indolessigsäure	5

Das entsprechend angesetzte Sprosssubkultur-Medium enthielt darüber hinaus 10g/l Saccharose und 6 g/l Agar. Der pH-Wert wurde auf 5.6 eingestellt.

Die Kultur erfolgte bei 3.000 bis 7.000 lux für 16 h und einer Temperatur von 20 bis 24°C in gut belüfteten Gläsern, um eine frühzeitige Vitrifizierung zu verhindern. Das Umsetzen auf frisches Medium erfolgte etwa alle 6 Wochen, wobei die einzelnen Plantlets stark eingekürzt und geteilt wurden (siehe auch REYNOIRD et al., 1997).

## **B 4 Chemische Methoden**

### **B 4.1 Extraktion und Identifizierung der Flavonoide**

Sowohl die Extraktion von Flavonoiden, einschließlich der Anthocyane, mit Ethylacetat, Methanol oder 1 % Methanol-HCl als auch die saure Hydrolyse der Extrakte erfolgte nach Standardmethoden (HARBORNE, 1967; MARBRY et al., 1970).

Zur Bestimmung des Flavongehaltes von Knospen und Petalen während der Blütenentwicklung wurden Extraktionen der Pigmente aus dem Gewebe unterschiedlicher Blütenstadien über 48 Stunden bei 4°C im Dunkeln durchgeführt. Es wurde Ethylacetat in einem Gewebe/Lösungsmittel Verhältnis von 1 : 40 (g/ml) verwendet

Flavonoide, in erster Linie die Flavone, wurden sowohl im UV-Licht (243 nm) jeweils vor und nach einer Behandlung mit Ammoniak oder HCl als auch durch Co-Chromatographie mit authentischen Proben in verschiedenen Laufmittelsystemen (Kap. B 4.2) identifiziert. Flavanone wurden zusätzlich nach einer Reduktion mit Natriumborhydrid und anschließender Bedampfung mit Salzsäure detektiert (EIGEN et al., 1957).

### **B 4.2 Chromatographiesysteme**

Die Dünnschichtchromatographie (TLC) wurde auf G1440 Zellulose Platten der Firma Schleicher & Schüll (Dassel) in folgenden Laufmittelsystemen durchgeführt :

System 1 : CAW (Chloroform-Essigsäure-Wasser; 10 : 9 : 1)

System 2 : 30 % Essigsäure

System 3 : Forestal (Essigsäure-Salzsäure-Wasser; 30 : 3 : 10)

System 4 : t-BuOH (*tert.*-Buthanol-Essigsäure-Wasser; 3 : 1 : 1)

Eine Charakterisierung und Quantifizierung durch Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) wurden an der GSF (Neuherberg) nach einer Methode von LANGE et al. (1994) durchgeführt. Dabei wurden 10 µl eines 75%igen methanolischen Extraktes auf eine Spherisorb ODS II Säule (Partikelgröße 5 µm, 250 x 4.6 mm, Bischoff, Leonberg) eingespritzt. Die Detektion erfolgte mit einem Dioden Array Detector Model 168 (Beckmann, München).

## **B 5 Enzymologische Methoden**

### **B 5.1 Synthese von radioaktiv markiertem Naringenin (NAR) und Eriodictyol (ERI)**

Die Substrate (4a, 8, 8-<sup>14</sup>C) NAR und (4a, 8, 8-<sup>14</sup>C) ERI wurden mit Chalkonsynthase (CHS) aus Expressionsklonen und Chalkonisomerase (CHI) aus Petersilie Zellsuspensionskulturen aus 4-Cumaroyl-CoA bzw. Kaffeoyl-CoA und [<sup>14</sup>C] 2-Malonyl-CoA (110.000 dpm und 1.5 nmol pro 5 µl) nach BRITSCH et al. (1981) bzw. BRITSCH und GRISEBACH (1985) synthetisiert (vgl. Abb. 2). Durch Weglassen der CHI wurden die entsprechenden Racemat Mischungen hergestellt.

### **B 5.2 Flavonsynthase II (FNS II) Tests**

#### **B 5.2.1 Aufarbeitungsmethode**

Alle Schritte wurden bei 4°C und mit vorgekühlten Geräten durchgeführt. Die Herstellung des Rohextraktes (RE) bzw. der mikrosomalen Fraktion durch Fällung mit MgCl<sub>2</sub> aus frischem oder schockgefrorenem Pflanzenmaterial wurde nach DIESPERGER et al. (1974) mit kleinen Änderungen durchgeführt. Die Standardaufarbeitung bestand aus :

- 6.0 g Pflanzenmaterial
- 6.0 g Dowex 1x2 (äquilibriert in Puffer 1)
- 3.0 g Seesand, geglüht
- 30.0 ml Puffer 1

Das Pflanzenmaterial wurde zusammen mit dem geglühten Seesand bzw. Dowex und etwa der Hälfte des Puffers in einem vorgekühlten Mörser homogenisiert. Nach Zugabe des restlichen Puffers erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 20 min. bei 12.000 x g und 4°C (Sorvall-Zentrifuge; SS34 Rotor). Der über Glaswolle abfiltrierte klare Überstand diente als RE. Die Mikrosomenfällung erfolgte aus 20 ml RE durch die Zugabe einer wäßrigen 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 30 mM Mg<sup>2+</sup> unter vorsichtigem Rühren auf Eis für 10 min. Das durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (20 min.; 17.000 x g; 4°C; Sorvall) erhaltene mikrosomale Pellet wurde in 4,0 ml Puffer 2 resuspendiert und im gekühlten

Glashomogenisator vorsichtig homogenisiert. Der Überstand des Pellets wurde zu Kontrolltests verwendet.

### **B 5.2.2 Standardenzymtest**

Der Inkubationsansatz für einen Standardtest in einem Gesamtvolumen von 200 µl setzte sich wie folgt zusammen :

175 µl Puffer 2

0.03 nmol radioaktiv markiertes Substrat (83 Bq oder 5.000 dpm)

5.0 nmol nicht markiertes Substrat

10 µl 20 mmol/l NADPH

15 µl RE oder mikrosomale Fraktion

Nach 20 min Inkubation bei 25°C wurde die Reaktion durch die Zugabe von 20 µl MeOH, das eine Mischung der eingesetzten bzw. erwarteten Flavonoide enthielt, gestoppt. Die Reaktion-Mischung wurde anschließend zweimal mit Ethylacetat (100 und 50 µl) extrahiert. Die vereinigte obere Phase wurde auf Zellulose Dünnschicht Platten (Schleicher & Schüll) im Laufmittelsystem 1 chromatographiert. Die Auswertung erfolgte wie in Kap. B 7.1 beschrieben.

### **B 5.2.3 Charakterisierung der FNS II**

pH-Optimum

Für die Herstellung des Enzymextraktes wurde Puffer 3 verwendet. Der Enzymtest wurde unter Standardbedingungen mit verschiedenen pH Stufen des Puffer 4 durchgeführt.

Sauerstoff-Abhängigkeit

Der Ausschluß von Sauerstoff aus dem Enzymtest wurde wie in KOCHS und GRISEBACH (1987) beschrieben mittels der Verwendung von Glucose und Glucose Oxidase durchgeführt.

#### B 5.4 Berechnung der spezifischen Enzymaktivität der FNS II

Die spezifische Enzymaktivität der FNS II wurde nach Bestimmung des Umsatzes (Kap. B 7.1) und der Proteinmenge (Kap. B 4.4) folgendermaßen berechnet :

$$\text{spezifische } E_{\text{akt}} = \frac{\text{Prod}^*}{\{\text{Prod}^* + \text{Sub}^*\}} \times \text{Sub} \times t^{-1} \times p^{-1}$$

mit	Prod* :	gemessener Relativwert für [ <sup>14</sup> C]-markiertes Produkt
	Sub* :	gemessener Relativwert für [ <sup>14</sup> C]-markiertes Substrat
	Sub :	Gesamtmenge Substrat im Testansatz (2.03 nmol)
	t <sup>-1</sup> :	Reaktionszeit
	p <sup>-1</sup> :	Menge an Protein

#### B 5.5 Nachweis der Aktivität der CPR in Hefe Mikrosomen

Die CPR Aktivität in Mikrosomenpräparationen aus Hefe wurde nach URBAN et al. (1990, 1994a) ermittelt. Der Standardtest (1 ml) bei RT enthielt 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 mM NADPH, 1 mM KCN (immer frisch angesetzt) und 16 µM Cytochrom c. Der Start der Reaktion (Reduktion von Cytochrom c) erfolgte durch die Zugabe von 10 - 50 µg mikrosomalem Protein. Aus dem Mittelwert ΔA<sub>550</sub> von drei Einzelmessungen wurde die spezifische Enzymaktivität (spezifische E<sub>akt</sub>) der CPR wie folgt berechnet :

$$\text{spezifische } E_{\text{akt}} = \Delta A_{550} * e^{550} * V * t^{-1} * p^{-1}$$

mit	ΔA <sub>550</sub> :	Absorptionsänderung bei 550 nm
	e <sup>550</sup> :	differentieller Absorptionskoeffizient von Cytochrom c (reduziert/oxidiert; e <sup>550</sup> = 21.000 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
	V :	Reaktionsvolumen (1 ml)
	t <sup>-1</sup> :	Reaktionszeit
	p <sup>-1</sup> :	Menge an mikrosomalem Protein

#### B 4.4 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Der Gesamtproteingehalt der Enzymextrakte wurde nach der Methode von BRADFORD (1976) mit Rinderserum Albumin Fraktion V (BSA) durchgeführt.

## **B 6 Molekularbiologische Methoden**

### **B 6.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden**

Folgende Methoden wurden nach SAMBROOK et.al (1989) oder nach Herstellerangaben durchgeführt :

Phenolextraktion, Ethanol- und Isopropanolfällungen bzw. Kits zur Reinigung von Nukleinsäuren (u.a. „High Pure PCR Product Purification“ Kit, Boehringer)

Agarose- und Polyacrylamid Gelelektrophorese

Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (u.a. „QIAEX II DNA Gel Extraction“ Kit, QIAGEN)

Klonierung von PCR Produkten („T/A Cloning“ Kit, Invitrogen)

Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen

### **B 6.2 RNA-Isolierung und Northern Blot Analyse**

#### **B 6.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA**

Gesamt-RNA wurde aus verschiedenen *Gerbera*-Linien und den 11 unterschiedlichen Blütenstadien mit Hilfe einer Guanidinium Thiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion-Methode isoliert (verändert nach GUILIANO et al., 1993) :

Pro Ansatz wurden 3.0 ml RNA-Extraktionspuffer, 21 µl 2-Mercaptoethanol (0.7% final) und 2.4 ml mit 0.1 M Citrat-Puffer gesättigtes Phenol in ein Corex-Röhrchen vorgelegt. 1 g in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsertes Pflanzenmaterial wurde vorsichtig in die Corex-Röhrchen überführt und durch kräftiges Vortexen homogenisiert. Nach der Zugabe von 0.6 ml Chloroform wurde das gut gemischte Homogenat für 20 min auf Eis belassen und anschließend bei 15.000 x g zentrifugiert (Sorvall RC-5B plus; SS34 Rotor). Das abgenommene Supernatant (Oberphase) wurde mit 1 Vol. Isopropanol versetzt und erneut auf Eis für 60 min inkubiert. Nach 30 min Zentrifugation bei 15.000 x g (Sorvall) wurde das Supernatant verworfen und das Pellet in sterilem H<sub>2</sub>O vorsichtig resuspendiert. Zur Entfernung der Polysaccharide wurde die Lösung mit 100 % Ethanol (20 % (v/v) Endkonzentration) versetzt, 20 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der die Nukleinsäuren enthaltende Überstand wurde mit 1/3 Vol. 8 M

Lithiumchlorid versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde 20 min bei 15.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die gefällte RNA wurde zweimal mit je 1 ml 80 % Ethanol gewaschen, um die Salze zu entfernen, dann in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und bei -70°C gelagert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (Pharmacia Biochrom 4060). Die Integrität der isolierten Gesamt-RNA wurde elektrophoretisch auf einem Agarosegel kontrolliert.

### **B 6.2.2    Aufreinigung der mit DNA kontaminierten RNA**

Zur Entfernung möglicherweise vorhandener Verunreinigungen durch genomische DNA wurde die isolierte Gesamt-RNA auf 1µg/µl mit Wasser eingestellt. 50 µg RNA wurden in Gegenwart von 10 U RNase-freier DNase (Boehringer, Mannheim) und 5 U (1 U/µl) human placental RNase Inhibitor (Boehringer) für 30 min. bei 37°C inkubiert. Nach einer Extraktion des Ansatzes mit 50 µl Phenol/Chloroform (3:1) erfolgte die Fällung der RNA durch die Zugabe von 5 µl 3 M Natriumacetat (pH 5.3) und 200 µl Ethanol (100 %). Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen und in 20 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte wie unter Kap. B 6.2.1 beschrieben.

### **B 6.2.3    Isolierung von poly(A)<sup>+</sup> RNA**

Polyadenylierte mRNA wurde aus Gesamt-RNA durch Affinitätschromatographie an Oligo(dT)-Cellulose (New England Biolabs, Frankfurt) nach SAMBROOK (1989) oder mit dem „Oligotex-dT mRNA“ Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben, isoliert. Die Vorbereitung neuer bzw. gebrauchter Oligo(dT) Cellulose erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben.

### **B 6.2.4    Northern Blot Analyse**

5 bis 10 µg Gesamt- oder 0.5 bis 1.0 µg poly(A)<sup>+</sup> RNA wurden mit Probenpuffer (siehe Kap. B 2.11) im Verhältnis 1 : 5 versetzt und 10 min. bei 65°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben in einem 1.5%igen Agarosegel bei 65 V unter denaturierenden Bedingungen (6.6 % Formaldehyd im Gel) aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der RNA-Marker III (Boehringer, Mannheim) verwendet. Die RNA wurde im Standard-Blottingverfahren in 20 x

SSC auf Hybond NX-Nitrocellulose Membran (Amersham, Braunschweig) oder Immobilon-Ny+ (Millipore, Eschborn) transferiert (SAMBROOK et al., 1989) und nach dem Trocknen der Membran durch Inkubation bei 80°C für 1 h fixiert. Marker- und 25S rRNA-Banden konnten aufgrund des Ethidiumbromids im Probenpuffer sowohl im Gel als auch auf der Membran durch UV-Beleuchtung sichtbar gemacht werden.

### B 6.2.5 Markierung von DNA-Fragmenten mit radioaktiven Nukleotiden

Radioaktiv markierte DNA-Sonden (Tab. 3) wurden nach Herstellerangaben mittels Rediprime™ DNA Labelling System (Amersham, Braunschweig) mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (ICN, Meckenheim) erstellt. Die markierte DNA wurde über Gelchromatographie mit Hilfe von 1 ml Sephadex G-50 Säulen von den nicht eingebauten Nukleotiden getrennt, wie in Kap. B 7.1 beschrieben quantifiziert, für 15 min bei 95°C denaturiert und dann zur Hybridisierungslösung gegeben.

**Tab. 3. Verwendete cDNA Sonden und deren Herkunft.**

Bezeichnung	Herstellung über RE mit	Länge der Sonde (Bp)	Herkunft
CypDDd7a	Eco RI aus pDDd7a	~390	Fragment aus Differential Display
CypTÁBATA	Eco RI aus pTÁBATA	~1.500	5'-RACE Fragment
CYP93B2-ORF	Eco RI aus pCYP93B-ORF	~1.600	PCR-Fragment mit CypFNS1H/R Primern (ORF)

### B 6.2.6 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten

Nach einer Prehybridisierung der RNA-Blots in 5 x SSPE, 5 x Denhardt's Lösung, 0.5 % (w/v) SDS, 0.1 mg/ml Heringssperma-DNA (*hs*-DNA), 50 % deionisiertem Formamid für 3 h bei 42°C, wurde die denaturierte DNA-Sonde (Kap. B 6.2.5) direkt zur Lösung zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte für 16 bis 20 h bei 42°C. Anschließend wurde der Filter bei 42°C zweimal 15 min. mit Waschlösung I und einmal bei 65°C für 10 min. mit Waschlösung II gewaschen.

Die qualitative und quantitative Auswertung der Hybridisierungssignale wurde wie in Kap. B 7.1 beschrieben durchgeführt.

## **B 6.3 Isolierung genomischer DNA und Southern Blot Analyse**

### **B 6.3.1 Isolierung von genomischer DNA**

Hoch reine genomische DNA aus *Gerbera*, geeignet für den direkten Verdau mit Restriktionsenzymen, wurde nach der Methode von DELLAPORTA et al. (1983) isoliert.

### **B 6.3.2 Southern Blot Analyse**

Genomische *Gerbera*-DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen (Kap. B 2.4) verdaut, in 0.8% Agarosegelen aufgetrennt und nach Herstellerangaben auf Immobilon-Ny+ (Millipore, Eschborn) übertragen und fixiert. Die Sondenherstellung wurden wie unter Kap. B 6.2.6 beschrieben und die Pre-Hybridisierung bzw. Hybridisierung entsprechend dem Hersteller Protokoll bei 68°C durchgeführt. Anschließend wurden die Filter zweimal bei Raumtemperatur für 5 min mit Waschlösung I und zweimal in vorgewärmter Waschlösung III bei 68°C gewaschen.

Die qualitative und quantitative Auswertung der Hybridisierungssignale wurde wie in Kap. B 7.1 beschrieben durchgeführt.

## **B 6.4 Reverse Transkription**

Im Rahmen des Differential Display wurde Gesamt-RNA mit Hilfe der SuperScript<sup>TM</sup>II RNase H<sup>-</sup> Reversen Transcriptase (Gibco/BRL, Eggenstein) in den komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben. Durch die Wahl der drei degenerierten Anker Oligo(dT)-Primer (Oligo A, C und G; Anhang A2) wird spezifisch nur mRNA revers transkribiert und die gesamt Population in drei Subpopulationen unterteilt.

Das Gesamt-Reaktionsvolumen betrug je Ansatz 25 µl. Gesamt-RNA wurde auf 1µg/µl und poly(A)<sup>+</sup> RNA auf 100 ng/µl eingestellt.

Folgender Denaturierungsansatz wurde pipettiert :

5 µl RNA (= 5µg Gesamt- und 500 ng poly(A)<sup>+</sup> RNA)

1 µl 25 µM Anker Oligo(dT)

11 µl steriles Wasser

Die Denaturierung erfolgt für 10 min. bei 70°C, anschließend wurden die Ansätze kurz abzentrifugiert und sofort auf Eis gestellt. Das weitere Primer-Annealing, die Reverse Transkription und die Inaktivierung des Enzyms erfolgte nach Herstellerangaben (Gibco/BRL).

Die cDNA Synthese mit genspezifischen Primern wurde entsprechend mit den jeweiligen Primern durchgeführt.

## **B 6.5 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)**

### **B 6.5.1 Oligonukleotide**

Synthetische Oligonukleotide wurden bei den Firmen MWG (Ebersberg) und Metabion (Martinsried) bezogen. Genspezifische Primer für 5'-RACE und Amplifikation des CYP93B2-ORF Fragmentes wurden von der bekannten Sequenz abgeleitet (Anhang A3). Sie hatten einen GC-Gehalt von 38-68 % und eine Länge von 22-30 Nukleotiden. Außerdem endete die Sequenz am 3'-Ende mit zwei „schwachen“ (A oder T) gefolgt von zwei „starken“ (G oder C) Nukleotiden. Alle verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang A2 und A3 dargestellt.

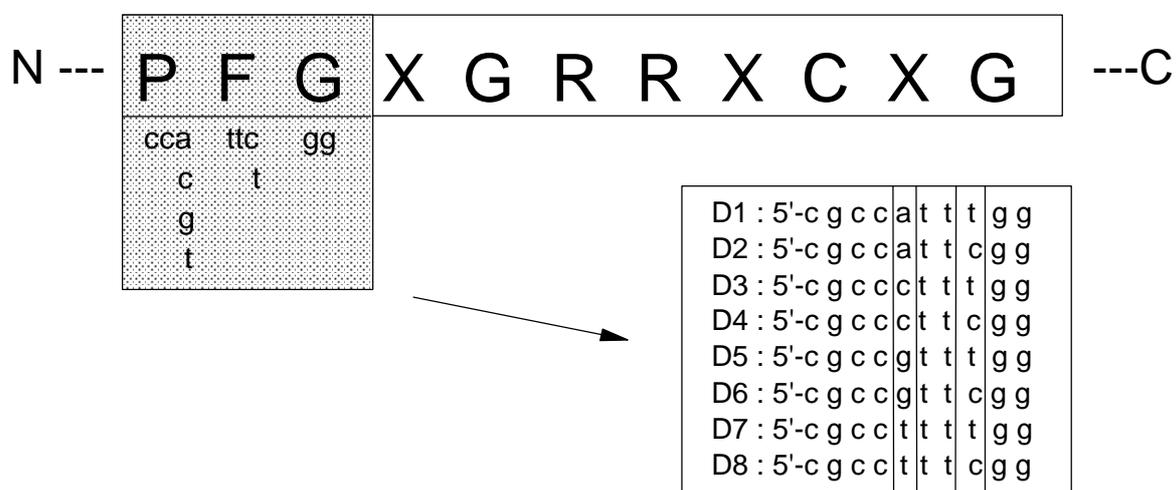
### **B 6.5.2 Standard PCR**

Standard PCR-Ansätze enthielten in einem Gesamtvolumen 1 x entsprechenden Polymerase Puffer, 0.2 mM dNTP, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U Polymerase, 0.2 µM 3'- bzw. 5'-Primer und 1 bis 4 µl cDNA aus den entsprechenden Synthesen nach Kap. B 6.4. Im Laufe der Arbeit wurden folgenden Polymerasen verwendet : Replitherm Polymerase (Epicentre, Madison, USA), *Taq* DNA Polymerase (Promega, Mannheim) und High Fidelity Polymerase (Boehringer, Mannheim). Das Amplifikationsprotokoll bestand aus 40 Zyklen (Denaturierung

1 min bei 94°C, Annealing 2 min bei 57-59°C, Polymerisierung (Extension) für 1 min bei 72°C) mit einer Anfangsphase von 10 min bei 94°C und einer abschließenden Polymerisierung von 10 min bei 72°C. Die PCR-Amplifikation wurde mit Hilfe eines Autogene II (Grant, Cambridge, Großbritannien) durchgeführt.

### B 6.5.3 Cyt P450 spezifisches Differential Display (DD-RT-PCR)

Um Unterschiede in der Transkript-Population in verschiedenen chemogenetisch und biochemisch definierten *Gerbera* Linien darzustellen, wurde jeweils Gesamt-RNA aus einer oder mehreren Linien vom Genotyp (*fns<sup>+</sup> fns<sup>+</sup>*) bzw. (*fns fns*) wie in Kap. B 6.2.1 beschrieben isoliert und DNA-Verunreinigungen falls nötig entfernt (Kap. B 6.2.2). Nach der Reversen Transkription (Kap. B 6.4) der zwei RNA-Populationen mit den drei degenerierten Anker Oligo(dT) Primern (Anhang A2) wurde die DD-RT-PCR nach LIANG und PARDEE (1992) bzw. LIANG et al. (1993) mit kleinen Veränderungen durchgeführt. Als upstream Primer wurden acht Cyt P450 spezifische, nicht-degenerierte Decamer-Primer nach SCHOPFER und EBEL (1998) verwendet (Abb. 13; Anhang A2).



**Abb. 13. Aus dem hoch konservierten Bereich der Häm-Bindungsstelle abgeleitete Primer für einen DD-RT-PCR Ansatz zum Screening für differentiell exprimierte Cyt P450 mRNAs.**

Anhand des Motives [PFG] lassen sich acht nicht-degenerierte Primer entsprechend der kodierenden Nukleotidsequenz konstruieren (nach SCHOPFER und EBEL, 1998).

Die 20 µl PCR-Ansätze wurden in Doppelansätzen je RNA und Primerpaar angesetzt und enthielten nach der Optimierung 4 µl cDNA, 0.5 µM eines Decamerprimer, 2.5 µM des entsprechenden Ankerprimers, 0.2 µM dNTP, 10 µCi (0.25 µM) [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-dATP, 1 x Replitherm Polymerase Puffer sowie 0.5 U Replitherm Polymerase (Epicentre). Die PCR-Amplifikation wurde nach folgendem Protokoll mit Hilfe eines Autogene II (Grant) durchgeführt :

1 x	94°C	10 min	Denaturierung
40 x	94°C	30 sec	Denaturierung
	40°C	2 min	Primerannealing
	72°C	30 sec	Extension
1 x	72°C	10 min	Extension

4 µl des PCR-Produktes wurden mit 4 µl Ladepuffer (Kap. B 2.10) versetzt, 3 min bei 80°C denaturiert und auf einem 5%igen Sequenzgel (Polyacrylamid) aufgetrennt. Die unfixierten Gele wurden auf Whatman 3MM Papier abgezogen, in einem Vakuum-Geltrockner (PheroTemp, Biotec Fischer, Reiskirchen) bei 80°C für 1 h getrocknet und anschließend über Nacht exponiert. Die Auswertung erfolgte wie in Kap. B 7.1 beschrieben.

Zur weiteren Analyse einzelner Amplifikationsprodukte wurden die Regionen, die differentiellen Banden entsprachen, möglichst genau mit einem scharfen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Dazu wurde das getrocknete Gel mit einem 1:1 Ausdruck in Deckung gebracht und die entsprechenden Regionen sauber markiert. Für die Elution der DNA aus den Polyacrylamidgel Resten wurden verschiedene Methoden ausprobiert. Die Methode nach LUTTERBÜSE (1995) mit Glykogen als Carrier erwies sich am geeignetesten. Dabei wurde das herausgeschnittene Gelstück 10 min in 50 µl Wasser hydratisiert, 15 min bei 95°C inkubiert und anschließend die DNA mit 0.3 M Natriumacetat (pH 5.2), 0.2 mg/ml Glykogen und 2.5 Vol. Ethanol gefällt. Die optimierte Reamplifikations-PCR mit dem DNA-Pellet und den entsprechenden Primern wurde unter den oben beschriebenen Bedingungen ohne radioaktiv markiertes dATP aber mit einer höheren dNTP Konzentration (32 µM) durchgeführt. Bei Banden, die zwar differentiell waren, aber nur ein schwaches Signal auf dem Film verursachten, wurden entsprechende Bereiche aus mehreren Auftrennungen des jeweiligen PCR-Ansatzes ausgeschnitten, eluiert und später vereinigt, um ausreichend Matrizen DNA für die PCR-Amplifikation zu erhalten. Die Reamplifikationsprodukte wurden über Agarosegel

Elektrophorese überprüft und bei Übereinstimmung der Länge mit der differentiellen Bande und deren Reinheit (Nebenprodukte) direkt über überhängende A-Nukleotide in den Vektor pCR2.1 („T/A-Cloning“ Kit, Invitrogen) kloniert. Jeweils 2 µl der Ligation wurden für die Transformation in kompetente Bakterien des Kits (Stamm TOP10) eingesetzt. Pro Transformation wurden etwa 15 Kolonien über Plasmid DNA Isolierung (Kap. B 6.6) und Restriktionsverdau (Kap. B 6.7.1) analysiert. Klone mit einem Insert der entsprechenden Länge wurden sequenziert.

#### **B 6.5.4 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)**

Das 5'-RACE wurde im nach einem verändertem Original Protokoll von FROHMAN et al. (1988) und mit Hilfe des entsprechenden Kits von Gibco/BRL (Eggenstein) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach einer reversen Transkription von Gesamt RNA mit einem genspezifischen Primer (GSP), wurden überschüssige Nukleotide und der Primer mit Hilfe des PCR Produkt Purification Kits (Boehringer, Mannheim) aus dem Ansatz entfernt. Die Tailing Reaktion mit Terminaler Transferase wurde entweder mit dATP's (nach FROHMAN et al., 1988) oder mit dCTP's (Gibco/BRL) durchgeführt. 5 µl der Tailing Reaktion wurden als Template für die erste PCR-Runde mit einem Oligo (dT) Anker Primer bzw. dem Abridged Anchor Primer (Gibco/BRL) und einem nested GSP verwendet. Für die zweite PCR-Runde wurden 5 µl 1 : 100 verdünntes PCR Produkt der 1. Runde, der PCR-Anker Primer bzw. der Backrace-Primer (modifizierter AUAP, Gibco/BRL) und ein weiterer nested GSP verwendet. PCR-Produkte in einem Längenbereich von 1.4 bis 1.6 kb wurde mit Hilfe des „T/A Cloning“ Kits (Invitrogen) einkloniert und nach Verifizierung der Länge über Plasmidisolierung und Restriktionsverdau (Kap. B 6.6; B 6.7.1) sequenziert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle A2 im Anhang aufgelistet. Die 50 µl PCR-Ansätze enthielten 0.4 µM der jeweiligen RACE-Primer bzw. GSP, 0.2 µM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> sowie 2.5 U Taq DNA Polymerase (Promega). Die PCR-Amplifikation wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt :

1 x	94°C	2 min	Denaturierung
35 x	94°C	1 min	Denaturierung
	57°C	1 min	Primerannealing
	72°C	2 min	Extension
1 x	72°C	7 min	Extension

### **B 6.5.5 RT-PCR**

Die Reverse Transkription PCR wurde mit Hilfe des „Titan One Tube RT-PCR“ Kits (Boehringer) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### **B 6.6 Präparation von Plasmid-DNA**

Die präparative Isolierung von Plasmid-DNA, die zur Klonierung, Sequenzierung und Transformation eingesetzt wurde, erfolgte für kleine Mengen mit dem „Plasmid Miniprep Kit - Quantum Prep“ der Firma Biorad (München) bzw. für mittlere Mengen mit dem „Plasmid Purification Midi Prep“ Kit der Firma Qiagen (Hilden).

### **B 6.7 Enzymkatalysierte Reaktionen**

#### **B 6.7.1 Restriktionsverdau**

Restriktionsspaltungen von genomischer und Plasmid-DNA wurden nach den jeweiligen Herstellerangaben mit verschiedenen Restriktionsenzymen (siehe Kap. B 2.4) durchgeführt.

#### **B 6.7.2 Terminale Transferase**

Die Verknüpfung von dNTP's (dATP und dCTP) mit 3'-OH Enden von Doppel- oder Einzelstrang DNA Molekülen wurde in einer Template-unabhängigen Reaktion mit Hilfe der Terminalen Transferase (Boehringer) nach Herstellerangaben bzw. nach dem entsprechenden 5'-RACE Protokoll durchgeführt.

#### **B 6.7.3 Ligation**

Die Ligation von Restriktionsfragmenten (*Bam* HI bzw. *Eco* RI) mit überstehenden Enden in entsprechende Vektoren wurde mit Hilfe der T4-DNA Ligase (Boehringer) in einem molaren Verhältnis von 3 : 1 (Insert/Vektor) für 2 h bei 16°C durchgeführt.

## B 6.8 DNA-Sequenzanalyse

DNA-Sequenzierungsreaktionen wurden nach der enzymatischen Didesoxykettenabbruch-Methode für doppelsträngige DNA nach SANGER et al. (1977) durchgeführt. Dabei wurde [ $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ ] dATP und das „Sequenase Version 2.0“ Kit (Amersham, Braunschweig) nach einem veränderten Herstellerprotokoll verwendet. Der Denaturierungsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 7  $\mu\text{l}$  2  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA, 1 pmol Primer (prUAg5' oder prUAg3'; Anhang A2). Nach der Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  1mol/l NaOH wurde der Ansatz für 10 min bei 75°C denaturiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  TES-Puffer und eine Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur (Primerannealing). Die Labelling Reaktion bestand je Reaktion aus 1  $\mu\text{l}$  100 mmol/l DTT, 2  $\mu\text{l}$  Labelling Mix (Pharmacia; 1 : 5 verdünnt), 0.5  $\mu\text{l}$  [ $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ ] ATP und 2  $\mu\text{l}$  Sequenase (1 : 8 verdünnt in Enzym Dilution Puffer; Pharmacia). Dieser Mix wurde nach dem Annealing zum Denaturierungsansatz zugegeben, anschließend für weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Zur Termination der Reaktion wurden 2.5  $\mu\text{l}$  der vier Terminationsmischungen einzeln in entsprechend markierte Mikrotiterplatten gegeben, zusammen mit 3.5  $\mu\text{l}$  der Labelling Reaktion bei 37°C für 5 min inkubiert und anschließend mit 4  $\mu\text{l}$  Stopplösung gestoppt. Die resultierenden markierten DNA-Fragmente wurden über denaturierende 6 % Polyacrylamidgele aufgetrennt. Nach Fixierung in 10 % Essigsäure für 15 min wurden die Gele 10 min unter fließendem, deionisierten Wasser gewaschen, auf der Glasplatte getrocknet und anschließend exponiert und ausgewertet (Kap. B 7.1).

Im Verlauf dieser Arbeit wurden auch Sequenzierungen in Auftrag gegeben (MWG-Biotech, Ebersberg; TopLab, Martinsried). Der Vollängenklon der aus *Gerbera* isolierten CYP-cDNA wurde, um Sequenzierfehler zu vermeiden, beidsträngig sequenziert. Für die Sequenzanalyse stand das Programm „OMIGA 1.0“ (Oxford Molecular, Oxford, Großbritannien) zur Verfügung. Homologie Vergleiche zur GenBank Datenbank wurden über den NCBI Server mit dem Programm „BLAST“ durchgeführt (BLAST Search Advanced Blast Search 2.0 - multiple sequence alignment; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>; ALTSCHUL et al., 1997). Für multiple Sequenz-Alignments wurden die Programme „ClustalW“ (Multiple Sequence Alignment 1.73; <http://www.transfac.gbf.de/dbsearch.html>; THOMPSON et al., 1994) bzw. „MultAlin“ (Multiple Sequence Alignment Version 5.3.3; <http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html>; CORPET, 1988) verwendet. Phyllogenetische Stammbäume wurden mit dem Programm „TREEVIEW“ erstellt (PAGE, 1996). Das Programm „SAPS“ (Statistical Analysis

of Protein Sequences; [http://www.isrec.isb-sib.ch/cgi-bin/SAPS\\_form\\_parser](http://www.isrec.isb-sib.ch/cgi-bin/SAPS_form_parser)) wurde zur Berechnung des Molekulargewichts verwendet.

## **B 6.9 Heterologe Hefe-Expression**

### **B 6.9.1 Klonierung in Hefe Expressionsvektoren**

Die kodierenden Bereiche der putativen Cyt P450 cDNA's wurden in die Hefevektoren pYeDP60 und pYES2 (Kap. B 2.9) wie in URBAN et al. (1994a) beschrieben einkloniert. Um einen vollständigen Klon des Cyt P450 mit einem offenen Leserahmen (ORF), aber möglichst wenig endogener 5' nicht translaterter Sequenz zu erhalten, wurde eine weitere PCR mit den genspezifischen Primern CypFNS1H bzw. CypFNS1R (Anhang A2) und einer proofreading DNA Polymerase (Kap. B 6.5.2) durchgeführt, um den Klon CYP93B2-ORF (Anhang A3c) zu generieren. Dabei enthielt der Forward Primer (CypFNS1H) eine *Bam HI* Restriktionsschnittstelle direkt gefolgt vom ATG Startkodon und den nächsten zehn genspezifischen Basen. Der Reverse Primer (CypFNS1R) war spezifisch für den 3' nicht translateren Bereich des Gens. Um die Subklonierung in den Hefe Expressionsvektor durchzuführen, wurde neben der eingeführten *Bam HI* Schnittstelle die interne *Eco RI* Stelle des Vektors pCR2.1 (Kap. B 2.9) verwendet. Dazu wurde das Insert (CYP93B2-ORF) zuerst mit *Eco RI* aus dem Plasmid pCR2.1 herausgeschnitten und nach Gelelution mit *Bam HI* nochmals verdaut. Das so erhaltene Fragment besaß eine *Bam HI* Stelle am 5'-Ende und eine *Eco RI* Stelle am 3'-Ende. Nach einer Reinigung mit dem „PCR Product Purification“ Kit (Boehringer), um das *Eco RI* - *Bam HI* Fragment des zweiten Verdaus zu entfernen, wurde CYP93B2-ORF in die ebenfalls mit *Bam HI* und *Eco RI* geöffneten und gereinigten Hefevektoren ligiert (Kap. B 6.7.3). Das Ligationsergebnis wurde anschließend in One-Shot-Kompetenzellen des Stammes TOP10 (Invitrogen) zwischenkloniert. Der Ligationserfolg wurde durch Plasmid DNA Präparationen (Kap. B 6.6), anschließendem Restriktionsverdau mit *Bam HI* und *Eco RI* (Kap. B 6.7.1), Längenbestimmung des Inserts auf einem Agarosegel und Einzelstrang-Sequenzierung (Kap. B 6.8) über die Schnittstellen überprüft.

### **B 6.9.2 Transformation von Hefezellen**

Plasmid DNA, die das CYP93B2-ORF Insert enthielt, wurden in kompetente Hefezellen der unter Kap. B 2.9 beschriebenen Hefestämme nach einer modifizierten Lithiumacetat Methode mit 50 µg Carrier DNA transformiert (GIETZ et al., 1992). Eine 5 ml Übernachtskultur in YPGA (Kap. B 2.11.2), angeimpft mit einer Kolonie des entsprechenden Stammes von einer YPGA-Platte, wurde in 50 ml frisches YPGA überführt und bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0.75 bis 0.8 herangezogen (28°C; 250 rpm). Nach dem Abzentrifugieren der zu je 10 ml aliquotierten Hefezellen (2 min bei 2.500 rpm) wurden diese einmal in 10 ml Wasser gewaschen, in 1 ml Wasser resuspendiert und erneut pelletiert. Es folgte ein zweiter Waschschrift in 1 ml frischer TE/LiAc Lösung und anschließender Resuspension in 50 µl TE/LiAc. Zu diesen Zellsuspensionen wurden 1 µg Plasmid DNA sowie 50 µg Carrier DNA und 300 µl 40%ige PEG4000 Lösung gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 28°C und 120 rpm im Schüttelinkubator erfolgte ein Temperaturschock bei 42°C, der nach 15 min durch die Zugabe von 1 ml YPGA und einer Zentrifugation (5 min; 2.500 rpm) beendet wurde. Das Pellet wurde in 1 ml TE (pH 7.5) resuspendiert und auf SGI-Platten (Kap. B 2.11.2) ausplattiert.

### **B 6.9.3 Anzucht und Induktion**

Die Induktion der Hefezellen erfolgte nach POMPON et al. (1996). Dabei wurde je eine Kolonie einer transformierten Hefe in 5 x 5 ml SGI-Medium angezogen und nach 16 h vollständig in 250 ml YPGE (Kap. B 2.11.2) überimpft. Bei einer Dichte von  $OD_{600}$  0.8 bis 1.2 ( $8 \times 10^7$  Zellen/ml) erfolgte die Induktion durch die Zugabe von 27 ml 20%iger Galaktose Lösung. Nach einer Inkubation von 12 bis 16 h wurden die Hefen geerntet und Mikrosomen isoliert.

### **B 6.9.4 Isolierung von Mikrosomen**

Die Hefezellen einer 270 ml Kultur wurden geerntet (10 min; 5.000 x g), nach kurzem Abtropfen in 27 ml TEK-Puffer (Kap. B 2.10) resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C bzw. auf Eis

durchgeführt. Das Pellet wurde vollständig in 2.5 ml eiskaltem TES-B\* (Kap. B 2.10) Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 7.5 g Glasperlen (Sigma) wurden die Hefezellen durch kräftiges, vertikales Schütteln (2 x pro s) aufgeschlossen. 20 Zyklen á 30 s schütteln und 30 s Inkubation auf Eis wurden durchgeführt. Eine Kontrolle des erfolgreichen Aufschlusses erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskopes. Nach dem kompletten Aufschluss wurden drei Waschschrte mit 5 ml TES-B\* durchgeführt und die jeweiligen Überstände in einem frischen Falcon vereinigt. Um letzte Zellbruchstücke und Glasperlen aus dem Extrakt zu entfernen, wurde noch ein Zentrifugationsschritt bei 16.000 rpm für 10 min durchgeführt. Der klare Überstand wurde in ein 25 ml Meßzylinder umgefüllt, in den bereits 940 µl 4 M NaCl (final 0.15 M) vorgelegt waren, und mit TES-B\* auf 25 ml aufgefüllt. Der gut vermischte Extrakt und 2.5 g PEG 4000 (Fluka) wurden anschließend in ein frisches Falcon gegeben und das PEG wurde durch heftiges Rühren vollständig gelöst. Nach einer Inkubation auf Eis für 15 min wurden die Mikrosomen durch Zentrifugation bei 10.5000 rpm für 10 min pelletiert. Nach zweimaligem Waschen des Pellets mit TES-B\* wurden die Mikrosomen in 1.5 ml TEG\* (Kap. B 2.10) in einem Potter homogenisiert, in Aliquots á 150 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

## **B 7        Sonstiges**

### **B 7.1      Radioaktivitätsmessungen**

Die verschiedenen radioaktiven Signale aus Enzymtests, Differential Display, Hybridisierungen und Sequenzierungen wurden mit Hilfe eines Fuji BAS 1000 Bio-Imaging Analyzer lokalisiert und mit dem Software Packet TINA (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) analysiert bzw. quantifiziert. Zur Quantifizierung wurden entsprechende Standards aus Eichlösungen erstellt. Die Radioaktivität in wäßrigen Lösungen, z.B. bei der Probenmarkierung für Hybridisierungen wurden mit Hilfe eines Quick Counter Bioscan QC 4000 XER (Bioscan, Washington, USA) bestimmt. Für die Messung von [<sup>32</sup>P] in 100 µl Flüssigkeit wurde ein entsprechender Quenchfaktor mit Hilfe einer Eichlösung erstellt und die jeweiligen Messungen bei einer Zähldauer von 25 Sekunden durchgeführt.

## C Ergebnisse

### C 1 Vorarbeiten

Wichtige Voraussetzungen für eine erfolgreiche Klonierung der FNS II aus *Gerbera* sind zum einen ein chemogenetisch definiertes Pflanzenmaterial und zum anderen der Nachweis der genetischen Kontrolle der entsprechenden Enzymaktivität. Ein umfangreiches definiertes Pflanzenmaterial stand bereits zu Beginn der Arbeit zur Verfügung (TYRACH, 1995). Enzymaktivität für die FNS II konnte bislang in Blüten verschiedener Pflanzenarten, wie z.B. *Antirrhinum majus*, *Dahlia variabilis*, *Sinningia cardinalis* und *Gerbera* Hybriden (STOTZ und FORKMANN, 1981; MARTENS, 1995, STICH et al., 1988) nachgewiesen werden. Die für die entsprechenden Enzymtests benötigten [<sup>14</sup>C]-markierten Substrate lassen sich enzymatisch mit Expressionsklonen der Chalkonsynthase synthetisieren (Kap. B 5.1). Mit den so hergestellten Flavanonen konnte die FNS II aus den vorhandenen *Gerbera* Sorten und Linien nachgewiesen und hinsichtlich verschiedener Eigenschaften charakterisiert werden (Kap. C 2.1).

#### C 1.1 Synthese von [<sup>14</sup>C]-markiertem Naringenin und Eriodictyol

[<sup>14</sup>C]-markiertes 2*S*-NAR und 2*S*-ERI wurde durch Umsatz von 3 Molekülen [<sup>14</sup>C] 2-Malonyl-CoA mit einem Molekül *p*-Cumaroyl-CoA bzw. Kaffeoyl-CoA nach BRITSCH et al. (1981) und BRITSCH und GRISEBACH (1985) mit CHS- und CHI-Extrakten, die aus Expressionsklonen bzw. Ammoniumsulfat Fällungen stammten, hergestellt (siehe Abb. 2 bzw. Kap. B 5.1). Das jeweilige Produkt wurde in den Laufmittelsystemen 1 und 2 (Kap. B 4.2) durch Co-Chromatographie mit authentischem NAR bzw. ERI identifiziert und gleichzeitig quantifiziert. Der Umsatz zu NAR lag zwischen 70 und 80 %, der zu ERI bei etwa 40 %. Eine weitere Bestätigung der Syntheseprodukte erfolgte durch den Umsatz mit FHT-Extrakt, der ebenfalls aus einem Expressionsklon gewonnen wurde (LUKACIN und BRITSCH, 1997). Beide Flavanone konnten unter optimalen Bedingungen zu 90 bis 95 % in das entsprechende Dihydroflavonol umgesetzt werden (Daten nicht dargestellt). Damit konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Isomerisierung durch die CHI erfolgreich durchgeführt wurde und zu einem sehr hohen Anteil 2*S*-NAR bzw. 2*S*-ERI entstanden ist. Nur diese Isomere werden im weiteren Verlauf von den Enzymen der Flavonoidbiosynthese als Substrat akzeptiert. Das so synthetisierte Substrat ermöglicht daher die Messung der FNS II Aktivität in *Gerbera*.

## C 2 Chemogenetische und enzymologische Charakterisierung des *Gerbera* Materials

### C 2.1 Aktivitätsnachweis

Die Flavanone NAR und ERI konnten in verschiedenen Pflanzen als Substrat für die beiden membrangebundenen Enzyme FNS II und Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H) identifiziert werden. Beide Enzyme kommen in der mikrosomalen Fraktion, hergestellt aus Blütengewebe der jeweiligen Pflanze, vor und benötigen für ihre Aktivität NADPH als Kofaktor (Abb. 14, STOTZ und FORKMANN, 1981; STICH et al., 1988). Eine Trennung der zwei Enzymaktivitäten kann in *Gerbera* durch die Verwendung von genetisch definierten Linien, wie z.B. „Th58“, als Enzymquelle erreicht werden. Die Linie „Th58“ besitzt ein dominantes Allel *fns*<sup>+</sup> für FNS II Aktivität aber auch dominante Allele für die F3'H Aktivität (*f3'h*<sup>+</sup>) und den bislang noch nicht identifizierten Inhibitor (*x*<sup>+</sup>) der F3'H, der eine Hydroxylierungsreaktion unterbindet (TYRACH, 1995; Anhang A1a).

Eine Inkubation von RE der Linie „Th58“ mit markiertem NAR in Gegenwart des Kofaktors NADPH ergab nur ein neues radioaktives Produkt. Dieses Produkt wurde durch Co-Chromatographie mit authentischen Proben in den Laufmittelsystemen 1-4 (siehe Kap. B 4.2) eindeutig als Ap identifiziert (Tab. 4). Eine Zugabe von Fe<sup>2+</sup>, Ascorbat und 2-Oxoglutarat, den Kofaktoren der bekannten 2-oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen FNS

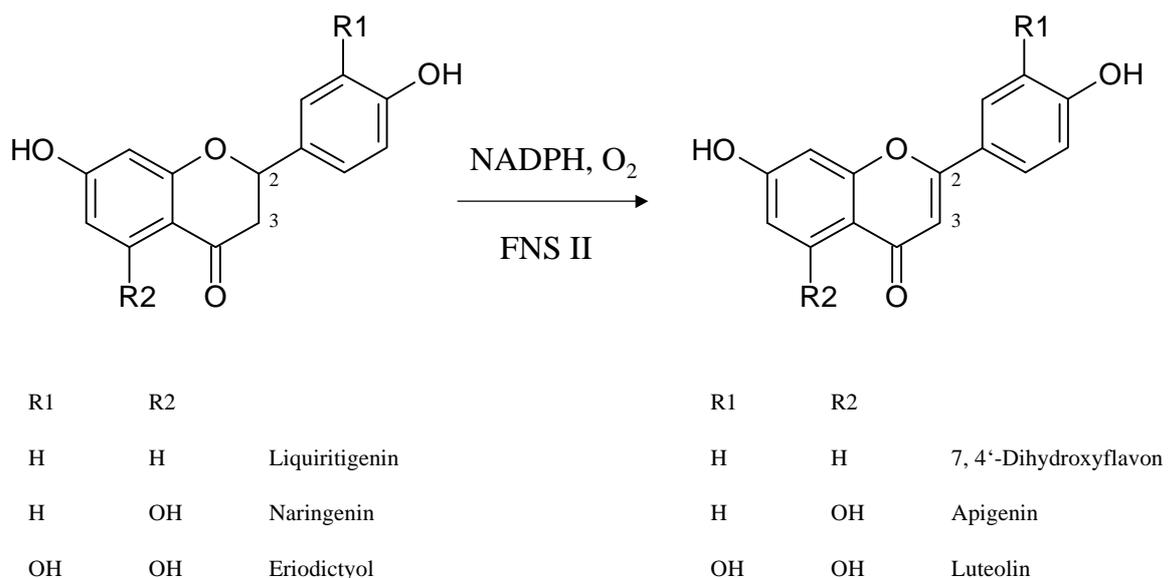


Abb. 14. Enzymatische Bildung von Flavonen aus verschiedenen Flavanonen.

I und FHT, führte nur zur Bildung des entsprechenden Dihydroflavonols DHK, was einer Aktivität der FHT entspricht. Wurde eine Racemat-Mischung von 2*S*/2*R*-NAR verwendet, konnte ein maximaler Umsatz von nur 50 % gezeigt werden, was auf eine stereoselektive Reaktion der FNS II aus *Gerbera* hindeutet. Der entsprechende Umsatz mit 2*S*-NAR lag bei über 90 %.

**Tabelle 4. Rf-Werte (x100) der verwendeten Substrate und der resultierenden Produkte auf Zellulose TLC-Platten.**

Flavonoid	Laufmittelsystem (s. Kap. B 4.2)			
	1	2	3	4
Naringenin	87	59	89	92
Eriodictyol	68	47	81	84
Liquiritigenin	85			
Apigenin	80	20	82	88
Luteolin	54	11	65	75
7, 4'-Dihydroxy-flavon	78			

## C 2.2 Mikrosomale Lokalisierung und Kofaktorenabhängigkeit

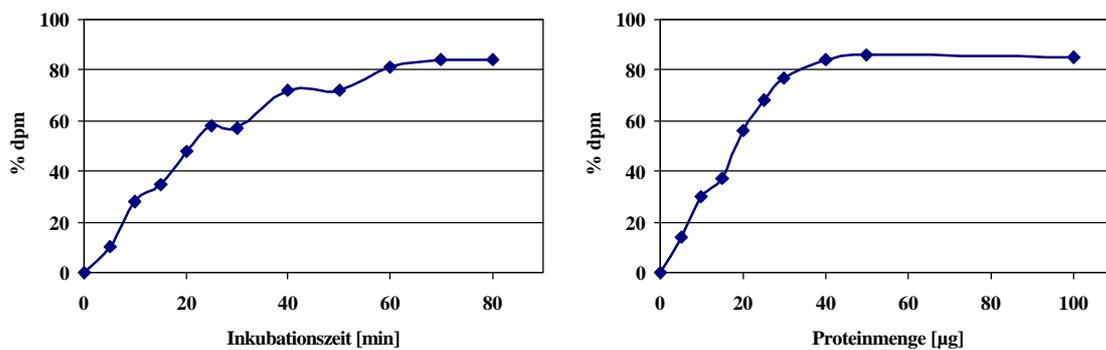
Nach der Fällung von Mikrosomen durch  $Mg^{2+}$  enthält diese Fraktion die höchste FNS II Aktivität. Im Vergleich zum RE lässt sich der Umsatz zum Ap um ca. das 3.5fache erhöhen. Im Supernatant des mikrosomalen Pellets kann dagegen nur noch eine sehr geringe Aktivität nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Reaktion deutlich vom Kofaktor NADPH abhängt. Ohne NADPH konnte weder im RE noch in der mikrosomalen Fraktion eine Aktivität der FNS II nachgewiesen werden. Auch nach einer Substitution von NADPH durch NADH konnte nahezu kein Umsatz zum Ap mehr gezeigt werden (Tab. 5). Bei einer Inkubation des RE bzw. des Supernatants nach Fällung in Gegenwart von  $Fe^{2+}$ , 2-Oxoglutarat und Ascorbat (s.o.) entstand das entsprechende Dihydroflavonol, was auf die Aktivität der löslichen FHT schließen lässt (siehe MARTENS, 1995). Ein entsprechender Versuchsansatz mit mikrosomalem Pellet zeigte wie erwartet keine Aktivität der FHT.

**Tabelle 5. Mikrosomale Lokalisierung und Kofaktorenabhängigkeit der FNS II Aktivität in Gerbera Blüten (\* mit 10 µg Protein gebildetes Ap).**

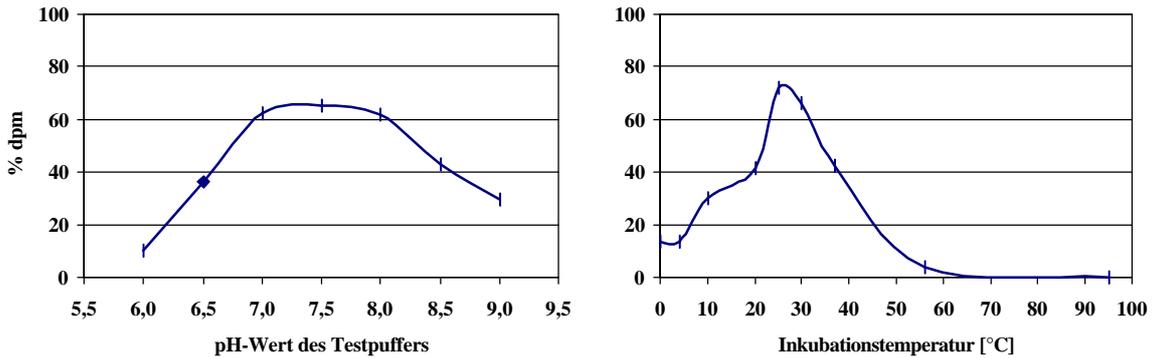
Enzymquelle	Zugaben	dpm in Ap*
Rohextrakt	ohne	0
	NADPH	925
	Fe <sup>2+</sup> ; Ascorbat; 2-Oxoglutarat	DHK-Bildung
Mikrosomale Fraktion	ohne	0
	NADPH	3.305
	NADH	90
	Fe <sup>2+</sup> ; Ascorbat; 2-Oxoglutarat	kein Umsatz
Supernatant des mikrosomalen Pellets	ohne	0
	NADPH	270
	Fe <sup>2+</sup> ; Ascorbat; 2-Oxoglutarat	DHK-Bildung

### C 2.3 Zeit-, Proteinlinearität, Temperatur- und pH-Optimum

Die Reaktion war linear mit der Zeit bis 25 min. Für die Proteinmenge wurde eine Linearität bis 30 µg Protein pro Test beobachtet (Abb. 15). Der höchste Umsatz von NAR zu Ap wurde beobachtet, wenn der pH-Wert des Testsystems zwischen 7.0 und 8.0 lag und die Inkubation bei 25°C durchgeführt wurde (Abb. 16).



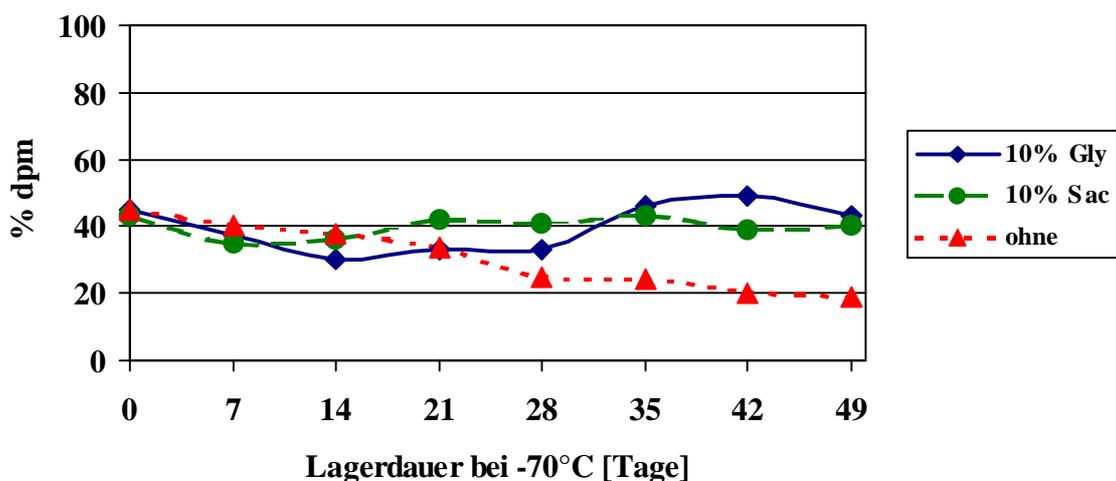
**Abb. 15. Flavonbildung (relativer Umsatz) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer(links) bzw. der Proteinmenge mit RE der Gerbera Sorte „Th 58“.**



**Abb. 16. Flavonbildung (relativer Umsatz) in Abhängigkeit vom pH-Wert des Testpuffers (links) bzw. der Inkubationstemperatur mit RE der Sorte „Th 58“.**

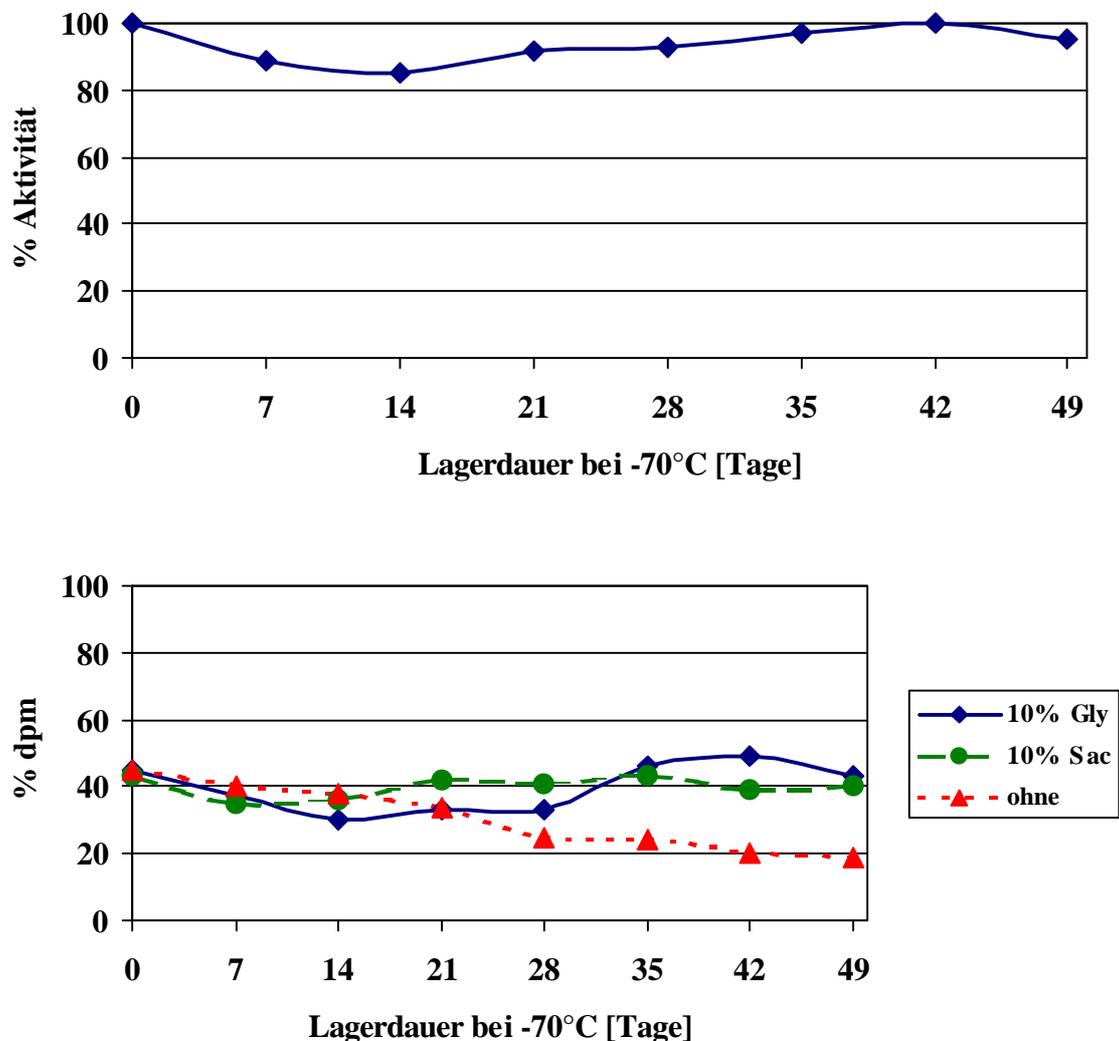
#### C 2.4 Stabilität des Enzyms

Um die Stabilität des Enzyms zu zeigen, wurde der Extrakt bei verschiedenen Temperaturen vorinkubiert. Bei einer Inkubation des RE für 45 min auf Eis oder bei 20 bzw. 25°C konnte nur ein geringer Einfluss auf die Enzymaktivität, etwa 20 % Verlust, festgestellt werden. Höhere Temperaturen, hier 37°C, führen schon nach 15 min zu einer deutlichen Reduzierung der FNS II Aktivität (Abb. 17). Dadurch konnte gezeigt werden, dass der RE für eine Charakterisierung der Enzymaktivität unter Standardbedingungen ausreichend stabil ist.



**Abb. 17. Stabilität der FNS II bei verschiedenen Vorinkubationstemperaturen.**  
Die Aktivität der Kontrollreaktionen (ohne Vorinkubation) wurde gleich 100 % gesetzt.

Blütengewebe, das direkt nach der Ernte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde, zeigte über eine Lagerdauer von 7 Wochen keinen Verlust an extrahierbarer Enzymaktivität (Abb. 18 oben).



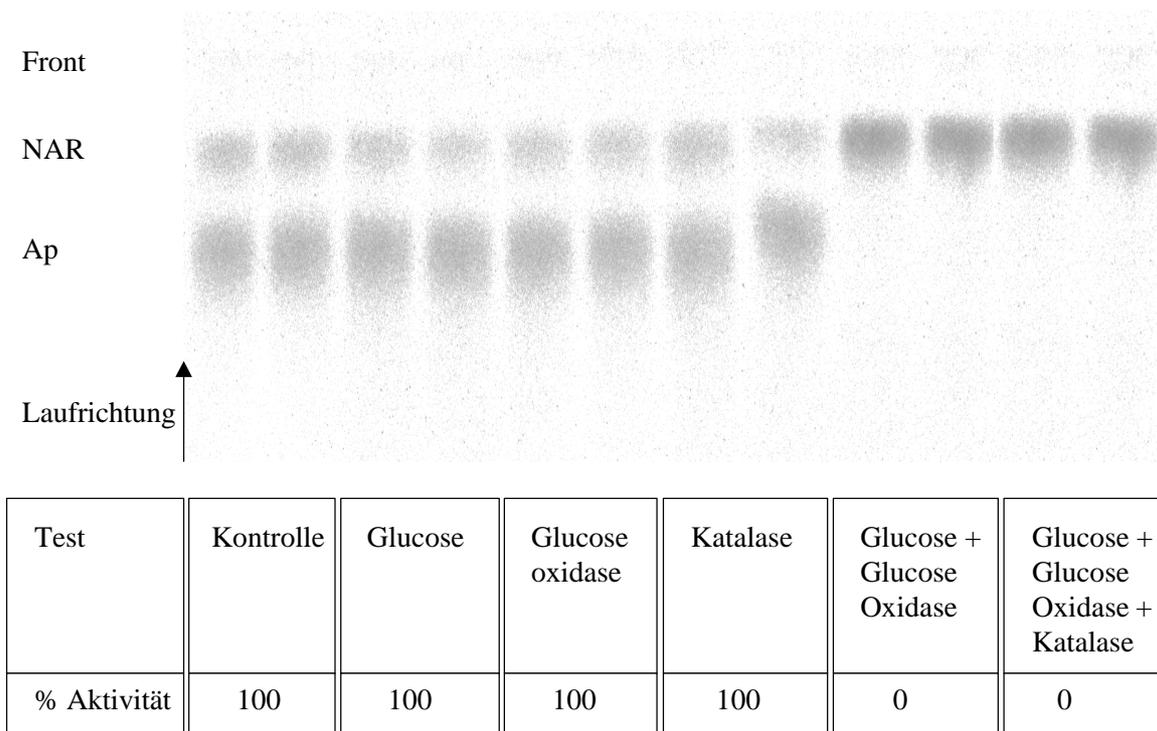
**Abb. 18. Stabilität der FNS II Aktivität bei Lagerung.**

Oben : frisch geerntete Petalen in % Aktivität bezogen auf Ausgangswert); unten : RE mit verschiedenen Zusätzen (relativer Umsatz).

Nur ein geringer Verlust der Aktivität der FNS II wurde beobachtet, wenn RE, der 10 % (v/v) Glycerin oder Saccharose enthielten, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde. Die Lagerungsdauer betrug bis zu 7 Wochen. Ohne die Zugabe von Glycerin bzw. Saccharose konnte nach der Lagerungsperiode nur noch ca. 50 % der ursprünglichen Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 18 unten).

## C 2.5 Sauerstoffabhängigkeit

Die Abhängigkeit der Reaktion von molekularem Sauerstoff wurde nach der Entfernung von Sauerstoff aus dem Testsystem durch die Zugabe von Glucose und Glucose Oxidase nachgewiesen (Kap. B 5.2.3). Unter absolut sauerstofffreien Bedingungen konnte weder mit RE noch mit Mikrosomen eine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Glucose, Glucose Oxidase und Katalase besitzen keine direkte Wirkung auf die Enzymaktivität (Abb. 19).



C

### Abb. 19. Abhängigkeit der FNS II Aktivität von molekularem Sauerstoff.

Durchgeführt als Doppeltests je Ansatz und in % Aktivität bezogen auf den Kontrollwert (= 100) angegeben.

## 2.6 Substratspezifität

Eine Inkubation von markiertem ERI mit Enzymaufarbeitungen aus „Th58“ und NADPH führte zur Bildung von Lu (Abb. 14), das ebenfalls durch Co-Chromatographie mit authentischen Proben in den Laufmittelsystemen 1-4 (Kap. B 4.2) identifiziert wurde. Unter Standardbedingungen betrug die Umsatzrate vom ERI zu Lu etwa 45 % im Vergleich zu der

von NAR zu Ap. Bei einem gleichzeitigen Angebot beider Flavanone, wurde NAR gegenüber ERI bevorzugt. Ebenfalls umgesetzt wurde Liquiritigenin. Es entstand 7, 4'-Dihydroxyflavon (Tab. 6; Abb. 14).

**Tab. 6. Substratspezifität der FNS II aus Gerbera (jeweils bezogen auf das eingesetzte Substrat).**

Substrat	dpm in Ap	dpm in Lu	dpm in 7,4'- Dihydroxyflavon
NAR	2350 (47%)	#	#
ERI	#	1050 (21%)	#
NAR + ERI	3000 (58%)	2350 (37%)	#
Liquiritigenin	#	#	5750 (86%) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Test ohne kaltes Substrat; ca. 8000 dpm im Test (vgl. Kap. B 5.2.2).

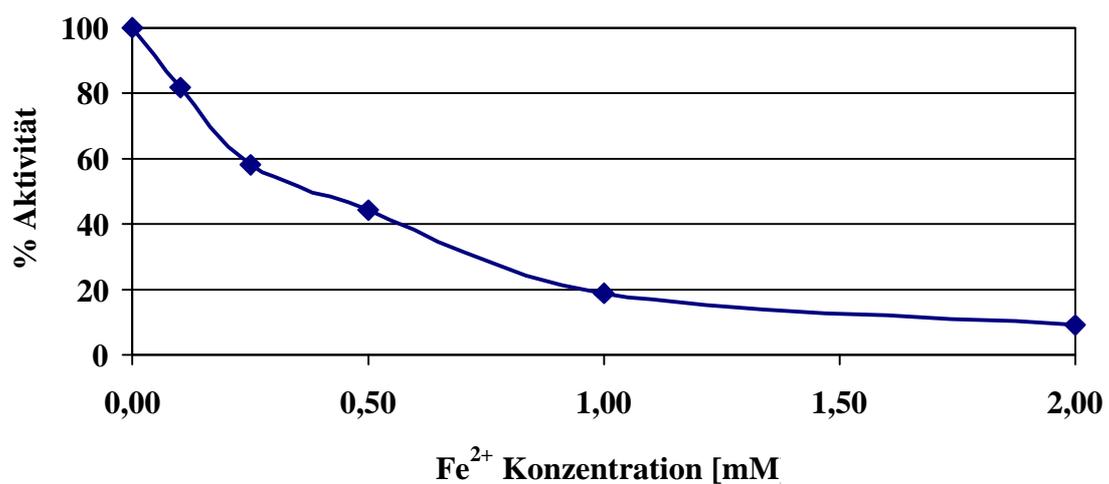
## C 2.7 Hemmstoffe

Eine starke Hemmung der FNS II Aktivität wurde mit den beiden bekannten Cyt P450 Hemmstoffen Ketokonazol und Ancymidol nachgewiesen. Dagegen zeigte Tetcyclacis, ein weiterer Cyt P450 Hemmstoff, keine hemmende Wirkung (Tab. 7). Überraschenderweise konnte die Reaktion durch die Zugabe von Fe<sup>2+</sup>-Ionen in verschiedenen Konzentrationen auf nahezu Null reduziert werden (Abb. 20). Eine deutliche Hemmung konnte darüber hinaus auch nach der Zugabe von Diethylpyrocarbonat (DEPC), p-Chloromercuribenzoat, Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>- bzw. Zn<sup>2+</sup>-Ionen und Kaliumthiocyanat (KCN) nachgewiesen werden. EDTA, o-Phenantrolin oder Diethyldithiocarbamat (DDC) zeigten dagegen keine wesentliche Wirkung auf die Enzymaktivität im Test. Die Zugabe von Kaliumrhodanid (KSCN), das Cyt P450 in Cyt P420 umwandelt (IMAI und SATO 1967), hemmt ebenfalls die Aktivität der FNS II (Tab. 7).

Die Zugabe von Cytochrom c, das in den Elektronentransport von der CPR zur terminalen Oxidase beteiligt ist, zeigte in der verwendeten Konzentration eine starke hemmende Wirkung auf die FNS II Aktivität (Tab. 7).

**Tab. 7. Wirkung von verschiedenen Zusätzen zum FNS II Test auf die Enzymaktivität**

Zusatz von	FNS II Aktivität (%)
ohne	100
2 mM EDTA	93
5 mM KCN	58
10 mM KSCN	65
0.5 mM DEPC	67
0.1 mM Chloromercuribenzoat	78
2 mM DDC	93
0.1 mM o-Phenanthrolin	110
2 mM Fe <sup>2+</sup>	9
2 mM Fe <sup>3+</sup>	33
2 mM Cu <sup>2+</sup>	15
2 mM Zn <sup>2+</sup>	19
50 µM Tetracyclacin	110
50 µM Ketokonazol	28
50 µM Ancymidol	40
50 µM Metyrapon	98
50 µM Cytochrom c	19



**Abb. 20. Wirkung von verschiedenen Fe<sup>2+</sup> Konzentrationen auf die Aktivität der FNS II.** Kontrollreaktion ohne Fe<sup>2+</sup>-Zugabe gleich 100 gesetzt.

## C 2.8 Aktivität über die Blütenentwicklung und Flavonakkumulation

Sowohl der Verlauf der Enzymaktivität der FNS II als auch die Akkumulation von Flavonen während der Entwicklung der Knospen und Blüten wurde untersucht. Diese Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, in welchem Blütenstadium die höchste Enzymaktivität vorhanden ist und damit aufzeigen, welche Knospen- oder Blütenstadien für eine spätere Isolierung von RNA besonders geeignet sind. Insgesamt betrachtet zeigte die FNS II Aktivität einen glockenförmigen Verlauf. Bereits im kleinsten Knospenstadium (Stadium 1; siehe auch Abb. 10 in Kap. B 2.1) konnte Aktivität der FNS II gezeigt werden. Im weiteren Verlauf der Blütenentwicklung steigt sie stetig an, um im Stadium 5 und 6 das Maximum zu erreichen. In den folgenden Stadien sinkt die Aktivität langsam ab. In den beiden letzten Stadien (10 + 11) ist schließlich nur noch eine geringe Aktivität nachweisbar. Die Akkumulation der Flavone beginnt im Stadium 2 und steigt dann parallel zur Enzymaktivität an. Da der Gehalt an Flavonen auch während der Alterung der Blüte konstant bleibt, kann davon ausgegangen werden, dass es nicht zu einem Abbau oder zu einer Umlagerung der Flavone kommt (Abb. 21).

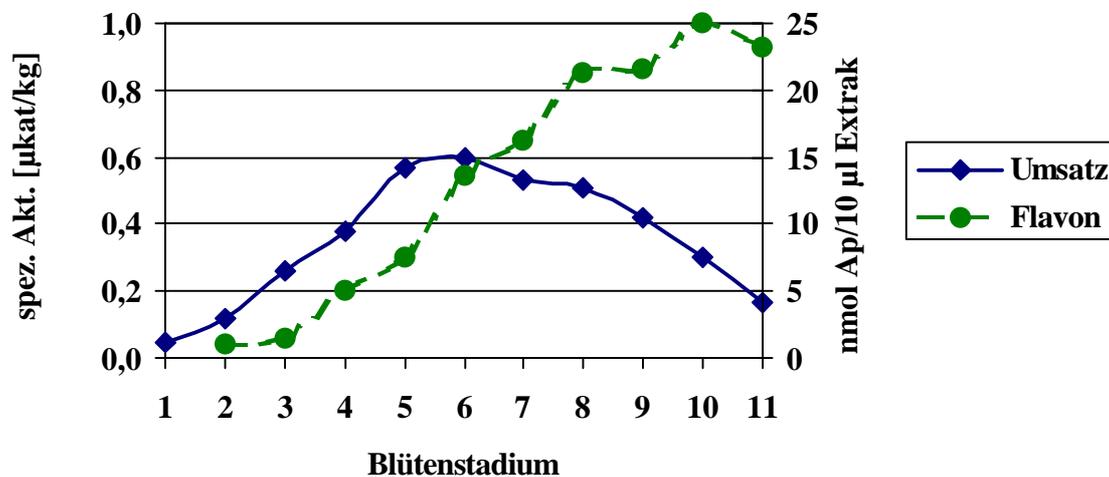


Abb. 21. Darstellung der Enzymaktivität der FNS II (spezifische Aktivität) und der Ap Akkumulation (in nmol Ap/10µl Extrakt) während der Blütenentwicklung in der *Gerbera* Sorte „Regina“.

## C 2.9 Genetische Kontrolle

Standardtests mit Enzymaufarbeitungen von verschiedenen farbigen, aber auch farblosen Linien, mit einem dominanten Allel *fns*<sup>+</sup> führten im wesentlichen zu den selben Ergebnissen wie für die Linie „Th58“ beschrieben (Abb. 22A). Dabei konnte mit Linien, die zusätzlich zur FNS II auch F3'H Aktivität besitzen (Genotyp *f3'h*<sup>+</sup> ; *x x*), auch die Bildung von ERI und Lu beobachtet werden (Abb. 22B). Sowohl im RE als auch in der mikrosomalen Fraktion aus Blüten von Linien mit rezessiven Allelen (*fns fns*) konnte keine Enzymaktivität der FNS II nachgewiesen werden (Abb. 22C). In entsprechenden Linien, die F3'H Aktivität besitzen (z.B. „Clivia 18-1“), konnte aber die Bildung von ERI gezeigt werden (Abb. 22D).

In Mischexperimenten, bei denen der Test sowohl Proteinextrakte dominanter als auch rezessiver Genotypen enthält, konnte keine Hemmung der Flavonbildung festgestellt werden (Tab. 8).

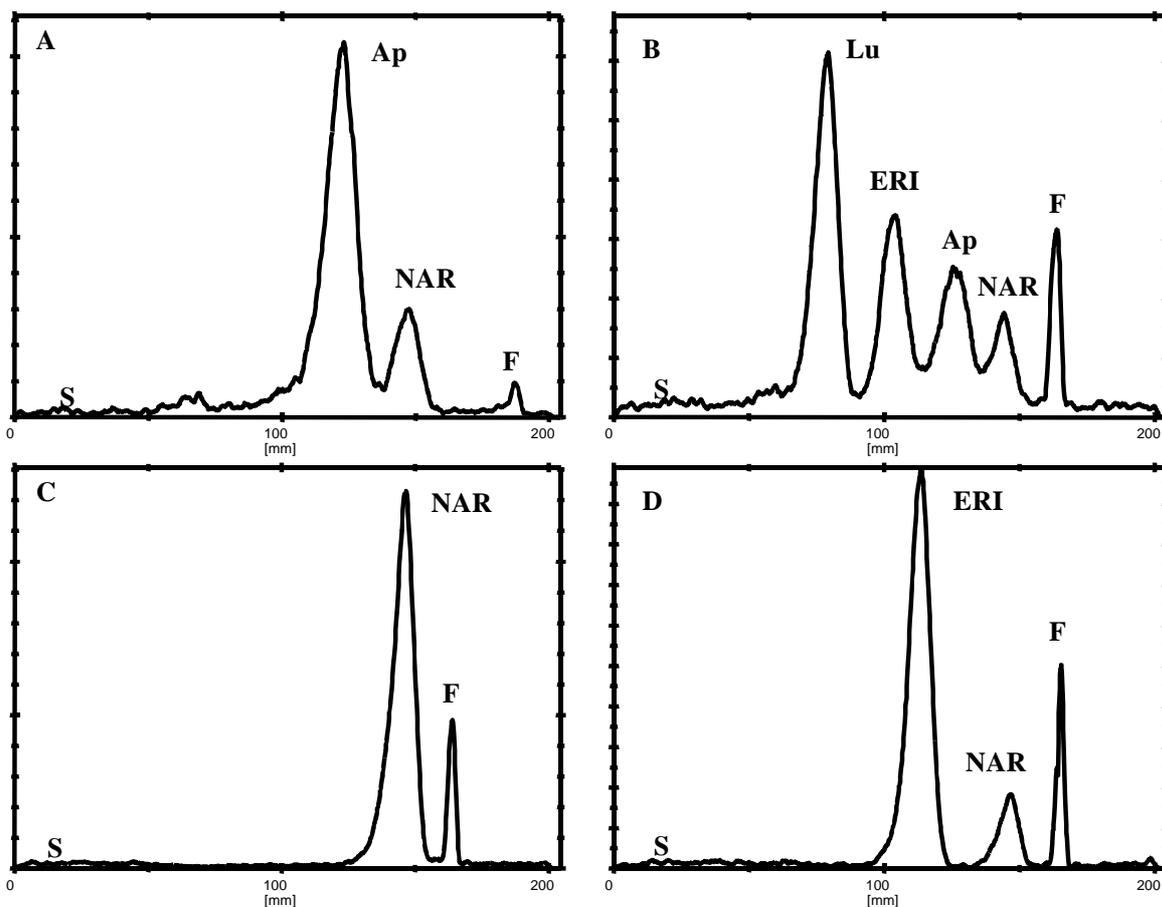


Abb. 22. Enzymatischer Umsatz NAR mit Proteinextrakten von verschiedenen *Gerbera* Genotypen.

S : Start; F : Front.

**Tab. 8. Mischexperiment mit Rohextrakten aus „Th 58“ und den drei definierten Mutanten „T1“, „T3“ und „Clivia 18-1“.**

Enzymquelle	dpm in Ap <sup>a</sup>	Mischexperiment <sup>b</sup> dpm in Ap
Th 58 T1	1.780 0	1.645
Th 58 T3	1.780 0	1.580
Th 58 Clivia 18-1	1.780 0	1.770 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Standardtest

<sup>b</sup> Standardtest mit 1 : 1 Mischung beider Enzymquellen

<sup>c</sup> entspricht der Summe der Radioaktivität aus den drei entstandenen Produkten Ap, Lu und ERI. Die Linie „Clivia 18-1“ besitzt F3'H-Aktivität.

### C 3 Genetische Studien

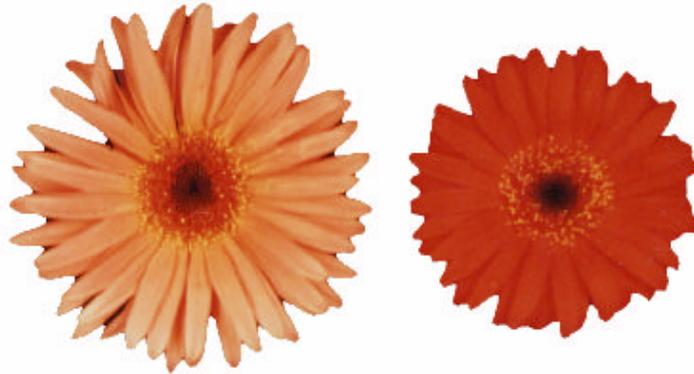
#### C 3.1 Selbstungsexperimente mit definierten Genotypen

Aus einer Kreuzung zwischen einem Genotyp ( $fns^+ fns^+$ ) mit Flavon-Akkumulation in den Blüten und dementsprechend mit FNS II Aktivität und einem flavonfreien Genotyp ( $fns fns$ ) ohne FNS II Aktivität stand die heterozygote Sorte „Th 58“ (Genotyp  $fns^+ fns$ ) zur Verfügung (TYRACH, 1995). Aus einer Selbstungsnachkommenschaft dieser Sorte konnten 64 Einzelpflanzen (147-100 bis 147-163) aufgezogen werden. Ziel dieses Experimentes war es, im Sortiment nicht vorhandene, homozygot dominante Linien für den Locus *Fns* zu selektieren und im weiteren Sinne „isogene“ Linien für die Klonierung der FNS II über differentielle Screening Methoden bereitzustellen.

#### C 3.2 Biochemische Charakterisierung der Nachkommenschaft (147-1..)

Von allen 64 Einzelpflanzen wurden einerseits Anthocyanextrakte, andererseits Extrakte der übrigen Flavonoidverbindungen, einschließlich der Flavone, hergestellt. In allen Extraktionen konnten Anthocyane nachgewiesen werden, wobei sowohl Pg- als auch Cy-Typen bzw. Mischtypen nachgewiesen werden konnten. Bezüglich der Flavone wurde in 30 Pflanzen nur Ap und in weiteren 18 Pflanzen zusätzlich Lu in unterschiedlichen Mengen gefunden. Ein

hoher Flavongehalt korrelierte eindeutig mit einem geringeren Anthocyangehalt. 16 der insgesamt 64 Einzelpflanzen enthielten keine Flavone und wiesen dementsprechend einen hohen Anthocyangehalt auf (Abb. 23).



**Abb. 23. Unterschiedlicher Anthocyangehalt in flavonhaltigen (links) und flavonfreien *Gerbera* Blüten aus Selbstungsnachkommenschaft 147-1...**

### **C 3.3 Enzymologische Charakterisierung der Nachkommenschaft (147-1..)**

Enzymologische Untersuchungen von Knospen- und Blütenextrakten der 64 Einzelpflanzen mit [<sup>14</sup>C]-NAR als Substrat und NADPH als Kofaktor bestätigten die chromatographischen Ergebnisse. In allen 16 flavonfreien Einzelpflanzen wurde weder im RE noch in entsprechenden Mikrosomenpräparationen aus Knospen oder Blüten eine Aktivität der FNS II gefunden. Dagegen wiesen RE und mikrosomale Präparationen aus Knospen und Blüten aller flavonhaltigen Linien FNS II Aktivität auf, die allerdings in ihrer Höhe deutlich variierte. Die Aufspaltung der Phänotypen in 48 flavonhaltige und 16 flavonfreie entspricht dem für einen monogenen Erbgang bei vollständiger Dominanz erwarteten Verhältnis von 3 : 1. Anschließende detaillierte enzymatische Untersuchungen unter Einbeziehung verschiedener Knospen- und Blütenstadien zeigten, daß im wesentlichen zwei Expressionstypen auftreten. Es konnten 17 Einzelpflanzen mit hoher FNS II Aktivität (> 50 % Umsatz zu Flavonen) und Flavonmenge und 31 Pflanzen mit einer geringeren Aktivität und Flavonmenge klassifiziert werden (siehe Anhang A1b). Die gefundenen Ergebnisse entsprechen weitgehend einer bei unvollständiger Dominanz (intermediärer Erbgang) der FNS II Expression erwarteten 1 : 2 : 1 Spaltungsverhältnis für ein Gen mit zwei Allelen (Tab. 9). Beide Spaltungsverhältnisse können mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0.01$  bei 2 bzw. 1 Freiheitsgrad (FG) angenommen

werden. Zu beachten ist, dass die Einteilung der Nachkommen in die verschiedenen Klassen willkürlich, rein nach objektiven Beobachtungen während der Untersuchungen geschehen ist. Die Enzymaktivität wurde aus dem Umsatz mit NAR zu Ap abgeleitet und die Flavonmenge wurde nur anhand von Dünnschichtchromatographie bonitiert. Detailliertere Untersuchungen zu diesen Aspekten waren nicht Bestandteil dieser Arbeit.

**Tab. 9. Aufspaltung der flavonhaltigen Typen in der Selbstungsnachkommenschaft der Sorte „Th 58“ (Daten siehe Anhang A1b).**

Kreuzung	n	flavon- haltig	flavon- frei		<sup>2</sup>	P
Th 58 x S	64	48	16		3 : 1 <sup>a</sup> 0.01	<b>0.95-0.99</b>
		> 50% Umsatz	< 50% Umsatz	kein Umsatz	<sup>2</sup>	P
		17	31	16	1 : 2 : 1 <sup>b</sup> 0.092	<b>0.95-0.98</b>

<sup>a</sup> für  $\{fns^+ . : fns fns\}$

<sup>b</sup> für  $\{fns^+ fns^+ : fns^+ fns : fns fns\}$

### C 3.4 Selbstung von verschiedenen, ausgewählten 147iger Linien

Zur weiteren Absicherung der Genetik wurden einige Vertreter aus den drei Klassen mit den putativen Genotypen  $fns^+ fns^+$ ,  $fns^+ fns$  und  $fns fns$  erneut geselbstet und hinsichtlich ihres Flavongehaltes bzw. ihrer FNS II Aktivität untersucht (Anhang A1c-e). Bei den geselbsteten Linien handelt es sich um „147-120“ (hohe FNS II Aktivität; „147-2.“), „147-125“ (geringe FNS II Aktivität; „147-3.“) und „147-114“ (keine FNS II Aktivität; „147-4.“). Aus den erhaltenen Samen konnten 17, 27 bzw. 33 Einzelpflanzen bis zur Blüte herangezogen werden. Phänotypisch konnten in den Nachkommenschaften aus „147-120“ hauptsächlich schwach gefärbte Blütentypen (geringer Anthocyangehalt; flavonhaltig), aus „147-114“ dagegen nur stark gefärbte Blüten (hoher Anthocyangehalt; flavonfrei) beobachtet werden. (Abb. 24 und 25). Anschließend wurde die FNS II Aktivität in Blüten aller Nachkommenschaften der Selbstung „147-3.“ und aus einigen (ca. 50 %) Vertretern der Selbstungen „147-2.“ bzw. „147-4.“, die zufällig ausgewählt wurden, getestet. In den ausgewählten Typen der Nachkommen aus „147-2.“ und „147-4.“ konnte eine hohe bzw. keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Mit den Enzymextrakten der Linien „147-3.“ konnten die drei unterschiedlichen Expressionstypen, die bereits für die Selbstung „147-1.“ beschrieben

wurden, nachgewiesen werden (Tab. 10). Diese Typen spiegelten sich auch in der Farbausprägung der Blüten, die das komplette Spektrum von schwach bis stark gefärbt zeigten, wieder (Abb. 25). Beide Spaltungsverhältnisse können mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0.01$  bei 2 bzw. 1 Freiheitsgrad (FG) angenommen werden. Diese Ergebnisse belegen die Richtigkeit der postulierten Genotypen für die erste Selbstung und es konnten homozygot dominante Linien für den Locus *Fns* („147-120“ plus „147-2..“) und weitere rezessive Typen („147-4..“) etabliert werden.

**Tab. 10. Aufspaltung der flavonhaltigen Typen in der Selbstungsnachkommenschaft der Linie „147-3..“ (Daten siehe Anhang A1d).**

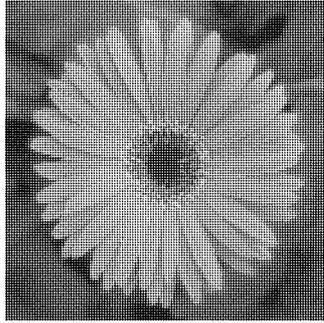
Kreuzung	n	flavon- haltig	flavon- frei		<sup>2</sup>	P
147-3.. x S	27	18	9		3 : 1 <sup>a</sup> 1.00	<b>0.3-0.4</b>
		> 50% Umsatz	< 50% Umsatz	kein Umsatz	<sup>2</sup>	P
		7	11	9	1 : 2 : 1 <sup>b</sup> 1.22	<b>0.5-0.6</b>

<sup>a</sup> für  $\{fns^+ . : fns fns\}$

<sup>b</sup> für  $\{fns^+ fns^+ : fns^+ fns : fns fns\}$

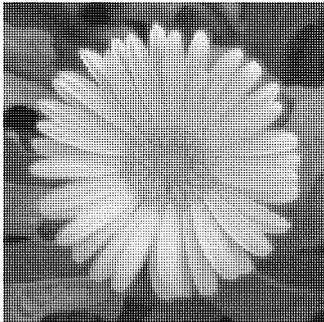
**Abb. 24 und 25 (Seite 69 bzw. 70). Phänotypen der verschiedenen Selbstungsnachkommenschaften.**

Ausgangslinie „Th 58“ und hieraus postulierte bzw. durch weitere Selbstungen verifizierte Genotypen.



X S

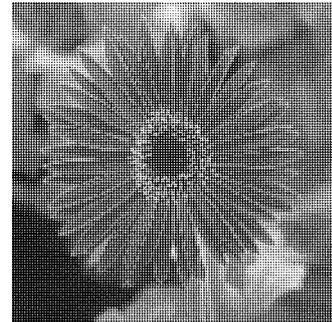
„Th 58” [*fns*<sup>+</sup> *fns*]



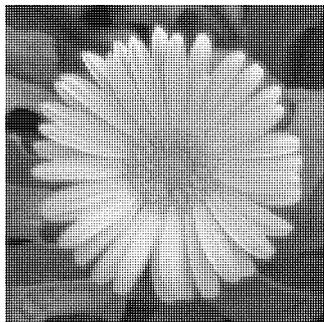
„147-120” [*fns*<sup>+</sup> *fns*<sup>+</sup>]



„147-125” [*fns*<sup>+</sup> *fns*]

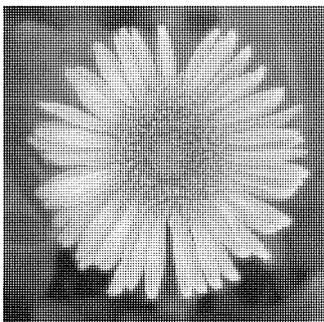


„147-114” [*fns* *fns*]

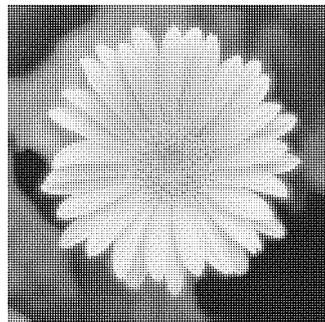


X S

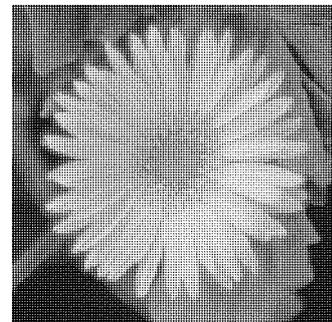
„147-120” [*fns*<sup>+</sup> *fns*<sup>+</sup>]



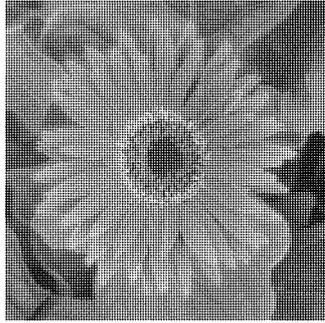
„147-202”



„147-206”

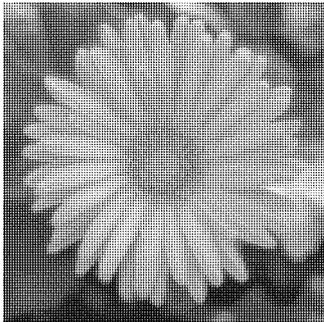


„147-213”

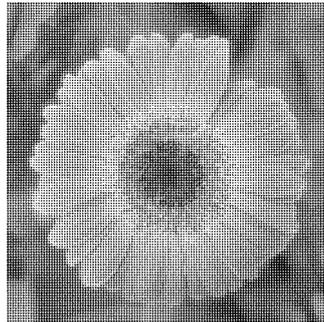


X S

„147-125” [*fns*<sup>+</sup> *fns*]



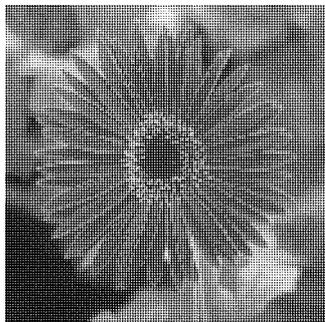
„147-305”



„147-320”



„147-323”

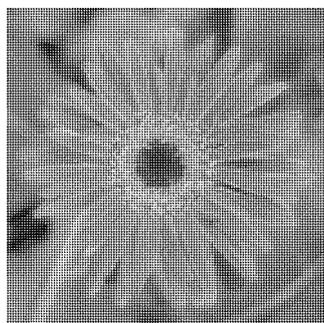


X S

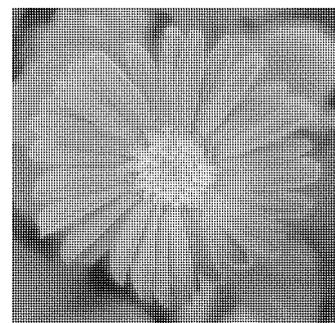
„147-114” [*fns* *fns*]



„147-408”



„147-417”



„147-429”

## C 4 Molekularbiologische Untersuchungen

### C 4.1 Strategie zur Isolierung der FNS II cDNA aus *Gerbera*

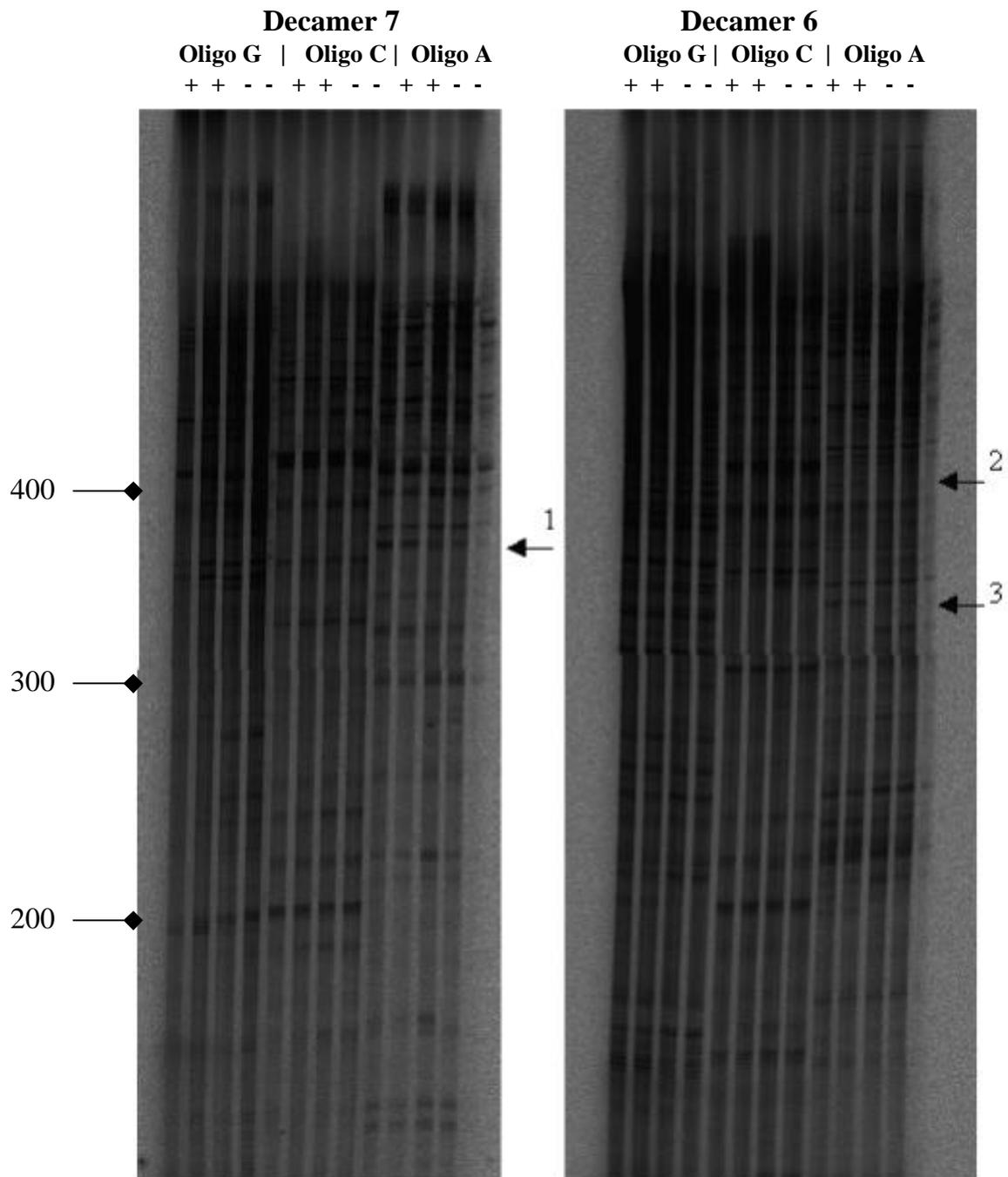
Die vorangegangenen biochemischen und genetischen Untersuchungen mit verschiedenen *Gerbera* Linien zeigten, dass die Bildung der Flavone durch das Gen *Fns* kontrolliert wird. FNS II Aktivität konnte nur in Linien mit dominantem Allel *fns*<sup>+</sup>, nicht in Linien mit rezessiven Allelen (*fns fns*) nachgewiesen werden. Wie schon bei verschiedenen anderen Pflanzen gezeigt werden konnte, betreffen diese Mutationen oft die Transkription (FORKMANN und HELLER, 1999 und Referenzen darin). Dadurch können verschiedene Methoden, die auf Unterschiede auf der Transkriptionsebene beruhen, zur Isolierung des entsprechenden Gens eingesetzt werden (z.B. RDA, Differential Display, differentielle Hybridisierung von Genbanken). Darüber hinaus konnte eine deutliche Abhängigkeit der Höhe der Enzymaktivität der FNS II vom Entwicklungszustand der Blüte mit einem Maximum im Stadium 5 bis 6 gezeigt werden (Abb. 21). Daher kann ein Maximum des entsprechenden Transkriptes in den Stadien 3 bis 4 erwartet werden. Dies ist besonders für die Isolierung der RNA für das differentielle Screening wichtig. Da die strukturelle Vielfalt innerhalb der P450 Proteine sehr hoch ist, wurden mRNA Populationen von flavon-akkumulierenden *Gerbera* Linien mit dominanten Allelen (*fns*<sup>+</sup> *fns*<sup>+</sup>; „147-120) und flavon-freie Mutanten mit rezessiven Allelen (*fns fns*; „147-114“) durch ein modifiziertes Differential Display (DD-RT-PCR) verglichen. Diese auf PCR beruhende Methode erlaubt den Vergleich von RNA-Populationen, die verschiedene genetische bzw. physiologische Zustände repräsentieren, und damit die Identifizierung von Genen, die unter diesen Bedingungen transkriptionell reguliert werden (BAUER et al., 1993; LIANG und PARDEE, 1992, LIANG et al., 1993). Um vornehmlich Cyt P450 spezifische PCR Produkte mit Hilfe dieser Methode zu erhalten, wurden die von SCHOPFER und EBEL (1998) konstruierten 5'-Primers verwendet, die auf einen hoch konservierten Sequenzbereich pflanzlicher Cyt P450 zurückzuführen sind, und mit einem der drei degenerierten 3' Ankerprimer (Oligo A, C und G; Anhang A2) kombiniert. Aus verschiedenen Cyt P450 spezifischen Motiven bietet sich besonders der Bereich der Häm-Bindungsstelle mit den Aminosäuren [PFG] an. Die entsprechenden Kodons enthalten nur zwei degenerierte Positionen. BAUER et al. (1993), zeigten, dass die sechs 3'-terminalen Nukleotide eines 5'-Primer genau mit dem Template übereinstimmen sollten, um eine möglichst hohe Spezifität zu erhalten. Um dies zu gewährleisten, mussten nur acht nicht degenerierte Primer konstruiert werden, die alle

Möglichkeiten hinsichtlich des [PFG] Motives nutzen (Abb. 13; Kap. B 6.5.3). Andere hoch konservierte Bereiche, in erster Linie das Häm-bindende Cystein, folgen dem [PFG] Motiv in Richtung 3'-Ende und ermöglichen daher eine einfache Identifizierung des Cyt P450 Fingerprints [PFGXGRRXCPG] in den Differential Display Fragmenten. Die drei 3' Ankerprimer (T<sub>12</sub>MN; M = Wobble aus A, C und G; N = A, C oder G; 14mere) sind ausreichend, um während der reversen Transkription an die Poly(A) Enden aller mRNA's zu binden und ermöglichen zudem die Aufteilung der RNA-Population in drei Unterpopulationen. Dies ist erforderlich, um bei der Auftrennung der Banden im Sequenzgel ein überschaubares Muster zu bekommen. Durch die zwei Basen, die unmittelbar hinter dem Oligo(dT) Abschnitt folgen - eine degenerierte M und eine spezifische N - wird eine höhere Spezifität der Hybridisierung an den Anfang des Poly(A) Schwanzes gewährleistet (LIANG et al., 1993). Da das [PFG] Motiv zwischen 300 und 500 bp, bei einer erwarteten Länge des nicht translatierten Bereiches von 100 bis 300 bp, in Richtung 5'-Ende vom Poly(A) Schwanz lokalisiert ist, besitzen die erwarteten Fragmente eine ungefähre Länge von 250 bis 500 bp und können daher mit Hilfe eines Standardsequenzgels (5 %) aufgetrennt und identifiziert werden.

Die DD-RT-PCR sollte zunächst putative FNS II Fragmente liefern, mit denen im Anschluß die entsprechenden vollständigen Klone mit Hilfe weiterer PCR-gestützter Methoden oder einer cDNA Bank isoliert werden können. Die Identifizierung der cDNA Klone kann durch Sequenzierung, sowie durch Analyse der Transkriptionsmuster in unterschiedlichen Genotypen bzw. Blütenstadien und durch funktionelle Expression in einem heterologen System erfolgen.

#### **C 4.2 Isolierung von *Gerbera* cDNA Fragmenten, die für differentiell expremierte Cyt P450 Proteine kodieren**

Nach einer Optimierung der PCR-Bedingungen, die aufgrund der kurzen und teilweise degenerierten Primer erforderlich war, zeigte das auf DD-RT-PCR basierende Screening fünf differentiell expremierte Banden im Größenbereich von 250 - 500 bp (Abb. 26). Alle wurden ausgeschnitten, eluiert, reamplifiziert und analysiert. Zur Kontrolle der Integrität der differentiellen Banden wurde zudem auch der Bereich aus der negativ Kontrolle auf die gleiche Weise eluiert, reamplifiziert und analysiert. Dies war besonders sinnvoll bei Banden, die nicht eindeutig differentiell erschienen (siehe Bande 1, Abb. 26). Die Sequenzdaten des PCR Produktes DDd7a aus Bande 1 (Abb. 26) zeigten auf Aminosäureebene eine hohe Homologie

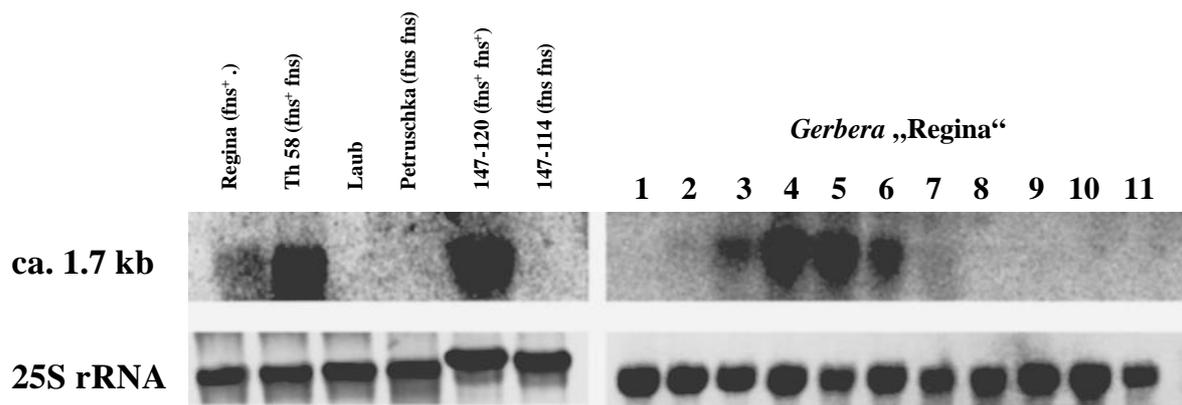


**Abb. 26. Cyt P450 spezifische DD-RT-PCR mit den Decamer-Primern 6 und 7.**  
RNA Präparationen der flavonhaltigen Linie „147-120“ (+) und der flavonfreien Linie „147-114“ (-) wurden in unabhängigen Wiederholungen gegeneinander verglichen. Die Decamer-Primer sind mit einem der drei Oligo Primer kombiniert. Auf den zwei Gelen können drei der fünf differentiellen Banden sichtbar gemacht werden (Pfeile). Links sind die Werte des Längenstandards angezeigt.

zu bekannten eukaryotischen Cyt P450 Sequenzen, einen offenen Leserahmen (ORF) mit dem konservierten Fingerprint [PFGXGRRXCPG] und intaktem 5'- bzw. 3'-PCR Primer (Anhang A3a). Der als CypDDd7a bezeichnete Klon repräsentiert den 3'-terminalen, kodierenden Bereich beginnend mit der Häm-Bindungsstelle über 74 Aminosäuren (AS) und einen 186 bp langen nichttranslatierten Bereich. Die Länge des Fragments stimmte mit der anhand des Gels bestimmten Größe überein.

### C 4.3 Expression des *Gerbera* CypDD7a Gens

Um die differentielle Expression des erhaltenen Cyt P450 Fragmentes CypDD7a zu zeigen, wurden Northern Blot Analysen mit Gesamt-RNA durchgeführt. Außerdem wurde in diesem Zusammenhang die Expression über die 11 unterschiedlichen Blütenstadien und in verschiedenen Geweben, Petalen und Laub, untersucht. Die unter hoch stringenten Bedingungen durchgeführte Hybridisierung von Gesamt-RNA mit einer CypDDd7a cDNA Probe, zeigte ein etwa 1.7 kb großes Transkript. Dieses Transkript wurde nur in genetisch definierten, flavonhaltigen *Gerbera* Linien, den Sorten „Th 58“ und „Regina“ mit jeweils dominantem Allel (*fns*<sup>+</sup>), nicht in flavonfreien Linien mit rezessiven Allelen für den Locus *Fns* und im Laub, das keine Flavone enthält, gefunden. Die Transkriptionsrate des entsprechenden Gens erreichte im Blütenstadium 4 ein Maximum, um dann relativ schnell wieder abzusinken



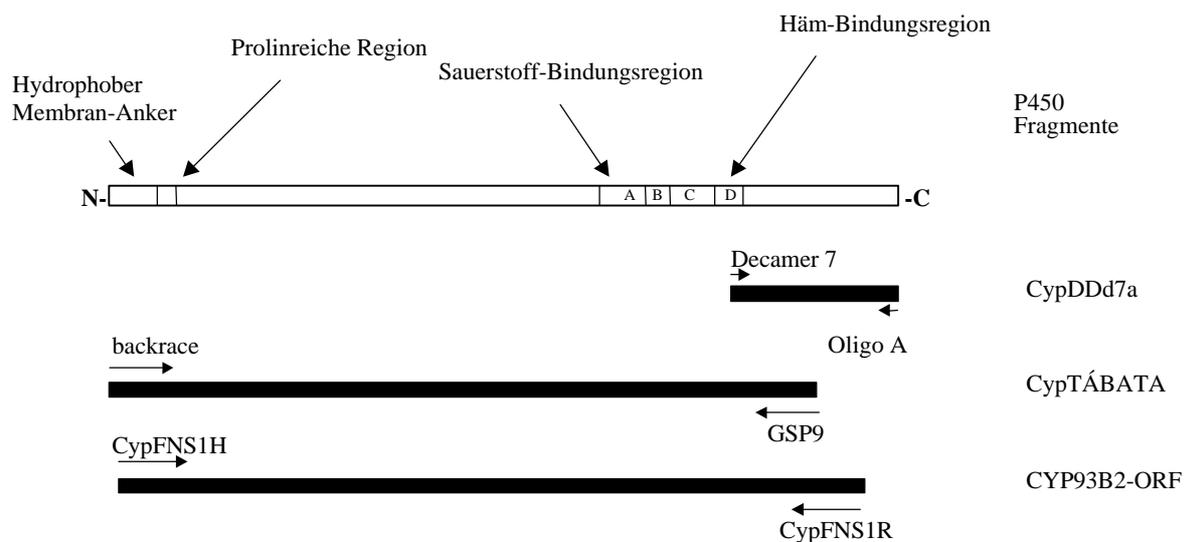
**Abb. 27. Northern Blot Analyse mit dem *Gerbera* Cyt P450 Fragments.**

links : verschiedene Genotypen; rechts : 11 unterschiedliche Blütenstadien der *Gerbera*-Sorte „Regina“. Die mit EtBr angefärbte 25S ribosomale RNA dient als Ladekontrolle.

(Abb. 27). Der Verlauf der Transkription steht im Einklang mit dem Verlauf der Enzymaktivität bzw. der Akkumulation von Flavonon in *Gerbera* (Abb. 21). Damit konnte gezeigt werden, dass das zum cDNA Klon CypDDd7a entsprechende Transkript ein Expressionsmuster besitzt, wie es für die FNS II erwartet wird.

#### C 4.4 Isolierung des entsprechenden full-length cDNA Klons zu CypDDd7a

Zur Isolierung des full-length cDNA Klons wurde 5'-RACE Technik gegenüber einem cDNA Bank Screening bevorzugt. Dazu wurden mehrere genspezifische Primer (GSP1 bis 9) aus dem bekannten Fragment abgeleitet. Nach zwei PCR-Runden wurde nur ausgehend vom C-Tailing Ansatz mit der Primer Kombination GSP9 und backrace (siehe Anhang A2 und A3a) ein 1.5 kb langes Fragment nach Gelelektrophorese beobachtet. Das erhaltene Fragment (CypTÁBATA; Anhang A3b) zeigte wiederum eine hohe Homologie mit anderen bekannten eukaryotischen Cyt P450 Sequenzen, einen ORF mit einem Startkodon, den konservierten Bereich der Häm-Bindungsstelle und den intakten 3' genspezifischen PCR Primer (GSP9). Der Klon CypTÁBATA repräsentiert daher den 5' kodierenden Bereich von 460 Aminosäuren beginnend mit einem 23 bp langen Leader. Alle im Verlauf der Klonierung über PCR Methoden amplifizierte cDNA Klone sind zusammenfassend in Abb. 28 dargestellt.



**Abb. 28. Amplifizierte PCR Fragmente im Verlauf der Klonierung.**

CypDDd7a : differential Display Fragment mit den Primern Decamer 7 und Oligo A.

CypTÁBATA : 5'-RACE Fragment (2. PCR-Runde) mit den Primer backrace und GSP9.

#### C 4.5 Sequenzanalyse des *Gerbera* CYP P450 cDNA Klon

Sowohl die Nukleotidsequenz bzw. die abgeleitete Aminosäuresequenz des Differential Display bzw. des 5'-RACE Fragmentes als auch die des vollständigen cDNA Klons wurden mit bekannten Sequenzen in der GenBank Datenbank unter Verwendung von „BLAST Search“ (ALTSCHUL et al., 1990) verglichen. In beiden Fällen zeigten die Nukleotidsequenzen des *Gerbera* Klone mit der der Flavanon 2-Hydroxylase (F2H; CYP93B1) aus *Glycyrrhiza echinata* L. (AKASHI et al., 1998; Accession Nr. AB001380) die größte Homologie. Ein Alignment des *Gerbera* Klons mit CYP93B1, erstellt mit Hilfe des Programms „ClustalW“ (THOMPSON et al., 1994), ergab eine Homologie von 52 % auf der Nukleotidebene und 53 % auf Aminosäureebene (Abb. 29; 58 % nach D. NELSON, persönliche Mitteilung : hierbei wurden Insertionsbereiche, die bei einem Alignment mit anderen Cyt P450's keinen Sinn ergaben, nicht in das Alignment einbezogen. Demnach wurde der neu isolierte Klon nach der auf der abgeleiteten Aminosäuresequenz basierenden Cyt P450 Klassifizierung als CYP93B2 eingeordnet; nach den in Abb. 29 dargestellten Werten des „vollständigen“ Alignments hätte der *Gerbera* Klon in einer neuen Unterfamilie zugeordnet werden müssen). Der Klon CYP93B2 enthält eine 1.7 kb cDNA mit einem einzelnen offenen Leserahmen von 1516 bp, der für ein Polypeptid von 511 Aminosäureresten kodiert und einer kalkulierten Molekularmasse von 58.2 kDa entspricht. Das ATG Startkodon konnte durch Sequenzvergleiche mit bekannten Cyt P450 aufgrund der hohen Homologie identifiziert werden. Das Start-Methionin wird von einer 22 Aminosäuren umfassenden Sequenz gefolgt, die 16 hydrophobe Reste, zusammengesetzt aus mehreren Leucin, Isoleucin, Phenylalanin und Prolin, besitzt (Anhang A3c). Im Anschluss an diesen hydrophoben Bereich folgt die Sequenz [-PPXPXXXP-], die dem Konsensus der prolinreichen Region vieler Cyt P450 entspricht (YAMAZAKI et al., 1993). Das Vorkommen eines weiteren Sequenzbereiches, der hoch konservierte Aminosäuren enthält [-(A/G)Gx(D/E)T(T/S)-], steht im Zusammenhang mit der Sauerstoffbindung bzw. Aktivierung. Schlüsselemente der sogenannten Sauerstoffbindungstasche, die in der Domaine A (vgl. Abb. 29; Box 1) lokalisiert ist, sind das konservierte Glycin-305 (entspricht G-248 in P450<sub>cam</sub>; Anhang A4), das 57 Aminosäurereste aufwärts vom [-EALR-]-Motiv liegt, und das Threonin-309 (T-252 in P450<sub>cam</sub>). Dies deutet daraufhin, dass das entsprechende Genprodukt zur sogenannten Gruppe A der Cyt P450 Gene gehört (DURST und NELSON, 1995). Diese Gruppe führt klassische Monooxygenisierung von verschiedenen Substraten durch (SCHULER, 1996). Da es sich bei der Flavonbildung nicht um

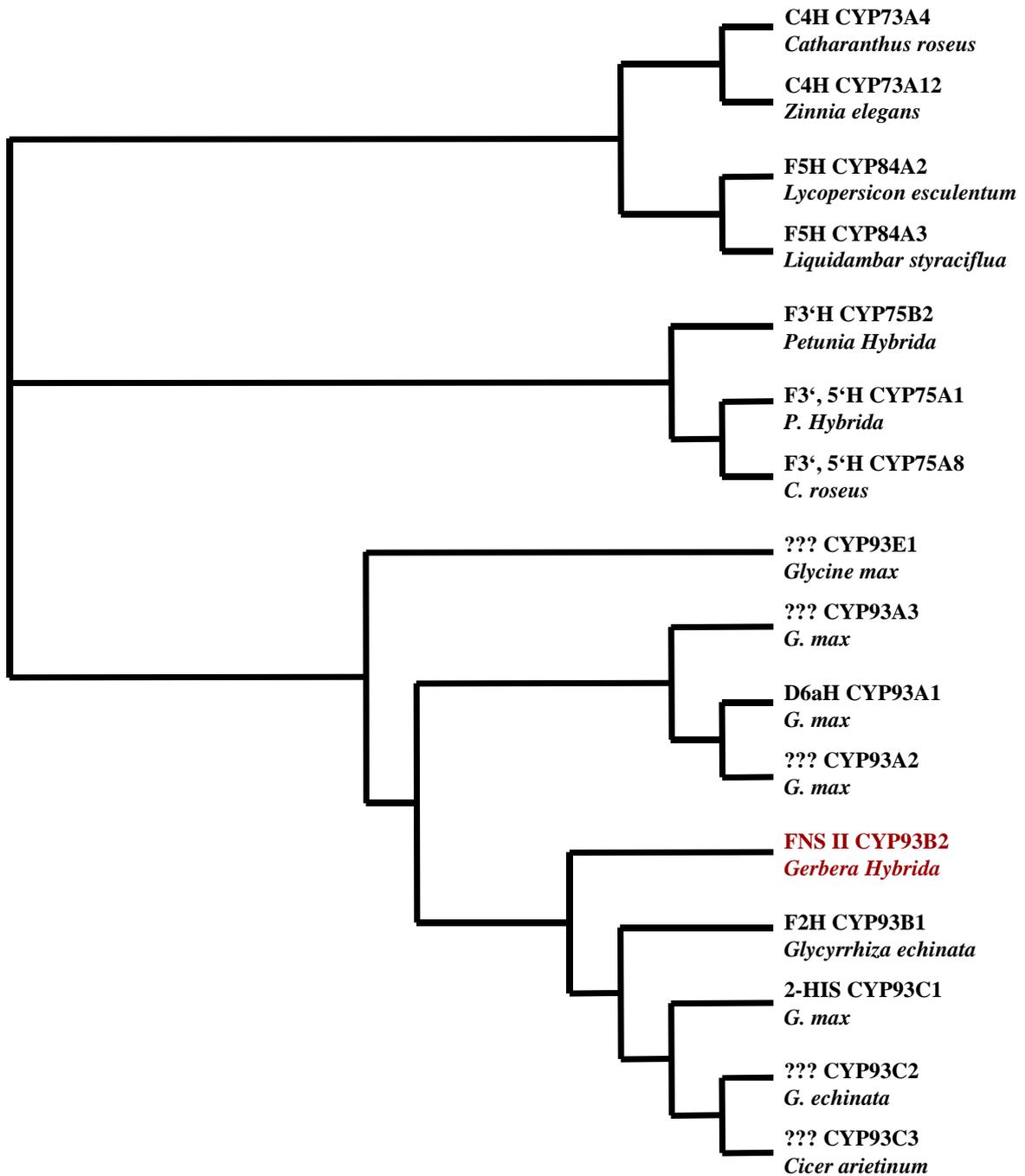


Isoleucin ersetzt. Eine ähnliche Substitution ist bei der BS in Position 248 (P450<sub>cam</sub>) zu finden. Das erwartete Glycin ist durch ein Prolin ersetzt. Die BS baut keinen aktivierten Sauerstoff ins Produkt ein, sondern führt eine klassische Oxidase Reaktion durch. Im *Gerbera* Klon kann dagegen keine auffällige Substitution in diesem Bereich festgestellt werden (Tab. 11). Das Motiv [-EXXR-], am Ende der Domain B (Abb. 29; Box 3), und ein weiteres, [-PXR-] (Abb. 29; Box 4), 52 Aminosäurereste weiter abwärts am Ende der Domain C gelegen, zeigen eine hohe Konservierung, wobei deren Funktion unter den Cyt P450 Sequenzen bislang unbekannt ist. 20 Aminosäurereste abwärts der Sauerstoffbindungsregion befindet sich außerdem ein in der CYP93 Unterfamilie hoch konserviertes Decapeptid [-K(A/V)R(Q/E)EXXXV(V/I)-] (Box 2). Dieser Sequenzbereich wurde durch Proteinreinigung und Mikrosequenzierung aus Elicitor-induzierten Sojabohne Zellen isoliert und anschließend zur Klonierung der D6aH (CYP93A1) verwendet (SCHOPFER et al., 1998). In CYP93B2 ist das Adenin an Position 8 des Decapeptides durch ein Glutamin-336 und das Valin an Position 10 durch ein Isoleucin-338 ersetzt. Ein weiterer hoch konservierter Bereich befindet sich in der Domain D zwischen Prolin-439 und Glycin-449. Dieser Bereich enthält die acht hoch konservierten Aminosäuren des bereits erwähnten Cyt P450 Fingerprints, der Häm-Bindungsregion (Box 5). Demnach entspricht das Cystein-447 dem Häm-Bindungsligand in diesem Enzym.

**Tab. 11. Vergleich der Aminosäurereste der Distal Helix von ausgewählten Cyt P450. (weitere Beschreibungen und Referenzen sind im Anhang A4 dargestellt).**

Cytochrom	Herkunft	Accession Nr.	Sequenz
P450cam	<i>Pseudomonas putida</i>	P00183	LLL <b>VGG</b> LD <b>T</b> VVN <b>F</b> LS <b>F</b>
CYP74	<i>Linum usitatissimum</i>	U00428	FNSW <b>GG</b> FK <b>I</b> LFPS <b>L</b> MK
CYP80	<i>Berberis stolonifera</i>	U09610	ETFG <b>PG</b> SD <b>T</b> NS <b>N</b> I <b>E</b> W
CYP93B1	<i>Glycyrrhiza echinata</i>	AB001380	DF <b>F</b> T <b>AG</b> T <b>D</b> T <b>T</b> A <b>I</b> ST <b>E</b> W
<b>CYP93B2</b>	<b><i>Gerbera Hybriden</i></b>	<b>AF156976</b>	<b>D</b> <b>F</b> <b>L</b> <b>T</b> <b>AG</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>T</b> <b>T</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>A</b> <b>I</b> <b>E</b> <b>W</b>
CYP73A4	<i>Catharanthus roseus</i>	Z32563	NIN <b>VAA</b> I <b>E</b> <b>T</b> TL <b>W</b> S <b>I</b> E <b>W</b>
CYP73A12	<i>Zinnia elegans</i>	U19922	NIN <b>VAA</b> I <b>E</b> <b>T</b> TL <b>W</b> S <b>I</b> E <b>W</b>
CYP73A14	<i>G. echinata</i>	D87520	NIN <b>VAA</b> I <b>E</b> <b>T</b> TL <b>W</b> S <b>I</b> E <b>W</b>
CYP75A3	<i>Petunia Hybriden</i>	Z22545	N <b>L</b> <b>F</b> <b>T</b> <b>AG</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>T</b> SS <b>S</b> A <b>I</b> E <b>W</b>
CYP75A8	<i>C. roseus</i>	AJ011862	N <b>L</b> <b>F</b> <b>T</b> <b>AG</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>T</b> SS <b>S</b> <b>V</b> I <b>E</b> <b>W</b>
CYP75B2	<i>P. Hybriden</i>	AF155332	N <b>L</b> <b>F</b> <b>V</b> <b>AG</b> <b>T</b> <b>D</b> <b>T</b> SS <b>S</b> <b>T</b> <b>V</b> E <b>W</b>

Das Ergebnis einer phylogenetischen Analyse verschiedener Cyt P450, die an der Biosynthese von Phenylpropanoiden bzw. Flavonoiden beteiligt sind, ist in Abb. 30 dargestellt. Es zeigt, daß der Klon CYP93B2 die größte Ähnlichkeit mit den Mitgliedern der CYP93-Familie besitzt. Alle anderen CYP-Familien weisen wie erwartet eine entferntere Verwandtschaft auf.



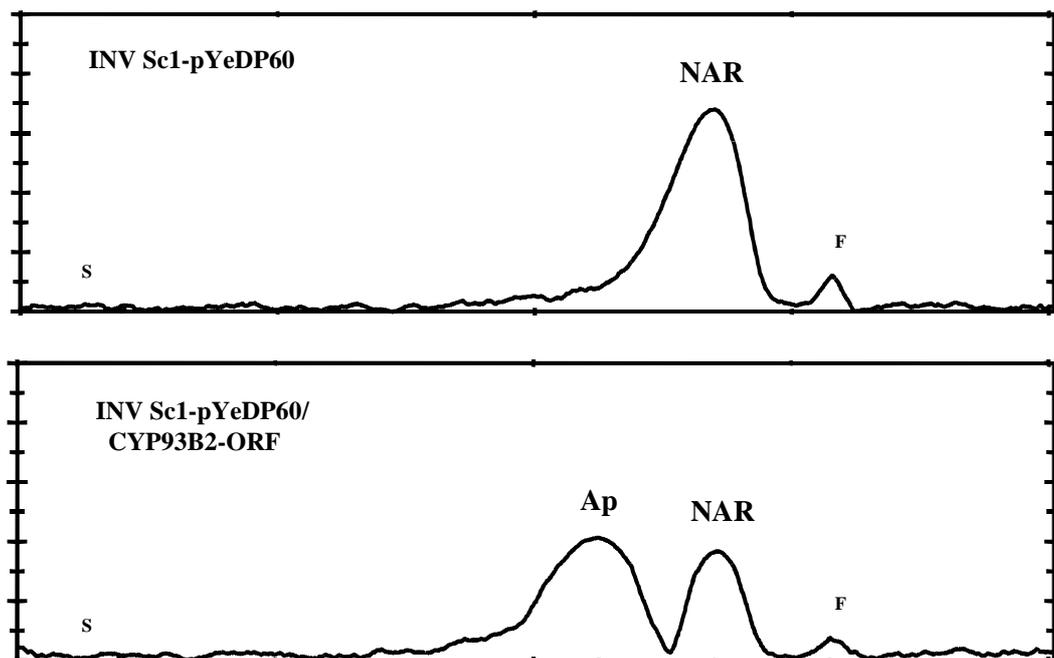
**Abb. 30. Phylogenetische Analyse von pflanzlichen Cyt P450, die direkt oder indirekt in den Flavonoidbiosyntheseweg verwickelt sind.**

Referenzen und Accession Nummern sind im Anhang A4 dargestellt.

C4H : Zimtsäure 4-Hydroxylase; F5H : Ferulat 5-Hydroxylase; F3'H : Flavonoid 3'-Hydroxylase; F3',5'H : Flavonoid 3', 5'-Hydroxylase; D6aH : Dihydroxypterocarpan 6a-Hydroxylase; FNS II : Flavonsynthase II; F2H : Flavanon 2-Hydroxylase; 2-HIS : 2-Hydroxyisoflavonsynthase.

#### C 4.6 Expression der *Gerbera* CYP93B2 cDNA in Hefe

Um die Funktion des Proteins, das durch die isolierte cDNA kodiert wird, zu verifizieren wurde das Insert CYP93B2-ORF (Abb. 28; Anhang A3c) in die zwei Hefeexpressionsvektoren pYeDP60 bzw. pYES2 einkloniert und in vier unterschiedliche Hefestämme transformiert (Kap. B 2.9). Beide durch Galaktose induzierbaren Vektoren eignen sich, eingeführte Fremdgene, wie z.B. rekombinante Cyt P450's, überzuexprimieren. Dazu wurde eine weitere PCR mit den genspezifischen Primern (CypFNS1H/R; Anhang A2) durchgeführt, um das Klonieren des vollständigen ORF des CYP93B2 Gens ohne endogene, 5' nichtkodierende Sequenzbereiche zu gewährleisten. Dies ist nötig, da überflüssige 5' nichttranslatierte Bereiche von Fremdgenen in einigen Fällen die Genexpression in Hefen negativ beeinflussen (POMPON et al., 1996). Deutliche Enzymaktivität der FNS II konnte in Mikrosomenpräparationen aus galaktose-induzierten Zellen der Hefestämme W(N), WAT11, WAT21 und INV Sc1, die jeweils mit einem der beiden Vektoren mit dem Insert transformiert wurden, nachgewiesen werden (exemplarisch für die Kombination INV Sc1-pYeDP60 in Abb. 31 dargestellt). Enzymaktivität konnte aber auch im Standardtest mit RE (Überstand nach dem Aufschluß der Hefezellen) in Gegenwart von NADPH nachgewiesen werden; daher war es nicht zwingend erforderlich, Mikrosomen zu isolieren. RE und Mikrosomen aus nicht- oder nur mit den beiden Vektoren transformierten Hefen bzw. nicht induzierten transformierten Hefen und Tests ohne NADPH zeigten dagegen keine Aktivität (Daten nicht dargestellt). Das resultierende Produkt aus den Enzymtests mit NAR als Substrat wurde durch Co-Chromatographie mit authentischen Flavanonen und Flavonen in vier verschiedenen Laufmittelsystemen (1-4; Kap. B 4.2) als Ap identifiziert. Dieses Ergebnis zeigt, dass das cDNA Insert des isolierten Gens für eine funktionelle FNS II kodiert, welche in der Lage ist die Bildung des Flavons Ap aus dem Flavanon NAR zu katalysieren. Darüber hinaus kann die *Gerbera* FNS II in diesem heterologen System stabil expremiert werden und ist in der Lage mit den heterologen CPR's, für die im INV Sc1-pYeDP60 System eine spezifische Aktivität von 17 mkat/kg Protein gemessen wurde, der Hefen W(N) und INV Sc1 bzw. aus *Arabidopsis thaliana*, die zusätzlich in den Hefestämmen WAT11 und WAT21 ausgeprägt wird, zu interagieren.



**Abb. 31. Test der FNS II Aktivität mit Mikrosomen aus transformierten Hefezellen.**

#### **C 4.7 Northern- und Southern-Blot Analyse mit CYP93B2**

Der verifizierte FNS II Klon CYP93B2-ORF wurde als [<sup>32</sup>P]-markierte Probe zur Hybridisierung von RNA-Blots mit Gesamt-RNA isoliert aus Petalen verschiedener Genotypen bzw. verschiedener Blütenstadien der Sorte „Regina“ und Blättern verwendet. Wie bereits mit dem Differential Display Fragment CypDDd7a gezeigt, konnte ein etwa 1.7 kb großes Transkript nur in Petalen von Linien mit dominantem Allel für den Locus *Fns* nachgewiesen werden. Rezessive Linien bzw. die Laubblätter, in denen natürlicherweise keine Flavone gebildet werden, zeigten dagegen unter stringenten Bedingungen keine Hybridisierungssignale (Abb. 32). Die Höhe der Expression des Transkriptes wurde auch über die Entwicklung der Blüte in 11 verschiedenen Entwicklungsstadien bestimmt. Bis zum Blütenstadium 4 steigt das Transkript an, um dann rasch wieder abzufallen. Ab dem Blütenstadium 8 ist kein Hybridisierungssignal mehr nachzuweisen. Der hieraus resultierende Transkriptionsverlauf korreliert mit der bereits bestimmten Enzymaktivität der FNS II bzw. der Flavonakkumulation in *Gerbera* (Abb. 33).

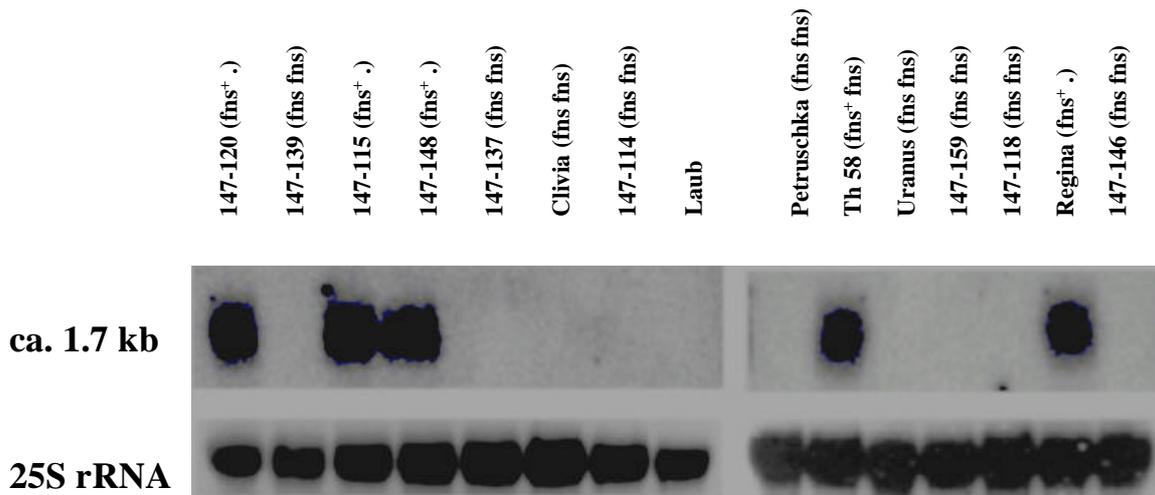


Abb. 32. Northern Blot mit verschiedenen Genotypen und Laub.  
Die mit EtBr angefärbte 25S ribosomale RNA dient als Ladekontrolle.

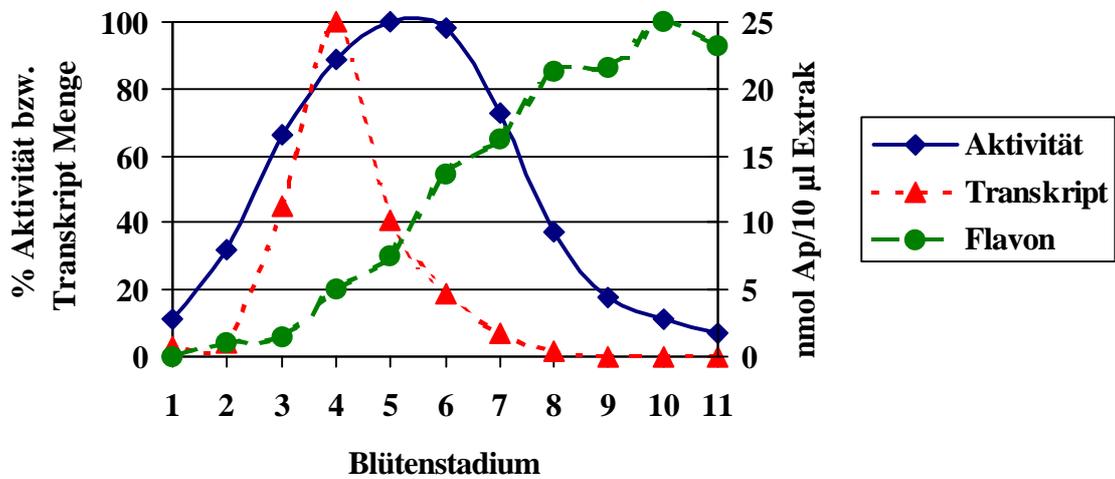
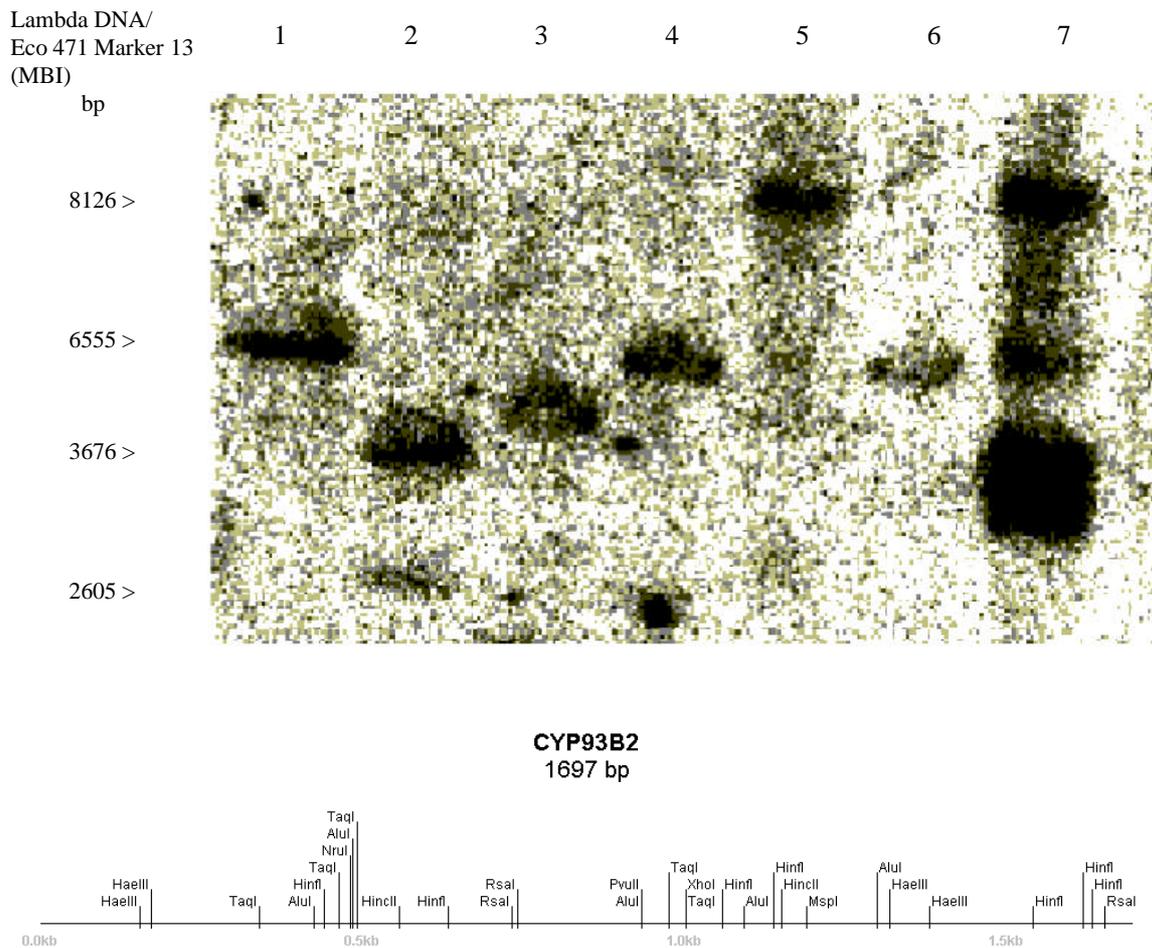


Abb. 33. Transkript Menge, FNS II Aktivität und Flavonakkumulation in der *Gerbera* Sorte „Regina“.

Die Maximalwerte der Transkriptmenge und hier auch der Enzymaktivität wurden gleich 100 gesetzt. Umsatzdaten entsprechen denen in Abb. 21; dort angegeben als spezifische Aktivität.

Darüber hinaus wurden Blots mit genomischer DNA, isoliert aus Laubblättern der Sorte „Regina“, mit der gleichen Probe hybridisiert. Die DNA wurde mit sieben verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut, wobei nur *Xho* I innerhalb der Probe spaltet (siehe Restriktionskarte in Abb. 34). Die DNA-Blots zeigten unter stringenten Bedingungen nur eine Hybridisierungsbande. Zwei oder mehr Hybridisierungsbanden wurden nur mit der durch *Eco* RI und *Xho* I verdauten DNA identifiziert (Abb. 33). Dieses einfache Hybridisierungsmuster stimmt mit einer einfachen Kopie des CYP93B2 Gens überein.



**Abb. 34. Genomischer Southern Blot von *Gerbera* mit dem kompletten cDNA-Klon.**

Restriktionsenzyme : 1 - Bam HI; 2 - Eco RI; 3 - Eco RV; 4 - Hind III; 5 - Kpn I; 6 - Sca I; 7 - Xho I.

Die Zahlen links entsprechen dem DNA Größenstandard (bp). Unten : Schema der cDNA mit

## D Diskussion

Nach laufenden Schätzungen kommen in Pflanzen mehr als 200.000 verschiedene sekundäre Metaboliten vor, von denen bis heute höchstens 10 % charakterisiert werden konnten (DURST et al., 1994). Viele von diesen Verbindungen besitzen eine hohe wirtschaftliche Bedeutung. Eine Gruppe dieser Metaboliten sind die weitverbreiteten Flavone, die als gelbe Blütenpigmente (HARBORNE, 1978), als Copigmente bei der Farbausprägung in Blüten (SCOTT-MONCRIEFF, 1936; GOTO und KONDO, 1991), als Induktor der Knöllchenbildung bei Leguminosen (PETERS et al., 1986; FIRMIN et al., 1986; REDMOND et al., 1986), als Signal Verbindung in verschiedenen Insekt-Pflanzen Wechselwirkungen (HARBORNE und GRAYER, 1994), als bioaktive Substanz bei der Ernährung von Menschen und Tieren (MIDDLETON und KANDAWAMI, 1994; BÖHM et al., 1998) und als Wirkstoff in verschiedenen Arzneimitteln (RICE-EVANS und PACKER, 1998) eine wichtige Rolle spielen. Die Bildung der Flavone und einiger anderer sekundärer Metaboliten wird unter anderem durch Enzyme aus der Klasse der Cyt P450 katalysiert. Die Klonierung von pflanzlichen Cyt P450 Genen mit Hilfe von entsprechenden Sequenzinformationen aus Proteinreinigungen wird vor allem durch die Tatsache erschwert, dass es sich bei den Enzymen um membran-gebundene Proteine handelt, die nur in geringem Maße im Gewebe vorkommen und für eine Reinigung oft nicht stabil genug sind. Während einige Gene, die für verschiedene pflanzliche Cyt P450's kodieren, mit Hilfe der konventionellen, biochemischen Methoden identifiziert wurden, sind viele andere durch PCR-gestützte Methoden isoliert worden. Dies wurde erst aufgrund der Verfügbarkeit von zahlreichen Cyt P450 Sequenzen und den daraus abgeleiteten konservierten Sequenzmerkmalen möglich (BOLWELL et al., 1994). Für einen Großteil dieser Cyt P450 Gene konnten jedoch noch keine Funktion nachgewiesen werden. Dies ist zum einen auf die begrenzte Verfügbarkeit von entsprechenden Substraten und zum anderen auf eine fehlende Enzymaktivität bzw. eine fehlendes Testsystem zurückzuführen. Auch Homologieschlüsse sind nur teilweise erfolgreich, da schon geringe Unterschiede in der Primärsequenz eine drastische Veränderung der katalytischen Funktion bewirken können (LINDBERG und NEGISHI, 1989). Die Verfügbarkeit von Mutanten, die in einem definierten Schritt, der z. B. durch ein Cyt P450 katalysiert wird, blockiert sind, bietet nun alternative Möglichkeiten, um pflanzliche Cyt P450 zu klonieren und erlaubt es, eine eindeutige Verbindung zwischen diesem Gen und der

Funktion des kodierten Proteins aufzustellen (HOLTON et al., 1993; WINKLER und HELENTJARIS, 1995; SZEKERES et al., 1996).

Aus dem Flavonoidbiosyntheseweg sind bis heute bereits eine Vielzahl von Strukturgenen (cDNA und/oder genomische Klone) isoliert und charakterisiert worden, die die Aktivität von spezifischen Enzymen in verschiedenen Pflanzen kontrollieren (DAVIES und SCHWINN, 1997). Viele dieser Gene können zur Veränderung von Blütenpigmentierung verwendet werden. Unter diesen befand sich jedoch bislang kein Gen, welches die Enzymaktivität für die Flavonbildung (hier FNS II) kontrolliert. In *Gerbera* Hybriden ist das Gen *Fns*, das vermutlich für diesen Biosyntheseschritt verantwortlich ist, chemogenetisch beschrieben worden (TYRACH, 1995; TYRACH und HORN, 1997).

Wegen der Bedeutung der Flavone im pflanzlichen Stoffwechsel und als bioaktive Substanz ist es äußerst wichtig, die Prozesse, durch welche die Bildung dieser Flavonoidklasse induziert wird und durch welche die unterschiedlichen Funktionen festgelegt werden, auf der biochemischen und molekularen Ebene zu charakterisieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig die FNS II aus *Gerbera* biochemisch charakterisiert, deren Kontrolle durch ein definiertes Gen dargestellt und ein entsprechender cDNA Klon, der für die FNS II kodiert, kloniert und expremiert werden.

## **D1 Biochemische Charakterisierung der FNS II**

Ein möglichst vollständiges Wissen zur Biochemie der Blütenfarbe einer Versuchspflanzenart ist von großer Bedeutung für deren Modifizierung über „genetic engineering“ (MEYER, 1991). So konnte z.B. im erfolgreichen Transformationsexperiment von MEYER et al. (1987), bei dem Pelargonidin-Derivate als neue Pigmente in *Petunia* Hybriden etabliert wurden, auf die Kenntnisse aus vorangegangenen biochemischen Arbeiten, die unter anderem die Substratspezifität der verschiedenen Flavonoidbiosynthese Enzyme betrafen, zurückgegriffen werden. Der Pigmenttyp bzw. dessen Konzentration sowie die biochemische Charakterisierung kann für die verschiedenen Pflanzenarten durch die Verwendung von unterschiedlichen, gut entwickelten Methoden durchgeführt werden (MARKHAM, 1982; HARBORNE, 1988; MARKHAM und GEIGER, 1994; FORKMANN und HELLER, 1999 und Referenzen darin). Durch chemogenetische Analysen, Vorstufen-Fütterung, Enzymtests, Hemmstofftests oder in vitro

Rekonstitutionsexperimenten mit isolierten Pigmenten an verschiedenen Sorten und Linien einer Art lässt sich ein Modell des jeweilig vorhandenen Pigmentmusters bzw. des Biosyntheseweges erstellen. Zudem lassen sich Mutanten charakterisieren und die möglichen Wege einer genetischen Modifizierung vorab hinsichtlich ihrer möglichen Wirkung testen (Substratspezifität, Hemmungen). Diese Ergebnisse dienen als Grundlage für die Auswahl geeigneter Sorten, die für eine Transformation mit einem spezifischen Gen in Frage kommen, und für eine erfolgreiche Einführung der jeweiligen Gene (FORKMANN, 1993). Intensive Untersuchungen der Flavonoidbiosynthese sind für einige wichtige Zierpflanzen, wie z.B. *Dendranthema* (SCHWINN et al., 1994) und *Gerbera* (TYRACH, 1995; TYRACH und HORN, 1997; MARTENS und FORKMANN, 1996), durchgeführt worden und bieten nun die Möglichkeit, gezielte klassische Züchtungsansätze oder gentechnische Experimente zur Etablierung neuer Blütenfarben bzw. anderer Flavonoidmuster zu planen.

Ein Enzym, das die Bildung der Flavone katalysiert, die FNS II, wurde bereits in Blütenextrakten von verschiedenen Pflanzenarten (STOTZ und FORKMANN, 1981; STICH und FORKMANN, 1987; STICH et al., 1988; STICH und FORKMANN, 1988) und unter osmotischem Stress auch in *Glycine max* Zellsuspensionskulturen (KOCHS und GRISEBACH, 1987) nachgewiesen und teilweise charakterisiert. Es war nun möglich, die Enzymaktivität, die für die Oxidation von Flavanonen zu den entsprechenden Flavonen verantwortlich ist, auch mit Blütenextrakten von chemogenetisch definierten *Gerbera* Hybriden nachzuweisen und diese Reaktion in Blüten von verschiedenen Genotypen bezüglich der Flavonsynthese zu untersuchen.

Eine sehr einfache und elegante Methode, die FNS II Aktivität getrennt von der in *Gerbera* Blüten nachgewiesenen F3'H zu untersuchen, ist die Verwendung von chemogenetisch definierten Mutanten, denen die Aktivität der F3'H fehlt (MARTENS und FORKMANN, 1996; TYRACH und HORN, 1997).

Wie schon in verschiedenen anderen Pflanzen gezeigt werden konnte, wird die Flavonbildung in *Gerbera* ebenfalls durch ein mikrosomal gebundenes Enzym katalysiert. Dieses Enzym zeigt eine absolute Abhängigkeit von NADPH und von molekularem Sauerstoff. Es konnte in diesem Zusammenhang auch eindeutig gezeigt werden, dass es sich nicht um die lösliche, 2-oxoglutarat-abhängige Dioxygenase FNS I handelt, die in Petersilie gefunden wurde (BRITSCH et al., 1981). Tests mit den entsprechenden Kofaktoren  $\text{Fe}^{2+}$ , Ascorbat und

2-Oxoglutarat führten zur Bildung von Dihydroflavonolen anstelle von Flavonen. Darüber hinaus konnte für die Reaktion der FNS II ein pH-Optimum gefunden werden, das ähnlich zu den anderen untersuchten Pflanzenarten ist (STOTZ und FORKMANN, 1981; STICH und FORKMANN, 1987). Durch Versuche mit Cyt P450 spezifischen Inhibitoren konnte die FNS II aus *Gerbera* als eine Cyt P450 abhängige Monooxygenase bestätigt werden. Zu dieser Klasse gehören unter anderem auch die F3'H, die F3',5'H und die C4H, die alle an der Biosynthese von verschiedenen Flavonoiden beteiligt sind (HELLER und FORKMANN, 1994). Unter absolut sauerstofffreien Bedingungen im Testsystem konnte keine Enzymaktivität der FNS II nachgewiesen werden, was auf eine O<sub>2</sub>-abhängige Reaktion hindeutet, wie sie für Cyt P450 allgemein und auch die FNS II beschrieben worden ist (KOCHS und GRISEBACH, 1987). Die ebenfalls sehr starke Hemmung der FNS II Aktivität durch Fe<sup>2+</sup>- bzw. Fe<sup>3+</sup>-Ionen könnte auf deren Fähigkeit beruhen, in Gegenwart von Ascorbat Radikale zu bilden. Ascorbat könnte aus dem Pflanzenextrakt in den Testansatz gelangen. Es ist bekannt, dass Hydroxyl-Radikale, die möglicherweise auf diesem Weg entstehen, mit vielen biologischen Molekülen reagieren (WARDMAN und CANDEIA, 1996; BUETTNER und JURKIEWICZ, 1996). Auch andere Metallionen, wie z.B. Kupfer und Zink, zeigten ähnlich starke Wirkungen auf die Enzymaktivität. Dagegen zeigte EDTA, das mit dem Dioxygenase Kofaktor Fe<sup>2+</sup> einen Komplex bildet und zu einer deutlichen Hemmung der FNS I führt (BRITSCH et al., 1981), keinerlei Wirkung auf die Aktivität der FNS II. Eine starke Hemmung der FNS II Aktivität mit Cytochrom c (Cyt c), wie sie auch bei anderen Enzympräparationen aus verschiedenen Pflanzen, z.B. *Glycine max* (KOCHS und GRISEBACH, 1987) beobachtet wurde, konnte ebenfalls gezeigt werden. Zugrunde liegt die Tatsache, daß die CPR *in vitro* Elektronen sowohl auf Cyt c als auch auf Cyt P50 übertragen kann (Abb. 7; KARP et al., 1990).

In Übereinstimmung mit den chemogenetischen Ergebnissen und den früher beschriebenen genetischen Daten (TYRACH und HORN, 1997), konnte eine Enzymaktivität der FNS II nur in Extrakten nachgewiesen werden, die von flavonhaltigen Genotypen mit dominantem Allel *fns*<sup>+</sup> hergestellt wurden. In Enzymaufarbeitungen von rezessiven Genotypen (*fns fns*) konnte dagegen keine Bildung von Flavonen gezeigt werden. Diese Ergebnisse belegen zum ersten Mal eine Korrelation zwischen einem Gen und der enzymatischen Bildung von Flavonen. Dementsprechend beweist dies, dass das Gen *Fns* aus *Gerbera*, den Schritt von Flavanonen zu Flavonen kontrolliert und dass die *in vitro* gemessene Enzymaktivität definitiv für diese Oxidationsreaktion *in vivo* verantwortlich ist.

## D2 Genetische Untersuchungen zur Vererbung des Gens *Fns*

In *Gerbera* Blüten, die einen dominanten Genotyp für *Fns* und keinen weiteren Block in der Flavonoidbiosynthese besitzen, ist der Gehalt an Anthocyanen gegenüber dem in für *Fns* rezessiven Typen deutlich reduziert. Dies kann auf eine Konkurrenz zwischen den Schlüsselenzymen für die Flavon- bzw. für die Anthocyan-Biosynthese (FNS II und FHT; Abb. 2), um die Flavanone als Substrat zurückgeführt werden.

Um das Pflanzenmaterial weiter zu definieren wurde ein Programm aufgebaut, bei dem im ersten Schritt die heterozygote Sorte „Th 58“ (*fns*<sup>+</sup> *fns*) geselbstet wurde. Diese „intermediäre“ Sorte ist aus einer Kreuzung zweier im Merkmal *Fns* verschiedener Elternlinien (*fns*<sup>+</sup> *fns*<sup>+</sup> und *fns* *fns*) entstanden. Zwar zeigten die Nachkommenschaften eine phänotypische 3 : 1 Aufspaltung in flavonhaltige und flavonfreie Linien, wie es für einen monogen dominanten Erbgang bei zwei Allelen erwartet wird. Enzymologische Untersuchungen der einzelnen Linien ließen jedoch eine Aufteilung in drei Gruppen mit unterschiedlicher Aktivität der FNS II zu. Diese Einteilung ergab eine Aufspaltung von 1 : 2 : 1, was einem intermediären Erbgang entspricht. Hierbei kommt es nicht zu einer Anlagenmischung, sondern die Zwischenbildung stellt das Resultat der Wirkungen zweier einander entgegengesetzter Erbanlagen dar. Bei der Keimzellenbildung trennen sich die Anlagen, und es entstehen Eizellen bzw. Pollen mit *fns*<sup>+</sup>- ebenso häufig wie mit *fns*-Anlage. Aus einer Selbstung der Sorte „Th 58“ sind demnach folgende drei Kombinationen möglich (vgl. Abb. 24 und 25) :

1. Eine *fns*<sup>+</sup> Eizelle wird von einer *fns*<sup>+</sup> Pollenzelle befruchtet. Daraus entsteht ein homozygoten Individuum, das in weiteren Selbstungen nur homozygote Nachkommen bringen kann („147-120“).
2. Eine *fns*<sup>+</sup> Eizelle wird von einer *fns* Pollenzelle oder umgekehrt befruchtet. Die als Folge des Zusammenwirkens der entgegengesetzten Erbanlagen entstandenen Zwischenformen entsprechen hinsichtlich des Merkmals *Fns* der Ausgangslinie („Th 58“). Alle Individuen spalten in der nächsten Generation in gleicher Weise wie die Ursprungslinie („147-125“)
3. Eine *fns* Eizelle wird von einer *fns* Pollenzelle befruchtet. Hieraus entstehen nur homozygote Individuen, die bei Selbstung nur noch solche hervorbringen können („147-114“).

Die Typen 1 und 3 lassen sich demnach rein züchten, während Pflanzen vom Typ 2 durch keine noch so sorgfältige oder lange andauernde Auslese konstant erhalten werden können.

Die vermutete Einordnung der verschiedenen Linien anhand der relativen Enzymaktivität in die drei Gruppen wurde im zweiten Schritt durch Selbstungen von je einer Pflanze aus den postulierten Genotyp-Gruppen genauer untersucht. Die biochemische und enzymologische Auswertung der Nachkommenschaften dieser Selbstungen bestätigten sowohl die vorangegangenen Ergebnisse und Vermutungen zu einem intermediären Erbgang als auch die erwartete Substratkonkurrenz. Flavonfreie Typen waren immer durch einen hohen Anthocyangehalt und durch eine kräftige Farbe geprägt. Dagegen konnten flavonhaltige Linien in der Regel schon aufgrund der blassen Blütenfarbe, die auf einen geringen Anthocyangehalt zurückzuführen ist, identifiziert werden. Die Vererbung der FNS II erfolgt demnach auf Produktebene mittels vollständiger Dominanz. Wird aber die Produktbildung betrachtet, wie hier durch Enzymtests mit einem definierten Blütenstadium geschehen, kann ein intermediärer Erbgang nachgewiesen werden. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Produktbildung deutlich von der zeitlichen Entwicklung bzw. Ausprägung der FNS II Aktivität beeinflusst wird.

Aus diesen Selbstungsexperimenten stehen nun erstmalig auch homozygot dominante Genotypen in Bezug auf das Gen *Fns* zur Verfügung.

### **D3 Isolierung der FNS II aus chemogenetisch definierten *Gerbera* Linien**

Obwohl die Bedeutung von Cyt P450 Enzymen als Katalysatoren in verschiedenen pflanzlichen Biosynthesewegen auf der biochemischen Ebene gut beschrieben ist und neuere Klonierungsstrategien eine Vielzahl von Cyt P450 Sequenzen hervorgebracht haben, sind bislang nur wenige dieser Klone in ihrer Funktion eindeutig charakterisiert worden. Eine gezielte Proteinreinigung von spezifischen Cyt P450 Enzymen, die in spezielle Biosyntheseschritte involviert sind, sind in der Vergangenheit an der Instabilität der Enzyme, deren geringen Konzentration in den meisten Pflanzengewebe und den Schwierigkeiten bei der Wiederherstellung der aktiven Komplexe aus den gelösten Komponenten gescheitert (SCHULER, 1996). Darüberhinaus wird es immer offensichtlicher, dass in den unterschiedlichsten pflanzlichen Geweben unter Umständen über hundert verschiedene Cyt P450 vorkommen können, wodurch eine Aufreinigung bis zur Homogenität eines einzelnen

Enzymes, das nur in geringer Menge vorhanden ist, ein erhebliches technisches Problem darstellt (SIMINSZKY, 1999).

Um diese Probleme zu umgehen, wurden verschiedene molekulare Strategien etabliert, die es ermöglichen, gezielt unterschiedlich expremierte Cyt P450 aus einem z.B. chemogenetisch und biochemisch oder physiologisch eindeutig charakterisiertem Pflanzenmaterial zu klonieren. Dabei wurde Differentiell Display als Screening Methode gegenüber anderen bekannten Methoden bevorzugt, da die Wahl von kurzen, nicht degenerierten Cyt P450 spezifischen Primern nach SCHOPFER und EBEL (1998) die zu erwartende Anzahl von differentiellen Banden und „false-positives“ reduziert und darüber hinaus durch die Auswahl des Genotypes, des Entwicklungsstadiums der Blüten und der Ankerprimer auf transkriptionell regulierte Gene beschränkt. Andere Methoden zur Isolierung von Genen, die auf der Transkriptionsebene reguliert werden, wie z.B. subtraktive oder differentielle Hybridisierung von Genbanken (VETTER et al., 1992), sind sehr zeitaufwendig. Auch bei neueren Screening Methoden, wie z.B. RDA, ist mit einer Vielzahl differentieller Fragmente bzw. „false-positives“ aufgrund des großen, nicht isogenen Hintergrundes des Ausgangsmaterials, und auch im Hinblick auf die große Diversität der Cyt P450 Superfamilie zu rechnen. Dies erfordert in allen Fällen eine weitere zeitaufwendige und arbeitsintensive Charakterisierung der einzelnen Fragmente. Außerdem ist es aufgrund der strukturellen Vielfalt der Cyt P450 Sequenzen nicht möglich lange, Cyt P450 spezifische nicht degenerierte Primer zu konstruieren. Auch die Hybridisierung mit heterologen Proben bekannter Cyt P450 Sequenzen ist bei den hier dargestellten Voraussetzungen nicht geeignet bzw. ist ebenfalls mit einer anschließenden zeitaufwendigen Charakterisierung einer Vielzahl von Klonen verbunden, die aufgrund der niedrigen Homologie innerhalb der verschiedenen pflanzlichen Cyt P450 Familie nachgewiesen werden (siehe HOLTON et al., 1993a; BRUGLIERA et al., 1999). Auf PCR-basierende Methoden mit einzelnen nicht degenerierten Primern (z.B. SUGIURA et al., 1996) oder entsprechende Primer, abgeleitet aus einem weniger konservierten Bereich bzw. stark degenerierte Primer (z.B. FRANK et al., 1995; AKASHI et al., 1997), wurden zwar auch erfolgreich zur Klonierung verschiedener Cyt P450 aus Pflanzen eingesetzt, es ist aber zu erwarten, daß nur ein geringer Anteil der expremierten Cyt P450 erfaßt wird.

Der hier dargestellte Versuchsansatz basiert auf der Annahme, dass in den rezessiven Genotypen *fns fns* keine Transkription der FNS II erfolgt. Eine Cyt P450 spezifische

DD-RT-PCR mit vorab hinsichtlich der FNS II chemogenetisch definierten *Gerbera* Linien ermöglichte es, differentiell exprimierte Cyt P450 cDNA Klone zu isolieren, die nur in Linien transkribiert werden, die ein dominantes Allel für den Locus *Fns* besitzen. Wie schon in SCHOPFER und EBEL (1998) beschrieben, zeigten sich die acht nicht-degenerierten aus der Häm-Bindungsregion abgeleiteten Cyt P450 spezifischen Primer, die anstelle der arbitrary upstream Primer des Original-Protokolls (Liang und Pardee, 1992) verwendet wurden, als geeignet, zum Screening nach differentiell exprimierten Genen dieser Klasse aus Pflanzen. Aber auch bei dieser Methode ist mit etwa 80 % false-positives zu rechnen (LIANG et al., 1993; BAUER et al., 1993), wobei die Gesamtzahl differentieller Banden aufgrund des gut charakterisierten Ausgangsmaterials und der Primerwahl relativ gering sein sollte.

Mit dieser Strategie konnten 5 differentiell exprimierte Banden isoliert werden, von denen eine, CypDDd7a, als eine Cyt P450 Sequenz identifiziert wurde. Die Northern Blot Analyse von Gesamt-RNA verschiedener *Gerbera* Genotypen, verschiedener Entwicklungsstadien der Blüten und Laub, ergab eine deutliche Hybridisierung mit Linien, die ein dominantes Allel (*fns*<sup>+</sup> .) besitzen. In Linien mit rezessiven Allelen (*fns fns*) und Laub, die keine Flavone bilden und bei denen keine FNS II Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurde keine Hybridisierung festgestellt. Zudem erreicht das Transkript, wie für die FNS II erwartet, im Blütenstadium 4 ihr Maximum. Dies stand im Einklang mit der entsprechenden Enzymaktivität und Flavonakkumulation, die für *Gerbera* Blüten gezeigt wurde. Das Induktionsmuster bzw. deren Verlauf ist ein erster guter Hinweis auf die Identität des cDNA-Fragments, läßt jedoch noch nicht auf die eigentliche Funktion des vollständigen Klons schließen.

Der vollständige cDNA Klon konnte mit Hilfe der 5' RACE Technik isoliert werden. Diese auf PCR-beruhende Methode wurde bereits bei der Klonierung verschiedener Klone erfolgreich eingesetzt (z.B. ROSATI et al., 1998) und erspart ein aufwendiges Erstellen einer entsprechenden cDNA-Bank. Wie erwartet besitzt der erhaltene cDNA Klon eine höhere Homologie zu Cyt P450 Sequenzen als zu anderen Sequenzen von Genen aus dem Flavonoidbiosyntheseweg in Pflanzen. Ein Vergleich zeigte eine hohe Homologie (52 % auf Aminosäureebene) mit CYP93B1, einem Cyt P450 Klon, der aus Elicitor-induzierten Suspensionskulturen von *Glycyrrhiza echinata* L. isoliert werden konnte (AKASHI et al., 1998). Dieser Klon wurde als Flavanon 2-Hydroxylase mit einer FNS II bzw. eine Licodionsynthase Aktivität dargestellt, da bei enzymatischen Untersuchungen mit Hilfe der Expression der cDNA

im Hefesystem nach einer chemischen Behandlung des entstandenen 2-Hydroxyflavanon die Bildung von Flavonen und Licodionen nachgewiesen werden konnte. Der mögliche Reaktionsmechanismus, der den beiden Schritten zu Grunde liegt, wird später ausführlich diskutiert.

Bei der funktionellen Charakterisierung des CYP93B2 Klons konnte auf die gut untersuchte Enzymologie des Flavonoidbiosyntheseweges, insbesondere der Flavonbildung, zurückgegriffen werden (HELLER und FORKMANN, 1999). Pflanzliche Cyt P450 sind bislang in verschiedenen heterologen Systemen, wie *Escherichia coli*, Hefen, Säugierzellen und Insektenzellen expremiert worden (SCHULER, 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein optimiertes Hefesystem nach POMPON et al. (1996) verwendet.

Im Gegensatz zu den oben bereits beschriebenen Ergebnissen bezüglich des Klons CYP93B1 (AKASHI et.al., 1998) konnte für den Klon CYP93B2 aus *Gerbera* in Expressionsexperimenten eine direkte Bildung von Flavonen aus den entsprechenden Flavanonen nachgewiesen werden. Dabei wurde die FNS II Aktivität mit Hilfe von zwei verschiedenen Expressionsvektoren (pYES; pYeDP60), die in jeweils vier unterschiedliche Hefestämme (INV Sc1; W(N); WAT11 und WAT21) transformiert und expremiert wurden, nachgewiesen. Es zeigte sich, dass sowohl mit den Stämmen, die die *Arabidopsis thaliana* CPR besitzen (WAT11 und WAT 21) als auch mit den zwei Stämmen, die nur die endogene CPR-Aktivität der Hefe besitzen (INV Sc1 und W(N)), eine deutliche Flavonbildung beobachtet werden konnte. Dieser Umstand deutet darauf hin, dass die entsprechenden Redoxsysteme für die FNS II ausreichend bzw. geeignet sind. Eine Behandlung der Reaktionsprodukte mit Säure, wie in AKASHI et al. (1998) beschrieben, war nicht nötig, um die Bildung von Flavonen zu zeigen. Darüber hinaus sind die dargestellten Expressionsstudien im Einklang mit den genetischen Daten und den biochemischen Studien, die die FNS II Aktivität und die Flavonbildung während der Blütenentwicklung betreffen.

Das hier etablierte FNS II Hefeexpressionssystem kann neben der Identifizierung der katalytischen Aktivität auch zur Charakterisierung des aktiven FNS II Proteins in nachfolgenden biochemischen Studien (z.B. Wirkung von verschiedenen Hemmstoffen und Substratspezifität) eingesetzt werden. In diesem Zusammenhang können auch katalytische Eigenschaften der FNS II, wie z.B. pH-, Temperatur Optimum, Protein- und Zeitabhängigkeit der Reaktion, näher untersucht werden. Dabei können klassische Ansätze zur Untersuchung

einzelner Cyt P450, bei denen aufwendige Proteinreinigungen und die Rekonstitution der Enzymkomplexe (Abb. 7) mit CPR und Lipiden nötig waren, elegant umgangen werden. Besonders hinsichtlich der Substratspezifität liegen bislang nur wenige Informationen vor, was unter anderem auf die eingeschränkte Verfügbarkeit von radioaktiv markierten Substraten zurückzuführen ist. Es kann jedoch vermutet werden, dass wie bei anderen pflanzlichen Cyt P450 Proteine auch bei der FNS II eine hohe Substratspezifität vorhanden ist (DURST, 1991). Aufgrund der hohen Enzymaktivität der expremierten FNS II können in Zukunft auch nicht markierte Substrate eingesetzt werden, um deren Spezifität genauer zu untersuchen. In diesem Zusammenhang können auch Modellsubstrate getestet werden, um die strukturellen Anforderungen potentieller alternativer Substrate zu analysieren.

Die Expression der FNS II wurde auf zwei Ebenen gemessen (Enzymaktivität und RNA Menge) und zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der Entwicklung der Blüte, wie es auch für andere Flavonoidbiosynthese Gene, wie z.B. die CHS und die DFR aus *Gerbera*, beschrieben wurde (HELARIUTTA et al., 1995). Die Transkription des FNS II Gens ist bereits in einem frühen Blütenstadium nachzuweisen, in dem noch keine Pigmentierung erkennbar ist und die Petalen noch von den Kelchblättern umgeben sind. Sie erreicht ihr Maximum in Stadium 4 kurz vor dem Beginn einer erkennbaren Anthocyanbildung bzw. während der Ausfaltung der Petalen. Im weiteren Verlauf der Blütenentwicklung sinkt die Transkriptmenge deutlich ab. Die Kurve der Transkription gemessen über die unterschiedlichen Blütenstadien korreliert mit der FNS II Aktivität bzw. der Flavonakkumulation. Die zeitliche Korrelation des maximalen Transkriptionspegels mit dem Anstieg der FNS II Aktivität bzw. dem Flavongehalt ist typisch für eine transkriptionelle Regulation, wie sie unter anderem für pflanzliche Abwehrgene bei UV Bestrahlung oder durch pilzliche Elicitoren beschrieben wurde (CHAPPELL und HAHLBROCK, 1984).

Der genomische Blot mit der kompletten cDNA (CYP93B2-ORF) zeigte ein einfaches Muster mit hybridisierten Banden entsprechend den Restriktionsstellen innerhalb der cDNA und lässt auf eine einzelne Kopie des Gens CYP93B2 schließen. Die zweite schwache Bande in der mit *Eco* RI verdauten DNA kann auf eine zusätzliche Schnittstelle im Intronbereich zurückzuführen sein und muss durch die Klonierung der genomischen Sequenz verifiziert werden. Zudem weisen die genetischen Untersuchungen eindeutig auf eine monogene

Vererbung des FNS II Gens hin, wodurch die Möglichkeit von zwei nahe verwandten Genen auszuschließen ist.

Bislang ist eine große Anzahl Cyt P450 Genen charakterisiert worden und Vergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigten, dass alle gemeinsame, hoch konservierte Bereiche besitzen (NELSON et al., 1996; CHAPPLE, 1998). Entsprechende Analysen der abgeleiteten Aminosäuresequenz von CYP93B2 brachten wertvolle Informationen in Bezug auf strukturelle Aspekte der FNS II. Die initiale, hydrophobe Ankerregion von 22 Aminosäuren ist wichtig die für die richtige Orientierung und Anlagerung des Proteins an die Membran des Endoplasmatischen Retikulum (SATO et al., 1990; MURAKAMI et al., 1994). Gefolgt wird dieser Bereich von einem hoch konservierten prolinreichen Bereich [-PPXPXXXXP-], der essentiell für die Ausbildung der richtigen Konformation des mikrosomalen Cyt P450 Moleküls ist (YAMAZAKI et al., 1993). Auch der Bereich der Sauerstoff Bindungsregion [-AGTDT(T/S)-] ist in allen neun bislang bekannten Mitgliedern der CYP93 Familie hoch konserviert. Diesem Bereich mit dem allgemeinen Motiv [-(A/G)Gx(D/E)T(T/S)-] wird eine wesentliche Rolle bei der Sauerstoffbindung bzw. Aktivierung zugetragen. Aufgrund der Sequenzhomologie und der vorhandenen Glycin und Threonin Reste an den erwarteten Positionen (305 bzw. 309) müsste der Klon CYP93B2 in die sogenannte Gruppe A der CYP P450 eingeordnet werden. Diese Gruppe ist für die klassische Monooxygenierung der jeweiligen Substrate und einer Inkorporation eines Sauerstoffatoms in das Reaktionsprodukt verantwortlich (SCHULER et al., 1996). Die Bildung von Flavonen verläuft jedoch ohne den entsprechenden Einbau von Sauerstoff in das Produkt, wie im folgenden noch ausführlicher diskutiert werden soll. Die zwei Cyt P450 spezifischen Konsensus Sequenzen [-PERF-] und [-EALR-] mit bislang noch unbekannter Funktion konnten ebenfalls in den entsprechenden Alignments nachgewiesen werden. Der für Cyt P450 charakteristische Fingerprint der Häm-Bindungsregion ist in den verglichenen Polypeptiden mit dem Motiv [PFGxGRRxCxG] hoch konserviert. Er enthält an Position 447 das für die Häm-Bindung wichtige Cystein. Die kalkulierte Molekularmasse liegt mit 58,2 etwas über dem für Cyt P450 gefundenen Durchschnitt von 55 kDa, aber deutlich im Bereich der bislang untersuchten Proteine, der zwischen 45 und 62 kDa liegt (SCHULER, 1996).

Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des CYP93B2 Klons mit CYP93B1 ergab eine hohe Homologie, die aufgrund der sehr ähnlichen Reaktion bzw. Substratspezifität durchaus zu erwarten ist. Weitere phylogenetische Analysen mit anderen Cyt P450, besonders

Mitgliedern aus der Unterfamilie CYP93 und aus dem Flavonoidbiosyntheseweg, zeigte eine erwartete nahe Verwandtschaft der Gene innerhalb der Unterfamilie. Dagegen konnte eine Verwandtschaft zu den anderen Genen aus der Flavonoidbiosynthese nicht gefunden werden.

Bei der FNS II (CYP93B2) und der F2H (CYP93B1) handelt es sich um zwei mikrosomale Cyt P450 abhängige Enzyme, die das gleiche Substrat verwenden und deren reaktives Zentrum sehr ähnlich lokalisiert ist. Die FNS II führt, um Flavone zu bilden, eine Doppelbindung zwischen dem C2 und C3 Atom unter Abspaltung von Wasser ein. Die F2H hydroxyliert Flavanone in der 2-Position (AKASHI et al., 1998). Die so gebildeten 2-Hydroxyflavanone sind bekannte Vorstufen in der Biosynthese von C-Glykosylflavonen (KERSCHER und FRANZ, 1987). Diese Flavonoide konnten in der Vergangenheit in verschiedenen *Glycyrrhiza* Arten, unter anderem auch in *G. echinata*, nachgewiesen werden (AFCHAR et al., 1984a; AFCHAR et al., 1984b).

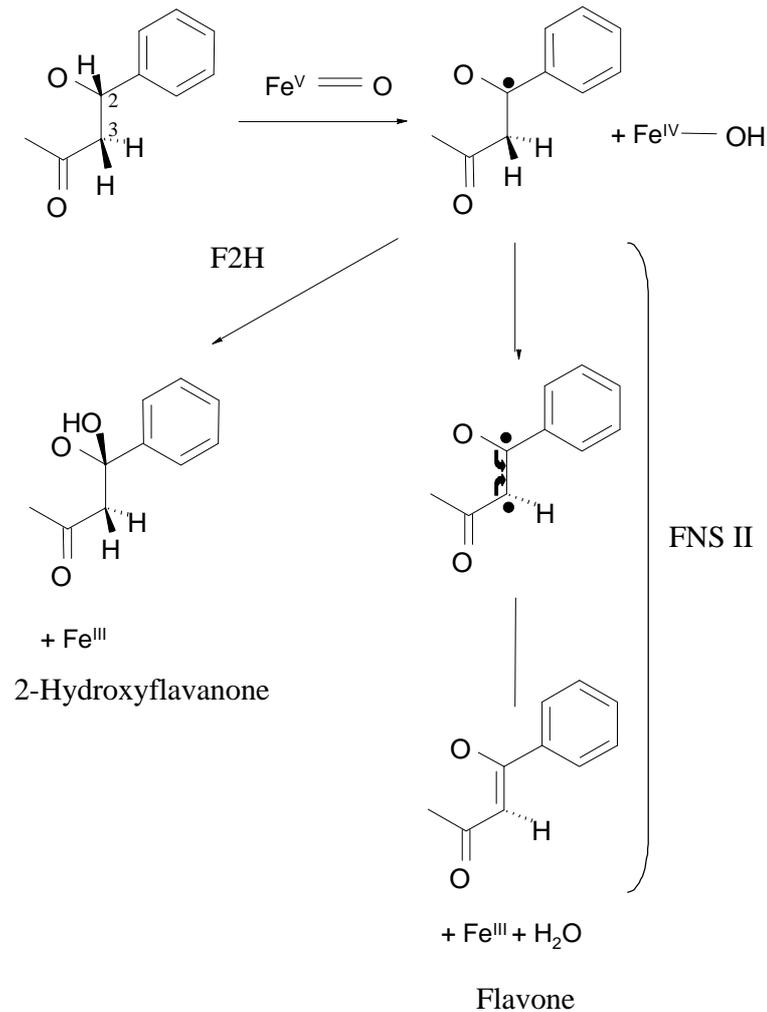
Der Reaktionsmechanismus, der zur Bildung der Flavone führt, ist bereits in Zusammenhang mit den enzymatischen Charakterisierungen der FNS I bzw. FNS II ausführlich diskutiert worden, konnte bislang aber noch nicht endgültig geklärt werden (BRITSCH et al., 1981; STOTZ und FORKMANN, 1981; KOCHS und GRISEBACH, 1987). Aus 2-Hydroxyflavanonen können die entsprechenden Flavone entweder durch eine spontane oder eine enzymatische Abspaltung von Wasser entstehen. Eine Beteiligung des postulierten Intermediates 2-Hydroxynaringenin in der Ap Bildung konnte in biochemischen Untersuchungen jedoch nicht bewiesen werden. Tests mit gereinigter FNS I bewiesen eindeutig, dass chemisch hergestelltes 2-Hydroxynaringenin nicht als Substrat für die Flavonbildung geeignet ist. Darüber hinaus konnte keine Konkurrenz zwischen 2-Hydroxynaringenin und dem Flavanon als Substrat festgestellt werden. Daraufhin wurde postuliert, dass die Einführung der Doppelbindung zwischen C2 und C3 durch eine aufeinander folgende Abstraktion der zwei vicinal Wasserstoffatome in einem Radikal-Mechanismus erfolgt, aber ein definitiver Beweis konnte noch nicht erbracht werden (BRITSCH, 1990; FORKMANN und HELLER, 1999). Betrachtet man die chemische Reaktion der FNS II genauer, stellt man fest, dass es sich hier nicht, wie bereits mehrfach angesprochen, um eine typische Monooxygenasen Reaktion handelt, da kein Einbau von aktiviertem Sauerstoff, wie bei der F2H oder den Hydroxylasen aus der Flavonoidbiosynthese, in das Substrat erfolgt. Der Vergleich der Aminosäuren im Bereich der Distal Helix brachte keine weiteren Hinweise bezüglich einer Veränderung, der für die Sauerstoffbindung essentiellen Reste. Sowohl die

charakteristischen Alanin/Glycin-, in der Berbamunin Synthase Sequenz ausgetauscht gegen Prolin, und Glycin-Reste (Positionen 248 und 249 in P450<sub>cam</sub>) als auch das in der Allenoxid Synthase gegen ein Isoleucin ausgetauschte Threonin (252) sind vorhanden.

Diese oben erwähnten Annahmen bzw. die experimentellen Ergebnisse entsprechen eher dem Reaktionsmechanismus einer Dehydrogenase, wie sie in MANSUY (1998) beschrieben wird. Eine Cyt P450 katalysierte Dehydrogenierung einer Alkan CH-CH Bindung und die anschließende Bildung einer entsprechenden Doppelbindung wurde bei verschiedenen Substraten, wie z.B. Testosteronen, 2-Propylpentansäuren und Lovastatinen beobachtet (MANSUY und RENAUD, 1995). Tatsächlich kann die Cyt P450 abhängige Oxidation dieser Substrate nicht nur zu einem dehydrogenierten (entspräche den Flavonen), sondern auch zu einem hydroxylierten Metabolit (2-Hydroxyflavanone) führen. Es konnte aber gezeigt werden, dass das Alken Produkt nicht durch eine Dehydrierung der hydroxylierten Form (entspräche 2-Hydroxynaringenin) entsteht. Ausgehend von der allgemeinen Intermediatsituation, wobei ein freies Radikal, abgeleitet aus dem Substrat, und ein putativer Cyt P450 Fe(IV)-OH Komplex involviert sind, ist anzunehmen, dass die Fe(IV)-OH Form entweder ein OH-Molekül auf ein Substratradikal überträgt (Monooxygenierung) oder ein Wasserstoffatom vom Substratradikal abgespaltet (Dehydrogenierung). Ob eine Monooxygenierung oder eine Dehydrogenierung stattfindet, kann schon durch eine geringe Verschiebung des aktiven Zentrums entschieden werden (W. Heller, persönliche Mitteilung). Ein postuliertes Reaktionsschema der F2H und der FNS II, das nun mit Hilfe deren Expression in Hefen und einer exakteren Charakterisierung des Enzyme im direkten Vergleich, inklusive einer site-spezifischen Mutagenese näher untersucht werden kann, ist in Abbildung 35 dargestellt.

#### **D4 Biotechnologische Verwendung des FNS II Klons**

Das Potential für gezielte Veränderungen des Flavonoidbiosyntheseweges durch die FNS II ist von hohem Interesse für die Biotechnologie. Durch genetische Veränderungen kann nun in verschiedenen Pflanzenarten und -geweben gezielt in die Flavonbiosynthese eingegriffen werden. Zwei Strategien konnten bislang erfolgreich eingesetzt werden, um die Expression von Flavonoidbiosynthese Genen zu hemmen : Die Produktion von Antisense RNA (Reviews von VAN BLOKLAND et.al., 1993; ELOMAA und HOLTON, 1994) oder die Einführung von zusätzlichen Kopien des Targetgens. Dieses Verfahren wird auch als Sense- oder



**Abb. 35. Postuliertes Reaktionsschema zur Monooxygenierung und Dehydrogenierung von Flavanonen, katalysiert durch die F2H bzw. FNS II**

Ko-Suppression bezeichnet (u.a. JORGENSEN, 1991; 1994; 1995; VAN BLOKLAND et.al., 1993; ELOMAA und HOLTON, 1994). Denkbar sind in diesem Zusammenhang die gezielte Veränderung von Blütenfarben und die Veränderungen des Flavongehaltes bzw. -musters in Blättern, Blüten, Früchten und anderen Geweben, besonders hinsichtlich der Stickstofffixierung in Leguminosen und anderen Nutzpflanzen. Leguminosen, wie *Trifolium repens* oder *Medicago sativa*, sondern verschiedene Flavonoide, darunter auch Flavone, über die Wurzelhaare ab. Es ist anzunehmen, daß diese Substanzen, die einen stimulierenden Effekt auf die Symbiose zwischen Rhizobien und Wirtspflanze besitzen, in der gesamten Pflanze über das vaskuläre Gewebe transportiert werden, aber nur in geeigneten Mengen aus dem Wurzel- und Kotyledonengewebe abgegeben werden. Wird die Flavonproduktion und deren Abgabe durch die Wurzel bzw. das Flavonmuster in diesem Gewebe verändert, könnte eine Verbesserung der

Stickstofffixierung erzielt werden und somit eine Umweltbelastung durch Stickstoffdüngung reduziert werden. Da eine optimale Konzentration spezifischer Flavone in der Wurzelhaarzone nachgewiesen werden konnte, die der wichtigste Punkt für eine Infektion ist, ist es zudem denkbar durch eine Etablierung der Flavonsynthese in geeignetem Gewebe bei nicht Leguminosen Pflanzen das Wirtsspektrums der *Rhizobium* Bakterien zu erweitern und eine Stickstofffixierung zu etablieren (REDMOND et.al., 1986). Im Hinblick auf die Blütenfarbe kann durch eine Antisense Expression der FNS II cDNA aus *Gerbera* in verschiedenen flavonhaltigen Pflanzen (*Gerbera* selbst, *Antirrhinum*, *Callistephus*, *Torenia* etc.) der Flavongehalt in unterschiedlichem Ausmaß verändert werden, wodurch es, entsprechend einem ähnlichen Ansatz in *Petunia* Hybriden mit einem FLS Antisense Konstrukt, zu einer Farbveränderung kommen kann. Dieser Antisense FLS Ansatz brachte auch bei *Nicotiana tabacum* eine deutliche Erhöhung des Anthocyangehaltes in den Blüten, was auf eine Konkurrenz um das Substratangebot (Flavanone) in der Flavon- bzw. Anthocyanthese hindeutet (HOLTON et.al., 1993b). Aus diesen beiden Ergebnissen lassen sich zwei mögliche Wirkungen und Anwendungen eines Antisense Experimentes bezüglich der FNS II ableiten. Zum einen kann durch eine Reduzierung des Flavongehaltes der Grad der Kopigmentierung verändert werden. Zum anderen wird durch die Veränderung der FNS II Aktivität und dadurch die Reduzierung von Nebenprodukten im Flavonoidbiosyntheseweg die Blütenfarbe über die Anthocyanmenge verändert. Dies kann besonders bei flavonhaltigen Pflanzenarten oder -sorten interessant werden, die nur schwach gefärbt sind. Die Einführung von Antisense Konstrukten wurde bei *Gerbera* bereits erfolgreich verwendet, um die CHS und die DFR herunter zu regulieren (ELOMAA et.al., 1993). Ein ähnlicher Ansatz ist für die FNS II denkbar, um die Anthocyanthese indirekt zu modifizieren. Aus den Kreuzungsexperimenten mit der Sorte „Th 58“ kann abgeleitet werden, dass die transgenen Pflanzen aufgrund der erhöhten Verfügbarkeit an Vorstufen (Naringenin bzw. Eriodictyol, Abb. 2) mehr Anthocyan bilden können und somit die Farbintensität deutlich gesteigert wird. Für die einzig bislang transformierte *Gerbera* Sorte „Regina“, die das Flavon Ap, Pelargonidin Derivate als Farbpigmente bildet und rosafarben ist, würde dies eine deutlichere Rotfärbung aufgrund des gestiegenen Anthocyangehaltes bedeuten.

Durch Untersuchungen der letzten Jahre besteht die begründete Annahme, dass aufgenommene Flavonoide, wie z.B. Flavone, Flavonole und Anthocyane im Körper biologisch wirksam werden und diese Wirkung in gesundheitlicher Hinsicht weitgehend positiv

ist. Eine Verbesserung einzelner Arten bzw. Sorten von Nutz- bzw. Nahrungspflanzen, die für die Ernährung von Mensch und Tier wichtig sind, durch die gezielte Veränderung des Gehalts oder Musters an gesundheitsfördernden Flavonoiden, würde so einen erheblichen Beitrag zur gesunden Ernährung von Mensch und Tier leisten. Dabei ist zu beachten, daß der Gehalt an Flavonoiden von vielen verschiedenen Faktoren abhängt. Zum einen unterscheiden sich Genotypen einer Art in ihrer Fähigkeit Flavonoide zu bilden und zu akkumulieren, woraus die erheblichen Unterschiede zwischen Sorten resultieren. Zum anderen beeinflussen neben den genetische Faktoren auch die Umweltbedingungen den Flavonoidgehalt, wobei vor allem die Witterung im Vergleich zu anderen Faktoren, wie Bodentyp oder Düngung, von hoher Bedeutung ist. Auch die weitere Verarbeitung der pflanzlichen Lebensmittel sollte berücksichtigt werden. In diesem Zusammenhang besitzen die Flavone wie auch die Flavonole gegenüber den Anthocyanen den Vorteil, daß sie wesentlich stabiler sind und somit von den verschiedenen Verarbeitungsvorgängen am wenigsten betroffen sind. Eine künstliche Zufuhr von Flavonoiden unabhängig vom pflanzlichen Rohstoff, z.B. durch Supplementierung, ist dagegen wegen der möglichen prooxidativen Reaktionen beim jetzigen Kenntnisstand nicht zu empfehlen (BÖHM et al., 1998).

## D5 Ausblick

Durch die Isolierung des CYP93B2-Klons und seine Identifizierung als kodierende Sequenz der FNS II liegen nun erstmals molekularbiologische Daten für ein Gen vor, das an der Synthese von Flavonen beteiligt ist, die zum einen in der Natur weitverbreitet ist und deren Eigenschaften bzw. Wirkungen sehr mannigfaltig sind.

Mittels der FNS II aus *Gerbera* können nun weitere cDNA Klone aus anderen flavonproduzierenden Pflanzen isoliert werden. Dazu bietet sich zuerst eine am Lehrstuhl verfügbare Genbank der Sommeraster (*Callistephus chinensis*; „Linie 01“) an, da eine gute Homologie zwischen den Sequenzen einer Familie zu erwarten ist. Während der Entstehung dieser Arbeit konnte das entsprechende Gen mit der erwähnten Methode bereits kloniert werden (MARTENS und FORKMANN, unveröffentlicht; CYP93B5; Acc. Nr. AF188612). Zudem wurden in den letzten Monaten zwei FNS II Gene aus *Antirrhinum majus* bzw. *Torenia Hybriden* (Akashi et al., unveröffentlicht; CYP93B3 bzw. CYP93B4; Acc. Nr. AB028151 bzw. AB028152) kloniert. Damit können über FNS II spezifische, degenerierte Primer, abgeleitet aus entsprechenden Alignments der bekannten FNS II Sequenzen, gezielt Fragmente, die für FNS II kodieren über PCR kloniert werden. Auch hierzu liegen am Lehrstuhl bereits putative FNS II Fragmente aus vier verschiedenen Pflanzenarten vor, die weiter charakterisiert werden sollen. Außerdem können andere Expressionssysteme (Insekten- und Säugerzellen, Bakterien) hinsichtlich ihrer Proteinproduktion getestet und optimiert werden, um die Voraussetzungen für eine enzymatische Synthese von verschiedenen Flavonen zu verbessern. Die Expression in diesen heterologen Systemen ermöglicht eine weitere enzymatische Untersuchung, um Fragen hinsichtlich der Substratspezifität und der  $K_m$ - bzw.  $V_{max}$ -Werte der FNS II aus *Gerbera* und anderer Pflanzenarten zu beantworten. Diese können anschließend mit denen anderer Schlüsselenzyme der Flavonoidbiosynthese verglichen werden, die das gleiche Substrat verwenden. Desweiteren gibt eine Klonierung von genomischen Klonen und die Analyse der Promotorregionen Einsicht in die Regulation der FNS II, auch bezüglich oder im Vergleich zu anderen Flavonoidgenen.

Die Isolierung eines FNS II cDNA Klons ermöglicht zudem weitere Studien zur Identifizierung der Bereiche, die für die Substratbindung essentiell sind. Modellierungen auf molekularer Ebene und Mutagenese der FNS II Aminosäure Sequenzen kann Aufschluß über die wichtigen Aminosäuren bringen, die für die Enzymaktivität und die Substratbindung

verantwortlich sind. Für die weitere Zukunft hinsichtlich der Klonierung von Cyt P450 ist es zudem von besonderem Interesse, Sequenzen von pflanzlichen Cyt P450, die toxische Substanzen synthetisieren, mit tierischen Cyt P450, die diese detoxifizieren, zu vergleichen, da zu erwarten ist, dass die Substratbindungsstellen ähnlich sein könnten. Hinsichtlich der Flavone könnten diese Untersuchungen bei der Aufklärung der Funktionsweise im Rahmen der Wechselwirkung Insekt-Pflanze von Bedeutung sein. Dies kann dann in weiteren experimentellen Ansätzen zur Manipulation der genetischen Information von Cyt P450 Substratbindungsstellen genutzt werden, mit dem Ziel Pflanzen herzustellen, die spezifische Schutzverbindungen synthetisieren, die gegen Pathogene und Schädlinge wirken (DONALDSON und LUSTER, 1991). In diesem Zusammenhang kann mit spezifische Sonden zur Aufklärung räumlicher Aspekte der Synthese der Flavone in verschiedenen Pflanzenarten und -geweben beigetragen werden. Zudem ermöglicht die Verfügbarkeit von zwei nahe verwandten Enzymen (FNS II und F2H), die sich deutlich in ihrer Stereochemie unterscheiden, aber eine relativ ähnliche Positionschemie zeigen, Wechselwirkungen zwischen der Bindung an das aktive Zentrum mit einem einfachen Substrat, welches die Geometrie der chemischen Reaktion während der Cyt P450 Katalyse bestimmt, zu untersuchen.

Ein weiterer sehr wichtiger Punkt ist die Nutzung von geeigneten Expressionssystemen zur Synthese von natürlichen, funktionellen Flavonen für medizinische oder ähnliche Anwendungen, z.B. Krebstherapie oder Verbesserung der menschlichen Immunabwehr.

## E Zusammenfassung

Die Blüten von *Gerbera* Hybriden (Compositae) enthalten verschiedene Flavonglykoside. Diese Verbindungen gehören zu einer der am weitesten verbreiteten Gruppe natürlich vorkommender Flavonoide. Neben ihrem Vorkommen in Blüten, in denen sie die Farbe zusammen mit anderen Flavonoiden beeinflussen, konnten sie auch in vielen anderen Teilen höherer Pflanzen nachgewiesen werden. Darüber hinaus sind die Flavone wichtige Moleküle bei der Induktion der Nodulationsgene in verschiedenen *Rhizobium* Arten, die wiederum zur Bildung von stickstofffixierenden Wurzelknöllchen bei Leguminosen beitragen. Sie spielen aber auch bei verschiedenen Wechselwirkungen zwischen Insekten und der Wirtspflanze eine wichtige Rolle. In den letzten Jahren wurden zudem therapeutische Wirkungen, die Eigenschaften als bioaktive Substanzen und als Arzneimittel bei der Behandlung von tierischen und menschlichen Erkrankungen verstärkt untersucht und beschrieben.

In den Blüten von definierten *Gerbera* Genotypen konnte eine Enzymaktivität gezeigt werden, die die Einführung einer Doppelbindung zwischen den C-Atomen 2 und 3 der Flavanone Naringenin und Eriodictyol katalysiert. Bei den gebildeten Produkten handelte es sich um die entsprechenden Flavone Apigenin und Luteolin. Wie für die Flavonsynthase II (FNS II) aus anderen Pflanzenarten beschrieben, ist die Enzymaktivität dieser Cytochrom P450-(Cyt P450) abhängigen Monooxygenase in der mikrosomalen Fraktion lokalisiert. Die Reaktion ist strikt von NADPH als Kofaktor abhängig und zeigte ein pH-Optimum von ungefähr 7.5. Die FNS II Aktivität konnte nur in Blütenextrakten von Genotypen mit dominanten Wildtyp Allelen am Locus *Fns*, nicht aber in Linien mit rezessiven Allelen (*fns fns*) nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse belegten zum ersten Mal eine Korrelation zwischen einem Gen und der Enzymaktivität der FNS II. Weitere genetische Untersuchungen bewiesen die monogene Vererbung der Flavonbildung in *Gerbera*.

Basierend auf den genetischen und biochemischen Ergebnissen wurde Differential Display zur Klonierung eines FNS II cDNA Klons eingesetzt. Aus zwei unterschiedlichen chemogenetisch definierten *Gerbera* Linien mit dominanten (*fns*<sup>+</sup> .) bzw. rezessiven (*fns fns*) Allelen am Locus *Fns* konnte ein Cyt P450 Fragment (CypDDd7a) isoliert werden. Dazu wurden upstream Primer, die aus dem konservierten Bereich der Häm-Bindungsregion der Cyt P450 Proteine abgeleitet wurden, in Kombination mit drei verschiedenen Oligo (dT) Primern verwendet. Der

vollständige cDNA Klon (CYP93B2), der sowohl einen offenen Leserahmen und Teile der CypDDd7a Sequenz enthielt wurde über ein 5'-RACE und end-to-end PCR mit genspezifischen Primern isoliert. Northern Blot Analysen mit Gesamt RNA von *Gerbera* Hybriden ergaben, dass das CYP93B2 Gen nur in Linien mit dominantem Allel *fns*<sup>+</sup> transkribiert wird und dass die Transkriptionshöhe während der Blütenentwicklung im Einklang mit der gemessenen Enzymaktivität der FNS II und der Flavonakkumulation steht. Mikrosomen von Hefezellen, die die cDNA CYP93B2 exprimieren, katalysierten die direkte Bildung von [<sup>14</sup>C]Flavonen aus den entsprechenden [<sup>14</sup>C]Flavanonen. Demnach konnte gezeigt werden, dass der Klon CYP93B2 ein funktionelle FNS II kodiert. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz zeigte, dass CYP93B2 eine Homologie von 52% zur Sequenz von CYP93B1 besitzt, welche kürzlich als eine (2S)-Flavanon 2-Hydroxylase aus *Glycyrrhiza echinata* L beschrieben wurde.

Durch die Kombination von Genetik, Chemie, Biochemie und Molekularbiologie ist es erstmalig gelungen einen cDNA Klon zu isolieren, der für eine funktionelle FNS II kodiert. Mit Hilfe des FNS II Gens bzw. des entsprechenden Enzyms ist es möglich in einen wichtigen Schritt in dem Flavonoidbiosyntheseweg zu eingreifen. Dieser Schritt ist an einem wichtigen Verzweigungspunkt der Flavonoidbiosynthese lokalisiert, an dem die Synthese von verschiedenen anderen Flavonoiden, wie z.B. Isoflavone, Flavonole, Proanthocyane und Anthocyane, abzweigt. Daher kann durch gezielte gentechnische Ansätze die Synthese der oben genannten Verbindung einschließlich der Flavone durch die Änderung der FNS II Aktivität beeinflusst werden. Darüber hinaus hat das isolierte Gen eine erhebliche Bedeutung bei der direkten Veränderung der Flavonsynthese in verschiedenen Geweben bei der Bildung von neuen Farben in Blüten und Blättern. Außerdem können eine Reihe wirtschaftlich bedeutende Faktoren im Pflanzenbau, die von Krankheitsresistenz, Knöllchenbildung bei Leguminosen bis zu neuen Produkten für die Ernährung und pharmakologische Anwendung reichen, beeinflusst werden

## Summary

Flowers of *Gerbera* Hybrids (Compositae) are known to contain several flavone glycosides. These compounds belong to one of the most abundant groups of naturally occurring flavonoid classes. Besides their occurrence in flowers, where they contribute to the colour together with other flavonoids, they were also found in many other parts of higher plants. Furthermore, they are important molecules during induction of nodulation genes in *Rhizobium spec.* resulting in the formation of nitrogen-fixing root nodules in *Leguminosae* and they also contribute to the interaction between insects and host plants. Recently, their use as bioactive substances and drugs in animal and human diseases were described.

In flower extracts of defined genotypes of *Gerbera* an enzyme activity was demonstrated which catalyses the introduction of a double bond between the C atoms 2 and 3 of the flavanones naringenin and eriodictyol. The products formed were the corresponding flavones, apigenin and luteolin. Similar to flavone synthases II (FNS II) from other plant species, the enzyme activity of this cytochrome P450-(Cyt P450) dependent monooxygenases was found to be localized in the microsomal fraction. The reaction required NADPH as cofactor and had a pH-optimum of about 7.5. FNS II activity was detectable only in flower extracts of genotypes with dominant wild-type alleles at the locus *Fns*, but not in lines with recessive alleles (*fns fns*). The results establish for the first time a correlation between a gene and the enzyme activity of FNS II. Further genetic studies proof the monogenic inheritance of the flavone formation in *Gerbera*.

Based on these genetic and biochemical data differential display technique was used for isolating a FNS II cDNA clone. From two different chemogenetic defined *Gerbera* lines with the dominant (*fns<sup>+</sup>* .) or recessive (*fns fns*) alleles at the locus *Fns* a Cyt P450 fragment (CypDDd7a) was isolated using upstream primers based on the conserved heme-binding region of cytochrome P450 proteins in combination with three different oligo (dT) primer. The full length cDNA (CYP93B2) containing the open reading frame and part of the CypDDd7a sequence was isolated via 5'-RACE and end-to-end PCR with gene specific primers. Northern blot analysis of total RNA of *Gerbera* hybrids indicated that the CYP93B2 gene was only transcribed in lines with the dominant allele *fns<sup>+</sup>* and that the transcription level during flower

development is in agreement with measured enzyme activity of FNS II and flavone accumulation. Microsomes from yeast cells expressing CYP93B2 catalysed the direct formation of [<sup>14</sup>C]flavones from the respective [<sup>14</sup>C]flavanones. Thus, CYP93B2 was shown to encode FNS II. Comparison of amino acid sequences revealed that CYP93B2 had 52% identity with the sequence of CYP93B1, which has recently been reported as a (2S)-flavanone 2-hydroxylase of *Glycyrrhiza echinata* L.

The combination of genetic, chemistry, biochemistry and molecular biology enables the first successful isolation of a cDNA clone, encoding a functional FNS II. The regulation of expression of FNS II now enables the control of a step in flavonoid biosynthesis that is located at an important junction of this pathway leading to different flavonoids, such as flavones, isoflavones, flavonols, proanthocyanidins and anthocyanidins. Thus, this new Cyt P450 gene might be useful in transgenic approaches to influence synthesis of these compounds by modification FNS II activity. The direct regulation of flavone formation in different plant tissues is a useful tool to create new flower colours and to influence a wide range of economic factors in plant performance including extend of plant disease resistance, novel products for mammalian nutrition and nodulation capacity in different plant species.

## F Literaturverzeichnis

- AFCHAR, D., CAVE, A., GUINAUDEAU, H. und VAQUETTE, J., 1984a. Etude des réglisses d'iran. III. Flavonoides des racines de *Glycyrrhiza echinata* L. *Plantes medicinales et phytotherapie*, **18(3)**, 170-174.
- AFCHAR, D., CAVE, A. und VAQUETTE, J., 1984b. Etude des réglisses d'iran. II. Flavonoides de *Glycyrrhiza glabra* L. var. *glandulifera* Waldst. et Kit. et de *Glycyrrhiza glabra* L. var. *violacea* Boiss. *Plantes medicinales et phytotherapie*, **18(2)**, 55-61.
- AHN, K., SZCZESNA-SKORUPA, E. und KEMPER, B., 1993. The amino-terminal 29 amino acids of cytochrome P450 2C1 are sufficient for retention in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 18726-18733.
- AKASHI, T., AOKI, T., TAKAHASHI, T., KAMEYA, N., NAKAMURA, I. und AYABE, S.I., 1997. Cloning of cytochrome P450 cDNAs from cultured *Glycyrrhiza echinata* L. cells and their transcriptional activation by elicitor-treatment. *Plant Science* **126**, 39-47.
- AKASHI, T., AOKI, T. und AYABE, S.I., 1998. Identification of a cytochrome P450 cDNA encoding (2S)-flavanone 2-hydroxylase of licorice (*Glycyrrhiza echinata* L.; Fabaceae) which represents licodione synthase and flavone synthase II. *FEBS Letters* **431**, 287-290.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. und LIPMAN, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.
- ASEN, S., 1984. High pressure liquid chromatographic analysis of flavonoid chemical markers in petals from *Gerbera* flowers as an adjunct for cultivar and germplasm identification. *Phytochemistry* **23(11)**, 2523-2526.
- ASEN, S. und HOROWITZ, R.M., 1974. Apigenin 4'-O- $\beta$ -D-glucoside 7-O- $\beta$ -D-glucuronide : the copigment in the blue pigment of *Centaurea cyanus*. *Phytochemistry* **13**, 1219-1223.
- ASEN, S., STEWART, R.N., NORRIS, K.H. und MASSIE, D.R., 1970. A stable blue non-metallic copigment complex of delphinidin and C-glycosylflavones in Prof. Blaauw iris. *Phytochemistry* **9**, 619-627.
- ASEN, S., NORRIS, K.H., STEWART, R.N., und SEMENIUK, P., 1973. Effect of pH, anthocyanin, and flavonoid co-pigments on the colour of statice flowers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **98**, 174-176.
- ASEN, S., GRIESBACH, R.J., NORRIS, K.H. und LEONHARD, B.A., 1986. Flavonoids from *Eustoma grandiflorum* flower petals. *Phytochemistry* **25**, 2509-2513.

- BARTLEY, G.E. und SCOLNIK, P.A., 1995. Plant carotenoids : pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell* **7**, 1027-1038.
- BAUER, D., MÜLLER, H., REICH, J., RIEDEL, H., AHRENKIEL, V., WARTHÖE, P. und STRAUSS, M., 1993. Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DD-RT-PCR). *Nucleic Acids Research* **21**, 4272-4280.
- BÖHM, H., BOEING, H., HEMPEL, J., RAAB, B. und KROKE, A., 1998. Flavonols, flavones and anthocyanins as native antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaften* **37**, 147-163.
- BOLWELL, G.P.; BOZAK, K. und ZIMMERLIN, A., 1994. Plant cytochrome P450. *Phytochemistry* **37**, 1491-1506.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- 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. und GRISEBACH, H., 1985. Improved preparation and assay of chalcone synthase. *Phytochemistry* **24**, 1975-1976.
- BRITSCH, L., HELLER, W. und GRISEBACH, 1981. Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley. *Zeitschrift für Naturforschung* **36c**, 742-750.
- BROUILLARD, R. und DANGLES, O., 1994. Flavonoids and flower colour. In : *The Flavonoids - Advances in Research since 1986* (Ed.: J.B. HARBORNE). Chapman & Hall, London, 565-587.
- BRUGLIERA, F., BARRI-REWELL, G., HOLTON, T.A. und MASON, J.G., 1999. Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the Ht1 locus of *Petunia hybrida*. *The Plant Journal* **19**, 441-451.
- BUETTNER, G.R. und JURKIEWICZ, B.A., 1996. Catalytic metals, ascorbate and free radicals : combinations to avoid. *Radiation Research* **145**, 523-541.
- CHAPPELL, J. und HAHLBROCK, K., 1984. Transcription of plant defense genes in response to UV light or fungal elicitor. *Nature* **311**, 76-78.

- CHAPPLE, C., 1998. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 311-343.
- CLEMENT, J.S., MABRY, T.J., WYLER, H. und DREIDING, A.S., 1994. Chemical review and evolutionary significance of the betalains. In : *Caryophyllales : Evolution and Systematics* (Hrsg. : H.-B. BEHNKE und T.J. MABRY). Springer-Verlag, Berlin, 247-261.
- CORPET, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* **16 (22)**, 10881-10890.
- DAVIES, K.M. und SCHWINN, K.E., 1997. Flower Colour. In : *Biotechnology I Agriculture Series, No. 16 - Biotechnology of ornamental plants* (Hrsg. : R.L. GENEVE, J.E. PREECE und S.A. MERKLE). CAB International, Wallington, U.K., 259-294.
- DELLAPORTA, S.J., WOOD, J. und HICK, J.B., 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**, 19-21.
- DIESPERGER, H., MÜLLER, C.R. und SANDERMANN, H. jr., 1974. Rapid isolation of a plant microsomal fraction by Mg<sup>2+</sup> precipitation. *FEBS Letter* **43**, 155-158.
- DONALDSON, R.P. und LUSTER, G.L., 1991. Multiple forms of plant cytochromes P-450. *Plant Physiology* **96**, 669-674.
- DOONER, H.K., ROBBINS, T.P. und JORGENSEN, R.A., 1991. Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annual Review of Genetics* **25**, 173-199.
- DURST, F., 1991. Biochemistry and physiology of plant cytochrome P450. In : *Frontiers in Biotransformation. Vol. 4. Microbial and plant P450 : biochemical characterizations, genetic engineering and practical implications* (Hrsg. : K. RUCKPAUL und H. REIN). Akademie Verlag, Berlin, 191-232.
- DURST, F. und O'KEEFE, D.P., 1995. Plant cytochromes P450 : an overview. In : *Drug metabolism and drug interactions* (Hrsg. : F. DURST und D.P. O'KEEFE). Freund, U.K., 171-187.
- DURST, F. und NELSON, D., 1995. Diversity and evolution of plant P450 and P450 reductases. In : *Drug metabolism and drug interactions* (Hrsg. : F. DURST und D.P. O'KEEFE). Freund, U.K., 189-206.
- DURST, F., BENVENISTE, I., SALAUN, J.P. und WERCK, D., 1994. Function and diversity of plant cytochrome P450. In : *Proceeding of the 8th International Conference of Cytochrome P450* (Eds.: M.C. LECHNER et.al.). John Libbey Eurotext, London, pp. 23-30.

- EIGEN, E., BLITZ, M. und GINSBERG, E., 1957. The detection of some naturally occurring flavanone compounds on paper chromatograms. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **68**, 501.
- ELOMAA, P. und HOLTON, T.A., 1994. Modification of flower colour using genetic engineering. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **12**, 63-88.
- ELOMAA, P., HONKANEN, J., PUSKA, R., SEPPÄNEN, P., HELARIUTTA, Y., METHO, M., KOTILAINEN, M., NEVALAINEN, L. und TEERI T.H., 1993. *Agrobacterium*-mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation. *Bio/Technology* **11**, 508-511.
- FIRMIN, J.L., WILSON, K.E., ROSSEN, L. und JOHNSTON, W.B., 1986. Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. *Nature* **324**, 90-92.
- FORKMANN, G., 1991. Flavonoids as Flower Pigments : The Formation of the Natural Spectrum and its Extension by Genetic Engineering. *Plant Breeding* **106**, 1-26.
- FORKMANN, G., 1993. Control of pigmentation in natural and transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* **4**, 159-165.
- FORKMANN, G. und HELLER, W., 1999. Biosynthese of flavonoids. In : *Comprehensive Natural Products Chemistry - Vol. 1* (U. SANKAWA). Elsevier, Amsterdam, 714-748.
- FORKMANN, G. und STOTZ, G., 1984. Selection and characterisation of flavanone 3-hydroxylase mutants of Dahlia, Streptocarpus, Verbena and Zinnia. *Planta* **161**, 261-265.
- FREAR, D.S., SWANSON, H.R. und TANAKA, F.S., 1969. N-demethylation of substituted 3-(phenyl) 1-methyl-ureas : isolation and characterization of a microsomal mixed function oxidase from cotton. *Phytochemistry* **8**, 2157-2169.
- FROHMAN, M.A., DUSH, M.K. und MARTIN, G.R., 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts : Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of the National Academie of Science USA* **85**, 8998-9002.
- GIETZ, D., ST. JEAN, A., WOODS, R.A. und SCHIESTL, R.H., 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research* **20**, 1425.
- GIULIANO, G., BARTLEY, G.E. und SCOLNIK, P.A., 1993. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *The Plant Cell* **5**, 379-387.
- GONZALES, F.J., 1994. Regulation of xenobiotic-metabolizing cytochromes P450. In : *Assessment of the use of single cytochrome P450 enzymes in drug research* (Hrsg. : M.R. WATERMAN und M. HILDEBRAND). Springer Verlag, Berlin, 21-42.

- GOTO, T. und KONDO, T., 1991. Struktur und molekulare Stapelung von Anthocyanen - Variation der Blütenfarben. *Angewandte Chemie* **103**, 17-33.
- GROVES, J.T. und HAN, YUAN-ZHANG, 1995. Models and mechanisms of cytochrome P450 action. In : *Cytochrome P450 - Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Hrsg. : P.R. ORTIZ DE MONELLANO). 2. Ausgabe, Plenum Press, New York, 3-48.
- GROVES, J.T., KRISHNAN, S., AVARIA, G.E. und NEMO, T.E., 1980. Studies of the hydroxylation and epoxidation reactions catalyzed by synthetic metalloporphyrinates. Models related to the active oxygen species of cytochrome P-450. *Advances Chem. ser. Series* **191**, 277-289.
- HAHLBROCK, K. und SCHEEL, D., 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* **40**, 347-369.
- HALKIER, B.A. (1997). Catalytic reactivities and structure/function relationships of cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry* **43**, 1-21.
- HARBORNE, J.B., 1967. *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*. Academic Press, New York.
- HARBORNE, J.B., 1975. Biochemical systematics of flavonoids. In : *The Flavonoids* (Hrsg. : J.B. HARBORNE, T.J. MABRY und H. MABRY). Chapman & Hall, London, Großbritannien, 1056-1095.
- HARBORNE, J.B., 1978. The rare Flavone Isoetin as a Yellow Flower pigment in *Heywoodiella oligocephala* and in other Cichorieae. *Phytochemistry* **17**, 915-917.
- HARBORNE, J.B., 1988. The Flavonoids : recent advances. In : *Plant Pigments* (Hrsg. : T.W. GOODWIN). Academic Press, London, Großbritannien.
- HARBORNE, J.B., 1994. *The Flavonoids - Advances in Research since 1986*. Chapman & Hall, London, Großbritannien.
- HARBORNE, J.B. und GRAYER, R.J., 1994. Flavonoids and Insects. In : *The Flavonoids - Advances in Research since 1986* (Ed.: J.B. HARBORNE). Chapman & Hall, London, 589-618.
- HELLARIUTTA, Y., ELOMAA, P., KOTILAINEN, M., GRIESBACH, R.J., SCHRÖDER, J. und TEERI, T.H., 1995. Chalcone synthase-like genes active during corolla development are differentially expressed and encode enzymes with different catalytic properties in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *Plant Mol. Biol.* **28**, 935-941.

- HELLER, W. und FORKMANN, G., 1994. Biosynthesis of Flavonoids. In : *The Flavonoids - Advances in Research since 1986* (Ed.: J.B. HARBORNE). Chapman & Hall, London, 499-536.
- HOLTON, T.A., BRUGLIERA, F., LESTER, D.R., TANAKA, Y., HYLAND, C.D., MENTING, J.G.T, LU, C.-Y., FARCY, E., STEVENSON, T.W. und CORNISH, E.C., 1993a. Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower color. *Nature* **366**, 276-279.
- HOLTON, T.A., BRUGLIERA, F. und TANAKA, Y., 1993b. Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia Hybriden*. *The Plant Journal* **4**, 1003-1010.
- HORN, W. und LANGE, P, 1996. *Gerbera* L. In : *Zierpflanzenbau* (Hrsg. W. HORN). Blackwell Wissenschaft, Berlin, 498-503.
- HOTZE, M., SCHRÖDER, G. und SCHRÖDER, J., 1995. Cinnamate 4-hydroxylase from *Catharanthus roseus*, and a strategy for the functional expression of plant cytochrome P<sub>450</sub> proteins as translational fusions with P<sub>450</sub> reductase in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **374**, 345-350.
- HRAZDINA, G., 1982. Anthocyanins. In : *The Flavonoids - Advances in Research* (Ed.: J.B. HARBORNE und MABRY, T.J.). Chapman & Hall, London, 135-188.
- IMAI, Y. und SATO, R., 1967. Conversion of P-450 to P-420 by neutral salts and some other reagents. *European Journal of Biochemistry* **1**, 419-426.
- JACOBS, M. und RUBERY, P.H., 1988. Naturally occurring auxin transport regulators. *Science* **241**, 346-349.
- JORGENSEN, R., 1991. Silencing of plant genes by homologous transgenes. *AgBiotech News and Information* **4**, 265N-273N.
- JORGENSEN, R., 1994. Developmental significance of epigenetic impositions on the plant genome : a paragenetic function for chromosomes. *Developmental Genetics* **15**, 523-532.
- JORGENSEN, R., 1995. Cosuppression, flower color patterns, and metastable gene expression states. *Science* **268**, 686-691.
- KALTENBACH, M., SCHRÖDER, G., SCHMELZER, E., LUTZ, V. UND SCHRÖDER, J., 1999. Flavonoid hydroxylase from *Catharanthus roses* : cDNA, heterologous expression, enzyme properties and cell-type specific expression in plants. *The Plant Journal* **19**, 183-193.
- KARP, F., MIHAILIAK, C.A., HARRIS, J.L. und CROTEAU, R., 1990. Monoterpene biosynthetic biosynthesis : specificity of the hydroxylations of (-) - limonene by enzyme preparations

- from peppermint (*Mentha piperita*), spearmint (*Mentha spicata*) and Perilla (*Perilla frutescens*) leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **276**, 219-226.
- KERSCHER, F. und FRANZ, G., 1987. Biosynthesis of vitexin and isovitexin : enzymatic synthesis of the C-glykosylflavones vitexin and isovitexin with an enzyme preparation from *Fagopyrum esculentum* M. seedlings. *Zeitschrift für Naturforschung* **42c**, 519-524.
- KOCHS, G. und GRISEBACH, H., 1987. Induction and Characterization of a NADPH-Dependent Flavone Synthase from Cell Cultures of Soybean. *Zeitschrift für Naturforschung* **42c**, 343-348.
- KRAUSS, P.F.X und KUTCHAN, T.M., 1995. Molecular cloning and heterologous expression of a cDNA encoding berbaminine synthase, a C-O phenol-coupling cytochrome P450 from higher plant *Berberis stolonifera*. *Proceedings of the National Academe of Science USA* **92**, 2071-2075.
- KUBASEK, W.L., SHIRLEY, B.W., MC KILLOP, A., GOODMAN, H.M., BRIGGS, W. und AUSUBEL, F.M., 1992. Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Cell* **4**, 1229-1236.
- LANGE, B.M., TROST, M., HELLER, W., LANGEBARTELS, C. und SANDERMANN jr, H., 1994. Elicitor-induced formation of free and cell-wall-bound stilbenes in cell-suspension cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Planta* **194**, 143-148.
- LIANG, P. und PARDEE, A., 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNAs by means of polymerase chain reaction. *Science* **276**, 2054-2057.
- LIANG, P., AVERBOUKH, L. und PARDEE, A., 1993. Distribution and cloning of eucaryotic mRNAs by means of differential display : refinements and optimization. *Nucleic Acids Research* **21**, 3269-3275.
- LINDBERG, R.L.P. und NEGISHI, M., 1989. Alteration of mouse P450<sub>coh</sub> substrate specificity by mutation of a single aminoacid residue. *Nature* **339**, 632-634.
- LUKACIN, R. und BRITSCH, L., 1997. Identification of strictly conserved histidine and arginine residues as part of the active site in *Petunia hybrida* flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase. *Eur. J. Biochem.* **249**, 748-757.
- LUO, D., COEN, E.S., DOYLE, S. und CARPENTER, R., 1991. Pigmentation mutants produced by transposon mutagenesis in *Antirrhinum majus*. *The Plant Journal* **1**, 59-69.
- LUTTERBÜSE, R., 1995 : Frühmetastasierung epithelialer Tumore : Vergleichende Analyse der Genexpression primärer und mikrometastatischer Tumorzellen mittels

- mRNA-Differential Display Technik. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld.
- MANSUY, D., 1998. The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **121**, 5-14.
- MANSUY, D. und RENAUD, J.P., 1995. Heme-thiolate proteins different from cytochromes P450 catalyzing monooxygenations. IN : *Cytochrome P-450 : Structure, Mechanism, and Biochemistry* (P.R. ORTIS DE MONTELLANO). 2. Ausgabe, Plenum Press, New York.
- MARBRY, T.L., MARKHAM, K.R. und THOMAS, M.B., 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- MARKHAM, K., 1982. Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press, London, Großbritannien.
- MARKHAM, K. und GEIGER, H., 1994. <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. In : *The Flavonoids : Advances in Research Since 1986* (Hrsg. : J.B. HARBORNE). Chapman & Hall, London, Großbritannien, 441-498.
- MARTENS, S., 1995. Flavonoidbiosynthese in *Gerbera* : Enzymologische Charakterisierung der Chalkonsynthase, der Flavanon 3-Hydroxylase und der Flavonsynthase II. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau; TUM Freising-Weihenstephan.
- MARTENS, S. und FORKMANN, G., 1996. Enzymology and genetics of flavonoid biosynthesis in *Gerbera*-Hybriden. In : *Polyphenols Communications, Vol. 96* (Hrsg. J. VERCAUTEREN, C. CHEZE, M.C. DUMON und J.F. WEBER). Groupe Polyphenols, Bordeaux, 545-546.
- MARTIN, C. und GERATS, T., 1993a. The control of flower colouration. In : *The Molecular Biology of Flowering* (Hrsg. B.R. JORDAN). C.A.B. International, Wallington, Großbritannien, 219-255.
- MARTIN, C. und GERATS, T., 1993b. Control of pigment biosynthesis genes during petal development. *The Plant Cell* **5**, 1253-1264.
- MAURER, J., 1967 : Untersuchungen zur Blütenbiologie an *Gerbera jamesonii* H. Bolus. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* **60**, 113-143.
- MEIJER, A.H.; SOUER, E., VERPOORTE, R., und HOOGE, J.H.C., 1993. Isolation of cytochrome-P-450 cDNA clones from higher plant *Catharanthus roseus* by a PCR strategy. *Plant Molecular Biology* **22**, 379-383.

- MEYER, P., 1991. Engineering of novel flower colours. In : *Genetics and Breeding of Ornamental Species* (Hrsg. : J. HARDING, F. SINGH und J.N.M. MOL). Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, 285-307.
- MEYER, P., HEIDMANN, I., FORKMANN, G. und SAEDLER, H., 1987. A new *Petunia* flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* **330**, 677-678.
- MEYER, K., CUSUMANO, J.C., SOMERVILLE, C. und CHAPPLE, C.C.S., 1996. Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Proceedings of the National Academie of Science USA* **93**, 6869-6874.
- MIDDLETON JR, E. und KANDASWAMI, C., 1994. The impact of plant flavonoids on mammalian biology : implications for immunity, inflammation and cancer. In : *The Flavonoids - Advances in Research since 1986* (Hrsg. : J.B. HARBORNE). Chapman & Hall, London, Großbritannien, 619-652.
- MIZUTANI, M., WARD, E., DIMAIO, J., OHTA, D., RYALS, J. und SATO, R., 1993. Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding mung bean cytochrome P450 (P450<sub>C4H</sub>) possessing cinnamate 4-hydroxylase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **190**, 875-880.
- MURAKAMI, K., MIHARA, K. und OMURA, T., 1994. The transmembrane region of microsomal cytochrome P450 identified as the endoplasmic reticulum retention signal. *Journal of Biochemistry*. **116**, 164-175.
- MURASHIGE, T. und SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**, 473-497.
- MURPHY, P.J. und WEST, C.A., 1969. The role of mixed function oxidases in kaurene metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **133**, 395-407.
- NELSON, D.R., KOYMANS, L. und KAMATAKI, T., 1996. P450 superfamily : update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**, 1-42.
- ORTIS DE MONTELLANO, P.R., 1986. *Cytochrome P-450 : Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Plenum Press, New York, USA.
- OSAKABE, K., TSAO, C.C., LI, L., POPKO, J.L., UMEZAWA, T., CARRAWAY, D.T., SMELTZER, R.H., JOSHI, C.P. und CHIANG, V.L., 1999. Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8955-8960.

- PAGE, R.D.M., 1996. An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp. Appl. Biosci.* **12**, 357-358.
- PETERS, N.K., FROST, J.W. und LONG, S.R., 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* **23**, 977-980.
- PFANDER, H., 1987. Carotenoids. In : *Key to Carotenoids* (Hrsg. : O. STRAUB). 2. Ausgabe, Birkhaeuser Verlag, Basel, Schweiz.
- POMPON, D., LOUERAT, B., BRONNE, A. und URBAN, P., 1996. Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods in Enzymology* **272**, 51-64.
- POULOS, T.L., FINZEL, B.C., GUNSALUS, I.C., WAGNER, G.C. und KRAUT, J., 1985. The 2.6-A crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 16122-16130.
- REDMOND, J.W., BATLEY, M., DJORDJEVIC, M.A., INNES, R.W., KUEMPEL, P.L. und ROLFE, B.G., 1986. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* **323**, 632-635.
- REYNOIRD, J.-P., MEYNET, J., CAISSARD, J.-C. und CHRIQT, D., 1997. Micropropagation of *Gerbera*. In : *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 40. High-Tech and Micropropagation IV (Hrsg. : Y.P.S. BAJAJ). Springer Verlag, Berlin.
- RICE-EVANS, C.A. und PACKER, L., 1998. Flavonoids in health and disease. Marcel Dekker, Inc., New York.
- ROBINSON, G.M. und ROBINSON, R., 1931. *Biochemical Journal* **25**, 1687.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. und MANIATIS, T., 1989 : *Molecular Cloning : A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SANGER, F., NICKLEN, S. und COULSON, A., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academie of Science USA* **74**, 5463-5467.
- SATO, T., SAKAGUCHI, M. MIHARA, K. und OMURA, T., 1990. The amino-terminal structures that determine topological orientation of cytochrome P-450 in microsomal membrane. *EMBO Journal* **9**, 2391-2397.
- SCHOPFER, C.R. and EBEL, J., 1998. Identification of elicitor-induced cytochrome P450s of soybean (*Glycine max* L.) using differential display of mRNA. *Molecular Gene Genetics*. **258**, 315-322.
- SCHOPFER, C.R., KOCHS, G., LOTTSPEICH, F. und EBEL, J., 1998. Molecular characterization and functional expression of dihydroxypterocarpan 6a-hydroxylase, an enzyme specific for

- pterocarpanoid phytoalexin biosynthesis in soybean (*Glycine max* L.). *FEBS Letters* **432**, 182-186.
- SCHULER, M.A., 1996. Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Critical Reviews of Plant Science* **15**, 235-284.
- SCHWINN, K.E., MARKHAM, K.R. und GIVEN, N.K., 1994. Floral flavonoids and the potential for pelargonidin biosynthesis in commercial chrysanthemum cultivars. *Phytochemistry* **35**, 145-150.
- SCOTT-MONCRIEFF, R., 1936. A biochemical survey of some mendelian factors for flower colour. *Journal of Genetics* **32**, 117-170.
- SIMINSZKY, B., CORBIN, F.T., WARD, E.R., FLEISCHMANN, T. und DEWEY, R.E., 1999. Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. *Proceedings of the National Academie of Science USA* **96** (4), 1750-1755.
- SONG, WEN-CHAO, FUNK, C.D. und BRASH, A.R., 1993. Molecular cloning of an allene oxide synthase : A cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Proceedings of the National Academie of Science USA* **90**, 8519-8523.
- STAFFORD, H.A., 1990. Flavonoid Metabolism. CRC Press, Boca Raton, USA.
- STEELE, C.L., GIJZEN, M., QUTOB, D. und DIXON, R.A., 1999. Molecular characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in Soybean. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **367** (1), 146-150.
- STICH, K. und FORKMANN, G., 1987. Enzymatic synthesis of 4'- and 3', 4'-hydroxylated flavanones and flavones with flower extracts of *Sinningia cardinalis*. *Zeitschrift für Naturforschung* **42c**, 1193-1199.
- STICH, K. und FORKMANN, G., 1988. Studies on columnidin biosynthesis with flower extracts from *Columnnea hybrida*. *Zeitschrift für Naturforschung* **43c**, 311-314.
- STICH, K., EBERMANN, R. und FORKMANN, G., 1988. Einfluß Cytochrom P-450-spezifischer Inhibitoren auf die Aktivität von Flavonoid-3'-hydroxylase und Flavonsynthase II bei verschiedenen Pflanzen. *Phyton* (Austria) **28**, 237-247.
- STOTZ, G. und FORKMANN, G., 1981. Oxidation of Flavanones to Flavones with Flower Extracts of *Antirrhinum majus* (Snapdragon). *Zeitschrift für Naturforschung* **36c**, 737-741.
- STOTZ, G., SPRIBILLE, R. und FORKMANN, G., 1984. Flavonoid biosynthesis in flowers of *Verbena hybrida*. *Journal of Plant Physiology* **116**, 173-183.

- SUZUKI, G., OHTA, H., KATO, T., IGARASHI, T., SAKAI, F., SHIBATA, D., TAKANO, A., MASUDA, T., SHIOI, Y. und TAKAMIYA, K., 1996. Induction of a novel cytochrome P450 (CYP93 family) in soybean suspension-cultured cells. *FEBS Letters* **383** (1-2), 83-86.
- SUZUKI, G., OHTA, H., KATO, T., SHIBATA, D., MASUDA, und TAKAMIYA, K., 1997. Molecular cloning of a cDNA encoding cytochrome P450 CYP93A2 from soybean-cultured cells. *Plant Physiology* **114**, 748.
- SZEKERES, M., NÉMETH, K., KONCZ-KÁLMÁN, Z. MATHUR, J., KAUSCHMANN, A., ALTMANN, T., RÉDEI, G.P., NAGY, F., SCHELL, J. und KONCZ, C., 1996. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de.etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* **85**, 171-182.
- TAYLOR, L.P. und JORGENSEN, R., 1992. Conditional male fertility in chalcone synthase deficient *Petunia*. *Journal of Heredity* **83**, 11-17.
- TEUTSCH, H.G., HASENFRATZ, A., LESOT, C., STOLTZ, J.-M., GARNIER, J.-M., JELTSCH, F., DURST, F. und WERCK-REICHHART, D., 1993. Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichokecinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. *Proceedings of the National Academie of Science USA* **90**, 4102-4106.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.J. und GIBSON, T.J., 1994. ClustalW : Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **2**, 4673-4680.
- TOGURI, T., AZUMA, M. und OHTANI, T., 1993. The cloning and characterization of a cDNA encoding a cytochrome P450 from flowers of *Petunia hybrida*. *Plant Science*. **94**, 119-126.
- TRUAN, G., CULLIN, C., REISDORF, P., URBAN, P. und POMPON, D., 1993 : Enhanced *in vivo* monooxygenase activities of mammalian P450s in engineered yeast cells producing high levels of NADPH-P450 reductases and human cytochrome b<sub>5</sub>. *Gene* **125**, 49-55.
- TYRACH, A., 1995 : Untersuchungen zur Genetik von Blütenpigmenten und zu quantitativen Merkmalen bei *Gerbera*. Dissertation am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau der Technischen Universität München-Weihenstephan.
- TYRACH, A. UND HORN, W., 1997. Inheritance of flower colour and flavonoid pigments in *Gerbera*. *Plant Breeding* **116**, 377-381.
- URBAN, P., CULLIN, C. und POMPON, D., 1990. Maximizing the expression of mammalian cytochrome P450 monooxygenase activities in yeast cells. *Biochimie* **72**, 463-472.

- URBAN, P., WERCK-REICHHART, D., TEUTSCH, H.G., DURST, F., REGNIER, S., KAZMEIER, M. und POMPON, D., 1994a : Characterization of recombinant plant cinnamate 4-hydroxylase produced in yeast. Kinetic and spectral properties of the major plant P450 of the phenylpropanoid pathway. *European Journal of Biochemistry* **222**, S. 843-850.
- URBAN, P., TRUAN, G., BELLAMINE, A., LAINE, R., GAUTIER, J.C. und POMPON, D., 1994b : Engineered yeast simulating P450-dependent metabolisms : tricks, myths and reality. In : *Drug Metabolism and Drug Interactions*, Vol. **11(3)** (Hrsg. N. KINGSLEY). Freund Publishing House, England, 169-200.
- URBAN, P., MIGNOTTE, C., KAZMEIER, M., DELORME, F. und POMPON, D., 1997 : Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 19176-19186.
- VAN BLOKLAND, R., DE LANGE, P., MOL, J.N.M. und KOOTER, J.M., 1993. Modulation of gene expression in plants by antisense genes. In : *Antisense Research and Applications*. (Hrsg. S.T. CROOKE und B. LEBLEU). CRC Press, London, 125-148.
- VETTER, H.-P., MANGOLD, U., SCHRÖDER, G., MARNER, F.-J., WERCK-REICHHART, D. und SCHRÖDER, J., 1992. Molecular analysis and heterologous expression of an inducible cytochrome P-450 protein from periwinkle (*Catharanthus roseus* L.). *Plant Physiol.* **100**, 998-1007.
- WARDMAN, P. und CANDEIA, L.P., 1996. Fenton chemistry : An introduction. *Radiation Research* **145**, 523-531.
- WINKLER, R.G. und HELENTJARIS, T., 1995. The maize *Dwarf3* gene encodes a cytochrome P450-mediated early step in gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1307-1317.
- WOLLENWEBER, E., 1994. Flavone and flavonols. In : *The Flavonoids - Advances in Research since 1986* (Ed.: J.B. HARBORNE). Chapman & Hall, London, 259-336.
- YAMAZAKI, S., SATO, K., SUHARA, K., SAKAGUCHI, M., MIHARA, K. und OMURA, T., 1993. Importance of the proline-rich region following signal-anchor sequence in the formation of correct conformation of microsomal cytochrome P-450s. *Journal of Biochemistry* **114**, 652-657.
- YE, Z. und VARNER, J.E., 1996. Expression patterns of cinnamic acid 4-hydroxylase gene during lignification in *Zinnia elegans*. *Plant Science* **121**, 133-141.

## G Anhang

### A1. Übersicht

#### a. Chemogenetisch definierte Sorten und Linien (nach TYRACH, 1995).

Sorte/Linie	Genotyp	Blütenfarbe	Flavonoidstruktur	FNS II Aktivität
Delphi	$fns^+ fns; f3'h f3'h; x^+ x^+$	weiß	Ap, Km (in Spuren)	ja
Simm	$fns^+ fns; f3'h f3'h; ..$	gelb	Ap, Km (in Spuren)	ja
T1	$fns fns; f3'h^+ f3'h; x^+ x$	creme	Km	nein
T3	$fns fns; f3'h f3'h; x^+ x^+$	gelb	Km	nein
Th 58	$fns^+ fns; f3'h^+ .; x^+ x$	orange	Ap, Km, Pg	ja
Clivia 18-1	$fns fns; f3'h^+ .; x x$	violett	Km, Cy	nein
D1	$fns^+ fns; f3'h^+ .; x x$	rot	Ap, Km, Qu, Pg, Cy	ja
Petruschka	$fns fns; . .; x^+ x^+$	rot	Km, Pg	nein
Uranus	$fns fns; f3'h^+ f3'h^+; x^+ x$	orange	Km, Pg	nein
Regina	#	rosa	Ap, Km, Pg	ja
Campidano	#	creme	Km	nein
Chubby	#	orange	Ap, Km, Pg	ja
Orca	#	weiß	Ap, Km	ja
Soleil	#	gelb	Km	nein
Spreewälderin	#	orange	Ap, Km, Pg	ja
Klon AMB02	#	violett	Ap, Lu, Km, Qu, Pg, Cy	ja
<i>G. jamesonii</i>	#	orange	Km, Pg	nein
Kleopatra	#	rot	Km, Pg	nein
Hera	#	rot	Km, Qu, Pg, Cy	nein

Genbezeichnungen :

- fns* Flavonsynthase II
- f3'h* Flavonoid 3'-Hydroxylase
- x* Hemmfaktor der F3'H
- +
- dominant
- # nicht bekannt

- b. Biochemisch charakterisierte Selbstungsnachkommenschaft von „Th 58“ (Genotyp *fns*<sup>+</sup> *fns*) (147-1..). Fettgedruckte Linien wurden für weitere Selbstungen verwendet.

Linie	Pg	Cy	Ap	Lu	Km	Qu	Enzymaktivität im FNS II Test (%dpm) <sup>a</sup>	F3'H Aktivität	postulierter Genotyp
147-100	+	-	+	-	+	-	71	-	<i>fns</i> <sup>+</sup> <i>fns</i> <sup>+</sup>
147-101	+	+	+	+	+	+	45	+	<i>fns</i> <sup>+</sup> <i>fns</i>
147-102	+	+	+	+	+	+	41	+	<i>fns</i> <sup>+</sup> <i>fns</i>
147-103	+	+	+	+	+	+	34	+	<i>fns</i> <sup>+</sup> <i>fns</i>
147-104	+	-	-	-	+	-	0	-	<i>fns</i> <i>fns</i>
147-105	+	-	-	-	+	-	0	-	<i>fns</i> <i>fns</i>
147-106	+	+	+	+	+	+	74	+	<i>fns</i> <sup>+</sup> <i>fns</i> <sup>+</sup>
147-107	+	-	+	-	+	-	29	-	<i>fns</i> <sup>+</sup> <i>fns</i>
147-108	+	-	+	-	+	-	38	-	<i>fns</i> <sup>+</sup> <i>fns</i>
147-109	+	+	-	-	+	+	0	+	<i>fns</i> <i>fns</i>
147-110	+	-	+	-	+	-	76	-	<i>fns</i> <sup>+</sup> <i>fns</i> <sup>+</sup>
147-111	+	-	+	-	+	-	40	-	<i>fns</i> <sup>+</sup> <i>fns</i>
147-112	+	-	+	-	+	-	70	-	<i>fns</i> <sup>+</sup> <i>fns</i> <sup>+</sup>
147-113	+	+	+	+	+	+	67	+	<i>fns</i> <sup>+</sup> <i>fns</i> <sup>+</sup>
<b>147-114</b>	+	+	-	-	+	+	<b>0</b>	+	<b><i>fns</i> <i>fns</i></b>
147-115	+	-	+	-	+	-	34	-	<i>fns</i> <sup>+</sup> <i>fns</i>
147-116	+	+	-	-	+	+	0	+	<i>fns</i> <i>fns</i>
147-117	+	+	-	-	+	+	0	+	<i>fns</i> <i>fns</i>
147-118	+	-	-	-	+	-	0	-	<i>fns</i> <i>fns</i>
147-119	+	-	+	-	+	-	68	-	<i>fns</i> <sup>+</sup> <i>fns</i> <sup>+</sup>
<b>147-120</b>	+	-	+	-	+	-	<b>58</b>	-	<b><i>fns</i><sup>+</sup> <i>fns</i><sup>+</sup></b>
147-121	+	+	+	+	+	+	84	+	<i>fns</i> <sup>+</sup> <i>fns</i> <sup>+</sup>
147-122	+	+	-	-	+	+	0	+	<i>fns</i> <i>fns</i>
147-123	+	-	+	-	+	-	31	-	<i>fns</i> <sup>+</sup> <i>fns</i>
147-124	+	-	+	-	+	-	52	-	<i>fns</i> <sup>+</sup> <i>fns</i> <sup>+</sup>
<b>147-125</b>	+	+	+	+	+	+	<b>29</b>	+	<b><i>fns</i><sup>+</sup> <i>fns</i></b>
147-126	+	-	+	-	+	-	41	-	<i>fns</i> <sup>+</sup> <i>fns</i>
147-127	+	-	+	-	+	-	32	-	<i>fns</i> <sup>+</sup> <i>fns</i>
147-128	+	-	-	-	+	-	0	-	<i>fns</i> <i>fns</i>
147-129	+	-	+	-	+	-	38	-	<i>fns</i> <sup>+</sup> <i>fns</i>
147-130	+	+	+	+	+	+	53	+	<i>fns</i> <sup>+</sup> <i>fns</i> <sup>+</sup>

Linie	Pg	Cy	Ap	Lu	Km	Qu	Enzymaktivität im FNS II Test (%dpm) <sup>a</sup>	F3'H Aktivität	postulierter Genotyp
147-131	+	+	+	+	+	+	26	+	fns <sup>+</sup> fns
147-132	+	-	-	-	+	-	0	-	fns fns
147-133	+	+	-	-	+	+	0	+	fns fns
147-134	+	-	+	-	+	-	43	-	fns <sup>+</sup> fns
147-135	+	-	+	-	+	-	16	-	fns <sup>+</sup> fns
147-136	+	+	+	+	+	+	48	+	fns <sup>+</sup> fns
147-137	+	+	-	-	+	+	0	+	fns fns
147-138	+	+	+	+	+	+	35	+	fns <sup>+</sup> fns
147-139	+	+	-	-	+	+	0	+	fns fns
147-140	+	-	+	-	+	-	69	-	fns <sup>+</sup> fns <sup>+</sup>
147-141	+	+	+	+	+	+	14	+	fns <sup>+</sup> fns
147-142	+	-	+	-	+	-	50	-	fns <sup>+</sup> fns
147-143	+	-	+	-	+	-	27	-	fns <sup>+</sup> fns
147-144	+	+	+	+	+	+	36	+	fns <sup>+</sup> fns
147-145	+	+	+	+	+	+	77	+	fns <sup>+</sup> fns <sup>+</sup>
147-146	+	-	-	-	+	-	0	-	fns fns
147-147	+	-	+	-	+	-	36	-	fns <sup>+</sup> fns
147-148	+	+	+	+	+	+	53	+	fns <sup>+</sup> fns <sup>+</sup>
147-149	+	-	+	-	+	-	38	-	fns <sup>+</sup> fns
147-150	+	-	+	-	+	-	28	-	fns <sup>+</sup> fns
147-151	+	-	+	-	+	-	19	-	fns <sup>+</sup> fns
147-152	+	+	+	+	+	+	26	+	fns <sup>+</sup> fns
147-153	+	+	+	+	+	+	63	+	fns <sup>+</sup> fns <sup>+</sup>
147-154	+	+	+	+	+	+	63	+	fns <sup>+</sup> fns <sup>+</sup>
147-155	+	-	+	-	+	-	35	-	fns <sup>+</sup> fns
147-156	+	-	+	-	+	-	45	-	fns <sup>+</sup> fns
147-157	+	-	+	-	+	-	38	-	fns <sup>+</sup> fns
147-158	+	+	+	+	+	+	46	+	fns <sup>+</sup> fns
147-159	+	-	-	-	+	-	0	-	fns fns
147-160	+	-	+	-	+	-	38	-	fns <sup>+</sup> fns
147-161	+	+	+	+	+	+	33	+	fns <sup>+</sup> fns
147-162	+	+	-	-	+	+	0	+	fns fns
147-163	+	+	+	+	+	+	65	+	fns <sup>+</sup> fns <sup>+</sup>

<sup>a</sup> bei vorhandener F3'H Aktivität wurde die Summe aus allen entstandenen Flavononen zur Ermittlung der FNS II Aktivität verwendet.

- c. Biochemisch charakterisierte Selbstungsnachkommenschaft von „147-120“ (postulierter Genotyp *fns<sup>+</sup> fns<sup>+</sup>*) (147-2..).

Linie	Flavonhaltig	Enzymaktivität im FNS II Test (%dpm) <sup>a</sup>	F3'H Aktivität
147-200	ja	n.u.	n.u.
147-201	ja	63	-
147-202	ja	65	+
147-203	ja	n.u.	n.u.
147-204	ja	54	-
147-205	ja	n.u.	n.u.
147-206	ja	65	-
147-207	ja	51	+
147-208	ja	n.u.	n.u.
147-209	ja	59	-
147-210	ja	69	+
147-211	ja	n.u.	n.u.
147-212	ja	50	-
147-213	ja	n.u.	n.u.
147-214	ja	62	-
147-215	ja	n.u.	n.u.
147-216	ja	n.u.	n.u.

- <sup>a</sup> bei vorhandener F3'H Aktivität wurde die Summe aus allen entstandenen Flavonen zur Ermittlung der FNS II Aktivität verwendet.

n.u. nicht untersucht

- d. Biochemisch charakterisierte Selbstungsnachkommenschaft von „147-125“ (postulierter Genotyp *fns*<sup>+</sup> *fns*) (147-3..).

Linie	Flavonhaltig	Enzymaktivität im FNS II Test (% dpm) <sup>a</sup>	F3'H Aktivität
147-300	ja	55	-
147-301	ja	45	+
147-302	nein	0	-
147-303	ja	33	-
147-304	ja	61	-
147-305	ja	23	+
147-306	nein	0	+
147-307	ja	45	-
147-308	ja	57	+
147-309	nein	0	-
147-310	ja	51	-
147-311	ja	34	-
147-312	nein	0	+
147-313	nein	0	-
147-314	ja	64	+
147-315	ja	40	-
147-316	nein	0	-
147-317	ja	56	-
147-318	nein	0	+
147-319	ja	34	+
147-320	ja	39	-
147-321	nein	0	-
147-322	ja	47	+
147-323	ja	69	-
147-324	ja	30	-
147-325	nein	0	+
147-326	ja	15	-

- <sup>a</sup> bei vorhandener F3'H Aktivität wurde die Summe aus allen entstandenen Flavonen zur Ermittlung der FNS II Aktivität verwendet.

- e. Biochemisch charakterisierte Selbstungsnachkommenschaft von „147-114“ (postulierter Genotyp *fns fns*) (147-4..).

Linie	Flavonhaltig	Enzymaktivität im FNS II Test (%dpm) <sup>a</sup>	F3'H Aktivität
147-400	nein	0	-
147-401	nein	0	+
147-402	nein	n.u.	n.u.
147-403	nein	0	-
147-404	nein	n.u.	n.u.
147-405	nein	0	+
147-406	nein	n.u.	n.u.
147-407	nein	0	-
147-408	nein	n.u.	n.u.
147-409	nein	n.u.	n.u.
147-410	nein	0	-
147-411	nein	0	+
147-412	nein	n.u.	n.u.
147-413	nein	n.u.	n.u.
147-414	nein	n.u.	n.u.
147-415	nein	0	+
147-416	nein	n.u.	n.u.
147-417	nein	0	-
147-418	nein	n.u.	n.u.
147-419	nein	0	-
147-420	nein	0	-
147-421	nein	n.u.	n.u.
147-422	nein	0	+
147-423	nein	n.u.	n.u.
147-424	nein	0	-
147-425	nein	n.u.	n.u.
147-426	nein	n.u.	n.u.
147-427	nein	0	+
147-428	nein	n.u.	n.u.
147-429	nein	0	-
147-430	nein	n.u.	n.u.
147-431	nein	n.u.	n.u.
147-432	nein	0	-

<sup>a</sup> bei vorhandener F3'H Aktivität wurde die Summe aus allen entstandenen Flavonen zur Ermittlung der FNS II Aktivität verwendet.

n.u. nicht untersucht

## A2. Übersicht der verwendeten PCR-Primer

Name	Nukleotidsequenz
Oligo A	5'-TTTTTTTTTTTTTMA-3'
Oligo C	5'-TTTTTTTTTTTTTMC-3'
Oligo G	5'-TTTTTTTTTTTTTMG-3'
Decamer 1	5'- CGCCATTTGG -3'
Decamer 2	5'- CGCCATTCGG -3'
Decamer 3	5'- CGCCCTTTGG -3'
Decamer 4	5'- CGCCCTTCGG -3'
Decamer 5	5'- CGCCGTTTGG -3'
Decamer 6	5'- CGCCGTCGG -3'
Decamer 7	5'- CGCCTTTTGG -3'
Decamer 8	5'- CGCCTTCGG -3'
GSP1	5'- AGTCG TTCACCTACAACATCCC -3'
GSP2	5'- ATTAACACCAGGACACCCTCTC -3'
GSP3	5'- CTCCTCCCCGTCCCAAAGGCG -3'
GSP4	5'- TAACACCAGGACACCCTCTCCTCCC -3'
GSP5	5'- TGCATACCCAAGATATACGATAAGC -3'
GSP6	5'- TTCAAACACGTGAGTCCCAAAGG -3'
GSP7	5'- ATCTTCAAAGTGTTTCCTCGTTCC -3'
GSP8	5'- AATGGAACACACACAAAATCTACC -3'
GSP9	5'- TCACCACTGAGAGTTCTCTCATGG -3'
AAP	5'- GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIIG-3'
backrace	5'- GCCACGCGTCGACTAGTACG -3'
Oligo (dT) Anker	5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTV-3'
PCR-Primer	5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3'
CypFNS1H	5'- CAAAGGATCCCAACACCATGAATACTCC-3'
CypFNS1R	5'- AGATAGACCGACTGCCATCAAGAAAGC -3'
prAUg5'	5'- GCTATGACCATGATTACGCCAAGC -3'
prUAg3'	5'- TGTA AAACGACGGCCAGTGAA -3'

M = A, C, G-Wobble

I = Inosin

A3. Nukleinsäuresequenzen mit abgeleiteter Aminosäuresequenz der verschiedenen erhaltenen PCR-Fragmente

Legende :

**Fett** : PCR Primer.

**Unterstrichen** : Start- und Stopkodon.

**Doppelt unterstrichen** : potentielle Sauerstoff-Bindungsregion.

**Cyt P450 Fingerprint - Häm-Bindungsstelle**

**hydrophobe Aminosäuren im Bereich des Membranankers**

**Prolin-reiche Region**

**konservierte Bereiche bekannter Cyt P450 mit unbekannter Funktion**

a. Differential Display Fragment CypDDd7a, einschließlich der für ein 5'-RACE abgeleiteten genspezifischen Primer.

```

P F G T G R R G C P G V N L A M R E L S V V I A N L I 27
CCTTTTGGGACGGGAGGAGAGGGTGTCTGGTGTAAATTGGCCATGAGAGAACTCTCAGTGGTGATTGCAAACCTCAT 80
D7> <GSP9
Q C F D W D V V G E R L L N T D E R A G L T A P R A 53
ACAATGCTTTGATTGGGATGTTGTAGGTGAACGACTATTGAATACAGATGAACGTGCTGGATTGACGGCTCCAAGGGCGG 160

V D F V C V P L E R G N T L K I L G S N * 74
TAGATTTTGTGTGTGTTCCATTGGAACGAGGAAACACTTTGAAGATTCTTGGTTCAAACTAAATTTATTTGTTGTTGCTT 240
<GSP8 <GSP7
TCTTGATGGCAGTCGGTCTATCTATAGGTCATAATACCTTGGGACTCACGTGTTTGAATCTTAATACGCTTTTAGTACAT 320

TGCTTATCGTATATCTTGGGTATGCATGAAAAAAAAAAAA 359
<Oligo A

```

b. 5'-RACE Fragment CypTÁBATA

**M N T L Q L I F L L F F F P T L L F L** 19  
 ATGTCCTAACACAACCCCAACACC**ATGA**ATACACTCCAACCTCATCTTCTCTCTTCTTCTTCCCAACCTTACTCTTCTCTC 80  
  
**Y C L P Y K R N Q N H R R L P P S P P S F P I I G H L** 46  
 TACTGTCTCCCCTACAAAAGAAACCAAAACCACCGCCGTCTTCCGCCGTCCCCGCCATCTTTTCCGATCATCGGCCACCT 160  
  
**H H L G P L I H Q S F H A L S T R Y G S L I H L R L** 72  
 CCACCATCTGGCCCACTCATCCACCAATCCTTCCACGCTCTCTCCACTCGCTACGGCTCTCTAATCCACCTCCGTCTCG 240  
  
**G S V P C V V V S T P D L A K D F L K T N E L A F S S** 99  
 GCTCAGTCCCATCGCTCGTCTTCAACCCAGACCTCGCAAAGACTTCTCTCAAAACAAACGAACCTCGCGTTCTCATCA 320  
  
**R K H S L A I D H I T Y G V A F A F A P Y G T Y W K F** 126  
 AGAAAACACTCCTTAGCCATCGACCACATCACCTATGGCGTAGCATTTGCATTGCGACCATATGGAACCTTACTGGAAGTT 400  
  
**I K K L F T V E L L G T Q N L S H F L P I R T H E I** 152  
 CATCAAGAAACTCTTACAGTGGAGCTTTTGGGCACCCAGAATCTCAGCATTCTCTACCCATTCTGAACCCATGAAATTC 480  
  
**R E L L R T L M V K S R A K E R V N L T E E L L K L T** 179  
 GCGAGCTTCTTCGAACGTTAATGGTGAAATCTAGGGCAAAGGAGAGATAAACTTGACGGAAGAGTTGTTGAAGTTGACC 560  
  
**N N V I S Q M M M S I R C S G T N S E A D E A K N L V** 206  
 AACAATGTGATAAGTCAAATGATGATGAGCATTAGGTGTTCCGGGACGAATAGTGAGGCTGATGAAGCAAAGAATCTTGT 640  
  
**R E V T K I F G Q F N V S D F I W F C K N I D L Q G** 232  
 TCGGGAAGTGACCAAAATTTTGGACAGTTTAATGTTTCAGATTTTCATATGGTTTTGTAAGAACATAGATTTGCAAGGGT 720  
  
**F K K R Y E G T H R R Y D A L L E R I I M G R E E N R** 259  
 TTAAGAAGAGGTACGAGGGTACACATAGAAGATATGATGCTTTGCTTGAAAGGATTATAATGGGGAGGGAAGAAAATAGA 800  
  
**R R G K I K D G E G K D F L D M L L D V L E D G K A E** 286  
 AGAAGAGGGAAGATAAAAGATGGTGAAGGGAAGATTTTCTTGATATGTTACTTGATGTTTTGGAGGATGGTAAGGCAGA 880  
  
**I K I T R D H I K A L I L D F L T A G T D T T A I A** 312  
 GATTAATAATTACTAGAGACCACATCAAAGCCTTGATTTTGGACTTCTTACAGCTGGGACGGATAACCACCGGATTGCAA 960  
  
**I E W A L V E L I N N P N A L E K A R Q E I D Q V I G** 339  
 TTGAATGGGCACTAGTCAATTGATAAACAACCCGAACGCTCTCGAGAAAGCAAGACAAGAGATTGATCAGGTCATCGGT 1040  
  
**D E R L V Q E S D T P N L P Y I Q A I I K E A L R L H** 366  
 GATGAGAGGCTAGTTCAAGAATCAGACACGCCTAACCTCCCTTATATCCAAGCTATCATAAAGGAAGCCCTACGACTTCA 1120  
  
**P P I P M L I R K S T E N V I V Q G Y D I P A G T L** 392  
 CCCACCAATCCCAATGTTGATTCGCAAGTCAACAGAAAATGTAATGTTTCAGGGGTATGACATCCAGCCGGCACCTTGT 1200  
  
**L F V N I W S I G R N P Q C W E T P L E F K P H R F L** 419  
 TGTTTGTCAATATTTGGTCCATTGGAAGAAACCCTCAATGTTGGGAAACCCTTTAGAGTTCAAGCCTCATCGGTTTTTG 1280  
  
**D G G D L K S S L D I K G H N F Q L L P F G T G R R G** 446  
 GATGGTGGTGACCTTAAAGCTCTTTAGATATTAAGGCCACAATTTTCAACTATGTCCTTTTGGGACGGGGAGGAGAGG 1360  
  
**C P G V N L A M R E L S V V** 460  
 GTGTCCTGGTGTAAATTTGGCCATGAGAGA**ACTCTCAGTGGTGA** 1404  
 <GSP9

c. CYP93B2, vollständige Sequenz (GenBank AF156976), einschließlich aller wesentlichen Primer.

```

M N T L Q L I F L L F F F P T L L F L 19
ATGTCCTAACACAACCCAAACACCATGAATACACTCCAACCTCATCTTCCTCCTCTTCTTCTTCCCAACCTTACTCTTCCTC 80
CypFNS1H>
Y C L P Y K R N Q N H R R L P P S P P S F P I I G H L 46
TACTGTCTCCCTACAAAAGAAACCAAAACCACCGCCGCTTCCGCCGCTCCCGCCATCTTTTCCGATCATCGGCCACCT 160

H H L G P L I H Q S F H A L S T R Y G S L I H L R L 72
CCACCATCTGGCCCACTCATCCACCAATCCTTCCACGCTCTCTCCACTCGCTACGGCTCTCTAATCCACCTCCGCTCTCG 240

G S V P C V V V S T P D L A K D F L K T N E L A F S S 99
GCTCAGTCCCATGCGTCGCTGTTTCAACCCAGACCTCGCCAAAGACTTCTCATAAACAAACGAACCTCGCGTTCTCATCA 320

R K H S L A I D H I T Y G V A F A F A P Y G T Y W K F 126
AGAAAACACTCCTTAGCCATCGACCACATCACCTATGGCGTAGCATTTGCATTGCGACCATATGGAACCTTACTGGAAGTT 400

I K K L F T V E L L G T Q N L S H F L P I R T H E I 152
CATCAAGAACTCTTACAGTGGAGCTTTTGGGCACCCAGAATCTCAGCCATTTCTACCATTTCGAACCCATGAAATTC 480

R E L L R T L M V K S R A K E R V N L T E E L L K L T 179
GCGAGCTTCTTCGAACGTTAATGGTGAATCTAGGGCAAAGGAGAGATAAACTTGACGGAAGAGTTGTTGAAGTTGACC 560

N N V I S Q M M M S I R C S G T N S E A D E A K N L V 206
AACAAATGTGATAAGTCAAATGATGATGAGCATTAGGTGTTCCGGGACGAATAGTGAGGCTGATGAAGCAAAGAATCTTGT 640

R E V T K I F G Q F N V S D F I W F C K N I D L Q G 232
TCGGGAAGTGACCAAAATTTTGGACAGTTAATGTTTCAGATTTTCATATGGTTTGTGAAGAACATAGATTTGCAAGGGT 720

F K K R Y E G T H R R Y D A L L E R I I M G R E E N R 259
TTAAGAAGAGGTACGAGGTACACATAGAAGATATGATGCTTTGCTTGAAGGATTATAATGGGGAGGAAGAAAATAGA 800

R R G K I K D G E G K D F L D M L L D V L E D G K A E 286
AGAAGAGGAAGATAAAAAGATGGTGAAGGAAAAGATTTTCTTGATATGTTACTTGATGTTTGGAGGATGGTAAGCAGA 880

I K I T R D H I K A L I L D F L T A G T D T T A I A 312
GATTAAAATTACTAGAGACCACATCAAAGCCTTGATTTTGGACTTTCTTACAGCTGGGACGGATAACCACCGGATTGCAA 960

I E W A L V E L I N N P N A L E K A R Q E I D Q V I G 339
TTGAATGGGCACTAGTCGAATTGATAAACCAACCCGAACGCTCTCGAGAAAGCAAGACAAGAGATTGATCAGGTATCGGT 1040

D E R L V Q E S D T P N L P Y I Q A I I K E A L R L H 366
GATGAGAGGCTAGTTCAAGAATCAGACACGCTAACCTCCCTTATATCCAAGCTATCATAAAGGAAGCCCTACGACTTCA 1120

P P I P M L I R K S T E N V I V Q G Y D I P A G T L 392
CCCACCAATCCCAATGTTGATTGCAAGTCAACAGAAAATGTAATGTTTCAGGGTATGACATCCAGCCGGCACCTTGT 1200

L F V N I W S I G R N P Q C W E T P L E F K P H R F L 419
TGTTTGTCAATATTTGGTCCATTGGAAGAAACCCTCAATGTTGGGAAACCCTTTAGAGTTCAAGCCTCATCGGTTTTTG 1280

D G G D L K S S L D I K G H N F Q L L P F G T G R R G 446
GATGGTGGTGACCTTAAAAGCTCTTTAGATATTAAGGCCACAATTTTCAACTATGCCTTTGGGACGGGGAGGAGAGG 1360
D7>
C P G V N L A M R E L S V V I A N L I Q C F D W D V 472
GTGTCCTGGTGTAAATTTGGCATGAGAGACTCTCAGTGGTGATTGCAAACCTCATACAATGCCTTTGATTGGGATGTTG 1440
<GSP9
V G E R L L N T D E R A G L T A P R A V D F V C V P L 499
TAGGTGAACGACTATTGAATACAGATGAACGTGCTGGATTGACGGCTCCAAGGGCGTAGATTTTGTGTGTTCCATTG 1520
<GSP8
E R G N T L K I L G S N * 511
GAACGAGGAAACACTTTGAAGATTCTTGGTTCAAACTAAATTTATTTGTTGTTGCTTTCTTGATGGCAGTCGGTCTATCT 1600
<GSP7 <CypFNS1R
ATAGGTATAATACCTTGGGACTCACGTGTTTGAATCTTAATACGCTTTTAGTACATTGCTTATCGTATATCTTGGGTAT 1680
GCATGAAAAAAAAA 1697
<Oligo A

```

A4. Beschreibungen und Referenzen der in Tabelle 11 bzw. Abb. 30 verwendeten Cyt P450.

Cytochrom	Funktion	Herkunft	Accession Nr.	Referenzen
P450 <sub>cam</sub>		<i>Pseudomonas putida</i>	P00183	POULOS et al., 1987
CYP73A4	C4H	<i>Catharanthus roseus</i>	Z32563	HOTZE et al., 1995
CYP73A12	C4H	<i>Zinnia elegans</i>	U19922	YE und VARNER, 1996
CYP73A14	C4H	<i>Glycyrrhiza echinata</i>	D87520	AKASHI et al., 1997
CYP75A1	F3',5'H	<i>Petunia Hybrida</i>	Z22545	HOLTON et al., 1993a
CYP75A8	F3',5'H	<i>C. roseus</i>	AJ011862	KALTENBACH et al., 1999
CYP75B2	F3'H	<i>P. Hybrida</i>	AF155332	BRUGLIERA et al., 1999
CYP74	AOS	<i>Linum usitatissimum</i>	U00428	SONG et al., 1993
CYP80	BS	<i>Berberis stolonifera</i>	U09610	KRAUSS und KUTCHAN, 1995
CYP84A2	F5H	<i>Lycopersicon esculentum</i>	AF150881	unveröffentlicht
CYP84A3	F5H	<i>Liquidambar styraciflua</i>	AF139532	OSAKABE et al., 1999
CYP93A1	???	<i>Glycine max</i>	D83968	SUZUKI et al., 1996
CYP93A2	???	<i>G. max</i>	D86351	SUZUKI et al., 1997
CYP93A3	D6aH	<i>G. max</i>	Y10492	SCHOPFER et al., 1998
CYP93B1	F2H	<i>G. echinata</i>	AB001380	AKASHI et al., 1997
CYP93B2	FNS II	<i>Gerbera Hybriden</i>	AF156976	MARTENS und FORKMANN, 1999
CYP93C1	2-HIS	<i>G. max</i>	AF022462	STEELE et al., 1999
CYP93C2	???	<i>G. echinata</i>	AB023636	unveröffentlicht
CYP93C3	???	<i>Cicer arietinum</i>	AJ243804	unveröffentlicht
CYP93E1	???	<i>G. max</i>	AF135485	STEELE et al., 1999

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gert Forkmann für die Überlassung des Themas, für sein entgegengebrachtes Vertrauen und für die ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Prof. Dr. Alfons Gierl danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Besonderer Dank gilt Dr. Christel Schopfer für die große Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bei der Etablierung des Cytochrom P450 spezifischen Differential Display, Sebastian Grün (Lehrstuhl für Genetik der TU München-Garching) für die Hilfe bei der Etablierung des Hefeexpressionssystems und Dr. Klaus Witter (Institut für Immunologie der LMU München) für die Hilfestellung hinsichtlich der RACE Methoden.

Bei Dr. Werner Heller (GSF, Oberschleißheim) bedanke ich mich für das Interesse an meiner Arbeit und die vielen hilfreichen Gespräche.

Bei Prof. Dr. Klaus Pantel (Institut für Onkologie, Universitätsklinik Eppendorf) möchte ich mich herzlich für die motivierenden Diskussionen und die vielen nützlichen Tips bezüglich verschiedener molekularer Arbeitsmethoden bedanken.

Weiterer Dank gilt Dr. P. Urban und Dr. D. Pompon für die Bereitstellung des Hefeexpressionssystems.

Für die Bereitstellung von *Gerbera* Pflanzenmaterial möchte ich Peter Ambrosius (Marbach am Neckar) und Friederike von Rundstedt (Bock Pflanzenexport KG, Bremen) danken.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern im Labor und der Gärtner Crew um Herrn Dinkel, die sich sehr sorgsam um das Pflanzenmaterial gekümmert haben.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Familien und allen Freunden bedanken, die mir in der gesamten Zeit eine wichtige Stütze waren.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten :

Name : Stefan Martens  
Geburtsdatum 27.06.1967  
Geburtsort : Hoya an der Weser  
Staatsangehörigkeit : deutsch  
Familienstand : verheiratet

### Schulbildung :

1973 bis 1977 Grundschule in Lemwerder  
1977 bis 1979 Orientierungsstufe in Lemwerder  
1979 bis 1987 Gymnasium a.d. Willmsstr. in Delmenhorst  
Abschluß : Allgemeine Hochschulreife

### Berufsausbildung und Studium :

10/1987 bis 10/1989 Ausbildung zum Gärtnergehilfen im Gartenbaubetrieb M. Hannig in Lemwerder, anschließende Tätigkeit als Gehilfe.  
11/1989 bis 9/1995 Studium der Gartenbauwissenschaften an der Technischen Universität München in Freising-Weihenstephan.  
1995 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, Lehrgebiet Pflanzenzüchtung : "Flavonoid Biosynthese in *Gerbera* : Enzymatische Characterization der Chalconsynthase, Flavanon 3-hydroxylase und Flavonsynthese II."  
Abschluß : Dipl.-Ing. agr. Univ.  
10/1995-4/1996 : Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemische Pflanzenpathologie der GSF Neuherberg, AK BIOP.  
seit 5/1996 : Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau