

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
LEHRSTUHL FÜR ZIERPFLANZENBAU

**Klonierung und Charakterisierung der Flavonoid 3'-Hydroxylase und  
der Flavonoid 3',5'-Hydroxylase**

**Christian Eder**

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

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

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

Die Dissertation wurde am 13.06.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 27.08.2001 angenommen.

**Für meine Mutter**

**Abbildungsverzeichnis .....IV**

**Tabellenverzeichnis ..... V**

**Abkürzungen ..... VI**

**A. Einleitung ..... 1**

**A.1 Flavonoide ..... 1**

    A.1.1 Bedeutung der Flavonoide ..... 2

    A.1.2 Flavonoidbiosyntheseweg..... 10

    A.1.3 Funktion der Flavonoid 3'- und der Flavonoid 3',5'-Hydroxylase ..... 12

**A.2 Blütenfarbstoffe ..... 15**

    A.2.1 Anthocyane ..... 18

**A.3 Cytochrom P450-Enzyme ..... 24**

    A.3.1 Pflanzliche Cytochrom P450 ..... 29

**A.4 Zielsetzung der Arbeit ..... 32**

**B. Material und Methoden ..... 33**

**B.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Enzyme und Radioisotope ..... 33**

**B.2 Pflanzenmaterial ..... 35**

    B.2.1 *Callistephus chinensis* (Sommeraster) ..... 35

    B.2.2 *Matthiola incana* (Gartenlevkoje)..... 36

    B.2.3 *Pelargonium zonale x hybridum* (Pelargonien)..... 38

    B.2.4 *Lycianthes rantonnetii* (Enzianstrauch) ..... 39

    B.2.5 Weitere Pflanzen ..... 39

**B.3 Bakterienstämme, Phagen und Plasmide..... 40**

    B.3.1 Bakterienstämme ..... 40

    B.3.2 Bakteriophagen ..... 41

    B.3.3 Plasmide ..... 41

    B.3.4 Anzucht und Transformation von Bakterien..... 42

**B.4 Hefen und Hefevektoren..... 44**

    B.4.1 Hefestämme ..... 44

    B.4.2 Hefeexpressionsvektoren ..... 45

    B.4.3 Anzucht, Transformation und Induktion von Hefen ..... 46

        B.4.3.1 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae* ..... 46

        B.4.3.2 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* ..... 47

        B.4.3.3 Induktion von transformierten *Saccharomyces cerevisiae*..... 48

**B.5 Molekularbiologische Methoden ..... 49**

    B.5.1 Isolation von Pflanzen-RNA und *Northernblot*-Analyse..... 49

        B.5.1.1 Isolation von Gesamt-RNA ..... 49

        B.5.1.2 Isolation von mRNA ..... 51

        B.5.1.3 *Northernblot*-Analyse ..... 51

    B.5.2 Isolation von genomischer DNA und *Southernblot*-Analyse ..... 51

    B.5.3 *Dotblot*-Analyse ..... 52

        B.5.3.1 Synthese von radioaktiv markierter erststrang cDNA ..... 52

        B.5.3.2 *Dot-Blotting* ..... 52

    B.5.4 *Screening* einer cDNA-Genbank ..... 53

        B.5.4.1 cDNA-Genbank der Sommeraster (*Callistephus chinensis*)..... 53

B.5.4.2 Anfertigen von Membranabdrücken und Hybridisierung .....	54
B.5.4.3 Identifizierung positiver Plaques und weitere <i>Screening</i> -Runden .....	54
B.5.4.4 Isolation von Phagen DNA und Insertverifikation.....	54
B.5.5 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Molekülen .....	55
B.5.5.1 Hybridisierungssonden.....	55
B.5.5.2 Hybridisierungsbedingungen .....	55
B.5.5.3 PC gestützte Auswertung von Autoradiogrammen.....	56
B.5.6 PCR-Techniken und reverse Transkription.....	57
B.5.6.1 Synthetische Oligonukleotide .....	57
B.5.6.2 Reverse Transkription .....	57
B.5.6.3 Standard-, Gradienten- und One-Tube RT-PCR.....	58
B.5.6.4 PCR mit <i>CYP</i> -spezifischen Primern.....	59
B.5.7 Subtraktive Hybridisierung zweier differentieller cDNA-Populationen .....	60
B.5.8 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE).....	66
B.5.8.1 5'-RACE mit A- und C-Tailing .....	66
B.5.8.2 RLM-RACE .....	67
B.5.8.3 3'-RACE .....	69
B.5.9 DNA-Klonierungstechniken .....	69
B.5.9.1 Klonierung von PCR-Produkten .....	69
B.5.9.2 Subklonierung in vorgeschchnittene Plasmide .....	70
B.5.9.3 Präparation von Plasmid-DNA .....	71
B.5.10 DNA-Sequenzierung.....	71
B.5.11 Transformation von Blütenblättern mit der Partikelkanone .....	71
B.5.12 Heterologe Genexpression in Hefe .....	73
B.5.13 Allgemeine molekularbiologische Standardmethoden .....	73
<b>B.6 Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>73</b>
B.6.1 Präparation von Hefemikrosomen .....	73
B.6.2 Cytochrom P450 Enzymtests .....	75
B.6.2.1 <i>In vivo</i> Enzymtests (Bioconversion) .....	75
B.6.2.2 <i>In vitro</i> Enzymtests mit Hefemikrosomen .....	76
B.6.2.3 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität der F3'H und der F3',5'H.....	76
B.6.3 Bestimmung der Cytochrom P450-Reduktase-Aktivität .....	77
B.6.4 Proteinbestimmung .....	77
<b>B.7 Computeranalysen .....</b>	<b>78</b>
<b>C. Ergebnisse .....</b>	<b>79</b>
<b>C.1 Ansatz zur Klonierung der F3'H bei <i>Matthiola incana</i> durch subtraktive Hybridisierung zweier differentieller cDNA-Populationen.....</b>	<b>79</b>
C.1.1 Isolierung von <i>CYP</i> -spezifischen cDNA-Fragmenten .....	79
C.1.2 Verifikation der <i>CYP</i> -cDNA-Fragmente durch <i>Northern</i> blot-Analyse .....	80
C.1.3 Schnelle Amplifikation der cDNA-Enden (RACE) der isolierten Fragmente.....	82
C.1.4 Verifikation der vollständigen cDNA-Klone.....	83
<b>C.2 Klonierung einer F3'- und/oder einer F3',5'H durch heterologes <i>Screening</i> der cDNA-Genbank von <i>Callistephus chinensis</i> .....</b>	<b>85</b>
C.2.1 RLM-RACE zur Gewinnung eines „full-length“ cDNA-Klons .....	88
<b>C.3 Klonierung der F3',5'H aus <i>Lycianthes rantonnetii</i> durch PCR-Amplifikation mit einem F3',5'H-spezifischen Primer .....</b>	<b>90</b>
C.3.1 Verifikation <i>CYP</i> -spezifischer Fragmente .....	91
C.3.2 RLM-RACE eines putativen F3',5'H cDNA Klons .....	92

<b>C.4 Ansatz zur Klonierung einer F3',5'H bei <i>Pelargonium zonale</i> durch PCR-Amplifikation mit einem F3',5'H-spezifischen Primer .....</b>	<b>94</b>
C.4.1 Verifikation <i>CYP</i> -spezifischer Fragmente .....	95
C.4.2 RLM-RACE eines putativen F3'H cDNA-Klons .....	97
<b>C.5 Ansatz zur Klonierung der F3'H bei <i>Matthiola incana</i> durch differentielle PCR-Amplifikation mit einem F3',5'H-spezifischen Primer .....</b>	<b>98</b>
C.5.1 Differentielle PCR-Amplifikation.....	100
C.5.2 Verifikation eines putativen F3'H-cDNA-Fragments.....	102
C.5.3 RLM-RACE eines putativen F3'H cDNA-Klons .....	103
<b>C.6 Klonierung weiterer F3'H- und F3',5'H-spezifischer cDNA-Fragmente aus weiteren Pflanzen.....</b>	<b>104</b>
<b>C.7 Sequenzanalyse von F3'H- und F3',5'H-cDNA .....</b>	<b>105</b>
<b>C.8 Heterologe Expression der klonierten „full-length“ cDNA-Klone in Hefe .....</b>	<b>107</b>
C.8.1 Nachweis der CPR-Aktivität in Hefemikrosomen.....	107
C.8.2 Heterologe Expression der putativen F3'H-cDNA-Klone aus <i>Callistephus chinensis</i> in Hefe.....	109
C.8.3 Heterologe Expression des putativen F3',5'H-cDNA-Klons <i>CYPLrpHf2</i> aus <i>Lycianthes rantonnetii</i> in Hefe .....	116
C.8.4 Heterologe Expression des putativen F3'H-cDNA-Klons <i>CYPPzpHt2</i> aus <i>Pelargonium zonale</i> in Hefe .....	117
C.8.5 Heterologe Expression des putativen F3'H-cDNA-Klons <i>CYPL4pHt</i> aus <i>Matthiola incana</i> in Hefe.....	120
<b>D. Diskussion.....</b>	<b>122</b>
<b>D.1 Klonierung einer F3'H-cDNA aus <i>Matthiola incana</i> .....</b>	<b>123</b>
<b>D.2 Klonierung zweier F3'H-spezifischer cDNAs aus <i>Callistephus chinensis</i>.....</b>	<b>125</b>
<b>D.3 Klonierung einer putativen F3',5'H-cDNA aus <i>Lycianthes rantonnetii</i>.....</b>	<b>128</b>
<b>D.4 Klonierung einer F3'H-cDNA aus <i>Pelargonium zonale</i> .....</b>	<b>130</b>
<b>D.5 Ableitung einer Proteinkonsensussequenz für die F3'H und für die F3',5'H... 132</b>	
D.5.1 Prolinreiche Region der isolierten CYP-Enzyme und 5'-RACE.....	136
<b>D.6 Phylogenetische Verwandtschaft der F3'H und der F3',5'H .....</b>	<b>138</b>
<b>D.7 Ausblick .....</b>	<b>141</b>
<b>E. Zusammenfassung .....</b>	<b>144</b>
<b>E. Summary .....</b>	<b>147</b>
<b>F. Literatur.....</b>	<b>149</b>
<b>G. Anhang .....</b>	<b>165</b>
<b>G.1 Verwendete Primer und Adapter.....</b>	<b>165</b>
<b>G.2. CYP-cDNA-Fragmente.....</b>	<b>166</b>
<b>G.3. „Full-length“ CYP-cDNA-Klone .....</b>	<b>169</b>
<b>G.4 Proteinalignments .....</b>	<b>175</b>
G.4.1 F3'H-Proteinalignment .....	175
G.4.2 F3',5'H-Proteinalignment.....	177
G.4.3 F3'- und F3',5'H-Proteinalignment.....	179
<b>G.5 Beschreibung der für die Nukleinsäure- und Proteinalignments verwendeten CYP-Enzyme .....</b>	<b>182</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>183</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>184</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Oxidationszustand des Heterocyclus der wichtigsten Flavonoidklassen.....	2
<b>Abb. 2:</b> Schematische Darstellung des allgemeinen Flavonoidbiosynthesewegs. ....	12
<b>Abb. 3:</b> Von der Flavonoid 3'- und von der F3',5'-Hydroxylase katalysierte Reaktionen im Flavonoidbiosyntheseweg.....	14
<b>Abb. 4:</b> Grundgerüst der natürlich vorkommenden Anthocyanidine (Flavylium-Kation). ....	19
<b>Abb. 5:</b> Apigenidin-Strukturen in wässrigen Lösungen bei verschiedenen pH-Werten.....	20
<b>Abb. 6:</b> Schematische Darstellung der typischen von Cytochrom P450-Enzymen katalysierten Reaktion. ...	24
<b>Abb. 7:</b> Katalytischer Zyklus der typischen Cytochrom P450-Reaktion .....	28
<b>Abb. 9:</b> <i>Callistephus chinensis</i> (Linie 01).....	35
<b>Abb. 10:</b> <i>Matthiola incana</i> (Linien 01-16).....	36
<b>Abb. 11:</b> <i>Pelargonium zonale</i> , Sorte Robe.....	38
<b>Abb. 12:</b> <i>Lycianthes rantonnetii</i> .....	39
<b>Abb. 13:</b> Hefeexpressionsvektoren pYES2 <sup>®</sup> und pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> .....	46
<b>Abb. 14:</b> Konstruktion von Reverse Transkriptase Primern für die cDNA-Synthese zweier differentieller mRNA-Populationen .....	61
<b>Abb. 15:</b> Schematische Darstellung der subtraktiven Hybridisierung zweier differentieller cDNA- Populationen. ....	64
<b>Abb. 16:</b> Northernblot-Analyse mit jeweils 10 µg mRNA der <i>M. incana</i> Linien 04 und 12.....	81
<b>Abb. 17:</b> Doppelte Membranabdrücke der zweiten Screening-Runde von einer im Phagen Lambda NM1149 erstellten cDNA-Bibliothek von <i>C. chinensis</i> .....	86
<b>Abb. 18:</b> Elektrophoretische Auftrennung (0,8 % Agarose) von isolierter rekombinanter Phagen-DNA nach einem <i>EcoRI</i> Restriktionsverdau. ....	87
<b>Abb. 19:</b> RLM-RACE des cDNA-Fragments <i>CYPCcpHt2</i> aus <i>C. chinensis</i> . ....	89
<b>Abb. 20:</b> Nukleinsäurealignment von sieben F3',5'H-cDNA-Sequenzen zur Anfertigung eines F3',5'H- spezifischen PCR-Primers. ....	90
<b>Abb. 21:</b> PCR-Amplifikation von cDNA aus <i>L. rantonnetii</i> mit den Primern HFDM und AUAP.....	91
<b>Abb. 22:</b> RLM-RACE des cDNA-Fragments <i>CYPLrpHf2</i> aus <i>L. rantonnetii</i> . ....	93
<b>Abb. 23:</b> PCR-Amplifikation von cDNA aus <i>P. zonale</i> mit den Primern HFDM und AUAP im Gradiententhermozykler .....	95
<b>Abb. 24:</b> Nukleinsäurealignment und Aminosäurealignment des ORF der PCR-Fragmente <i>CYPPzpHt1</i> und <i>CYPPzpHt2</i> aus <i>P. zonale</i> .....	96
<b>Abb. 25:</b> PCR-Amplifikation von cDNA aus <i>M. incana</i> (Linie 04) mit den Primern HFDM und AUAP im Gradiententhermozykler. ....	99
<b>Abb. 26:</b> Nukleinsäurealignment von fünf F3'H-cDNA-Sequenzen zur Anfertigung des F3'H-spezifischen PCR-Primers HTDM. ....	100
<b>Abb. 27:</b> Gradienten-PCR mit cDNA einer plus Linie mit F3'H-Aktivität (Linie 04) und einer minus Linie ohne F3'H-Aktivität (Linie 12).....	101
<b>Abb. 28:</b> Enzymtests zum Nachweis der Expression des cDNA-Klons <i>CYPCcpHt1</i> aus <i>C. chinensis</i> in transformierten Hefen im Vergleich zur Expression von Genen aus <i>L. rantonnetii</i> und <i>M. incana</i> . .....	110

<b>Abb. 29:</b> Dünnschichtchromatographische Analyse der durch die Expression von <i>CYPCcpHt1</i> aus <i>C. chinensis</i> in Hefemikrosomen aus [ <sup>14</sup> C]-Naringenin synthetisierten Produkte.....	111
<b>Abb. 30:</b> Bestimmung des Temperaturoptimums der F3',5'H CYPCcpHt1 aus <i>C. chinensis</i> .....	112
<b>Abb. 31:</b> Umsetzung von Dihydrokaempferol zu Dihydroquercetin durch den heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klon <i>CYPCcpHt1</i> aus <i>C. chinensis</i> .....	113
<b>Abb. 32:</b> Bildung von DHM aus DHK und DHQ durch den heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klon <i>CYPCcpHt1</i> aus <i>C. chinensis</i> .....	114
<b>Abb. 33:</b> <i>In vivo</i> Enzymtest (Bioconversion) mit <i>CYPLrpHf2</i> -pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup> -Konstrukt transformierten INVSc1-Kulturen.....	116
<b>Abb. 34:</b> Umsetzung von Naringenin zu Eriodictyol durch den heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klon <i>CYPPzpHt2</i> aus <i>Pelargonium zonale</i> .....	118
<b>Abb. 35:</b> Vergleich des Umsatzes von NAR und DHK durch den heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klon <i>CYPPzpHt2</i> aus <i>Pelargonium zonale</i> .....	119
<b>Abb. 36:</b> <i>In vivo</i> Enzymtest (Bioconversion) mit <i>CYPL4pHt</i> -pYES2 <sup>®</sup> -Konstrukt transformierten INVSc1-Kulturen.....	120
<b>Abb. 37:</b> Proteinalignment einer 22 AS umfassenden Region, die möglicherweise mit der 5'-Hydroxylierung in Zusammenhang steht.....	133

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Von Insekten bevorzugte Blütenfarbe und Vorkommen des entsprechenden Anthocyanidins.....	16
<b>Tab. 2:</b> Substitutionsmuster und Grundfarbton der häufigsten natürlich vorkommenden Anthocyanidine....	19
<b>Tab. 3:</b> Nomenklatur bei Cytochrom P450-Proteinen und -Nukleinsäuren.....	27
<b>Tab. 4:</b> Verwendete Radiochemikalien.....	34
<b>Tab. 5:</b> Charakterisierung homozygoter Genotypen von <i>M. incana</i> .....	37
<b>Tab. 6:</b> Verwendete Plasmide zur Klonierung von DNA-Molekülen.....	41
<b>Tab. 7:</b> CPR-Aktivität in den Mikrosomenfraktionen der verwendeten Hefestämme.....	45
<b>Tab. 8:</b> Bezugsquellen und wichtigste Parameter der verwendeten thermostabilen DNA-Polymerasen.....	58
<b>Tab. 9:</b> Homologiematrix der F3'H-Sequenzen.....	105
<b>Tab. 10:</b> Homologiematrix der F3',5'H-Sequenzen.....	106
<b>Tab. 11:</b> Nachweis der CPR-Aktivität in Hefemikrosomen.....	107
<b>Tab. 12:</b> Maximale Substratumsätze durch die F3',5'H CYPCcpHt1 aus <i>C. chinensis</i> .....	115

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Acc.	Zugangsnummer (accession number)
ANS	Anthocyanidinsynthase
AOS	Allenoxid Synthase
Ap	Apigenin
AS	Aminosäure
FLS	Flavonolsynthase
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
C4H	Zimtsäure 4-Hydroxylase
CAW	Laufmittel (Chloroform:Essigsäure:H <sub>2</sub> O)
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CHI	Chalkonisomerase
CHS	Chalkonsynthase
CoA	Coenzym A
CPR	Cytochrom P450-Reduktase
Cy	Cyanidin
Cyt b5	Cytochrom b5
Cyt c	Cytochrom c
CYP	Cytochrome P450 Protein oder mRNA
<i>CYP</i>	Cytochrome P450 genomische oder complementäre DNA
Da	Dalton
dATP	Deoxyadenosin 5'-triphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	Deoxycytidin 5'-triphosphat
DD-RT-PCR	Differential Display - Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction
DFR	Dihydroflavonol 4-Reduktase
DHK	Dihydrokaempferol
DHM	Dihydromyricetin
DHQ	Dihydroquercetin
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonukleinsäuretriphosphat
Dp	Delphinidin
dpm	Zerfälle pro Minute
dT	Deoxythymidin
E.C.	Enzyme Commission Number
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGME	Ethylenglykolmonomethylether
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERI	Eriodictyol
EtOAc	Ethylacetat
F2H	Flavanon 2-Hydroxylase
F3',5'H	Flavonoid 3',5'-Hydroxylase
F3'H	Flavonoid 3'-Hydroxylase
F5H	Ferulat 5-Hydroxylase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FGT	UDPG-Flavonoid-3-O-Glukosyltransferase



FHT	Flavanon 3-Hydroxylase
FLS	Flavonolsynthase
FMN	Flavinmononukleotid
FNS II	Flavonsynthase II
GSP	genspezifischer Primer
kDa	kilo Dalton
Lu	Luteolin
MeOH	Methanol
mRNA	Boten(messenger)-Ribonukleinsäure
Mv	Malvidin
My	Myricetin
NaCl	Natriumchlorid
NAD <sup>+</sup>	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid
NADH	reduzierte Form des NAD +
NADP <sup>+</sup>	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotidphosphat
NADPH	reduzierte Form des NADP +
NAR	Naringenin
OD600	Absorptionsstärke bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	Open Reading Frame = offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerase Ketten Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pg	Pelargonidin
PHF	Pentahydroxyflavanon
Pn	Päonidin
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Qu	Quercetin
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RE	Rohextrakt
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolution per minute)
RS	Restriktion
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TES	N-Tris[hydroxymethyl]methyl-2-aminoethan Hydrogensulfid
THC	Tetrahydroxychalkon
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit Enzymaktivität (μmol Substratumsatz/min)
UDPG	Uridin-5'-diphospho-Glukose-2-HIS 2-Hydroxyisoflavonsynthase
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen

Aminosäuren und Nukleotide sind im IUPAC-Code (**I**nternational **U**nion of **P**ure and **A**ppplied **C**hemistry) wiedergegeben. Alle verwendeten Basiseinheiten bzw. davon abgeleitete Einheiten entsprechen den Konventionen des SI-Systems (**S**ystème **I**nternational d'unités).

## A. Einleitung

Die Bedeutung der Flavonoid 3'- und der Flavonoid 3',5'-Hydroxylase lässt sich grundsätzlich von drei verschiedenen Gesichtspunkten aus betrachten.

Der erste, und wahrscheinlich bedeutungsvollste, besteht in der Auswirkung dieser Enzyme auf die Blütenfarben von Pflanzen. Kein anderes Enzym beeinflusst die Farbe von anthocyanhaltigen Blüten in solchem Ausmaß wie diese. Hauptsächlich durch ihre Aktivität können in Blüten intensive rote und blaue Farben erzeugt werden.

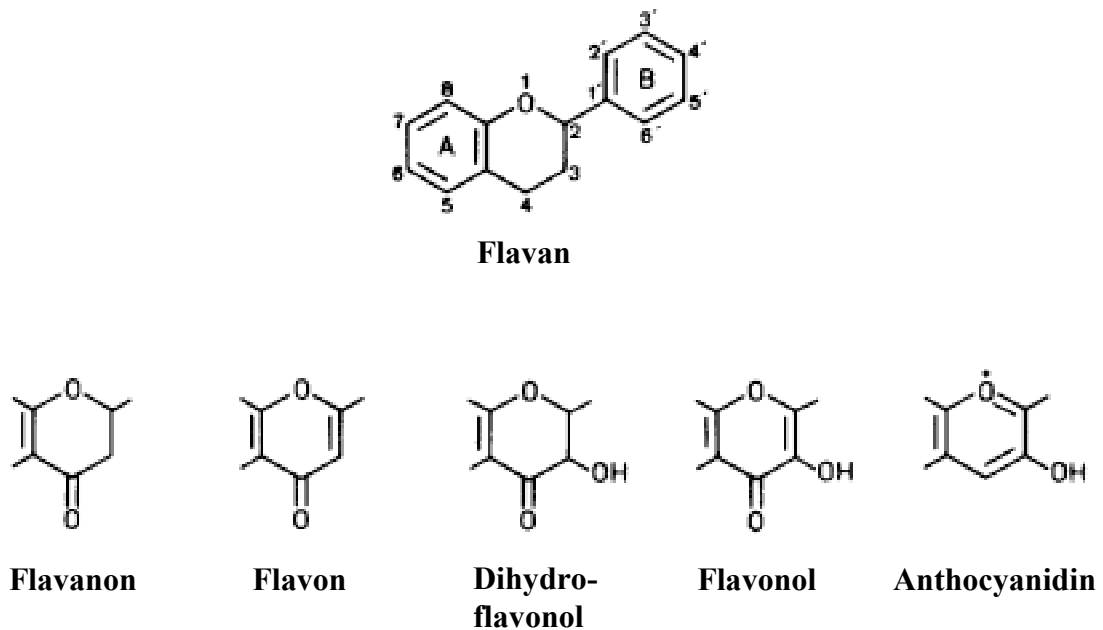
Der zweite Gesichtspunkt besteht in der von diesen Enzymen durchgeführten Modifikation des B-Rings bei Flavonoiden, die bezüglich der für das menschliche Auge sichtbaren Färbung von Blüten keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen, dafür aber andere wichtige Eigenschaften besitzen. Hierbei ist vor allem die Bedeutung dieser Flavonoide für die Pflanze in bezug auf die Anlockung von Bestäubern, den Schutz vor Strahlenschäden, Fäulnis, Schädlingsbefall und Tierfraß zu berücksichtigen. Darüber hinaus spielen verschiedene, zunehmend als Bioflavonoide bezeichnete Flavonoide bzw. deren Derivate eine wichtige Rolle in der menschlichen Ernährung und in der Medizin.

Der dritte Aspekt betrifft die Zugehörigkeit beider Enzyme zu den Cytochrom P450 Enzymen. Diese ubiquitär vorkommende Enzymgruppe katalysiert eine Vielfalt von chemischen Reaktionen im Primär- und Sekundärstoffwechsel aller Organismen und zeichnet sich einerseits durch ihre hohe Ähnlichkeit im Aufbau, andererseits durch die große Verschiedenartigkeit ihrer Funktionen aus.

### A.1 Flavonoide

Flavonoide stellen eine wichtige Gruppe sekundärer Pflanzenstoffe dar, deren Struktur sich vom C<sub>15</sub>-Flavangrundgerüst ableiten lässt (Abb. 1). Es besteht aus zwei aromatischen C<sub>6</sub>-Ringen und einem sauerstoffhaltigen Heterozyclus (Pyranring). Die einzelnen Gruppen der Flavonoide unterscheiden sich im Oxidationsgrad ihres zentralen Pyranrings. Die Vertreter einer Gruppe wiederum in der variierenden Zahl und Anordnung der Hydroxyl- und Alkylsubstituenten und der unterschiedlichen Art, Zahl und Stellung von Zuckerresten. Die meisten Flavonoide treten in der Pflanze in glykosidisch gebundener Form auf, was ihre Wasserlöslichkeit erheblich steigert.

Flavonoide absorbieren elektromagnetische Strahlung in einem Spektralbereich von 220-600 nm (Bohm, 1998). Bis 1999 konnten bereits über 6400 verschiedene Flavonoide identifiziert werden (Harborne und Williams, 2000).



**Abb. 1:** Oxidationszustand des Heterozyklus der wichtigsten Flavonoidklassen.

### A.1.1 Bedeutung der Flavonoide

Die Bedeutung der Flavonoide in der Natur ist so vielfältig, dass hier nur ein genereller Überblick über die wichtigsten Funktionen von Flavonoiden gegeben werden kann. Einzelnen Flavonoiden dabei eine spezifische Funktion zuzuordnen ist oft nicht möglich, weil es häufig vorkommt, dass ein und dasselbe Flavonoid in unterschiedlichen Organismen völlig verschiedene Aufgaben erfüllt. Außerdem ist es unter Umständen nicht möglich, sie isoliert und von anderen Faktoren losgelöst zu betrachten und zu bewerten.

Die auffälligste Funktion der Flavonoide stellt ohne Zweifel die Färbung von Blüten, Blättern und anderen Pflanzenteilen dar. Die Färbung von Blüten und Früchten, die dazu dient Bestäuber und Fruchtverbreiter anzulocken, wird eingehend in Kapitel A.2 (inkl. Unterkapitel) besprochen.

Weitere wichtige Aufgaben, die Flavonoide in Pflanzen übernehmen, sind im Einzelnen: der Schutz vor Strahlenschäden (v.a. UV-B-Strahlung), der Schutz vor Fäulnis, Fraß und Schädlingsbefall (v.a. Catechine und Isoflavone), die z.T. essentielle Rolle als Faktoren für Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum, die Funktion als Signalstoffe für die Modulation von Knöllchenbakterien bei Leguminosen und für die Eiablage bestimmter Insekten.

Die Färbung von Blättern und der Epidermis von Pflanzen durch Flavonoide dient vor allem dem Schutz vor Strahlenschäden. Dies umfasst sowohl den Schutz, insbesondere des Photosystems II vor Photooxidation bei „natürlicher“ Strahlenbelastung, als auch den Schutz der gesamten Pflanze bei verstärkter UV-B-Exposition.

Der gesamte UV-A Anteil (320-400 nm) und ein Teil des UV-B Anteils (280-320 nm) der von der Sonne abgestrahlten UV-Strahlung (100-400 nm) erreicht die Erdoberfläche. Der gesamte UV-C Anteil (100-280 nm) und ein Teil des kurzwelligen UV-B Anteils werden von der Ozonschicht absorbiert (Green, 1983; Robberecht, 1989). Das langwelligere UV-A verursacht „nur“ verhältnismäßig leichte photooxidative Schäden, während das energiereichere UV-B, neben Photooxidationen, stärkere Photoläsionen verursacht (Larcher, 1995). Diese Photoläsionen bestehen u.a. in der Sprengung von Disulfidbrücken bei Proteinen, Dimerisierung von Thymingruppen in der DNA, Schädigung des D1-Proteins des Photosystems II, der Rubisco und der Membranlipide, vor allem durch Peroxidation der Lipide (Rüeggsegger, 1996).

Flavonoide sind ebenso wie z.B. Ascorbinsäure, Tocopherole und Carotinoide in der Lage, als sogenannte „quencher“ reaktive Sauerstoffspezies wie z.B. hochreaktiven Singulett-Sauerstoff zu neutralisieren, oder als „scavenger“ (Radikalfänger) unter anderem Hydroxylradikale zu inaktivieren und somit photooxidative Schäden zu vermindern bzw. zu verhindern (Elstner, 1996). Die primäre Funktion der in der Epidermis akkumulierten Flavonoide besteht jedoch darin, zusammen mit den Epicuticularwachsen, den Großteil der schädlichen UV-B Strahlung zu absorbieren.

Versuche mit zwei *Arabidopsis*-Mutanten, die in einem Fall eine Chalkon-Synthase- und in dem anderen Fall eine Chalkon-Isomerase-Mutation aufwiesen und daher beide nicht in der Lage waren, nach UV-B-Bestrahlung Flavonoide zu akkumulieren, zeigten bei den Mutanten eine deutlich höhere UV-B-Sensibilität als der Wildtyp (Li et al., 1993). Versuche mit einer weiteren *Arabidopsis*-Mutante, welche keine Flavonoide nach UV-B-Bestrahlung akkumulierte, zeigten ebenfalls eine erhöhte UV-B-Empfindlichkeit, während sich die

Mutante in ihrer Empfindlichkeit gegenüber anderen Streßfaktoren wie z.B. Hitze, Hypoxia, Salz und Kälte nicht von dem Wildtyp unterschied (Lois und Buchanan, 1994).

Weitere Versuche mit dem *Arabidopsis*-Wildtyp zeigten bei UV-Bestrahlung mit verschiedenen Wellenlängen und Intensitäten unterschiedlich starke Zunahme an Flavonoidgehalt der Epidermis und bestätigten somit die übrigen Resultate (Lois, 1994).

Untersuchungen bei Raps (*Brassica napus*) zeigten eine Akkumulation von Flavonoiden in den Blättern nach UV-B-Bestrahlung (Wilson und Greenberg, 1993). In Versuchen, in denen Pflanzen mit monochromatischem Licht mit einer Wellenlänge von 298 nm bestrahlt wurden, konnte zum Teil schon nach wenigen Minuten Bestrahlungsdauer eine deutliche Akkumulation von Flavonoiden in den untersuchten Pflanzengeweben beobachtet werden. Bei einer Zellkultur von *Petroselinum crispum* erfolgte eine verstärkte Flavonoidakkumulation bereits nach wenigen Sekunden Bestrahlungsdauer (Beggs et al., 1986). Selbst bei UV-C-Bestrahlung im Wellenbereich von 220-280 nm konnte bei *Arbutus unedo* (Erdbeerbaum), ein vor allem im mediterranen Raum vorkommendes Heidekrautgewächs, eine u.a. durch Flavonoidakkumulation bedingte Absorption der UV-Strahlung durch die Blattepidermis von 90-95 % beobachtet werden (Wellmann, 1983). Bei dem Antarktismoos (*Bryum argenteum*) konnten jahreszeitliche Schwankungen des intrazellulären Gehaltes an Flavonglykosiden entsprechend der UV-Strahlenbelastung beobachtet werden und anhand von quantitativen Analysen aus gesammelten Herbariumproben die Jahre mit - durch das Ozonloch verursachter - erhöhter UV-Strahlenbelastung rekonstruiert werden (Markham et al., 1990). Des Weiteren zeigten Versuche, dass eine signifikante Akkumulation von Flavonoiden, die in der Lage sind, UV-B-Strahlung zu absorbieren, auch bei Pflanzen auftreten, die „natürlichem“ Starklicht, wie es z.B. an einem Sommermittag im Freien auftritt, ausgesetzt wurden (Teramuara, 1986).

Viele weitere Untersuchungen bestätigen die herausragende Bedeutung der Akkumulation von Flavonoiden als Schutz vor Strahlung in einem weiten Wellenlängenbereich, so dass einige Wissenschaftler darin die **ursprüngliche Bedeutung von Flavonoiden** für die frühe Entwicklung von terrestrischen Pflanzen sehen (Bohm, 1998).

Auch als Phytoalexine und Catechine (Vorstufe zahlreicher Gerbstoffe) spielen Flavonoide zum Schutz der Pflanze vor Pathogenbefall, Tierfraß und Fäulnis eine große Rolle. Aus Proanthocyanidinen können sogenannte kondensierte Gerbstoffe gebildet werden. Die dabei synthetisierten Oligo- bzw. Polymere werden durch Kondensation von zwei oder mehr Hydroxyflavanolen gebildet (Schweizer und Métraux, 1996).

So hat beispielsweise das in den Blattstielen der Erdnuss (*Arachis hypogaea*) gebildete Procyanidin eine stark fraßhemmende Wirkung auf die Röhrenlaus (*Apis craccivora*) (Harborne und Grayer, 1994). Die Wirkung der Gerbstoffe in ihren fraßhemmenden und pathogenabwehrenden Eigenschaften ist dabei vielfältig. In ihrer unlöslichen Form verleihen sie dem Pflanzengewebe Zähigkeit, was das Eindringen der Schädlinge erschwert, in ihrer löslichen Form wirkt allein ihr Geschmack fraßhemmend. Des Weiteren führt die Eigenschaft von Gerbstoffen, Proteine in unverdaulichen Komplexen zu binden dazu, dass die Verwertung der aufgenommenen Nahrung für den Parasit stark vermindert wird. Darüber hinaus wird angenommen, dass komplexe Gerbstoffe in der Lage sind, das Wachstum von schädlichen Insekten durch das Inhibieren wichtiger Stoffwechselfunktionen signifikant zu verringern. Diese Eigenschaft teilen die komplexen Gerbstoffe mit zahlreichen anderen Flavonoiden, die die Vermehrung von Pflanzenschädlingen zu verringern vermögen. Darunter kommen Vertreter von vielen verschiedenen Flavonoidklassen vor wie z.B. Luteolin und Tricetin bei den Flavonen, Quercetin und Myricetin bei den Flavonolen und Eriodictyol und Dihydroquercetin bei den Flavononen bzw. den Dihydroflavonolen (Harborne und Grayer, 1994). Ebenso fungieren zahlreiche Vertreter aus unterschiedlichen Flavonoidklassen, insbesondere Isoflavone, als Phytoalexine. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass nicht glykosilierte Flavonoide eine stärkere antibiotische Wirkung besitzen als glykosilierte, was mit der größeren Wirksamkeit lipophiler Moleküle gegenüber Molekülen mit polaren Substituenten zu erklären ist. Die Synthese von Flavonoiden, die als Phytoalexine fungieren, erfolgt nicht zwingend erst nach Pathogenbefall, sondern kann auch durch andere äußere Reize, wie z.B. UV-Bestrahlung, Hitzeschock, Verwundung oder Behandlung mit anorganischen Substanzen ausgelöst werden (Bohm, 1998).

Eine weitere erwähnenswerte Eigenschaft von Flavonoiden ist ihre allelopathische Wirkung, d.h. die Fähigkeit zahlreicher Pflanzen durch Sezernierung von Flavonoiden das Wachstum und die Entwicklung artfremder Pflanzen zu unterdrücken (Roshchina und Roshchina, 1993). Von Leguminosenwurzeln ausgeschiedene Flavonoide - v.a. Chalkone, Flavanone, Flavone und Isoflavone - dienen außerdem als Signalmoleküle für die Nodulation von Knöllchenbakterien, in dem sie die Transkription von Nodulationsgenen induzieren (Bohm, 1994 und 1998). Auch bei der Pollenkeimung, dem Pollenschlauchwachstum und bei der Samenbildung scheinen Flavonoide wichtige Signalfunktionen zu übernehmen. So zeigten sterile Pollen einer Petunien-Mutante, die über keine Chalkonsynthaseaktivität

verfügte und daher keine Flavonoide synthetisieren konnte, durch Zugabe von Stigmaextrakten des Wildtyps normale Pollenkeimung und normales Pollenschlauchwachstum unter Kulturbedingungen und vollständige Samenreifung *in vivo*. Das für die Wiederherstellung der Pollenfertilität verantwortliche Flavonoid, das Flavonol Kaempferol, zeigte auch bei Untersuchungen von zahlreichen anderen Pflanzen großen Einfluss auf die Pollenkeimung und das Pollenschlauchwachstum (Bohm, 1998). Auf der anderen Seite zeigten Versuche mit *A. thaliana*-Mutanten, die ebenfalls keine Chalkonsynthaseaktivität besaßen, keinerlei Wirkung auf die Pollenfertilität, so dass der Einfluss von Flavonoiden auf die Pollenentwicklung offensichtlich kein universelles Phänomen bei Samenpflanzen darstellt (Burbulis et al., 1996; Ylstra et al., 1996).

Neben den vielfältigen Aufgaben, die Flavonoide in der Natur erfüllen, gewinnen Flavonoide in der menschlichen Ernährung und in der Medizin immer mehr an Bedeutung. Zahllose Artikel beschäftigen sich mit den gesundheitsfördernden Eigenschaften der sogenannten Bioflavonoide. Der Begriff Bioflavonoide geht auf den amerikanischen Wissenschaftler Albert Szent-Györgyi von Nagyrápolt zurück. Er bezeichnete damit die gelben Farbstoffe (lat. flavus = goldgelb, blond) in den Schalen von Zitrusfrüchten. Später wurde der Begriff Bioflavonoide auf alle natürlich vorkommenden Flavonoide mit einer pharmakologischen Wirkung ausgedehnt. Szent-Györgyi entdeckte 1936, dass reines Vitamin C eine geringere präventive Wirkung gegen Skorbut zeigte als aus Zitronenschalen extrahiertes verunreinigtes Vitamin C. Nach ersten Analysen der „Verunreinigung“, welches er zunächst „Citrin“ nannte, ging Szent-Györgyi davon aus, dass die synergistische Wirkung auf ein einziges Flavonoid zurückzuführen war. Nach weiteren Untersuchungen nannten Szent-Györgyi und seine Mitarbeiter Bentsháth und Rusznyák die isolierte Substanz Vitamin-P (Bentsháth et al., 1937). Das P stand für Permeabilität bzw. Permeabilitätsfaktor, da Vitamin-P in der Lage war, die Permeabilität und Fragilität von Blutkapillaren herabzusetzen und damit einer möglichen Veneninsuffizienz und Blutungen von Kapillargefäßen, wie sie bei Skorbut auftreten, entgegenzuwirken. Auf diesem Effekt beruht zumindest zum Teil wahrscheinlich auch die antiexsudative (= ödemprotektive) und antiphlogistische Wirksamkeit von Flavonoiden. Erklärt wird diese Wirkung durch eine Reihe von *in vitro* nachgewiesenen Effekten, darunter u.a. die Hemmung von Hyaluronsäureabbau und Histaminausschüttung, die Radikalfängereigenschaften und die Stimulierung der Kollagenbiosynthese.

Spätere Untersuchungen zeigten jedoch, dass Citrin bzw. Vitamin-P zum einen kein einzelnes Flavonoid, sondern ein Gemisch aus den zwei Flavanonen Hesperidin (Hesperetin-7-O-rutinosid) und Eriodictyol war (Lahann und Purucker, 1974), zum anderen ließ sich kein reines Vitamin-P-Mangelsyndrom erzeugen. Szent-Györgyi, der 1937 den Nobelpreis für Medizin u.a. für die Erforschung und erstmalige Isolierung von Vitamin C aus Paprika erhielt, räumte ein, dass für die antihämorrhagische Wirkung von Vitamin-P geringe Mengen an Vitamin C essentiell notwendig sind und dass die Wirkung von reinem Vitamin-P eher vergleichsweise gering sei.

In den folgenden Jahrzehnten wurden viele Flavonoide auf ihre gesundheitsfördernden Wirkungen - insbesondere auf ihren Vitamin-P-Charakter - hin untersucht. Es wurden weitere Flavonoide mit Vitamin-P-Eigenschaften entdeckt, wie z.B. das Rutin (Quercetin 3-O-rutinosid), welches ebenfalls positiven Einfluss auf verschiedene Krankheitsbilder, die mit Kapillarblutungen oder Ödemen einhergehen, zeigte und daher auch als ein Bioflavonoid mit Vitamin-P-Wirkung bzw. als Vitamin-P-Faktor bezeichnet wurde. Jahrzehntlang verschrieben Hausärzte in den USA Bioflavonoide bei entsprechenden Leiden. Da es aber im Laufe der Zeit nie gelang bei einem Bioflavonoid einen echten Vitamincharakter nachzuweisen, verfügte die FDA (**F**ood and **D**rug **A**dministration) 1968 eine Aberkennung des Vitamin-P-Status für Flavonoide und stoppte die ärztliche Verschreibung von Flavonoiden. Der Verkauf von Flavonoiden, vor allem in Kombination mit Vitamin C und anderen Vitaminen, wurde aber nach wie vor geduldet, nicht zuletzt aufgrund der objektiv nachweisbaren gesundheitsfördernden Eigenschaften von Flavonoiden. Der synergistische Effekt, dass ein mit Flavonoiden „verunreinigtes“, natürliches Vitamin C eine wesentlich stärkere präventive und heilende Wirkung auf Skorbut aufweist, als vollkommen aufgereinigtes bzw. synthetisches Vitamin C, ist neben den oben aufgeführten Eigenschaften von Bioflavonoiden, mit einer von diesen bewirkten besseren Aufnahme von Vitamin C und mit der Schutzwirkung des Vitamin C vor Autooxidation und dem Angriff von freien Radikalen u.a. aggressiven Sauerstoffverbindungen zu erklären (Lahann und Purucker, 1974; Cody, 1984; Bässler et al., 1992; Middleton und Kandaswami, 1994).

Nach der Erforschung des Vitamin-P-Charakters der Bioflavonoide machte ein weiteres Phänomen, welches als das „Französische Paradoxon“ (French paradox) bezeichnet wird, Anfang der 70er Jahre auf sich aufmerksam. Das „Französische Paradoxon“ beschreibt das widersprüchliche Phänomen, dass in Frankreich trotz fett- und cholesterinreicher Ernäh-



rung signifikant weniger Menschen an Herzinfarkt sterben als in anderen Ländern. Da dieses Phänomen auch in anderen mediterranen Ländern, deren Bevölkerung traditionell einen hohen Weinkonsum hat, auftrat, wurde der Zusammenhang von Herzinfarkt und Weinkonsum näher untersucht.

Eine bereits 1979 angelegte Studie zeigte den Zusammenhang zwischen dem pro Kopf Konsum von Wein und der Sterberate der 55-64 jährigen an Herzinfarkt bei der Bevölkerung von 18 Industrienationen (Brouzeix, 1993). Das Ergebnis zeigte eindeutig, dass in Ländern mit hohem pro Kopf Konsum an Wein die Sterberate an Herzinfarkt deutlich niedriger war als in Ländern mit niedrigerem Weinkonsum. Frankreich, das die wenigsten Sterbefälle aufwies, zeigte eine über 5 mal geringere Sterberate als das Schlusslicht Finnland. Zudem zeigte die Hälfte der Länder mit hohem und mittlerem Weinkonsum eine fast lineare Korrelation zwischen Weinkonsum und Herzinfarkttoten.

Eine weitere Studie von Criqui und Rigel (1994), die das Verhältnis von Sterbefällen an koronaren Herzkrankheiten und dem Alkoholkonsum der Bevölkerung von 21 Ländern in den Jahren 1965, 1970, 1980 und 1988 untersuchten, zeigte, dass Frankreich nach Japan die geringste Sterberate, dafür aber den höchsten Wein- und total Alkoholkonsum von allen Ländern aufwies. Dabei wurde auch der Zusammenhang zwischen den allgemeinen Ernährungsgewohnheiten, wie zum Beispiel die Aufnahme von ungesättigten Fettsäuren durch Olivenöl oder der Obst- und Gemüsekonsum der Bevölkerung, berücksichtigt. Die Ergebnisse zeigten eine umgekehrt proportionale Abhängigkeit der Sterbefälle an Herzkrankheiten vom Weinkonsum der Bevölkerung, die unabhängig vom total Alkoholkonsum oder anderen Ernährungsgewohnheiten der Bevölkerung war.

Mittlerweile gilt es als gesichert, dass ein regelmäßiger moderater Weinkonsum die Gefahr, an einer Herzkrankheit zu sterben, deutlich verringert. Dieser Effekt ist unbestritten zum Teil auf den aufgenommenen Alkohol zurückzuführen, der z.B. den Anteil an HDL erhöht, die Aggregation von Blutplättchen hemmt und die Fibrinolyse steigert, wird aber vorwiegend auf andere Inhaltsstoffe im Wein zurückgeführt (Constant, 1995). Bei den dabei diskutierten Inhaltsstoffen handelt es sich hauptsächlich um Catechine und Proanthocyanidine, die größtenteils in den Kernen der Weintrauben vorkommen, was auch die ebenfalls gute Wirkung von Weißwein erklärt (Brouzeix, 1993). Die Wirkungen der Catechine und insbesondere der Proanthocyanidine sind im wesentlichen die gleichen, die auch den Bioflavonoiden mit Vitamin-P-Charakter zugeschrieben werden.

Neben den bereits erwähnten Eigenschaften spielen außerdem der Schutz vor LDL-Oxidation und die daraus resultierende Verminderung der arteriosklerotischen Plaques eine große Rolle. Dieser Effekt wurde auch bei alkoholfreien Extrakten von Rotwein beobachtet (Chjopra et al., 2000). Darüber hinaus haben die in Wein enthaltenen Flavonoide eine entspannende Wirkung auf die glatten Herzmuskelzellen, was Arrhythmien und Bluthochdruck entgegen wirkt (Formica und Regelson, 1995).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Flavonoide erwiesenermaßen über zahlreiche gesundheitsfördernde Eigenschaften für den Menschen verfügen (Böhm et al., 1998). Vor allem die präventive Wirkung gegen Herz-Kreislauf-erkrankungen, welche nach wie vor die Haupttodesursache in den westlichen Industrienationen darstellen, hat zu der großen Popularität der Flavonoide beigetragen. Mittlerweile gibt es zahllose Publikationen, die den Flavonoiden vielfältige gesundheitsfördernde Eigenschaften zusprechen. So sollen Flavonoide sogar die Vermehrung von HIV-Viren hemmen, indem sie die Reverse Transkriptase der Retroviren inhibieren (Formica und Regelson, 1995). Auch bei den häufigsten Krebsarten wie Lungen-, Brust- und Enddarmkrebs sollen Flavonoide eine hemmende Wirkung auf das Wachstum der Krebszellen besitzen (Rodgers und Grant, 1998; Duthie und Dobson, 1999; Le Marchand et al., 2000). Es gibt so gut wie keine ernstere Erkrankung, bei der der Einfluss von Flavonoiden noch nicht untersucht wurde. Einige dieser Studien widersprechen sich und kommen zu völlig entgegengesetzten Resultaten. Außerdem wurde der Großteil der - von den Flavonoiden verursachten - Effekte nur *in vitro*, oder in Tierversuchen bzw. in Versuchen mit Zelllinien nachgewiesen (Middleton und Kandaswami, 1994). Es bleibt daher abzuwarten, welche - den Flavonoiden nachgesagten - Eigenschaften auf Dauer durch weitere epidemiologische Studien und entsprechende biochemische und molekularbiologische Untersuchungen bestätigt werden.

## A.1.2 Flavonoidbiosyntheseweg

Die Biosynthese der Flavonoide ist Dank jahrzehntelanger Forschung weitgehend aufgeklärt. Schon 1936 postulierte Robinson (Robinson, 1936), dass die C<sub>15</sub>-Flavonoidgrundstruktur aus einer C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-Einheit (B-Ring und C-Atome C2, C3 und C4 des Heterozyklus) und einer C<sub>6</sub>-Einheit synthetisiert wird.

Birch und Donovan stellten 1953 die Hypothese auf, dass diese Grundstruktur aus einer Hydroxyzimtsäure und aus drei Acetateinheiten gebildet wird. Zahlreiche Versuche mit markierten Vorstufen bestätigten diese These im wesentlichen (Grisebach, 1962). Demnach stammte der B- und der C-Ring über Phenylalanin und Zimtsäure von der Shikiminsäure ab, der A-Ring durch intermolekulare Kondensation von Acetateinheiten. Mit der Entdeckung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) begann die enzymologische Erforschung über die Entstehung der Phenylpropanoide und somit des Flavonoidbiosynthesewegs (Koukol und Conn, 1961).

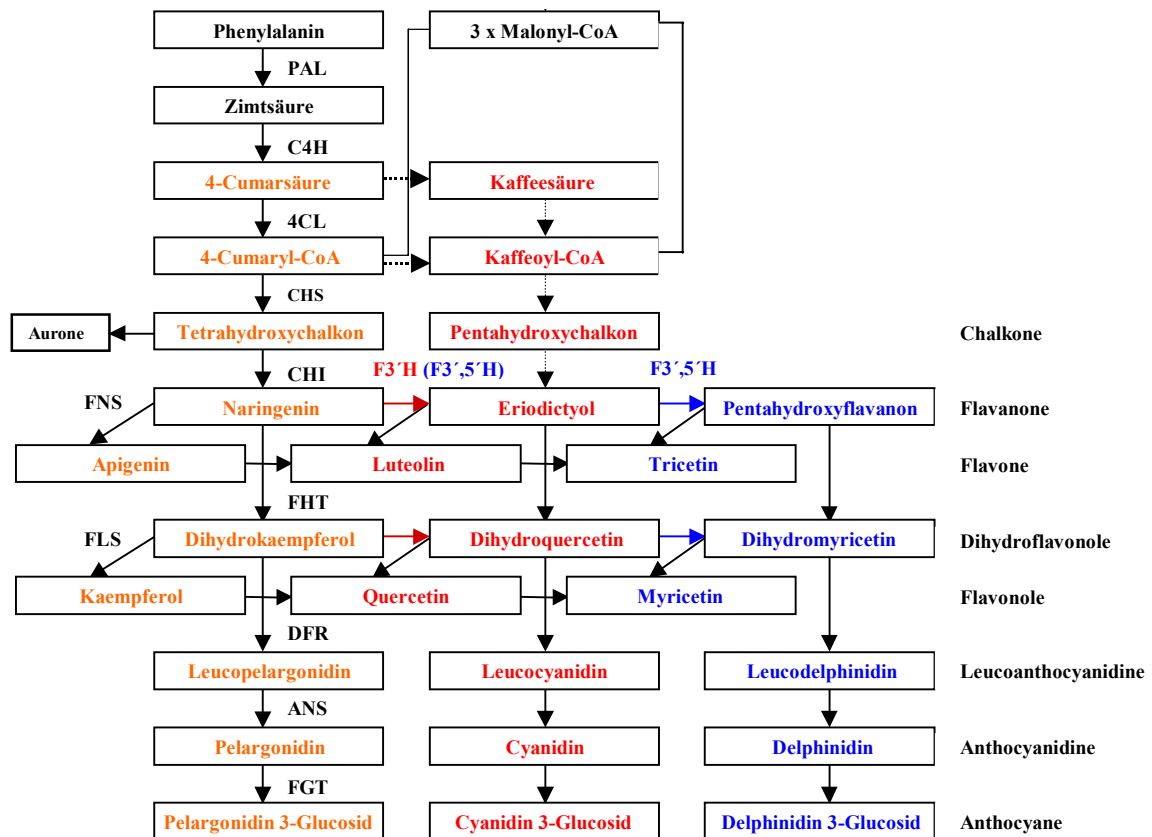
Anfang der siebziger Jahre wurden aus Zellsuspensionen von Pflanzen - insbesondere der Gartenpetersilie (*Petroselinum crispum*) - Enzyme des Flavonoidbiosynthesewegs isoliert und charakterisiert. Durch spätere biochemische Untersuchungen von chemogenetisch definierten Zierpflanzen konnten nun erstmals einzelne Gene mit den entsprechenden Enzymen korreliert werden (Seyffert, 1982). Bis auf wenige Ausnahmen sind heute alle Reaktionen des allgemeinen Flavonoidbiosynthesewegs mit den individuellen Unterschieden bei verschiedenen Pflanzenarten bekannt. Sämtliche Gene, die die Enzyme aus dem Hauptsyntheseweg codieren, konnten als cDNA Klone isoliert werden, ebenso zahlreiche Regulatorgene und Gene, die für Modifikationen der einzelnen Flavonoidklassen verantwortlich sind (Forkmann und Heller, 1999).

Wie bereits in Kapitel A.1 erwähnt besteht das C<sub>15</sub>-Grundgerüst (Flavan) aus zwei aromatischen C<sub>6</sub>-Ring (A- und B-Ring) und einem sauerstoffhaltigen Pyranring (C-Ring), der mit dem A-Ring kondensiert ist. Die C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-Einheit, aus der B- und der C-Ring gebildet werden, stammt von Phenylalanin ab, das durch die Phenyl-Ammonium-Lyase (**PAL**) unter Abspaltung von Ammoniak zu trans-Zimtsäure umgeformt wird. Nachfolgend wird die trans-Zimtsäure unter Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und NADPH als Reduktionsäquivalent durch das Enzym Zimtsäure 4-Hydroxylase (**C4H**), welches ein membran gebundenes CYP-Enzym darstellt, hydroxyliert und es entsteht 4-Cumarsäure. Diese wird durch das Enzym 4-Hydroxy-Cumarsäure: CoA Ligase mit Coenzym A verestert und es

entsteht 4-Cumaroyl-CoA. Das so aktivierte 4-Cumaroyl-CoA reagiert mit 3 Malonyl-CoA Molekülen, wobei durch die Chalkonsynthase (**CHS**) schrittweise Acetateinheiten von den Malonyl-CoA-Einheiten an das 4-Cumaroyl-CoA kondensiert und unter CoA-Abspaltung und CO<sub>2</sub>-Freisetzung Tetrahydroxychalkon entsteht. Die Malonyl-CoA-Einheiten wurden zuvor von dem Enzym Acetyl-CoA-Carboxylase (**ACCase**) durch Carboxylierung gebildet. Die Chalkonsynthase (**CHS**) akzeptiert neben 4-Cumaroyl-CoA auch andere Hydroxycinnamoyl-CoA-Ester, insbesondere Kaffeoyl-CoA, das durch Cumaroyl-CoA-Hydroxylase aus 4-Cumaroyl-CoA gebildet wird. Alle bisher untersuchten Chalkonsynthasen zeigten jedoch bei gleichzeitiger Anwesenheit beider Substrate einen deutlich höheren Umsatz mit 4-Cumaroyl-CoA als mit Kaffeoyl-CoA, so dass diese Reaktion wohl nur von untergeordneter Bedeutung ist (Heller und Forkmann, 1994). Die Bildung von Chalkonen stellt eine Schlüsselreaktion im Flavonoidbiosyntheseweg dar, da von diesen Zwischenprodukten alle anderen Flavonoidklassen abstammen. Durch die Chalkonisomerase (**CHI**) wird Tetrahydroxychalkon stereospezifisch zu dem 2S-Flavanon Naringenin zyklisiert.

Bei einem Umsatz von Kaffeoyl-CoA entsteht über Pentahydroxychalkon das 2S-Flavanon Eriodictyol mit zwei Hydroxylgruppen am B-Ring, was in der Regel durch eine Hydroxylierung von Naringenin in 3'-Position durch die Flavonoid 3'-Hydroxylase (**F3'H**) gebildet wird. Die Bildung von 3',4',5'-hydroxyliertem Pentahydroxyflavanon wird durch die Flavonoid 3',5'-Hydroxylase (**F3',5'H**) katalysiert, die die 3',5'-Hydroxylierung in einem Schritt von Naringenin ausgehend, oder eine 5'-Hydroxylierung von Eriodictyol ausgehend, vollziehen kann. Die Flavanone können neben diesen Modifikationen des B-Ringes in zwei weitere Flavonoidklassen überführt werden. Auf einem Nebenweg werden die Flavone durch die Enzyme Flavonsynthase I oder Flavonsynthase II (**FNS I**, **FNS II**) gebildet. Auf dem Hauptsyntheseweg werden durch die Flavanon 3-Hydroxylase (**FHT**) aus den Flavanonen durch Hydroxylierung des C3-Atoms des Heterozyklus Dihydroflavonole gebildet. Auf einem weiteren Nebenweg werden diese durch Einführung einer Doppelbindung zwischen dem C2- und dem C3-Atom durch die Flavonolsynthase (**FLS**) in Flavonole umgewandelt. Auf dem Hauptsyntheseweg werden aus den Dihydroflavonolen durch die Dihydroflavonol 4-Reduktase (**DFR**), die die Ketogruppe am C4-Atom des Heterozyklus reduziert, Flavan-3,4-diole (Leucoanthocyanidine) gebildet. Aus den Leucoanthocyanidinen werden nachfolgend durch die Anthocyanidinsynthase (**ANS**) in einer noch nicht abschließend geklärten Reaktion die Anthocyanidine gebildet. Durch die nachfolgende, von der UDP-Glukose: Flavonoid 3-O-Glukosyltransferase (**FGT**) katalysierten,

Glykosilierung der C3-Hydroxylgruppe werden aus den chemisch instabilen und wenig wasserlöslichen Anthocyanidinen, die chemisch stabilen und wasserlöslichen Anthocyane gebildet. Die zuvor angesprochenen Modifikationen des B-Ringes bei den Flavanonen durch die F3'H und die F3',5'H können in gleicher Weise auch bei den Flavonen, den Flavonolen und den Dihydroflavonolen durchgeführt werden (siehe auch A.1.3).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des allgemeinen Flavonoidbiosynthesewegs. Die 4'-hydroxylierten Verbindungen sind orange, die 3',4'-hydroxylierten rot und die 3',4',5'-hydroxylierten blau dargestellt. CHS = Chalkonsynthase, CHI = Chalkonisomerase, FHT = Flavanon 3-Hydroxylase, DFR = Dihydroflavonol 4-Reduktase, ANS = Anthocyanidinsynthase, FGT = Flavonoid 3-O-Glukosyltransferase, F3'H = Flavonoid 3'-Hydroxylase, F3',5'H = Flavonoid 3',5'-Hydroxylase, FNS I / FNSII = Flavonsynthase I / Flavonsynthase II (siehe auch weitere Erläuterungen im Text)..

### A.1.3 Funktion der Flavonoid 3'- und der Flavonoid 3',5'-Hydroxylase

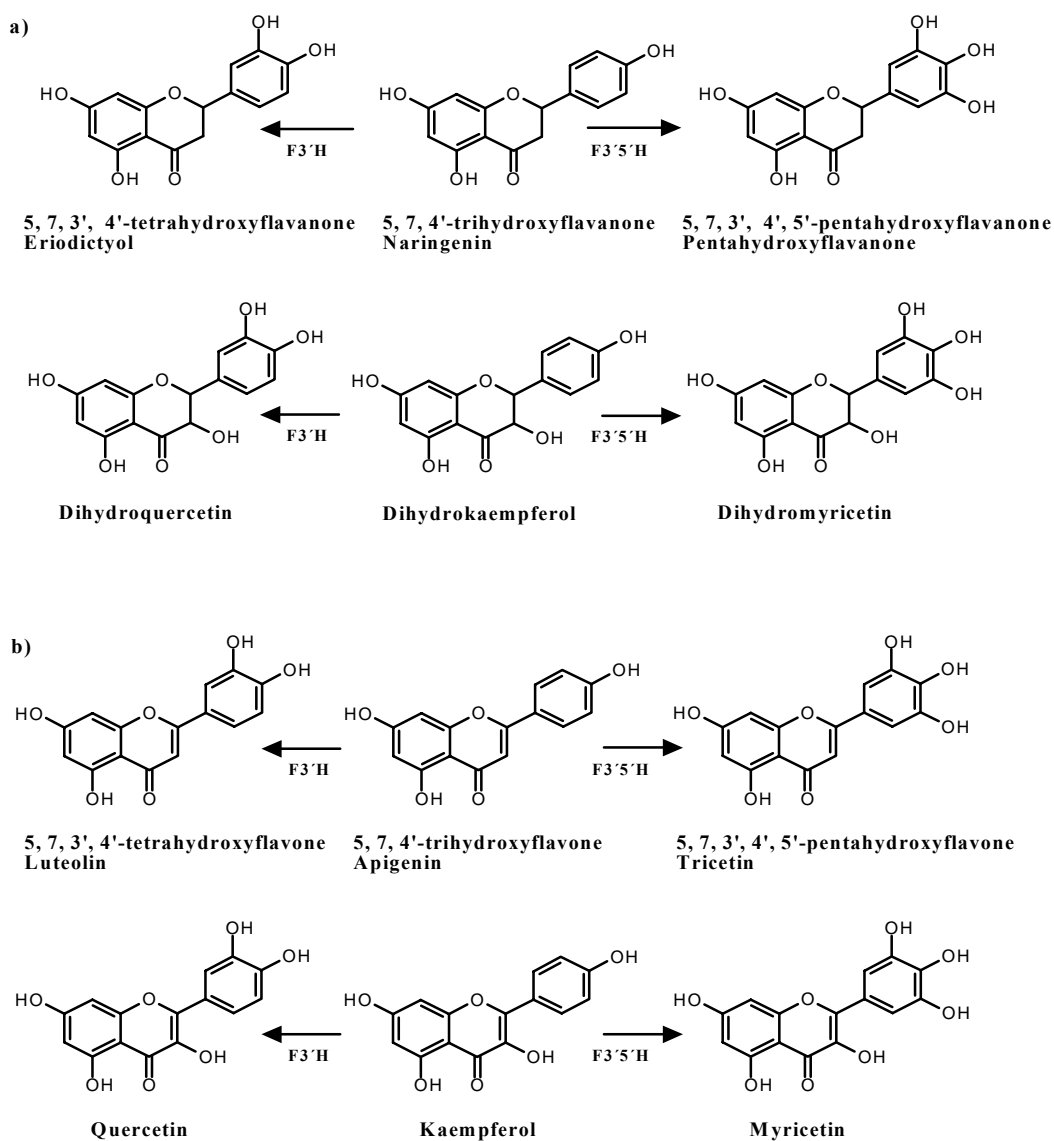
Aufgrund von Vorstufenexperimenten und vieler Untersuchungen an chemogenetisch definierten Pflanzen wurden zwei unterschiedliche Hypothesen über die Entstehung der Hydroxylierungsmusters des B-Ringes über viele Jahre diskutiert (siehe auch A.1.2.).

Die erste Hypothese postulierte die genetisch kontrollierte Selektion von entsprechend hydroxylierten Zimtsäuren **bei** der Bildung des C<sub>15</sub>-Grundgerüsts (Hess, 1968). Die zweite Hypothese ging von der Hydroxylierung des B-Ringes **nach** der Bildung des C<sub>15</sub>-Skeletts durch spezifische Enzyme aus (Grisebach, 1968). Weitere Untersuchungen bezüglich der Substratspezifität der Chalkonsynthase (CHS) zeigten grundsätzlich höhere Umsätze mit der 4-hydroxylierten Cumarsäure als mit der 3,4-hydroxylierten Kaffeesäure, besonders wenn beide Substrate im gleichen Versuchsansatz zugegeben wurden (Heller und Forkmann, 1994). Da des weiteren 3,4,5-Trihydroxyzimtsäure in der Natur noch nie beobachtet wurde, kann man davon ausgehen, dass die B-Ring Hydroxylierung hauptsächlich durch spezifische Enzyme auf der C<sub>15</sub>-Ebene erfolgt (Forkmann und Heller, 1999).

Das für die 3'-Hydroxylierung verantwortliche Enzym Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H) konnte zuerst in der aus einer Zellsuspension von *Haplopappus gracilis* präparierten Mikrosomenfraktion nachgewiesen werden (Fritsch und Grisebach, 1975). Mittlerweile wurde die F3'H-Aktivität in zahlreichen Pflanzen wie z.B. Löwenmäulchen (*Anthirrhinum majus*), Gerbera (*Gerbera hybrida*) und Petunie (*Petunia hybrida*) beobachtet (Heller und Forkmann, 1994). Detaillierte Untersuchungen mit Zellsuspensionen von *Petroselinum crispum* (Hagmann et al., 1983) zeigten die 3'-Hydroxylierung des Flavanons Naringenin und des Dihydroflavonols Dihydrokaempferol (Abb. 3 a), des Flavons Apigenin und des Flavonols Kaempferol (Abb. 3 b). Die in der Mikrosomenfraktion gefundene F3'H-Aktivität benötigte NADPH und molekularen Sauerstoff als Cofaktoren und wurde durch NADP<sup>+</sup>, Cytochrom c und Kohlenmonoxid inhibiert (Hagmann et al., 1983). Hemmung der Hydroxylierung konnte auch durch typische Cytochrom-P450-Inhibitoren wie Ketocozazol und Tetracyclis beobachtet werden (Stich et al., 1988). Anhand dieser Ergebnisse konnte die F3'H eindeutig als eine membrangebundene mischfunktionelle Cytochrom P450 Monooxygenase klassifiziert werden.

Die Flavonoid 3',5'-Hydroxylase-Aktivität wurde zuerst in einer Mikrosomenpräparation aus Blüten von *Verbena hybrida* nachgewiesen (Stotz und Forkmann, 1982). Die F3',5'H führt sowohl 3',5'-Hydroxylierungen bei 4'-hydroxylierten Flavonoiden, als auch 5'-Hydroxylierung bei 3',4'-hydroxylierten Flavonoiden durch. Gleich der F3'H ist F3',5'H in der Mikrosomenfraktion lokalisiert und benötigt ebenso NADPH und molekularen Sauerstoff als Cofaktoren. Studien an *Petunia* zeigten eine Hemmung der F3',5'-H-Aktivität durch Kohlenmonoxid, Cytochrom c und Tetracyclis.

Darüber hinaus wurde die F3',5'H-Aktivität durch monoklonale Antikörper, die die Cytochrom P450-Reduktase (CPR) höherer Pflanzen hemmt, ebenfalls inhibiert, so dass die F3',5'H ebenfalls zweifelsfrei als membrangebundenes Cytochrom P450-Enzym klassifiziert werden konnte (Menting et al., 1994). Abbildung 3 stellt alle bisher klar nachgewiesenen Reaktionen der F3'- und der F3',5'H dar. Die 3'-Hydroxylierung auf der Flavan-3,4-diol(Leucoanthocyanidin)-Ebene konnte bisher einmalig bei *Petunia* durch Supplementationsversuche festgestellt werden (Schwinn, 1994) und bedarf noch der Überprüfung durch weitere Untersuchungen. 3'- oder 3',5'-Hydroxylierungen bei Anthocyanidinen sind bislang nicht dokumentiert.



**Abb. 3:** Von der Flavonoid 3'- und von der F3',5'-Hydroxylase katalysierte Reaktionen im Flavonoidbiosyntheseweg. a) B-Ring-Hydroxylierung im Hauptbiosyntheseweg, b) B-Ring-Hydroxylierung in Nebenwegen.

## A.2 Blütenfarbstoffe

Die Färbung von Blüten und Früchten bei Angiospermen dient in erster Linie der Anlockung von Bestäubern und Fruchtverbreitern. Angiospermenblüten locken mit ihren Pigmenten, die dabei zusammen mit Duftstoffen die Funktion von sogenannten Reizstoffen übernehmen, Bestäuber an und bieten ihnen als Gegenleistung für ihren Besuch normalerweise eine „Belohnung“ in Form von Nahrung. Die Gegengabe, die das eigentliche Lockmittel darstellt, bestand ursprünglich aus im Überschuss gebildeten Pollen, die reich an Fett, Kohlenhydraten und Vitaminen sind. In der weiteren Entwicklung der Blüten wurden zunehmend zuckerhaltige Säfte (Nektar) dargeboten, was zu einer Einsparung der baustoffmäßig aufwendigeren Pollen und einer Bevorzugung von Insekten mit saugenden Mundwerkzeugen, die bei ihrem Besuch die Pflanze weniger schädigen als Insekten mit beißenden Mundwerkzeugen, führte. Durch weitere Coevolution passten sich die Blüten und Mundwerkzeuge der Insekten immer mehr aneinander an. Ein Großteil der rezenten angiospermischen Tierblumen, d.h. Blumen, die durch Tierblütigkeit (Zoogamie) bestäubt werden, sind als sogenannte Nektarblumen zu bezeichnen und werden überwiegend von Insekten mit saugenden Mundwerkzeugen bestäubt. Pflanzen, die keine Gegengabe darbieten, werden Täuscherblumen genannt. Man unterscheidet Futtertäuscherblumen, die eine Futterquelle vortäuschen; Sexualtäuscherblumen, deren Blüten mit Duft, Form und Farbe Insektenweibchen nachahmen und dadurch Männchen anlocken, die versuchen sich mit der Blüte zu paaren (Pseudokopulation); und Täuscherblumen, die einen Eiablageplatz imitieren.

Die starke Differenzierung der Lock- und Reizmittel, sowie des Blütenbaus führte dazu, dass immer mehr Tiergruppen, insbesondere Insekten (Entomogamie) und Vögel (Ornithogamie), für den Dienst der Bestäubung gewonnen werden konnten. Die damit verbundene fortschreitende Spezialisierung und Präzisierung in der Anlockung bestimmter Besucher und im Anbringen bzw. Abnehmen der Pollen, ermöglicht der Pflanze eine zunehmend sicherere und pollensparendere Bestäubung und damit einen besseren Samenansatz. Das Verhältnis von Pollenkörnern zu Samenanlagen bei Windblütlern (Anemogame), das in etwa bei  $10^6 : 1$  liegt, kann im Extremfall bei hoch spezialisierten Insektenblütlern (z.B. Orchideen) auf  $1 : 1$  sinken (Sitte et al., 1991).



Der hohe Spezialisierungsgrad der Angiospermenblüten wirkt sich auch deutlich in der Zusammensetzung der Blütenfarben aus, die auf die unterschiedlichen sinnesphysiologischen Voraussetzungen abgestimmt sein müssen. So bevorzugen Vögel scharlachrote bis rote Farbtöne, während Bienen blaue und gelbe (mit UV-Anteil) Farben vorziehen. In den gemäßigten Klimazonen spielen Vögel bei der Bestäubung keine Rolle, in den tropischen Klimaten finden sich dagegen Vogelblumen (Ornithogame) in fast allen tierblütigen Pflanzenfamilien. Auch bei Insekten bestehen z.T. große Unterschiede in der bevorzugten Blütenfarbe (Tab. 1).

**Tab. 1:** Von Insekten bevorzugte Blütenfarbe und Vorkommen des entsprechenden Anthocyanidins (verändert nach Harborne und Grayer, 1994)

Insekt	bevorzugte Blumenfarbe	häufig anzutreffende Anthocyanidine
Bienen	intensives blau oder gelb (inkl. UV-Anteil)	Delphinidin, gelegentlich mit Cyanidin
Käfer	matt, cremefarben oder grün, gelegentlich rot	Cyanidin-Pelargonidin-Mischung
Schmetterlinge	hellrosa und malvenfarben	Delphinidin-Cyanidin-Mischung
Fliegen	mattbraun, purpur oder grün	Cyanidin
Motten	rot, blassrosa und weiß	Cyanidin
Wespen	violett und braun	Delphinidin

Während Motten rote, blassrosa und weiße bevorzugen, können Bienen rote Farbtöne nicht wahrnehmen. Das Farbrezeptorsystem im Bienenauge ist gegenüber dem des Menschen zum UV-Bereich hin verschoben. Sie können daher die vom Menschen nicht mehr sichtbare UV-Strahlung in einem Wellenlängenbereich von 310-400 nm wahrnehmen. Dies ermöglicht es den Bienen, UV-absorbierende und UV-reflektierende Pigmente zu erkennen, die häufig die Bienen zu ihrer Nahrungsquelle leiten. Diese sogenannten Blumenmale (Saftmale, Pollenmale) treten auch in dem für Menschen sichtbaren Wellenbereich auf, v.a. wenn sie zur Anlockung von Vögeln dienen. Besonders häufig treten UV-absorbierende bzw. reflektierende Blumenmale bei gelben Blüten auf, die von Bienen häufig besucht werden. Erstmals wurden 1972 im UV-Bereich sichtbare Blumenmale bei dem rauen Sonnenhut (*Rudbeckia hirta*) nachgewiesen (Thompson et al., 1972). Die Petalen dieses Korbblütlers erscheinen dem Menschen bei Tageslicht einheitlich gelb. Unter UV-Licht betrachtet erscheinen die äußeren, UV-Licht reflektierenden, Bereiche der Strahlenblüten hell leuchtend, während die inneren, UV-Licht absorbierenden, Bereiche dunkel sind.

Durch chemische Analysen konnten die UV-reflektierenden Pigmente als Carotinoide, die UV-absorbierenden als Flavonoide identifiziert werden. Bei diesen Flavonoiden handelt es sich um drei wasserlösliche gelbe Flavonole, insbesondere Patuletin 7-Glukosid. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass auch Pigmente, die von Menschen unter Umständen nicht wahrgenommen werden, eine wichtige Funktion in der Blütenökologie besitzen.

Drei verschiedene Farbstoffgruppen treten in Blüten von Angiospermen auf, wenn man Chlorophyll in bezug auf die Blütenfarbe vernachlässigt: Betalaine, Carotinoide und Flavonoide. Betalaine und Flavonoide sind Vakuolenfarbstoffe (chymotrope Farbstoffe), d.h. sie sind bis auf wenige Ausnahmen im Zellsaft der Vakuole gelöst. Carotinoide treten normalerweise in Chromatophoren (Chloro- und Chromoplasten) auf.

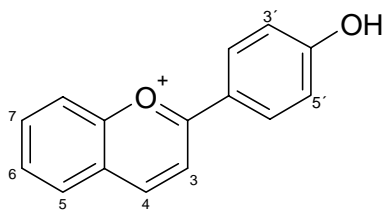
Betalaine sind stickstoffhaltige Farbstoffe, die sich von der Betalaminsäure ableiten, deren Biosynthese aus Tyrosin über Dihydroxyphenyllanin (DOPA) verläuft. Die einzelnen Vertreter der Betalaine unterscheiden sich im Glykosilierungs- und Alkylierungsgrad. Die rot-violetten Betalaine heißen Betacyane, die gelben Farbstoffe Betaxanthine. Das Vorkommen der Betalaine ist charakteristisch für die Ordnung der Nelkenartigen (Centrospermae), wo sie die Anthocyane ersetzen. Betalaine treten zusammen mit ungefärbten Flavonoiden, aber nie mit Anthocyanen auf.

Carotinoide, die aufgrund ihrer Fettlöslichkeit auch Lipochrome genannt werden, kommen vornehmlich in den Membranen von Chromatophoren vor, können aber auch in Plastoglobuli (Lipidtropfen) oder als Kristalle vorliegen. Carotinoide gehören zur Naturstoffgruppe der Isoprenoide, die aus Isopren-Einheiten ( $C_5H_8$ , Methylbutadien) aufgebaut sind. Ihre Synthese verläuft zunächst über den allgemeinen Isoprenoidbiosyntheseweg bis zum  $C_{20}$ -Körper Geranylgeranylphosphat. Aus zwei dieser  $C_{20}$ -Körper wird der  $C_{40}$ -Grundkörper der Carotinoide synthetisiert, der zu der Klasse der Tetraterpene gehört (1 Terpeneinheit = 2 Isopreneinheiten). Die gelborangen bis purpurroten Carotinoide absorbieren, wie ihre Farbe erkennen lässt, im Blau- und im UV-Bereich des Spektrums. Sie dienen daher als „Antennenpigmente“, d.h. sie übertragen bei der Photosynthese die im Blaubereich absorbierte Anregungsenergie auf das Chlorophyll. Außerdem schützen sie den Photosyntheseapparat, insbesondere durch den Xantophyllzyklus, vor Photooxidation. In vielen gelben und einigen roten Blüten stellen sie z.T. das einzige Blütenpigment dar, sie treten aber auch häufig mit Anthocyanen und anderen Flavonoiden auf und erzeugen mit diesen gelbe, orange, scharlachrote und braune Blüten.

Flavonoide stellen die wichtigste und am weitesten verbreitete Gruppe von Blütenfarbstoffen dar. Neben den Anthocyanen (siehe folgendes Kapitel A.2.1), welche die Grundfärbung der Blüten am stärksten festlegen, sind auch farblose und weniger intensiv gefärbte Flavonoide für die Blütenfärbung von großer Bedeutung. So können Chalkone und Aurone Blüten eine gelbe bis orange Färbung verleihen, obwohl intensive gelbe Farbtöne von Blüten zumeist auf Carotinoide zurückzuführen sind. Von größerer Bedeutung ist die Funktion der wenig oder nicht gefärbten Flavonoide für die Copigmentierung der Anthocyane. Außerdem dienen sie als UV-absorbierende Pigmente zur Anlockung vieler Insekten (s.o.). Eine Übersicht über die wichtigsten Flavonoidklassen und die Darstellung des allgemeinen Flavonoidbiosynthesewegs sind in Kapitel A.1 und A.1.1 beschrieben.

### **A.2.1 Anthocyane**

Anthocyane (v. gr. anthos = Blüte, Blume; kyanos = blauer Farbstoff) sind die wichtigsten, für das menschliche Auge sichtbaren Blütenpigmente. Sie stellen die wasserlöslichen und chemisch stabilen Glykoside und Acylglykoside der chemisch instabilen Anthocyanidine dar. Die meisten roten bis blauen Farbtöne in höheren Pflanzen werden durch Anthocyane erzeugt (Dooner et al., 1991). Sie kommen ebenso in vielen weiteren Pflanzengeweben vor, wo sie wie die anderen Flavonoidklassen vielfältige Funktionen übernehmen (siehe A.1.1). Gewöhnlich treten Anthocyane gelöst in der Vakuole auf. Bei lichtabhängiger Anthocyanakkumulation sind sie gelegentlich auch in sphärischen Vesikeln, den sogenannten Anthocyanoplasten, oder in Kristallen lokalisiert (Hemleben, 1981; Strack und Wray, 1994). Die Biosynthese der Anthocyane verläuft über den allgemeinen Flavonoidbiosyntheseweg (siehe A.1.2), wobei der letzte Schritt von den Leucoanthocyanidinen zu den Anthocyanidinen noch nicht restlos aufgeklärt ist. Die chromatophore Aglykon-Form der Anthocyane, die Anthocyanidine liegt bei einem pH-Wert  $< 3$  als positiv geladenes, intensiv rot gefärbtes Flavylum-Kation vor (Abb. 4).



**Abb. 4:** Grundgerüst der natürlich vorkommenden Anthocyanidine (Flavylium-Kation).

Die Grundstruktur der Flavylium-Chromatophore wird durch Hydroxy-, Methoxy- und O-Glykosylgruppen modifiziert. Die gewöhnlichen und am weitesten verbreiteten Anthocyanidine unterscheiden sich nur im Hydroxylierungsmuster des B-Ringes und in der möglichen Methylierung dieser Hydroxygruppen (Tab. 2).

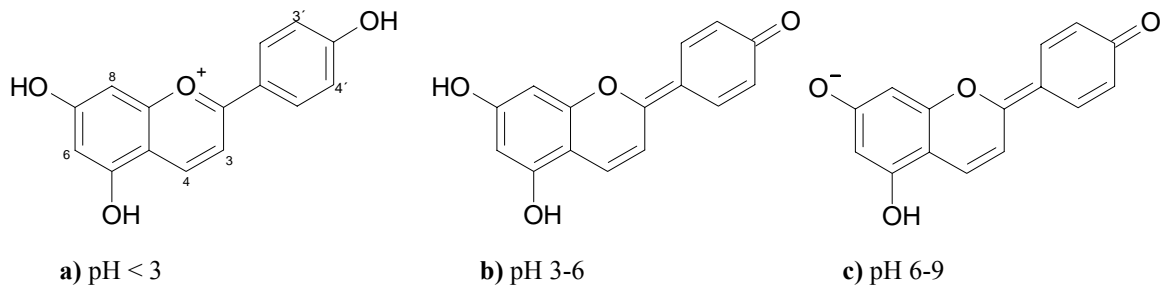
**Tab. 2:** Substitutionsmuster und Grundfarbton der häufigsten natürlich vorkommenden Anthocyanidine. (verändert nach Strack and Wray, 1994)

Anthocyanidin	Substitutionsmuster						Farbe*
	3	5	6	7	3'	5'	
Pelargonidin (Pg)	OH	OH	H	OH	H	H	scharlachrot
Cyanidin (Cy)	OH	OH	H	OH	OH	H	karminrot
Delphinidin (Dp)	OH	OH	H	OH	OH	OH	purpur
Peonidin (Pn)	OH	OH	H	OH	OMe	H	pink
Petunidin (Pt)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	rot-purpur
Malvidin (Mv)	OH	OH	H	OH	OMe	OMe	blau-purpur

\*In wässriger Lösung, pH < 3.

Die Hydroxylierung des B-Ringes in der 3' und 5'-Position wird im Verlauf des allgemeinen Flavonoidbiosynthesewegs bei einer Vorstufe der Anthocyanidine durch die F3'H und die F3',5'H durchgeführt (siehe A.1.2 und A.1.3). Die B-Ring O-Methylierung von Cyanidin in 3'-Position und von Delphinidin in 3'- und 5'-Position erfolgt vermutlich ausschließlich auf der Ebene der Anthocyanidin 3-O-Glykoside (Forkmann und Heller, 1999). Die Farbe, die Anthocyane bzw. Anthocyanidine dem sie enthaltenden Pflanzengewebe verleihen, wird *in vivo* von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Die wichtigsten stellen der pH-Wert des Zellsaftes, die Bildung molekularer Komplexe und Komplexbildung mit Metallen dar.

In wässrigen Lösungen entstehen *in vitro* bei steigendem pH-Wert verschiedene, zunehmend ungefärbte Strukturen, u.a. die Hemiacetal- und Chalkonform (Brouillard und Dangel, 1994). Neben der Flavylium-, stellen die chinoidalen Strukturen die intensiv gefärbten Formen der Anthocyanidine dar (Abb. 5).



**Abb. 5:** Apigenidin-Strukturen in wässrigen Lösungen bei verschiedenen pH-Werten (verändert nach Brouillard und Dangels, 1994). a) Flavylium-Kation, b) neutrale chinoidale Struktur, c) negativ geladene chinoidale Struktur (weitere Erläuterungen, siehe Text).

Abbildung 5 stellt anhand des Beispiels von Apigenidin die drei gefärbten Anthocyanidin-Strukturen dar. Die Flavylium-Struktur ist bei pH < 3 gewöhnlich rot, die deprotonierte neutrale Chinoidal-Struktur ist bei pH 3-6 normalerweise purpurn und die negativ geladene Chinoidal-Struktur ist bei pH 6-9 in der Regel blau.

Ob bei den jeweiligen pH-Werten gefärbte oder ungefärbte Strukturen auftreten, hängt in erster Linie von dem Ausmaß der Hydratation des Flavylium-Kations ab, welche die Ausbildung der ungefärbten Strukturen verursacht. Die Hydratation des Flavylium-Kations wird *in vivo* durch die Bildung von molekularen Komplexen verhindert bzw. vermindert. Die Bildung von molekularen Komplexen verringert die mit dem Solvens in Kontakt stehende Oberfläche der Flavylium-, bzw. der etwas schwächer gefärbten chinoidalen Strukturen, wodurch die Hydratation vermindert wird. Ermöglicht wird die Komplexbildung durch elektrostatische und dispersive Kräfte, wie Dipol-Dipol-Interaktionen, Wasserstoffbrückenbindungen, Ladungsaustausch-Interaktionen und bei aromatischen Gruppen durch Überlappung der delokalisierten  $\pi$ -Elektronenwolke. Zusätzlich begünstigt wird die Komplexbildung in wässrigen Lösungen durch die Überführung von Wassermolekülen, die zuvor an der Hydratisierung des Flavylium-Kations beteiligt waren, in das Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk dem Solvens (hydrophobe Wechselwirkung). Bei der molekularen Komplexbildung sind grundsätzlich vier verschiedene Formen zu unterscheiden: die Selbstassoziation, die intramolekulare und intermolekulare Copigmentierung und die Interaktion mit Metallionen.

Anthocyan-Selbstassoziation tritt bei hohen Anthocyankonzentrationen auf (Goto und Kondo, 1991). Die Ausbildung der Selbstassoziation ist bei der neutralen Chinoidal-Form stärker ausgeprägt, als bei der Flavylium- und der negativ geladenen Chinoidalform, was

mit der elektrostatischen Abstoßung der geladenen Strukturen zu erklären ist. Dies könnte auch erklären, warum die durch die neutrale Chinoidal-Struktur verursachten Farbtöne in den meisten Vakuolen von Blütenzellen vorherrschen (Brouillard und Dangels, 1994).

Intramolekulare Copigmentierung kann bei Anthocyanen mit aromatischen Acylgruppen, insbesondere bei polyacylierten Strukturen, beobachtet werden. Die Acylgruppen von verschiedenen Zimtsäuren, wie z.B. Kaffee-, Cumar- und Ferulasäure, sind dabei mit den Glykosylgruppen der glykolisierten Anthocyane verestert. Die intramolekulare Copigmentierung ist im Gegensatz zur Selbstassoziation konzentrationsunabhängig. Die Beteiligung der aromatischen Acylgruppen an der Stabilisierung der färbenden Strukturen konnte dadurch gezeigt werden, dass nach der hydrolytischen Abspaltung der aromatischen Acylgruppen eine sofortige Hydratation zu ungefärbten Strukturen auftrat. Es wird davon ausgegangen, dass die Acylgruppen sich in Form einer intramolekularen „Sandwichstruktur“ oberhalb und unterhalb des Pyrilium-Rings anlagern und diesen somit vor der nukleophilen Attacke des Wassers schützen. Daneben werden auch Formen in Betracht gezogen, die nicht durch eine Sandwichstruktur, sondern durch eine Stapelung bzw. Schichtung der Acylgruppen zwischen die Anthocyane (engl. stacking), verursacht wird (Goto und Kondo, 1991).

Intermolekulare Copigmentierung stellt bei der Pigmentierung von anthocyanhaltigen Blüten, neben dem pH-Wert, möglicherweise den wichtigsten Einzelfaktor dar (Brouillard und Dangels, 1994). Bei der Komplexbildung zwischen Anthocyan und Copigment treten zwei die Farbe des Anthocyan beeinflussende Phänomene auf. Zum einen wird durch die Stabilisierung der gefärbten Strukturen die Absorption der Chromatophore vom UV- in den sichtbaren Spektralbereich verschoben (Hyperchromer Effekt), zum anderen erfolgt eine Verlagerung des Absorptionsmaximums innerhalb des sichtbaren Spektralbereichs zu längerwelligem Licht (Bathochronismus), was die Farbe der Pigmente zum bläulichen hin verschiebt (blue shift). Viele strukturell verschiedene Moleküle, insbesondere natürlich vorkommende, wie Polyphenole, Flavonoide, Alkaloide, Basen der Nucleinsäuren und Aminosäuren, können als Copigmente fungieren. Intermolekulare Copigmentierung von Anthocyanen führt zu einer Stabilisierung der gefärbten Anthocyan-Strukturen und schützt diese, wie die intramolekulare Copigmentierung und die Selbstassoziation der Anthocyane, vor dem nukleophilen Angriff des Wassers. So wurde beispielsweise bei der Copigmentierung von Malvin durch Chlorogensäure in wässrigen Lösungen bei einem pH-Wert von 3,6, bei dem weniger als 10 % der Anthocyane in einer gefärbten Struktur vorliegen, nach

Zugabe eines Überschusses des Copigments ein spektakulärer 20-30igfacher Anstieg der Absorption im sichtbaren Spektralbereich beobachtet. Dass dieser Effekt in erster Linie auf die Stabilisierung der gefärbten Strukturen zurückzuführen ist, zeigt der vergleichsweise geringe Effekt, den die Zugabe von ungefärbter Chlorogensäure bei einem pH-Wert  $< 1$  verursacht, bei dem hauptsächlich gefärbte Strukturen des Anthocyans vorherrschen. Neben dem pH-Wert besitzt vor allem die Temperatur einen entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der Copigmentierung. Während es bei Malvin-Chlorogensäure-Komplexen in leicht sauren, wässrigen Lösungen bei Temperaturerhöhung zur drastischen Abnahme der Farbintensität kommt, zeigen entsprechende Malvinlösungen ohne Chlorogensäure in einem Temperaturbereich von 10-60 °C keinerlei Effekte. Ob und wie stark die Farbe einer Blüte *in vivo* durch Copigmentierung beeinflusst wird, kann daher mit einem leichten Experiment untersucht werden. Man inkubiert eine Blüte nur für kurze Zeit im Kühlschrank und vergleicht sie danach mit einer ungekühlten. Sollte die gekühlte Blüte nun einen dunkleren Farbton aufweisen als die ungekühlte, ist dies ein guter Anhaltspunkt dafür, dass die Färbung dieser Blüte durch Copigmentierung beeinflusst wird (Brouillard und Dangels, 1992 und 1994). Die starke Temperaturabhängigkeit von intramolekularer Copigmentierung ist damit zu erklären, dass die durch steigende Temperaturen bedingte Entropieerhöhung die schwachen intermolekularen Bindungen zwischen Pigment und Copigment auflöst und der Komplex zerfällt.

Da die intermolekulare Copigmentierung auf den gleichen Mechanismen beruht wie die intramolekulare (siehe oben), fungieren auch viele natürliche Moleküle mit aromatischen Ringsystemen als effektive Copigmente. Auch planare heterocyclische Verbindungen mit konjugierten Doppelbindungen können als Copigmente dienen. So konnte Copigmentierung von Malvin auch mit Koffein und Adenosin gezeigt werden. Beim Vergleich der beiden Purinverbindungen mit Chlorogensäure zeigte sich, dass sowohl Koffein als auch Adenosin stärkere Komplexe mit der neutralen Chinoidal-Struktur als mit der positiv geladenen Flavylium-Struktur bildeten. Chlorogensäure hingegen bildete stärkere Komplexe mit der Flavylium-Struktur als mit der neutralen Chinoidal-Struktur, und die schwächsten Komplexe mit der negativ geladenen Chinoidal-Struktur (Wigand et al., 1992; Brouillard und Dangels, 1994). Dies ist mit den Ladungszuständen der einzelnen Moleküle bei den entsprechenden pH-Werten zu erklären und zeigt, dass bei unterschiedlichen pH-Werten - wie sie in den Vakuolen von verschiedenen Pflanzen vorliegen können - unterschiedlich gefärbte Strukturen von entsprechend dazu geeigneten Molekülen copigmentiert werden.

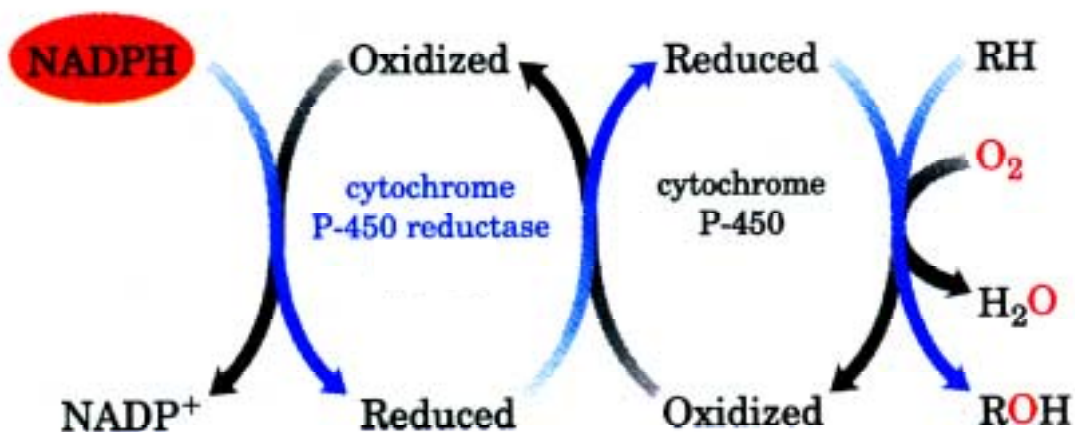
Innerhalb der Flavonoide stellen vor allem die Flavonolglykoside, wie z.B. Rutin (Quercetin 3-O-rutinosid), höchst effektive Copigmente dar (Brouillard et al., 1989; Brushi et al., 1999). Häufig fungieren auch Flavone und Flavoglykoside, die häufig eine Farbverschiebung zu blauen Farbtönen hin bewirken (blue shift, siehe oben), und weitere Flavonoide bzw. Polyphenole als Copigmente (Forkmann, 1991; Davies and Mazza, 1993; Bloor, 1999). Außer dem pH-Wert und der Temperatur spielt auch das Glykolisierungs-muster der Anthocyane und der Copigmente bei der intramolekularen Copigmentierung eine wichtige Rolle (Goto und Kondo, 1991; Schwinn et al., 1997; Bloor, 1999).

Interaktionen mit Metallen treten vor allem in blauen Blüten auf. Bevorzugt als Chelatkomplexe zwischen Anthocyanen, die am B-Ring eine Catecholgruppe tragen (Catechol = o-Dihydroxybenzol), d.h. die am B-Ring mindestens zwei Hydroxylgruppen besitzen, und dreiwertige Eisen- und Aluminiumkationen. Anthocyane in blauen Blüten müssen jedoch nicht notwendiger Weise über Catecholgruppen verfügen, treten aber immer gemeinsam mit Flavonen auf, die als starke Copigmente bekannt sind (Harborne, 1976). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Farbe in blauen Blüten durch die Interaktionen der Anthocyane mit Metallen und durch Copigmentierung, insbesondere durch Flavone, erzeugt wird (siehe oben). Die Rolle der Metallionen besteht dabei darin, dass sie die Pigment-Copigment-Interaktionen verstärken und/oder zu höheren Assoziationsraten der Komponenten führen (Brouillard und Dangels, 1994). Das wohl bekannteste Beispiel für das Auftreten von blauen Blüten durch Metall-Pigment-Copigment-Komplexe stellen die blauen Blüte der Hortensie (*Hydrangea macrophylla*) dar (Asen et al., 1963; Takeda et al., 1985). In diesem Fall ist das farbbestimmende Anthocyan Delphinidin 3-Glukosid und als Copigmente fungieren 3-p-Cumaroylchinasäure und 3-Kaffeoylchinasäure. Dabei konjugiert das Aluminium mit der *ortho*-Dihydroxy-Gruppe des Anthocyan-B-Rings und der Carboxyl- und  $\alpha$ -Hydroxy-Gruppe der jeweiligen Chinasäure (Takeda et al., 1990). Neben Eisen- und Aluminium-Komplexen sind auch blaue Farbstoffkomplexe mit  $Mg^{+2}$  bekannt, wie zum Beispiel bei Commelina-Blüten, in denen das Anthocyan mit einem Flavon und mit  $Mg^{+2}$ -Ionen komplexiert in einem Verhältnis von 4 : 4 : 2 vorliegt (Forkmann, 1991). Ein Beispiel für die Interaktionen von zwei verschiedenen Metallionen zeigt die Komplexierung von jeweils sechs Cyanidin 3-(6''-succinylGlukosid)-5-Glukosid- und sechs Apigenin 4'-(6''-malonylGlukosid)-7-Glukosidmolekülen mit jeweils einem Eisen- und einem Magnesiumkation in den tiefblauen Blüten der Kornblume (*Centaurea cyanus* [Strack und Wray, 1994]).



### A.3 Cytochrom P450-Enzyme

Unter Cytochrom P450-Enzymen (CYP-Enzymen) versteht man Proteine mit einer Häm-Gruppe als prosthetische Gruppe und einem charakteristischen Absorptionsmaximum bei 450 nm (daher P = Pigment) der reduzierten, mit Kohlenmonoxid gebundenen Form (Omura und Sato, 1964). Im allgemeinen katalysieren CYP-Enzyme Oxidationsreaktionen, in denen von molekularem Sauerstoff simultan ein Sauerstoffatom auf ein spezifisches Substrat übertragen wird und das andere Sauerstoffatom zu Wasser reduziert wird (Abb. 6). Man bezeichnet CYP-Enzyme daher auch als mischfunktionelle Monooxygenasen oder als Hydroxylasen, weil das eingebaute Sauerstoffatom vom Substrat reduziert wird und in der Regel eine Hydroxylgruppe entsteht (Schuler, 1996). Die zur Reduzierung des zweiten Sauerstoffatoms zu  $\text{H}_2\text{O}$  notwendigen Reduktionsäquivalente werden von NADPH über die Cytochrom P450-Reduktase (CPR) auf das Cytochrom P450 übertragen.



**Abb. 6:** Schematische Darstellung der „typischen“ von Cytochrom P450-Enzymen katalysierten Reaktion (Lehninger, 1993).

Die Cytochrom P450-Reduktase von Eukaryonten ist ein Flavoprotein, das FAD (Flavinadeninindinukleotid) und FMN (Flavinmononukleotid) als prosthetische Gruppen enthält (Iyanagi und Mason, 1973). Bei seiner Entdeckung wurde es zunächst für eine in der Leber von Säugern vorkommende NADPH-spezifische Cytochrom c-Reduktase gehalten (Horecker, 1950). Spätere Untersuchungen zeigten, dass die CPR im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und daher nicht der natürliche Redoxpartner für das, in Mitochondrien lokalisierte, Cytochrom c sein konnte (Williams und Kamin, 1962). Lu et al. (1968, 1969)

zeigten erstmalig am Beispiel einer mikrosomal gebundenen Fettsäurehydroxylase, dass die CPR einen essentiell notwendigen Faktor für die Aktivität von CYP-Enzymen darstellt. Die Bezeichnung Cytochrom c-Reduktase für die CPR hat sich bis heute hartnäckig gehalten. Die zur Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser notwendigen Elektronen werden vom NADPH auf das FAD, vom FAD auf das FMN und vom FMN schließlich auf das CYP-Enzym übertragen (Vermilion et al., 1981; Oprian und Coon, 1982). Es wurden bereits zahlreiche CPR-cDNA-Klone isoliert und die entsprechenden Proteine exprimiert. Es handelt sich dabei um Proteine mit einer Größe von 506 (*Helianthus tuberosus*) bis 719 (*Pseudotsuga menziesii*) Aminosäureresten (unveröffentlichte Daten aus der Genbank), die unspezifisch Elektronen auf Cytochrom b<sub>5</sub>, Cytochrom c und Cytochrom P450 übertragen können. Daher ist ihre Bezeichnung nach der offiziellen Nomenklatur eher allgemein gefasst: NADPH: ferrihemoprotein Reduktase (EC 1.6.2.4). Neben den Eisenhämproteinen werden auch andere Enzyme, wie die ebenfalls im endoplasmatischen Reticulum lokalisierten Squalenmonooxygenase (EC 1.14.99.7) und Hämoxygenase (EC 1.14.99.3), von der CPR reduziert (Schacter et al., 1972; Enoch und Strittmatter, 1979).

Über die Mechanismen, die zur Retention eukaryontischer CYP-Enzyme im endoplasmatischen Reticulum (ER) führen ist noch wenig bekannt. In Versuchen mit den CYP-Enzymen CYP2C1 und CYP2C2 vom Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) konnten zwei unabhängige Bereiche gefunden werden, welche als Signale für die Lokalisierung der Enzyme im endoplasmatischen Reticulum verantwortlich sind. Dabei ließen sich zuvor cytoplasmatische Proteine durch Fusionierung von 29 Aminosäuren vom N-Terminus der CYP-Enzyme im ER akkumulieren. Dabei war die Orientierung des fusionierten Ankers von entscheidender Bedeutung, da die Retention der fusionierten Proteine im ER nur erfolgte, wenn der Anker am N-Terminus der cytoplasmatischen Proteine fusioniert wurde. Neben dieser relativ kleinen Proteindomäne konnte gezeigt werden, dass auch im cytoplasmatischen Anteil der CYP-Enzyme Domänen auftreten, die unabhängig von dem N-terminalen Anker als Signale für die Retention im ER dienen. Auch bei pflanzlichen CYP-Enzymen konnte ein Bereich mit ca. 20-30 hydrophoben Aminosäuren am N-Terminus als Signalsequenz für die Insertion der CYP-Enzyme identifiziert werden, so dass man davon ausgehen kann, dass diese Domäne bei eukaryontischen CYP-Enzymen für die Insertion und Retention im ER von besonderer Bedeutung ist (Ahn et al., 1993; Murakami et al., 1994; Szczesna-Skorupa et al., 1995; Halkier, 1997). Die im Cytoplasma gelösten prokaryontischen CYP-Enzyme werden an dieser Stelle nicht näher behandelt.

Die Interaktion zwischen CPR und CYP-Enzym basiert primär auf elektrostatischer Anziehung, obwohl es auch Hinweise auf zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen gibt (Tamburini und Schenkman, 1986; Nadler und Strobel, 1991). Zahlreiche Studien zeigten, dass CPRs multiple Carboxylgruppen besitzen, die vornehmlich von den Aminosäuren Aspartat und Glutamat stammen (Nisimoto, 1986; Nadler und Strobel, 1988). Diese negativ geladenen Gruppen interagieren mit den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin der verschiedenen Elektronenakzeptorproteine. CYP-Enzyme scheinen darüber hinaus einen Dipol quer durch das Molekül zu formen, mit einer positiven Ladung auf der proximalen Seite des Proteins, wo sich die Hämgruppe am nächsten zur Proteinoberfläche befindet (Hasemann et al., 1995). Bei Bakterien treten Proteine auf, die die Funktion der CPR und eines CYP-Enzyms in einem einzelnen Enzym vereinigen. Bei dem CYP BM-3 aus *Bacillus megaterium* handelt es sich um eine 119 kD große Fettsäurehydroxylase, die aus einem CYP- und einem CPR-Anteil aufgebaut ist (Daff et al., 1997). Die FAD und FMN enthaltenden Domänen zeigen dabei hohe Homologien mit eukaryontischen CPRs (Govindaraj und Poulos, 1997). Die FMN enthaltende Domäne von eukaryontischen CPRs zeigt ihrerseits hohe Homologien zu dem in Bakterien vorkommenden Flavodoxin, während die FAD-Domäne hohe Homologie mit der Ferredoxin-Reduktase aus Spinat (*Spinacia oleracea*) zeigt. Dies legt die Vermutung nahe, dass die eukaryontischen CPRs durch die Fusionierung von zwei Genen entstanden sein könnten, die zuvor Flavodoxin und Ferredoxin-Reduktase ähnliche Proteine codierten (Porter und Kasper, 1986). Das CYP BM-3 aus *Bacillus megaterium* könnte demnach, mit dem zusätzlich dazu kommenden Hämprotein-Anteil, durch die Fusionierung von wenigstens drei einzelnen Genen entstanden sein (Govindaraj und Poulos, 1997). Neben dem Elektronentransfer von NADPH über die CPR auf CYP-Enzyme, gibt es Anhaltspunkte für die Beteiligung weiterer membrangebundener Elektronentransportkomponenten, insbesondere von Cytochrom  $b_5$  und NADPH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase (Durst, 1991).

CYP-Enzyme wurden als erstes in Mikrosomen (siehe auch B.6.1) aus der Leber von Ratten entdeckt (Garfinkel, 1958; Klingenberg, 1958). Annähernd 10 Jahre später wurde das erste CYP-Enzym in Bakterien entdeckt, kurz darauf in Pflanzen (Frear et al., 1969; Murphy and West, 1969). Seitdem sind mehr als 750 CYP-Gene kloniert worden (inkl. Fragmente), wobei pflanzliche CYP-Gene (siehe A.3.1) mit über 500 identifizierten Klonen bei weitem überwiegen (Dr. David Nelsons Homepage: <http://drnelson.utmem.edu/-nelsonhomepage.html>).

Die entsprechenden Proteine haben eine Größe zwischen 45 und 65 kD (Mansuy, 1998). Die Hämgruppe (b-Typ = Ferriprotoporphyrin IX) ist bei CYP-Enzymen über einen Cysteinrest kovalent mit dem Apoprotein verbunden. Zur Bezeichnung von CYP-Genen und Proteinen setzt sich folgende Nomenklatur zunehmend durch (Nebert und Nelson, 1991):

**Tab. 3:** Nomenklatur bei Cytochrome P450-Proteinen und -Nukleinsäuren

Kategorie	Symbol
Superfamilie	CYP <sup>1</sup> , CYP <sup>2</sup> , Cyp <sup>3a</sup> , Cyp <sup>3b</sup>
Familie	1. Arabische Ziffer
Unterfamilie	Lateinischer Großbuchstabe
Individuelle Nummer	2. Arabische Ziffer

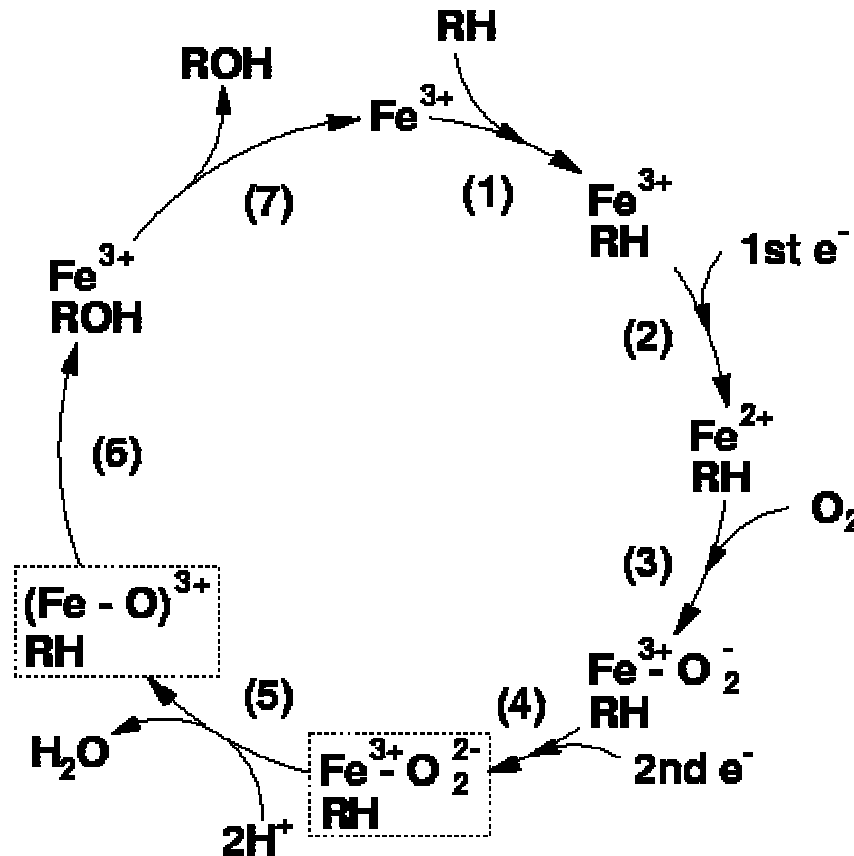
1 = mRNA und Protein, 2 = Gene und cDNA, 3a+b = spezielle Schreibweise für Proteine und Nukleinsäuren aus Mäusen.

Beispiel: CYP75A1 Flavonoid 3',5'-Hydroxylase von *Petunia hybrida* (Protein oder mRNA).

Maßgeblich für die Klassifizierung ist dabei der Sequenzvergleich der codierenden Nukleotidsequenzen. Die Sequenzhomologie zwischen einzelnen Mitgliedern der stark divergierenden Superfamilie kann unter 20 % liegen. Bei > 40 %iger Homologie spricht man von einer Familie, bei > 55 %iger Homologie von einer Unterfamilie und bei > 97 %iger Homologie von allelischen Varianten. Eine einheitliche EC (Enzyme Commission) Nummer für CYP-Enzyme gibt es aufgrund der Vielfalt der von ihnen katalysierten Reaktionen nicht. Fast alle gehören zu Klasse 1, den Oxidoreduktasen. Die meisten von diesen sind als unspezifische Monooxygenasen mit der EC Nummer 1.14.14 klassifiziert.

Der Reaktionsmechanismus (Abb. 7) der von CYP-Enzymen durchgeführten als typisch bezeichneten Reaktion  $RH + O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow ROH + H_2O$  gilt als weitgehend aufgeklärt (Dolphin, 1985; Lewis, 1996; Halkier, 1997).

Neben der, von CYP-Enzymen am häufigsten durchgeführten, spezifischen C-Hydroxylierung organischer Substanzen, sind zahlreiche weitere, von CYP-Enzymen katalysierte, Redoxreaktionen bekannt. Unter anderem katalysieren CYP-Enzyme Hydroxylierungen von Heteroatomen, Epoxidierungen, Sulfoxidierungen, Dehalogenierungen, -aminierungen, -alkylierungen, -methylierungen etc. (Song et al., 1993; Groves und Han, 1995; Ortiz de Montellano, 1995; Lewis, 1996). Die große Vielfalt von katalysierten Reaktionen macht diese Enzymklasse daher so ungewöhnlich interessant für die Wissenschaft und insbesondere für die Pharmaindustrie.



**Abb. 7:** Katalytischer Zyklus der „typischen“ Cytochrom P450-Reaktion. 1) Substratbindung, das Binden des Substrats verringert das Redoxpotential um ca. 100 mV, was zu einem erleichterten Elektronenfluss vom Elektronendonator (NADPH) führt. 2) Erste Reduktion, Reduktion des  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  durch einen Elektronentransfer von NADPH über CPR zum CYP. 3) Sauerstoffbindung, Sauerstoff bindet zunächst schnell an das  $\text{Fe}^{2+}$  und bildet einen  $\text{Fe}^{2+}-\text{O}_2$  Komplex, der eine langsame Konversion zum stabileren  $\text{Fe}^{3+}-\text{O}_2^-$  Komplex vollzieht. 4) Zweite Reduktion, durch einen weiteren Elektronentransfer wird ein  $\text{Fe}^{3+}-\text{O}_2^{2-}$  Komplex gebildet. 5) Spaltung des molekularen Sauerstoffs,  $\text{O}_2^{2-}$  reagiert mit Protonen aus der umgebenden Lösung, die O—O Bindung wird gespalten,  $\text{H}_2\text{O}$  entsteht und es bleibt ein  $(\text{Fe}-\text{O})^{3+}$  Komplex zurück. 6) Sauerstoffübertragung, das eisengebundene Sauerstoff wird auf das Substrat übertragen, wobei eine Hydroxylgruppe entsteht. 7) Substratfreisetzung, Freisetzung des hydroxylierten Substrats und Wiederherstellung des Ausgangszustands. Die mit gestrichelten Linien umrandeten Reaktionen gelten als die geschwindigkeitslimitierenden (verändert nach Levis, 1996).

Neben ihren Funktionen im Primärstoffwechsel dienen sie in tierischen Organismen vor allem der Entgiftung von Xenobiotika. Dabei steht die Überführung von zunächst wasserunlöslichen „Fremdstoffen“ in wasserlösliche und damit eliminierbare Substanzen durch Hydroxylierung im Vordergrund. Zum Teil werden dabei zunächst verhältnismäßig untoxische Substanzen in toxische umgewandelt, welche das Detoxifizierungssystem wiederum belasten (Lehninger, 1993; Gonzalez, 1994 und 1998; Lock und Reed, 1998). Mittlerweile gibt es nahezu unzählige Veröffentlichungen, die sich mit der Wechselwirkung von Drogen, Medikamenten und Umweltgiften aller Art mit CYP-Enzymen und -Genen befassen (Sligar et al., 1984; Guengerich, 1990; Cholerton et al., 1992; Strobel et al., 1997).

Wenn man darüber hinaus z.B. die Bedeutung von CYP-Enzymen bei der Resistenz mancher Insekten gegen Insektizide (Hodgson et al., 1993) oder den Abbau von organischen Xenobiotika in aquatischen Ökosystemen bedenkt (Livingstone, 1998), kann man annähernd erahnen, welches enorme wirtschaftliche, ökologische und gesellschaftspolitische Potential sich in der Erforschung und in der Nutzung dieser Enzymfamilie verbirgt.

### A.3.1 Pflanzliche Cytochrom P450

Ungefähr zwei Drittel aller klonierten *CYP*-Gene wurden aus Pflanzen isoliert (siehe A.3). Dieser große Anteil von pflanzlichen *CYP*-Genen macht die besondere Bedeutung dieser Enzymfamilie für Pflanzen deutlich. Während tierische CYP-Enzyme vorwiegend zur Entgiftung und Ausscheidung von Xenobiotika beitragen, sind CYP-Enzyme in Pflanzen an zahlreichen, zum Teil essentiellen Stoffwechselwegen, beteiligt. Dementsprechend groß ist ihre Zahl innerhalb einer Pflanzenart. Pflanzliche CYP-Enzyme sind unter anderem am Stoffwechsel von Fettsäuren, Phenylpropanoiden, Terpenoiden, Alkaloiden und cyanogenen Glukosiden beteiligt, um nur die wichtigsten endogenen Substrate zu nennen. Frühere Schätzungen gingen z.B. bei *Catharanthus roseus* von mehr als 14 verschiedenen CYP-Enzymen aus (Meijer et al., 1993).

Einige Jahre später schätzten Holton und Lester die Anzahl von verschiedenen CYP-Enzymen bei der Petunie schon auf ca. 60 (Holton und Lester, 1996). Am Beispiel der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*), aus der bisher 269 CYP-Sequenzen, davon 244 „full-length“, in 45 verschiedenen Familien isoliert wurden (Stand August 2000, Dr. David Nelsons Homepage: <http://drnelson.utmem.edu/-nelsonhomepage.html>), lässt sich leicht erkennen, dass die bisherigen Schätzungen weit unter der tatsächlichen Anzahl an verschiedenen *CYP*-Genen bzw. -Enzymen innerhalb einer Pflanzenart liegen. Diese „Fehleinschätzung“ lässt sich damit erklären, dass die wenigsten *CYP*-Gene konstitutiv exprimiert werden (Durst und O’Keefe, 1995), sondern nur in gewissen Stadien der Ontogenese, oder durch äußere Reize, exprimiert werden. CYP-Enzyme, die beispielsweise an der Terpenoidsynthese (Hallahan et al., 1995; Lupien et al., 1995), der Alkaloidsynthese (De-Eknamkul et al., 1992; Kutchan, 1995; Kammerer et al., 1994; Nasreen et al., 1996), oder der Flavonoidbiosynthese (Holton, 1993) beteiligt sind, werden nur in bestimmten Entwicklungsstadien der Pflanze, bzw. des betroffenen Pflanzengewebes, exprimiert.

Andere CYP-Enzyme werden durch Reize wie UV-Bestrahlung (Kato et al., 1994), Verwundung (Frank et al., 1996), Pathogenbefall (Bolwell et al., 1994) oder Xenobiotika induziert (Frear, 1995). Dagegen werden CYP-Enzyme, die an der Ligninbiosynthese beteiligt sind, wie die Zimtsäure 4-Hydroxylase oder die Ferulat 5-Hydroxylase, konstitutiv exprimiert (Meyer et al., 1996; Ye and Varner, 1996). Ebenso wie bei tierischen und bakteriellen CYP-Enzymen stellt auch bei den pflanzlichen CYP-Enzymen die C-Hydroxylierung organischer Verbindungen die am häufigsten katalysierte Reaktion dar (siehe auch A.3). Daneben werden aber auch zahlreiche weitere Reaktionen, wie z.B. Epoxidierung (Schuler, 1996), oxidative Dealkylierung (Frear, 1995) oder Phenol-Kopplung (Stadler et al., 1993) von pflanzlichen CYP-Enzymen durchgeführt.

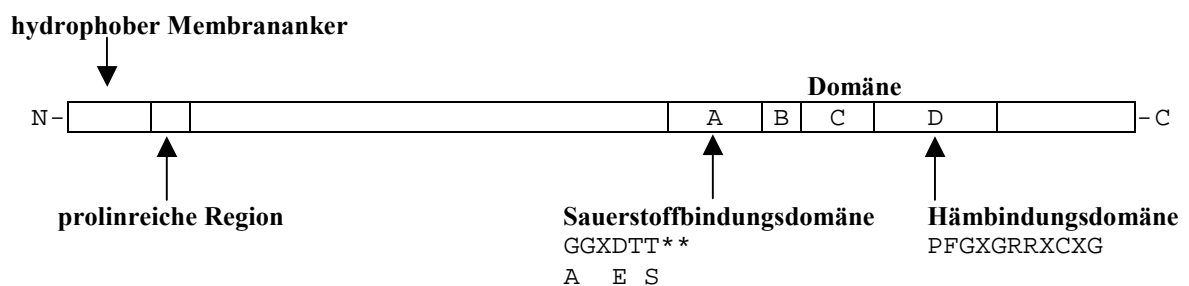
Die vielfältigen Funktionen und Charakteristika pflanzlicher CYP-Enzyme sind Gegenstand zahlreicher Reviews, welche sich ausschließlich mit pflanzlichen CYP-Enzymen bzw. -Genen befassen (Donaldson and Luster, 1991; Bolwell et al., 1994; Durst und Nelson, 1995; Nelson et al., 1996; Schuler, 1996; Nelson, 1999). Grundsätzlich lassen sich CYP-Enzyme in zwei verschiedene Gruppen einteilen, wobei innerhalb beider Gruppen immer mehr Ausnahmen auftreten.

Die Vertreter der Gruppe A gehen im phylogenetischen Stammbaum aus dem gleichen Nebenast hervor und stammen möglicherweise von einem gemeinsamen Vorfahren ab.

Die Familien der Gruppe B gehen aus verschiedenen Seitenästen hervor und scheinen von einem einzelnen gemeinsamen Vorfahren abzustammen. Während die A-Gruppe hohe Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der einzelnen Familien aufweist, zeigen die Familien der B-Gruppe zum Teil höhere Verwandtschaftsgrade gegenüber tierischen, bakteriellen und Pilz-Familien als zu irgendeiner pflanzlichen CYP-Familie. Vermutlich bildeten sich die pflanzlichen CYP-Genfamilien der B-Gruppe vor der entwicklungsgeschichtlichen Separation von Pflanzen, Pilzen und Tieren.

Innerhalb der Aminosäuresequenz von pflanzlichen CYP-Enzymen, insbesondere der A-Gruppe, treten 4 verhältnismäßig stark konservierte Domänen auf (Abb. 8). Die höchst konservierte Domäne D [PFGXGRRXCXG] befindet sich ca. 15 % vom C-Ende entfernt und stellt die Hämbindungsregion dar. Das kovalent mit der Häm-Gruppe verbundene Cystein ist dabei von Aminosäuren umgeben, deren Konsensussequenz in dieser Form nur bei pflanzlichen CYP-Enzymen der A-Gruppe auftritt (Durst und Nelson, 1995).

Die Funktionen der weiter „upstream“ liegenden Domänen B und C sind bisher noch nicht geklärt. Bei der am nächsten zum N-Terminus befindlichen A-Domäne geht man hier von der Funktion als Sauerstoffbindungsregion aus. Die Konsensussequenz [(A/G)GX(D/E)T(T/S)] dieser Domäne wurde anhand von dreidimensionalen Strukturmodellen bakterieller CYP-Enzyme als Teil eines mutmaßlichen I-Helix-Bereichs identifiziert und befindet sich normalerweise etwa 60 % unterhalb des N-Terminus (Halkier, 1997). Neben diesen 4 Proteindomänen treten außerdem zwei weitere Regionen mit häufig vorkommenden Abfolgen bestimmter Aminosäuren auf. Dabei handelt es sich zum einem um die ersten 20-30 Aminosäuren am N-Terminus, die sich überwiegend aus hydrophoben Aminosäuren zusammensetzen und vermutlich als Membrananker dienen. Unmittelbar an diese Anchor-Sequenz schließt sich die zweite konservierte Region an, die durch das häufige Auftreten der Aminosäure Prolin gekennzeichnet ist und die Verbindung zwischen dem membranintegrierten und dem cytoplasmatischen Anteil des Enzyms darstellt. Außer den erwähnten Bereichen zeichnen sich pflanzliche CYP-Enzyme durch eine große strukturelle Vielgestaltigkeit aus.



**Abb. 8:** Schematische Darstellung charakteristischer Strukturelemente in der Aminosäuresequenz pflanzlicher Cytochrom P450-Enzyme der A-Gruppe. (Erläuterungen, siehe Text).



## A.4 Zielsetzung der Arbeit

Mit über 6400 bekannten Verbindungen stellen die Flavonoide eine sehr große Naturstoffgruppe dar, deren Vertreter zahlreiche wichtige Aufgaben innerhalb der Pflanzen erfüllen und darüber hinaus auch wichtige Eigenschaften für andere Organismen besitzen (siehe A.1.1).

Innerhalb der jeweiligen Flavonoidklassen unterscheiden sich die einzelnen Flavonoide durch das Substitutionsmuster des A-, B- und des C-Ringes. Bei dem Substitutionsmuster des B-Ringes besitzen die F3'H und die F3',5'H eine Schlüsselfunktion. Durch die von diesen Enzymen durchgeführten 3'- und 3',5'-Hydroxylierungen wird die Blütenfarbe in entscheidender Weise beeinflusst (siehe A.2.1). Darüber hinaus ermöglichen die von ihnen katalysierten Hydroxylierungen alle weiteren Modifikationen, wie Methylierung, Glykosylierung und nachfolgende Acylierung, des Zuckerrestes an diesen Positionen.

Aufgrund früherer biochemischer Untersuchungen konnten die F3'H und die F3',5'H als P450-Enzyme identifiziert werden (siehe A.1.3). Im Rahmen dieser Arbeit sollte jeweils ein cDNA-Klon der F3'H und der F3',5'H isoliert werden. Dabei sollten mit Hilfe zweier bereits bekannter F3',5'H-Gensequenzen aus *Petunia hybrida* F3',5'H-spezifische DNA-Fragmente durch RT-PCR gewonnen werden, um damit verschiedene bereits vorhandene cDNA-Bibliotheken von Pflanzen mit F3'H- und/oder F3',5'H-Aktivität zu „screenen“. Aufgrund der hohen funktionellen Ähnlichkeit und der Zugehörigkeit beider Enzyme zu den Cytochrom P450-Enzymen wurde dabei davon ausgegangen, dass auch F3'H-Gene, von denen bislang noch keines kloniert werden konnte, bei dem *Screening* mit einer F3',5'H-spezifischen DNA-Sonde erfasst werden.

Parallel dazu sollte mit Cytochrom P450-spezifischen PCR-Primern versucht werden, F3'H- und F3',5'H-spezifische Fragmente aus verschiedenen Pflanzen mit F3'H- und/oder F3',5'H-Aktivität durch RT-PCR zu isolieren.

Des Weiteren sollte aus chemogenetisch definierten Linien von *Matthiola incana* durch Verwendung einer differentiellen *Screening*-Methode ein F3'H-spezifisches cDNA-Fragment isoliert werden.

Nach der Verifikation der gewonnenen Fragmente, sollten die entsprechenden „full-length“ cDNA-Klone durch verschiedene RACE-Methoden generiert und anschließend durch heterologe Genexpression in Hefe charakterisiert werden.

## B. Material und Methoden

### B.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Enzyme und Radioisotope

Die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden soweit nicht anders beschrieben von folgenden Firmen bezogen:

Zefa Laborservice (München)	<a href="http://www.zefa-laborservice.de/">http://www.zefa-laborservice.de/</a>
Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	<a href="http://www.sial.com/">http://www.sial.com/</a>
Fluka (Neu-Ulm)	<a href="http://www.fluka.de/">http://www.fluka.de/</a>
Merck (Darmstadt)	<a href="http://www.merck.de/">http://www.merck.de/</a>
Roth (Karlsruhe)	<a href="http://www.carl-roth.de/">http://www.carl-roth.de/</a>
Biorad (USA)	<a href="http://www.bio-rad.com/">http://www.bio-rad.com/</a>
Biozym (USA)	<a href="http://www.biozym.com/">http://www.biozym.com/</a>
Duchefa (Niederlande)	<a href="http://www.duchefa.com/">http://www.duchefa.com/</a>
Qiagen (Hilden)	<a href="http://www.qiagen.com/">http://www.qiagen.com/</a>
Schleicher & Schüll (Dassel)	<a href="http://www.s-und-s.de/">http://www.s-und-s.de/</a>
Difco (USA)	

Enzyme wurden soweit nicht anders beschrieben von folgenden Firmen bezogen:

MBI Fermentas (Litauen)	<a href="http://www.fermentas.com/">http://www.fermentas.com/</a>
Promega (Mannheim)	<a href="http://www.promega.com/">http://www.promega.com/</a>
Boehringer (Mannheim)	<a href="http://biochem.boehringer-mannheim.com/">http://biochem.boehringer-mannheim.com/</a>
Boehringer (Ingelheim)	<a href="http://www.boehringer-ingelheim.com/">http://www.boehringer-ingelheim.com/</a>
Gibco/BRL (USA)	<a href="http://www.lifetech.com/">http://www.lifetech.com/</a>
Invitrogen (Niederlande)	<a href="http://www.invitrogen.com/">http://www.invitrogen.com/</a>
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	<a href="http://www.apbiotech.com/">http://www.apbiotech.com/</a>
New England Biolabs (USA)	<a href="http://www.neb.com/">http://www.neb.com/</a>
Stratagene (USA)	<a href="http://www.stratagene.com/">http://www.stratagene.com/</a>
Roche (Schweiz)	<a href="http://www.roche.com/">http://www.roche.com/</a>

Reaktionssysteme und Kits wurden soweit nicht anders beschrieben von folgenden Firmen bezogen:

Clontech (USA)	<a href="http://www.clontech.com/">http://www.clontech.com/</a>
Invitrogen (Niederlande)	<a href="http://www.invitrogen.com/">http://www.invitrogen.com/</a>
Qiagen (Hilden)	<a href="http://www.qiagen.com/">http://www.qiagen.com/</a>
MBI Fermentas (Litauen)	<a href="http://www.fermentas.com/">http://www.fermentas.com/</a>
Boehringer (Mannheim)	<a href="http://biochem.boehringer-mannheim.com/">http://biochem.boehringer-mannheim.com/</a>
Biorad (München)	<a href="http://www.bio-rad.com/">http://www.bio-rad.com/</a>
Gibco/BRL (USA)	<a href="http://www.lifetech.com/">http://www.lifetech.com/</a>
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	<a href="http://www.apbiotech.com/">http://www.apbiotech.com/</a>
Invitrogen (Niederlande)	<a href="http://www.invitrogen.com/">http://www.invitrogen.com/</a>

Folgende Radiochemikalien wurden verwendet:

**Tab. 4:** Verwendete Radiochemikalien

Substanz	spezifische Aktivität	Quelle
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] dCTP	~ 3000 Ci/mmol	ICN, Meckenheim
[ $\alpha$ - <sup>35</sup> S] dATP	~ 1000 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	Eigensynthese vom Lehrstuhl *
[ <sup>14</sup> C] Dihydrokaempferol	100 dpm/ $\mu$ l	Eigensynthese vom Lehrstuhl *

\* Von Dr. Stefan Martens zur Verfügung gestellt.

## B.2 Pflanzenmaterial

### B.2.1 *Callistephus chinensis* (Sommeraster)

Zur Klonierung eines Flavonoid 3'- bzw. 3', 5'-Hydroxylase cDNA Klons aus *Callistephus chinensis* steht am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau biochemisch und genetisch gut charakterisiertes Pflanzenmaterial zur Verfügung. Hiervon wurde die Linie 01 verwendet, aus der auch die verwendete cDNA-Genbank erstellt wurde (siehe B.5.4).



**Abb. 9:** *Callistephus chinensis* (Linie 01)

Bei *C. chinensis* bestimmt nur ein Gen den Grad der Hydroxylierung des B-Ringes. An diesem Locus R liegt vermutlich multiple Allelie vor (Wit, 1937; Forkmann, 1977), so dass folgende homozygote Typen auftreten: RR, r'r' und rr. Bei dem Typ rr finden sich in den Blüten vorwiegend Pelargonidin und etwas Cyanidin. In Blüten vom Typ r'r' vor allem Cyanidin und etwas Pelargonidin und Delphinidin. Beim RR Typ größtenteils Delphinidin, neben etwas Cyanidin und Spuren von Pelargonidin (Forkmann, 1977). Die verwendete Linie 01 stellt einen RR-Typ mit blauen Blüten dar (Abb. 9). Zur Isolation von DNA und insbesondere von RNA wurden Petalen von verschiedenen Blütenstadien geerntet und vereinigt. Dabei wurden Blütenstadien berücksichtigt, in denen die Zungenblüte gerade zu sehen war bis hin zu Stadien, wo ihre Pigmentierung gerade eingesetzt hatte und sie 1-1,5 cm aus dem Blütenkelch ragten.

Da vorherige Untersuchungen über Enzyme des Flavonoidbiosynthesewegs bei *C. chinensis* (Ruhnau-Brich, 1991) und verschiedenen anderen Pflanzen (Stotz, 1983) die höchste Aktivität der untersuchten Enzyme innerhalb dieser Stadien zeigten. Somit konnte man davon ausgehen, dass zu diesem Zeitpunkt der Ernte die entsprechenden Transkripte der verantwortlichen Gene in besonders großen Mengen vorhanden waren. Die Blüten konnten von Anfang August bis ungefähr Mitte Oktober geerntet werden.

### B.2.2 *Matthiola incana* (Gartenlevkoje)

Für die Untersuchung von *M. incana* liegen 16 genetisch und biochemisch gut untersuchte Linien zur Verfügung. Diese Linien gehen auf langjährige Züchtung des Lehrstuhles für Genetik der Universität Tübingen zurück und sind in bezug auf 4 Anthocyan modifizierende Gene eindeutig genetisch charakterisiert (Seyffert, 1971). Diese vier Loci treten in homozygoten Kombinationen gegen einen bezüglich der Blütenfärbung völlig isogenen Hintergrund auf (Tab. 5). Das Gen  $b^+$  codiert die Flavonoid 3'-Hydroxylase, die am B-Ring eine Hydroxylgruppe in 3-Position einfügt (Forkmann, 1980). Die Allele  $l^+$ ,  $u^+$  und  $v^+$  betreffen Modifikationen am Pyranring und am A-Ring (Abb. 2). Dabei ist  $l^+$  für Glukosylierung,  $u^+$  für Xylosylierung und  $v^+$  für Acylierung mit verschiedenen Zimtsäuren verantwortlich (Seyffert, 1960 und 1982).



Abb. 10: *Matthiola incana*, Linien 01-16. Linien 1-8 mit F3'H-Aktivität, Linien 9-16 ohne F3'H-Aktivität.

Drei weitere Gene des Flavonoidbiosynthesewegs liegen in allen 16 Linien homozygot dominant vor. Das Gen  $e^+$  ist für die Bildung von Flavan 3,4-Diolen aus Dihydroflavonolen verantwortlich. Gen  $f^+$  kontrolliert die Chalkonsynthase (Spribille und Forkmann, 1981). Die Rolle von Gen  $g^+$  ist noch nicht abschließend geklärt, es betrifft die Anthocyan-synthese nach der Dihydroflavonolbildung (Seyffert, 1962; Heller et al., 1985a und 1985b). Beim Auftreten von homozygot rezessiven Allelen eines dieser Gene wird die Anthocyanbiosynthese verhindert (Kappert, 1949; Forkmann, 1977).

**Tab. 5:** Charakterisierung homozygoter Genotypen von *M. incana*

Linie	Genotyp		Phänotyp	Pigmente
	<i>e g f</i>	<i>b l u v</i>		
01	+ + +	+ + + +	dunkelviolett	ac Cy-T
02	+ + +	+ <i>l</i> + +	tief stumpf violett	ac Cy-T, ac Cy-B
03	+ + +	+ + <i>u</i> +	braunviolett	ac Cy-T, Cy-T, Cy-D, Cy-M
04	+ + +	+ + + <i>v</i>	dunkellila	ac Cy-T
05	+ + +	+ <i>l</i> <i>u</i> +	dunkelbraun	ac Cy-B, Cy-B, Cy-M
06	+ + +	+ <i>l</i> + <i>v</i>	tief stumpf lila	ac Cy-B
07	+ + +	+ + <i>u</i> <i>v</i>	braunlila	Cy-T, Cy-D, Cy-M
08	+ + +	+ <i>l</i> <i>u</i> <i>v</i>	braun	Cy-B, Cy-M
09	+ + +	<i>b</i> + + +	dunkelkarmin	ac Pe-T
10	+ + +	<i>b</i> <i>l</i> + +	tief stumpf karmin	ac Pe-T, ac Pe-B
11	+ + +	<i>b</i> + <i>u</i> <i>v</i>	braunkarmin	ac Pe-T, Pe-T, Pe-D, Pe-M
12	+ + +	<i>b</i> + + <i>v</i>	dunkelrosa	ac Pe-T
13	+ + +	<i>b</i> <i>l</i> <i>u</i> +	braun	ac Pe-B, Pe-B, Pe-M
14	+ + +	<i>b</i> <i>l</i> + <i>v</i>	braunrosa	ac Pe-B
15	+ + +	<i>b</i> + <i>u</i> <i>v</i>	braunrosa	Pe-T, Pe-D, Pe-M
16	+ + +	<i>b</i> <i>l</i> <i>u</i> <i>v</i>	braun	Pe-B, Pe-M

ac = acyliert, Cy = Cyanidin, Pe = Pelargonidin, B = 3-Biosid, T = 3,5-Triglykosid, D = 3,5-DiGlukosid, M = 3-Monosid

Durch frühere Untersuchungen der F3'H-Aktivität bei *M. incana* war bekannt, dass die Hauptaktivität dieses Enzyms bei frühen Blütenstadien auftritt (Stotz, 1983). Daher wurde zur Klonierung eines F3'H cDNA Klons aus *M. incana* eine Mischung von Petalen junger Blüten geerntet, die diesen Bereich großzügig abdeckten. Dabei handelte es sich um Blüten, die gerade aufgingen bis hin zu Blüten mit leicht pigmentierten Petalen, die bereits 3-5 mm aus dem Kelch ragten. Die Ernte des Pflanzenmaterials war ganzjährig möglich, da blühende Levkojen problemlos unter Kunstlicht im Gewächshaus zu kultivieren waren.

### B.2.3 *Pelargonium zonale x hybriden* (Pelargonien)

Von den zahlreichen dem Lehrstuhl zur Verfügung stehenden Sorten wurde die Sorte Robe verwendet. Sie stammt aus dem normalen Handelssortiment der Firma ElsnerPAC Jungpflanzen (Dresden). Aufgrund früherer Analysen war die Anthocyanidinzusammensetzung in den Blüten dieser Sorte bekannt (Hassenpflug, 1995). Mit Pelargonidin, Cyanidin und Delphinidin treten alle Grundstrukturen der Anthocyanidine auf. Außerdem findet man Peonidin, Petunidin und Malvidin, welche die häufig vorkommenden methylierten Anthocyanidine darstellen (siehe A.2.1). Von diesen Anthocyanidinen stellen Pelargonidin, Peonidin und Malvidin die Hauptpigmente dar, was auf eine hohe Aktivität der F3'- und der F3',5'H schließen lässt. Als Pflanzenmaterial wurden Petalen von jungen noch geschlossenen oder gerade geöffneten Blüten verwendet, da in diesen Stadien die höchste Aktivität von Enzymen des Flavonoidbiosynthesewegs beobachtet wurde (Hassenpflug, mündl. Mitteilung). Das Pflanzenmaterial wurde vorwiegend im Winter oder im Frühjahr geerntet, da es bei im Sommer geerntetem Material durch höhere Konzentration an störenden Inhaltsstoffen zu Problemen bei der RNA-Isolation kam (siehe B.5.1.1). Petalen konnten von den im Gewächshaus unter Kunstlicht kultivierten Pflanzen ganzjährig geerntet werden.



Abb. 11: *Pelargonium x zonale*, Sorte Robe.

### **B.2.4 *Lycianthes rantonnetii* (Enzianstrauch)**

Die Flavonoidzusammensetzung der Blüten des blau blühenden *Lycianthes rantonnetii* (vormals *Solanum rantonnetii*) wurde am Lehrstuhl im Rahmen zahlreicher Praktika untersucht. Unter anderem konnte man 3',5'-hydroxylierte Flavonoide, wie z.B. Delphinidin, identifizieren, was auf eine F3',5'H-Aktivität schließen ließ. Als Pflanzenmaterial wurden Petalen von jungen, halbgeschlossenen und nur apikal leicht pigmentierten Blüten verwendet.



---

**Abb. 12:** *Lycianthes rantonnetii*.

### **B.2.5 Weitere Pflanzen**

Neben den bereits aufgeführten wurden außerdem folgende Pflanzenarten verwendet:

*Osteospermum x hybridum* (Kapmargerite), Sorte „Dondo“

*Zantedeschia x hybridum*, Sorte „Cameo Zalm“

*Hydrangea macrophylla* (Hortensie)

*Petunia hybrida* (Petunie), Linie V33 und Linie RL01



Die beiden erst aufgeführten Arten wurden am Lehrstuhl im Rahmen zweier Diplomarbeiten bearbeitet. Bei der Kapmargerite konnte F3',5'H-Aktivität gefunden werden (Seitz, 2000), bei *Zantedeschia* F3'H-Aktivität (Oswald, 2000). Von *Osteospermum* wurden ungefärbte bis leicht apical gefärbte Petalen verwendet, bei *Zantedeschia* wurde das gefärbte Hochblatt (Spatha), das den Blütenstand umgibt, verwendet.

Bei *Hydrangea macrophylla* konnte schon früh Delphinidin 3-Glukosid als Hauptpigment in den Sepalen identifiziert werden (Asen et al., 1963; Takeda et al., 1985). Dies ließ auf eine F3',5'-Aktivität und auf das Vorhandensein des oder der entsprechenden Gene schließen. Geerntet wurden leicht pigmentierte Sepalen von frühen Blütenstadien.

Von *Petunia hybrida* Linie V33 wurden leicht pigmentierte und geöffnete Sepalen von jungen Blüten verwendet. Linie V33 verfügt über die Gene *Hf1* und *Hf2*, welche die F3',5'H-Aktivität bei der Petunie kontrollieren (Wierig, 1974).

Die zur Transformation von Blütenblättern mit der Partikelkanone (siehe B.5.11) verwendete Linie RL01 trägt die homozygot rezessiven Allele *ht1* und *hf1* und besitzt daher keine F3'- und F3',5'-H-Aktivität.

## **B.3 Bakterienstämme, Phagen und Plasmide**

### **B.3.1 Bakterienstämme**

Zur Klonierung der entsprechenden Plasmide wurden die *E. coli* Stämme Top 10 und Inv  $\alpha$  (Invitrogen, Niederlande) verwendet.

Als Wirtsstamm für die Vermehrung des Bakteriophagen  $\lambda$ NM1149 wurde *E. coli* K12 POP 13 verwendet. Dieser stellt einen Abkömmling von *E. coli* K12 POP 101 (Lathe und Lecocq, 1977; Murray, 1983) dar und wurde ursprünglich von Frau Dr. V. Pirota (EMBL, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

### B.3.2 Bakteriophagen

Als Vektor für die cDNA-Bibliothek von *Callistephus chinensis* diente der Bakteriophage  $\lambda$ NM1149 (Scherer et al., 1981; Murray, 1983)

### B.3.3 Plasmide

Die zur Klonierung von DNA-Molekülen verwendeten Plasmide sind mit den wichtigsten Parametern in Tabelle 6 dargestellt

**Tab. 6:** Verwendete Plasmide zur Klonierung von DNA-Molekülen

Plasmid	Größe [kb]	Selektionsmarker	blau/weiß Screening	T/A Cloning	Sequenzierprimer	Produktname / Hersteller
pUAG	3,8	Kanamycin Ampicillin	+	+ U/A	M 13 pUAg SEQ-Primer	The LigATor Ingenius
pUC57/T	2,71	Ampicillin	+	+	M13, pUC	InsT/AClone Cloning Kit / MBI Fermentas
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>	3,9	Kanamycin Ampicillin	+	+	M13, T7	TOPO TA Cloning <sup>®</sup> KIT / Invitrogen
pCR <sup>®</sup> 4-TOPO <sup>®</sup>	3,957	Kanamycin Ampicillin	-	+	M13, T3/T7	TOPO TA Cloning <sup>®</sup> KIT for Sequencing / Invitrogen
pBluescript <sup>®</sup> II Ks (+)	2,961	Ampicillin	+	-	M 13, T3/T7, SK/KS	pBluescript <sup>®</sup> II / Stratagene

Bei den 4 erstgenannten handelt es sich um Plasmide, die speziell zur Klonierung von PCR-Produkten entwickelt wurden. Der letztgenannte diente ausschließlich zur Subklonierung von DNA-Fragmenten. Alle Vektoren verfügen über eine „Multiple Cloning Site“ (MCS) mit zahlreichen Restriktionsschnittstellen.

Für die Transformation von Blütenblättern mit der Partikelkanone wurde das Plasmid pGun verwendet. Dieses Plasmid wurde von Dirk Börstling, Mitarbeiter des Lehrstuhls, zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um einen 3724 Basenpaar großen Vektor mit Ampicillinresistenzgen, einem *ori* (origin of replication, Replikationsursprung) zur high-copy Vervielfältigung in *E. coli* und einem doppelten 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus vor der multiplen „cloning site“.

### **B.3.4 Anzucht und Transformation von Bakterien**

Alle verwendeten Bakterien wurden in LB (Luria-Bertani) Flüssigmedium und Agarplatten angezogen. Bei bereits transformierten Bakterien wurde je nach verwendetem Plasmid (siehe B.3.3) das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Für die halb- bzw. einstündige Vorkultur unmittelbar nach einer Hitzeschocktransformation wurde SOC Medium zur Stabilisierung der Transformation und zur Entwicklung der Antibiotikaresistenz verwendet (s. u.). Die Aufzucht von Bakterien in Flüssigkulturen erfolgte bei 37 °C und 200-250 rpm im Schüttelinkubator bis die gewünschte Bakteriendichte bzw. das gewünschte Entwicklungsstadium erreicht war (i.allg. 8-16 h). Die Aufzucht von Bakterien auf Agarplatten erfolgte für die gleiche Zeitdauer und Temperatur im Brutschrank. Nach der Aufzucht können Flüssigkulturen und Plattenkulturen für mehrere Monate bei 4 °C gelagert werden. Zur mehrjährigen Lagerung müssen Flüssigkulturen mit Glycerin nach Sambrook et al. (1989) bei -70 °C eingefroren werden.

#### **LB Flüssigmedium:**

Für 1 Liter Medium werden 10 g/l Trypton oder Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl in 950 ml deionisiertem Wasser gelöst mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und mit deionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Anschließend wird das Medium für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Bei Bedarf erfolgt die Zugabe von 50-100 µg/l Ampicillin oder 50 µg/l Kanamycin durch konzentrierte und sterilfiltrierte Stammlösungen nach Abkühlen auf Raumtemperatur. Die Lagerung der Medien erfolgt bei Raumtemperatur oder bei 4 °C.

#### **LB Agarplatten:**

Zusammensetzung wie bei LB Flüssigmedium, jedoch Zugabe von 15 g Agar/l. Die Zugabe von Antibiotika in gleicher Konzentration wie beim Flüssigmedium erfolgt kurz vor dem Gießen in Petrischalen bei Erreichen von ca. 55 °C. Bei der Herstellung von Selektionsplatten zum blau/weiß *Screening* werden 40 µl einer X-Gal-Stammlösung auf die Oberfläche der erkalteten Platten aufgebracht und für ca. 15 min getrocknet. Die Platten werden bei Raumtemperatur oder bei 4 °C gelagert, bereits mit X-Gal versehene Platten müssen lichtgeschützt und bei 4 °C gelagert werden.

**Ampicillin und Kanamycin Stammlösungen:**

Jeweils 100 mg Ampicillin oder Kanamycin werden in 1 ml deionisiertem Wasser gelöst und anschließend sterilfiltriert. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgt bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ :

**X-Gal-(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid) Stammlösung:**

400 mg X-Gal werden in 10 ml Dimethylformamid gelöst und lichtgeschützt bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**SOC Medium:**

Für 1 Liter Medium werden 20 g/l Trypton oder Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,6 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1 g/l  $\text{MgCl}_2$ , 3,5 g/l Glukose in deionisiertem Wasser gelöst und 20 min bei  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  autoklaviert, das Medium wird bei Raumtemperatur oder bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Transformation von kompetenten Zellen mit den jeweilig verwendeten Plasmiden (siehe B.3.3) erfolgte durch Hitzeschock bei  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad für exakt 30 Sekunden. Danach wurden die Bakterien nach Zugabe von SOC Medium 30 Minuten bei Kanamycinresistenz und 1 Stunde bei Ampicillinresistenz bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Schüttler inkubiert und auf LB Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Bei Transformation von Plasmiden, die blau/weiß *Screening* ermöglichen, werden die antibiotikahaltigen LB Agarplatten zuvor mit X-Gal versetzt (s.o.). Die Herstellung von chemisch kompetenten Zellen erfolgte nach Sambrook et al. (1989) oder nach Angaben der Hersteller.

## B.4 Hefen und Hefevektoren

### B.4.1 Hefestämme

Es wurden vier von Herrn Dr. D. Pompon frei zur Verfügung gestellte und ein kommerziell erworbener Hefestamm verwendet.

Bei den Hefestämmen von Herrn Pompon handelt es sich um die haploiden *Saccharomyces cerevisiae* Stämme W(N), W(R), Wat11 und Wat21 (Pompon et al. , 1996). W(N) (*MAT $\alpha$* , *ade 2-1*, *leu 2-3*, *ura 3-1*, *trp 1*, *can<sup>R</sup>*, *cyr<sup>+</sup>*) stellt den ursprünglichen Hefestamm dar, aus dem die anderen Stämme durch „genetic engineering“ modifiziert wurden. Bei W(R) wurde der Promotor des hefeeigenen Cytochrom P450 Reduktase Gens mit Hilfe eines integrativen Vektors gegen einen Galaktoseinduzierbaren *GAL10-CYC1* ausgetauscht, welcher bei Induktion mit Galaktose die CPR überexprimiert. Da dieser Promotor von Glukose stark reprimiert wird, wird die CPR bei Anwesenheit von Glukose so gut wie nicht mehr exprimiert.

Bei WAT11 und WAT21 wurde durch integrative Vektoren das gesamte hefeeigene *CPR* Gen inklusive Promotor gegen jeweils ein *CPR* Gen aus *Arabidopsis thaliana* mit Galaktoseinduzierbaren *GAL10-CYC1* Promotor ausgetauscht. Bei diesen Genen handelt es sich um die offenen Leserahmen (ORF) der Genloci *ATR1* und *ATR2*.

Die integrativen Vektoren können sich, im Gegensatz zu den Hefeexpressionsvektoren, nicht autonom innerhalb der Hefezelle replizieren, sondern werden einzeln in das Hefegenom integriert und dort zusammen mit dem Hefegenom repliziert. Neben den offenen Leserahmen der *CPR* Gene mit *GAL10-CYC1* Promotor übertragen die integrativen Vektoren einen *URA3* Kompletationsmarker, was die Selektion der modifizierten Hefen auf einem uracilfreien Medium ermöglicht.

Bei dem kommerziell erworbenen *Saccharomyces cerevisiae* Stamm handelt es sich um den diploiden Stamm INVSc1(*MAT $\alpha$* , *his 3 $\Delta$ 1*, *leu2*, *trp 1-289*, *ura3-52* / *MAT $\alpha$* , *his3 $\Delta$ 1*, *trp1-289*, *ura3-52*) von der Fa. Invitrogen (Groningen, Niederlande).

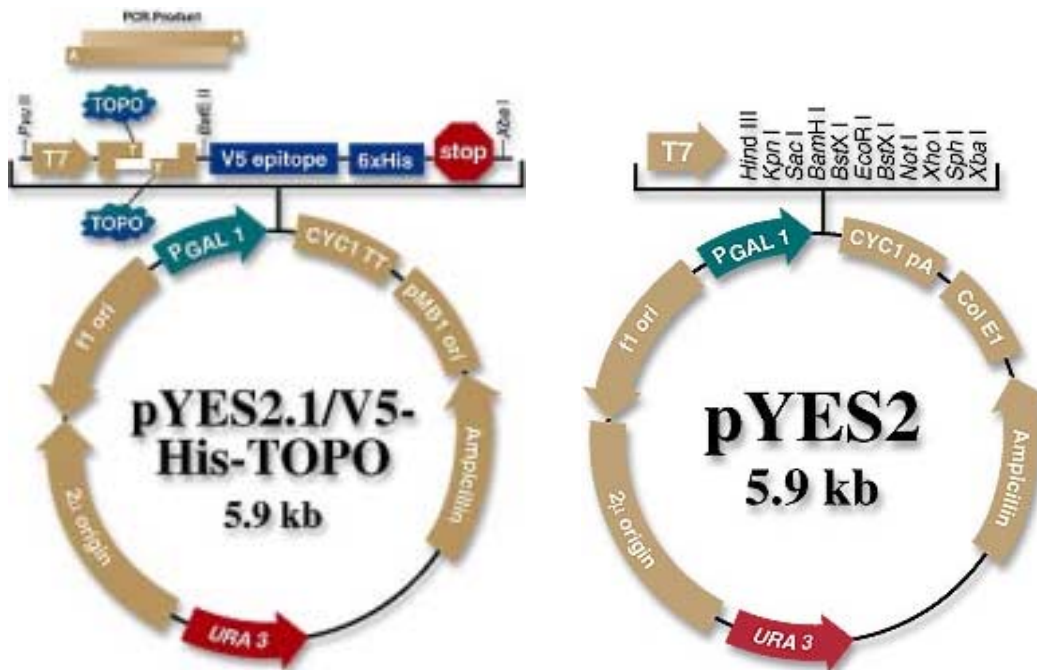
**Tab. 7:** CPR-Aktivität in den Mikrosomenfraktionen der verwendeten Hefestämme (Pompon et al., 1995).

Hefestamm	Ploidy	CPR-ORF	CPR-Promotor	CPR-Aktivität <sup>a)</sup>	
				In Glukose	In Galaktose
INVSc1	diploid	Wildtyp	Wildtyp	n. d.	n. d.
W(N)	haploid	Wildtyp	Wildtyp	100	100
W(R)	haploid	Wildtyp	GAL10-CYC1	≤ 0,1	2500-3000
WAT11	haploid	ATR1	GAL10-CYC1	≤ 0,1	200-300
WAT21	haploid	ATR2	GAL10-CYC1	≤ 0,1	300-400

a) Reduziertes Cytochrom c [nmol] /min \* mg mikrosomales Protein in 50 mM Tris-HCl Puffer pH 7,4 und 1mM KCN.

### B.4.2 Hefeexpressionsvektoren

Für die Expression der klonierten Cytochrom P450 Gene wurden drei verschiedene Hefeexpressionsvektoren verwendet. Der Hefektor pYeDP60 wurde von Herrn Dr. D. Pompon frei zur Verfügung gestellt (Urban et al., 1990 ; Pompon et al., 1996). Dieser Vektor verfügt neben einem *URA3*- über einen *ADE2*-Komplementationsmarker. Dadurch wird nach der Transformation mit diesem Expressionsvektor die Selektion aller verwendeten Hefestämme, auch wenn diese zum Teil durch einen integrativen Vektor *URA3* komplementiert sind, auf Adenosin freiem Medium ermöglicht (siehe B.4.1). Darüber hinaus ist die Komplementation mit *ADE2* auch bei Kultivierung von Adenosin auxotrophen Hefen in Komplettn Medien von Bedeutung, da bei hoher Zelldichte die sinkende Adenosinkonzentration spontan limitierend auf das Wachstum wirkt. Da pYeDP60 nicht über eine „Multiple Cloning Site“ verfügt, sondern nur über eine *Bam*HI- und eine *Eco*RI-Schnittstelle zwischen Promotor und Terminator, können Gene mit diesen Schnittstellen nicht ohne weiteres in den Vektor inkloniert werden. Bei den Hefektoren pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> und pYES2<sup>®</sup> (Invitrogen, Niederlande) handelt sich um zwei sehr ähnliche Expressionsvektoren, die sich nur in zwei Punkten unterscheiden. Während pYES2 über eine „Multiple Clonig Site“ verfügt und zirkular geliefert wird, stellt pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> einen linearisierten Vektor mit überhängenden Deoxythymidinen zur direkten Klonierung von PCR-Produkten mit überhängenden Adenosinen dar. Außerdem verfügt er über eine V5 Epitop- und eine Polyhistidin(6x)-Region. Beide dienen dazu, die Proteine der exprimierten Gene nachzuweisen und zu isolieren, soweit die klonierten Gene nicht über ein Stop Codon verfügen, so dass diese Regionen ebenfalls exprimiert werden.



**Abb. 13:** Hefeexpressionsvektoren pYES2<sup>®</sup> und pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, Groningen, Niederlande). Die vollständigen Sequenzdaten beider Vektoren können unter <http://www.invitrogen.com/> bezogen werden.

Alle drei Hefeexpressionsvektoren besitzen ein Ampicillinresistenzgen und können als „multy copy“ Plasmide in *E.coli* vervielfältigt werden.

### B.4.3 Anzucht, Transformation und Induktion von Hefen

#### B.4.3.1 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

Untransformierte Hefen werden in YPG(A/U)-Medium (20 g/l Glukose, 10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton) kultiviert, dem je nach verwendetem Hefestamm 30 mg/l Adenin oder 100 mg/ml Uracil zugesetzt werden kann. Aufgrund der zugegebenen Menge an Hefeextrakt war es in der Regel nicht notwendig den Uracil oder Adenin auxotrophen Hefestämmen zusätzlich die entsprechende Base zuzuführen.

Transformierte Hefen werden in SGI-Medium (20 g/l Glukose, 0,1 g/l Bactocasaminoacids, 0,67 g/l Yeast Nitrogen Base, 20 mg/l Tryptophan) oder in SRI (10 g/l Raffinose statt Glukose, sonst gleich wie SGI) kultiviert.

SRI-Medium ist SGI-Medium im allgemeinen vorzuziehen, es sei denn, es handelt sich „nur“ um Vor- oder Dauerkulturen. Die im SGI-Medium enthaltene Glukose hemmt den *Gal1* Promotor nahezu vollständig (West et al., 1984). Bei den verwendeten Hefestämmen sinkt die Cytochrom P450 Reduktase-Aktivität (CPR) bei Anwesenheit von Glukose unter 0,1 %, verglichen zum Wildtyp dessen CPR Expression nicht durch den *Gal1* Promotor gesteuert wird (siehe B.4.1). Nach vollständigem Verbrauch der Glukose durch die Hefen kann eine Induktion des *Gal1* Promotors durch Galaktose erfolgen (Giniger et al., 1985). In diesem Fall wird eine in SGI-Medium angezogene Vorkultur in YPGE-Medium (5 g/l Glukose, 30 ml/l Ethanol, 10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton) überimpft. In diesem Medium dient das enthaltene Ethanol nach Verbrauch der Glukose als Energie- und Kohlenstoffquelle. Beim Verwenden von SRI-Medium ist dies nicht notwendig, da die enthaltene Raffinose den *Gal1* Promotor weder hemmt noch induziert. Da Raffinose jedoch um ein Vielfaches teurer ist als Glukose ist bei Vor- und Dauerkulturen sowie bei der Kultivierung von untransformierten Hefen, Glukose zu verwenden. Glukose und Raffinose werden sterilfiltriert, alle anderen Bestandteile können bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert werden. Bei der Herstellung von Festmedien wurde dem entsprechenden Medium 15 g/l Agar zugegeben.

Die Anzucht der Hefen in Flüssigmedium erfolgte bei 28-30 °C und 200-250 rpm im Schüttler, auf Festmedium bei gleicher Temperatur im Brutschrank. Zur Kontrolle des Wachstums wurde die optische Dichte der Kultur bei 600 nm gemessen ( $OD_{600}$ ). Auf Festmedium ausgestrichen können die Hefen mindestens 1 Jahr bei 4 °C gelagert werden. Flüssigkulturen können innerhalb der frühen bis mittleren exponentialen Wachstumsphase unter Zugabe von 20 Vol.-% Glycerol bei -70-80 °C auf unbestimmte Zeit gelagert werden (Sherman, 1991).

#### **B.4.3.2 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae***

Die Transformation von *S. cerevisiae* mit den entsprechenden Expressionsvektoren erfolgte durch eine modifizierte LiAc/SS-DNA/PEG-Methode (Gietz et al., 1992, 1995; Schiestl und Gietz, 1989). Dabei wurden 10 ml YPG (siehe B.4.3.1) mit einer Kolonie des verwendeten Hefestamms angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 250 rpm im Schüttler



angezogen. Nach der Messung der  $OD_{600}$  wurden mit dieser Vorkultur 50 ml YPG mit einer Anfangs- $OD_{600}$  von 0,4 inokuliert und für weitere 2-4 Stunden bei 28 °C und 250 rpm kultiviert. Der Ansatz wurde dann in 10 ml Portionen aliquotiert und 2 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert, die Zellen in 10 ml TE (10 mM Tris-HCl; pH 7,5; 1 mM EDTA) resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in 1 ml LiAc/TE (100 mM LiAc; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten auf Raumtemperatur belassen und nachfolgend mit 1-5 µg Expressionsvektor (siehe B.4.2), 100 µg gescherstem und denaturiertem Heringsperma DNA (Sigma) und mit 300 µl PEG 4000 Lösung (40 %ig in Wasser gelöst) versetzt. Das verwendete Heringsperma wurde kurz vor Gebrauch durch 15minütige Erhitzung auf 95 °C und unmittelbar anschließender Abkühlung auf Eis denaturiert. Es folgte eine 30minütige Inkubation bei 28 °C und 120 rpm auf dem Schüttler darauf folgend ein 15minütiger Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad. Zu dem Ansatz wurde dann 1 ml YPG (siehe B.4.3.1) gegeben, 2 min bei 2500 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge), der Überstand dekantiert und das Pellet in 1 ml TE resuspendiert. Von dieser Suspension wurden jeweils 300 und 600 µl auf SGI Platten (siehe B.4.3.1) ausplattiert und bei 28 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 4 bis spätestens 7 Tagen war nach erfolgreicher Transformation ein Wachstum von Hefekolonien auf dem Selektionsmedium zu erkennen.

#### **B.4.3.3 Induktion von transformierten *Saccharomyces cerevisiae***

Die Transkription von transformierten *CYP*-Genen, und bei den Hefestämmen mit integriertem Vektor von dem transgenen Cytochrom P450 Reduktase-Gen (siehe B.4.1), wurde durch Zugabe von Galaktoselösung (20 %ig in Wasser gelöst) induziert. Dabei wurde 5 x 5 ml Vorkulturen in SGI-Medium über Nacht kultiviert und anschließend vollständig in 225 ml SRI-Medium überimpft. Nach Erreichen einer  $OD_{600}$  von 1 wurden 25 ml Galaktoselösung zugegeben und die Hefen ca. 15 Stunden weiterkultiviert (siehe B.4.3.1).

## B.5 Molekularbiologische Methoden

### B.5.1 Isolation von Pflanzen-RNA und *Northern*blot-Analyse

#### B.5.1.1 Isolation von Gesamt-RNA

Durch den hohen Gehalt an störenden Inhaltsstoffen, wie Polyphenolen und Polysacchariden, war es notwendig, verschiedene Methoden für die Isolation von Gesamt-RNA bei den untersuchten Pflanzen zu verwenden. Neben der Wahl der Pflanzen waren außerdem der Entwicklungszustand des Pflanzenmaterials und die Jahreszeit während der Ernte von Bedeutung. Generell konnte man feststellen, dass die Isolation von Gesamt-RNA aus späten Blütenstadien und aus während des Hochsommers geerntetem Pflanzenmaterial schwieriger war, was sich mit einer höheren Konzentration störender Inhaltsstoffe erklären ließ.

Bei den meisten Pflanzen, wie Levkojen, Petunien und Gerbera, konnte mit einer modifizierten Guanidin-Thiocyanat Methode (modifiziert nach Giuliano et al., 1993) qualitativ hochwertige Gesamt-RNA isoliert werden. Für diese Pflanzen konnten kleinere Mengen an Gesamt-RNA auch problemlos durch das RNAesy Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert werden.

Die Isolierung von Gesamt-RNA bei Sommeraster war, insbesondere bei im Hoch- bzw. Spätsommer geerntetem Pflanzenmaterial, mit der oben erwähnten modifizierten Guanidin-Thiocyanat Methode nur nach einem zusätzlichen Extraktionsschritt durch Zugabe der speziell Polysaccharid bindenden Matrix „Nucleon PhytoPure“ möglich (s. u. ).

#### **Gesamt-RNA Isolation (modifiziert nach Giuliano et al., 1993):**

Mit UV-Licht behandeltes deionisiertes Wasser und alle Geräte wurden bei 135 °C für 30 Minuten autoklaviert. Der Extraktionspuffer wurde sterilfiltriert.

Extraktionspuffer:  
 Guanidinthiocyanat        50 g  
 3M Natriumacetat        5 ml  
 Natriumsarcosinat        2 ml  
 ad 100 ml mit deionisiertem Wasser

Kurz vor der Präparation wurde 0,7 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol zu dem Extraktionspuffer zugegeben. Mörser, Pistil und Spatel wurden zuvor in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. 5 ml Extraktionspuffer und 4 ml Citrat-equilibriertes Phenol pH 4,3 wurden in ein Zentrifugenröhrchen vorgelegt und auf Eis gestellt. 2-3 g Pflanzenmaterial wurden in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver zermörsert und in das Röhrchen gegeben. Das Röhrchen wurde mit Parafilm möglichst dicht verschlossen und anschließend heftig gevortext. Nach vollständiger Homogenisierung wurde 1 ml Chloroform zugegeben und erneut gevortext bis das Homogenat gleichmäßig milchig-trüb erschien. Nach einer 10minütigen Inkubation bei 65 °C im Wasserbad und anschließender 5minütiger Abkühlung auf Eis erfolgte eine 20minütige Zentrifugation bei 4 °C und 15000 g. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und je nach verarbeitetem Pflanzenmaterial auf zwei verschiedene Arten weiterverarbeitet (s.o.). Bei Pflanzenmaterial mit hohem Anteil an schwer wasserlöslichen Polysacchariden wurde zum Überstand ein halber Volumenanteil –20 °C kaltes Chloroform und ein fünftel Volumenanteil Nucleon PhytoPure Resin<sup>®</sup> (Scotlab Ltd, Großbritannien) zugegeben, kräftig gevortext und für 10 Minuten bei 4 °C und 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues steriles Zentrifugenröhrchen überführt, mit einem Volumenanteil Isopropanol versetzt, 15 Minuten auf Eis gegeben und erneut 10 Minuten bei 4 °C und 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 1 ml Wasser gelöst, mit 200  $\mu$ l Ethanol versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert, um die noch gelösten Polysaccharide zu fällen. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 15000 g wurde der Überstand in ein neues steriles Röhrchen überführt und die RNA selektiv durch Zugabe von einem drittel Volumenanteil 8M LiCl und wenigstens halbstündiger Inkubation auf Eis gefällt. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 15000 g wurde das Pellet mit 80 %igem Ethanol gewaschen und anschließend in 500  $\mu$ l Wasser gelöst. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde photometrisch bestimmt (Sambrook et al., 1989). Die RNA konnte bei –20 °C in Wasser gelöst über mehrere Monate ohne erkennbaren Abbau gelagert werden.

Die Isolierung von Gesamt-RNA von Pelargonien ist äußerst problematisch. Es empfiehlt sich daher, bevorzugt Blüten zu verwenden, die unter Kunstlicht im Frühjahr, Herbst oder Winter geerntet wurden. Unter Zugabe von Nucleon PhytoPure Resin<sup>®</sup> (s.o.) war es möglich, von derartigem Pflanzenmaterial in stark verdünnten Ansätzen geringe Mengen an RNA zu isolieren. Für größere Maßstäbe wurde jedoch die besser geeignete Methode nach Dong und Dunstun (1989) verwendet.

### **B.5.1.2 Isolation von mRNA**

Die für *Northernblot*-Analyse (siehe B.5.1.3), subtraktive Hybridisierung zweier cDNA Populationen (siehe B.5.7) und das RLM-RACE (siehe B.5.8.2) benötigte polyadenylierte mRNA wurde durch Affinitätschromatographie mit Oligo(dT)-Zellulose (New England Biolabs, Frankfurt) nach Aviv und Leder (1972) isoliert. Außerdem wurde mRNA mit Oligotex™ (Qiagen, Hilden) und PolyAtract® mRNA (Promega, Mannheim) nach Angaben der Hersteller isoliert. Da insbesondere bei der subtraktiven Hybridisierung zweier cDNA Populationen (siehe B.5.7) große Mengen an qualitativ hochwertiger und rRNA freier mRNA benötigt wurden, musste die RNA zu diesem Zweck doppelt aufgereinigt werden. Dafür kam nur die mRNA Isolation durch Affinitätschromatographie mit Oligo(dT)-Zellulose in Frage. Bei den beiden anderen Verfahren kam es in der zweiten Aufreinigungsprozedur zu drastischen qualitativen und quantitativen Einbußen.

### **B.5.1.3 Northernblot-Analyse**

Bei *Northernblot*-Analysen wurden 5-10 µg mRNA eingesetzt und in einem 1,5 %igen, 6,6 % Formaldehyd enthaltenden Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen bei 60 V für 4-6 h elektrophoretisch aufgetrennt. Die Probenvorbereitung erfolgte nach Sambrook et al. (1989). Als Molekulargewichtsmarker wurde RNA-Marker I (Böhringer, Mannheim) verwendet. Das *Blotten* auf positiv geladene Nylonmembranen Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) erfolgte mit 20 x SSC Puffer nach einem Standardprotokoll (Darling und Brickell, 1996). Nach dem *Blotten* wurde die DNA durch Hitzebehandlung nach Angaben des Herstellers an der Membran fixiert.

## **B.5.2 Isolation von genomischer DNA und Southernblot-Analyse**

Die Isolation genomischer DNA bei *M. incana* erfolgte durch das DNAesy Plant-Mini-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Nachfolgende *Southernblot*-Analyse wurde nach einem Standardprotokoll (Bertram und Gassen, 1991) durchgeführt.

### **B.5.3 Dotblot-Analyse**

Zur Identifikation differenzieller cDNA Klone aus der subtraktiven Hybridisierung zweier differentieller cDNA-Populationen (siehe B.5.7) wurden die klonierten DNA-Fragmente u.a. durch *Dotblot*-Analyse verifiziert.

#### **B.5.3.1 Synthese von radioaktiv markierter erststrang cDNA**

Für die Synthese von radioaktiv markierter erststrang cDNA wurden jeweils 100 ng mRNA der Linie 04 und 12 von *M. incana* eingesetzt. Die Synthese wurde grundsätzlich wie in Kapitel 5.6.2 beschrieben durchgeführt, abweichend davon wurden dem Ansatz zusätzlich 1 µl 1 : 2 verdünntes  $\alpha$ -<sup>32</sup>P (10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol) zugegeben. Nach einem Verdau mit RNase H wurden die nicht inkorporierten Nukleotide durch eine Ammonium-acetatfällung (Sambrook et al., 1989) mit 1 µl Muskelglykogen (10mg/ml) als Carrier für die cDNA entfernt. Das Pellet wurde in 50 µl aufgenommen und zur Hybridisierung der *Dotblots* wie in Kapitel B.5.5.2 beschrieben eingesetzt.

#### **B.5.3.2 Dot-Blotting**

Die *Dotblot*-Analyse der klonierten DNA-Fragmente erfolgte nach einem Standardprotokoll (Darling und Brickell, 1996). Die dazu notwendige *Dotblot*-Analyse-Apparatur wurde von der Arbeitsgruppe Gietl vom Botaniklehrstuhl der Technischen Universität München zur Verfügung gestellt.

### **B.5.4 Screening einer cDNA-Genbank**

Die cDNA-Genbank der Sommeraster (*Callistephus chinensis*) wurde mit zwei F3',5'H „full-length“ cDNA-Klonen aus *Petunia hybrida* und einem F3'H „full-length“ cDNA-Klon aus *Arabidopsis thaliana* (Acc. : AL133421) „gescreened“. Bei den Klonen aus der Petunie handelt es sich um den offenen Leserahmen der cDNA-Klone *pCGP175* und *pCGP175* (Holton et al., 1993), die den beiden Genloci *Hf1* und *Hf2* entsprechen, welche die F3',5'H-Aktivität in der Petunie steuern. Bei dem cDNA-Klon aus *A. thaliana* handelt es sich um den offenen Leserahmen eines cDNA-Klons, der dem Genlocus *TT7* entspricht, welcher die F3'H-Aktivität in *A. thaliana* kontrolliert. Die cDNA-Klone aus der Petunie wurden nach mRNA-Isolation (siehe B.5.1) und cDNA-Synthese (siehe B.5.6.2) durch PCR-Amplifikation mit „end-to-end“ Primern isoliert. Die PCR Primer Hf15' und Hf13' (zur Amplifikation von *Hf1*), Hf25' und Hf23' (zur PCR Amplifikation von *Hf2*) und die Referenzen zu den entsprechenden cDNA-Klonen sind im Anhang G.1 bzw. G.5 aufgeführt.

Der cDNA-Klon von *A. thaliana* wurde von Herrn Dr. Bernd Weisshaar vom Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln zur Verfügung gestellt (siehe Anhang G.5).

#### **B.5.4.1 cDNA-Genbank der Sommeraster (*Callistephus chinensis*)**

Die cDNA-Genbank der Sommeraster (*Callistephus chinensis*) wurde von Herrn Prof. Dr. G. Forkmann zur Verfügung gestellt. Sie wurde aus 2-3 µg Poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus jungen Blütenknospen der Linie 01 hergestellt. Die Klonierung in Bakteriophagen Lambda NM1149 erfolgte durch Aufsetzen von *EcoRI*-Linkern, nachdem die cDNA zuvor durch *EcoRI*-Methylase methyliert worden war. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der cDNA-Moleküle wurden durch Elektroelution alle DNA-Fragmente, die größer als 900 Bp waren, eluiert und nachfolgend in die Phagenarme ligiert. Abschließend wurde die in die Phagenarme integrierte cDNA mit einem passenden Verpackungslysatz verpackt. Nach der Verpackung der DNA in die Phagen wurde der Phagentiter durch das Ausplattieren der Phagen in verschiedenen Verdünnungsstufen bestimmt.

#### **B.5.4.2 Anfertigen von Membranabdrücken und Hybridisierung**

Das Ausplattieren auf den *E.coli* Stamm K12 POP 13 erfolgte wie in Sommer et al. (1990) beschrieben. Das Anfertigen von Membranabdrücken mit positiv geladenen Nylonmembranen Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig) erfolgt wie bei Benton und Davis (1977) beschrieben.

#### **B.5.4.3 Identifizierung positiver Plaques und weitere *Screening*-Runden**

Nach dem Identifizieren positiver Plaques anhand des erstellten Autoradiogramms wurden diese großflächig mit der stumpfen Seite einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen und erneut in einer höheren Verdünnungsstufe ausplattiert (siehe B.5.4.2). Nach erneuter Hybridisierung waren in der Regel deutlich mehr Signale zu erkennen. Konnten die Signale deutlich abgegrenzten Einzelplaques zugeordnet werden, wurden diese mit der spitzen Seite einer Pasteurpipette ausgestochen und nachfolgend verifiziert (siehe B.5.4.4). War dies nicht möglich, musste eine dritte *Screening*-Runde erfolgen, indem wieder mit der stumpfen Seite einer Pasteurpipette ausgestochen wurde und mit einer noch höheren Verdünnung erneut ausplattiert wurde.

#### **B.5.4.4 Isolation von Phagen DNA und Insertverifikation**

Die Präparation von Phagen-DNA erfolgte nach Sambrook et al. (1989). Durch einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* wurde die Größe des Inserts der rekombinanten Phagen-DNA bestimmt. Aufgrund starker Verunreinigungen war es nicht möglich, die isolierte Phagen-DNA direkt durch Sequenzanalyse zu analysieren. Aus diesem Grund wurde die isolierte DNA mit Phagen spezifischen Primern durch PCR amplifiziert und in PCR-Klonierungsvektoren subkloniert. Bei diesen Primern handelt es sich um pLGT10-H und -R (siehe Anhang G.1), die die *EcoRI* Schnittstelle im Phagen-Genom auf beiden Seiten flankieren. Auf diese Weise konnte die Größe des Inserts bestimmt werden und das Insert im PCR-Vektor durch Sequenzanalyse verifiziert werden.

## B.5.5 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Molekülen

### B.5.5.1 Hybridisierungssonden

Radioaktiv markierte DNA-Sonden wurden nach der „random primed“ Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) hergestellt. Dabei wurden 5-25 ng DNA mit Hilfe des Rediprime™ DNA Labeling System (Amersham, Braunschweig) mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP (ICN, Meckenheim) nach Angaben des Herstellers markiert. Nicht inkorporierte Nukleotide wurden durch eine Sephadex™ Gelchromatographie nach Sambrook et al. (1989) entfernt. Die spezifische Aktivität der radioaktiv markierten DNA-Sonden wurde mit dem Szintillationsmeßgerät Quick Counter Bioscan QC 4000 XER (Bioscan, Washington, USA) ermittelt. Die durchschnittliche spezifische Aktivität der verwendeten Sonden lag zwischen  $0,7$ - $1,2 \times 10^9$  dpm/ $\mu$ g. Die hergestellten Hybridisierungssonden wurden bis zu ihrem Gebrauch bei  $-20$  °C tiefgefroren.

### B.5.5.2 Hybridisierungsbedingungen

Alle Hybridisierungen wurden mit 5 x SSC (20 x SSC: 3 mol/l NaCl<sub>2</sub>; 0,3 mol/l Na<sub>3</sub>; pH 7,0), 5 x Denhardt's Lösung (100 x Denhardt's Lösung: 2 % BSA [w/v]; 2 % Ficoll™ 400 [w/v]; 2 % PVP [w/v]) und 0,1 % (v/v) SDS (10 % SDS-Stammlösung [w/v]) durchgeführt. Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und wurden weder autoklaviert, noch sterilfiltriert. Die 100 x Denhardt's Stammlösung wurde bei  $-20$  °C gelagert.

1-2 Stunden vor dem Hybridisierungsverfahren wurde der Hybridisierungsofen auf die gewählte Temperatur vorgeheizt. Anschließend wurden 50 ml der oben genannten Lösung in ein Schott-Hybridisierungsgefäß gegeben und ca. 1 Stunde im Hybridisierungsofen erwärmt. Zwischenzeitlich wurde aliquotiertes geschertes Heringssperma aufgetaut und durch 15minütige Erhitzung auf 95 °C denaturiert und 1 min auf Eis abgekühlt. Nachdem die Hybridisierungslösung die entsprechende Temperatur erreicht hatte, wurde die zu hybridisierende Nylonmembran in das Hybridisierungsgefäß gegeben und 50  $\mu$ l des denaturierten Heringsspermas (100 mg/ml;  $\sim$ 100  $\mu$ g/ml final) hinzupipettiert.

Nach 2-4 Stunden Prähybridisierung wurde die entsprechende Hybridisierungssonde (siehe



B.5.5.1) auf die gleiche Weise wie das Heringssperma denaturiert und hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgte meist über Nacht, mindestens jedoch 16 Stunden. Nach der Hybridisierung wurde mit 2 x SSC, 0,1 % SDS für 30 min bei Hybridisierungstemperatur gewaschen, und 2 mal mit 1 x SSC, 0,1 % SDS für 20 min bei Hybridisierungstemperatur. Zwischen den einzelnen Waschsritten wurde mit einem Zählrohr die Radioaktivität des *Blots* gemessen, wobei strengstens darauf geachtet wurde, dass die Membran feucht blieb. Bei nur leicht erhöhter Strahlung gegenüber dem Hintergrund wurde auf weiteres Waschen verzichtet. Bei stark erhöhter Strahlung wurde bei 3 °C unterhalb der Hybridisierungstemperatur liegender Temperatur mit 0,1 x SSC, 0,1 % SDS jeweils 10 min gewaschen und anschließend erneut die Radioaktivität des *Blots* bestimmt. Dieser Waschschrift wurde solange wiederholt bis nur noch eine leicht erhöhte Radioaktivität der Membran zu messen war. Die Membran wurde auf einem Whatmanpapier abgetupft, noch feucht in eine undurchlässige Spezialfolie eingeschlagen und auf einer Photoplatte exponiert (siehe B.5.5.3).

#### **B.5.5.3 PC gestützte Auswertung von Autoradiogrammen**

Zur Erstellung von Autoradiogrammen wurden die speziellen Photoplaten BAS-MS 2040 von der Firma Fuji Photo Film verwendet und durch einen Fuji BAS 1000 Bio-Imaging Analyser (Fuji Photo Film GmbH, Nakanuma, Japan) in einen Personalcomputer eingelesen. Die Analyse erfolgte durch das Programm TINA 2,09 (Raytest, Straubenhardt, Deutschland)

## B.5.6 PCR-Techniken und reverse Transkription

### B.5.6.1 Synthetische Oligonukleotide

Die für diese Arbeit verwendeten synthetischen Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG (Ebersberg) und Metabiom (Martinsried) bezogen. PCR-Primer für die subtraktive Hybridisierung (siehe B.5.7) und für die verschiedenen RACE-Techniken (siehe B.5.8) gehörten zum Lieferumfang der erworbenen Reaktionssysteme. Alle verwendeten Primer sind im Anhang G.1 aufgeführt.

### B.5.6.2 Reverse Transkription

Reverse Transkription wurde mit Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (M-MLV RT) Superscript™ II RNase H<sup>-</sup> (Gibco/BRL, Eggenstein) und mit Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transkriptase (AMV RT, Boehringer, Mannheim) durchgeführt. Aufgrund der fehlenden RNase H Aktivität ist die M-MLV RT besonders zur Transkription von langen RNA-Molekülen geeignet, während die AMV RT durch ihre größere Hitzestabilität gekennzeichnet ist und daher vor allem für die Transkription von RNA-Molekülen, die reich an Sekundärstrukturen sind, verwendet wurde. Soweit nicht anders erwähnt wurden 1-5 µg Gesamt-RNA, oder bis zu 500 ng mRNA pro Ansatz verwendet. Die Reverse Transkription erfolgte nach Angaben des Herstellers des jeweilig verwendeten Enzyms. Zusätzlich wurde bei einigen RT-Ansätzen RNase Inhibitor (Promega, Mannheim) zugegeben. Bei unspezifischer cDNA-Synthese wurden Oligo(dT) Primer verwendet (T<sub>33</sub>VN, V = Wobble aus G, A, C; N = Wobble aus G, A, T, C). Bei spezifischer cDNA-Synthese, wie sie bei der subtraktiven Hybridisierung von differentiellen cDNA-Populationen (siehe B.5.7) und bei den verschiedenen RACE Techniken (siehe B.5.8) erforderlich war, wurden genspezifische Primer verwendet. Beim 3'RACE (siehe B.5.8.3) und bei PCR mit CYP-spezifischen Primern (siehe B.5.6.4) erfolgte die cDNA-Synthese mit Hilfe eines modifizierten Oligo(dT)-Primers (adapter primer, AP), der neben einem dT<sub>17</sub>-Anteil, welcher sich an das polyadenylierte 3'Ende der mRNA anlagert, über einen überhängenden 20 Nukleotid großen Adapteranteil verfügt, der für die nachfolgende PCR von Bedeutung ist.

Bei dem „Titan™ One Tube RT-PCR System“ der Firma Boehringer (Mannheim) erfolgte

die Reverse Transkription und die nachfolgende PCR-Amplifikation in einem Reaktionsansatz. In dem dafür verwendeten Enzymmix war neben einer M-MLV RT (mit RNase H Aktivität) und einer AMV RT eine thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermus thermophilus* enthalten, die über eine intrinsische RT Aktivität verfügt und dadurch eine hocheffiziente Transkription von RNA-Molekülen bis 1000 Basenpaaren bei Temperaturen um 75 °C ermöglichte. Für die PCR-Amplifikation war neben der erwähnten thermostabilen Polymerase aus *T. thermophilus*, der Expand™ High Fidelity Enzymmix im *One Tube* RT-PCR Ansatz enthalten (siehe B.5.6.3). Das verhältnismäßig teure Reaktionssystem wurde aus den Einzelkomponenten von verschiedenen Herstellern selbst hergestellt, wobei alle enthaltenen Enzyme bzw. Enzymgemische im gleichen Mengenverhältnis eingesetzt wurden. Bei routinemäßiger Anwendung konnten zwischen dem erworbenen und dem selbst hergestellten Reaktionssystem keinerlei Unterschiede festgestellt werden.

### B.5.6.3 Standard-, Gradienten- und One-Tube RT-PCR

Die Polymerasenkettenreaktion wurde mit den Standardthermozyklern Autogene II (Grant, Cambridge, England), MWG-Primus (MWG, Ebersberg) und dem Gradiententhermozykler Hybaid Express (Hybaid, USA) durchgeführt. Die in Tabelle 8 dargestellten thermostabilen Polymerasen wurden unter variierenden Bedingungen nach Angaben der Hersteller verwendet.

**Tab. 8:** Bezugsquellen und wichtigste Parameter der verwendeten thermostabilen DNA-Polymerasen.

Polymerase	T/A-Klonierung <sup>a)</sup>	Proof-Reading <sup>b)</sup>	Hersteller
ThermoZyme™	(+/-)	+	Invitrogen, Niederlande
Expand™ High fidelity PCR	(+/-)	+	Boehringer, Mannheim
AGSGold™	+	-	Hybaid, USA
Replitheme™	+	-	Epicentre, USA
Taq DNA Polymerase	+	-	Promega, Mannheim
<i>Tth</i> DNA Polymerase	+	-	Promega, Mannheim

a) Durch Anlagerung überhängender Deoxyadenosine Klonierung in speziellen PCR-Klonierungsvektoren möglich ( siehe B.5.9.1) b) Polymerasen mit 3'→5' Exonukleaseaktivität.

Bei den beiden zuerst aufgeführten Produkten handelt es sich um Kombinationen aus jeweils einer Polymerase mit 3'→5' Exonukleasaktivität und einer Polymerase ohne diese Aktivität, die unspezifisch Deoxyadenosine an die Amplifikate anhängt. Diese Enzymkombinationen wurden vornehmlich für Klonierung von „full-length“ cDNA-Klonen in Expressionsvektoren verwendet.

Die reverse Transkription (RT) und die nachfolgende PCR wurden bei der RT-PCR entweder in einem einzigen Versuchsansatz mit dem „Titan™ One Tube RT-PCR System“ durchgeführt oder nacheinander in zwei separaten Ansätzen (siehe auch vorheriges Kapitel B.5.6.2).

#### **B.5.6.4 PCR mit CYP-spezifischen Primern**

Zur Klonierung von F3'H- und F3',5'H-cDNA Klonen durch PCR wurden P450 spezifische Primer eingesetzt, die sich von der höchst konservierten Domäne D ableiten, welche die Hämbindungsregion darstellt (siehe A.3.1). Die erstellten Primer wurden in sense Orientierung (Downstream Primer) zusammen mit einem in antisense orientierten unspezifischen Amplifikationsprimer AUAP (Upstream Primer) eingesetzt. Bei dem unspezifischen Amplifikationsprimer AUAP handelt es sich um die überhängende Anchor-Region des bei der cDNA Synthese eingesetzten modifizierten Oligo(dT)-Primers (siehe B.5.6.2). Die Verwendung dieses Amplifikationsprimers statt eines einfachen Oligo(dT)-Primers bei der PCR ermöglichte höhere *Annealing*-Temperaturen und somit eine höhere Spezifität. Die Sequenz des modifizierten Oligo(dT)-Primers und des Amplifikationsprimer AUAP sind im Anhang G.1 dargestellt.

### **B.5.7 Subtraktive Hybridisierung zweier differentieller cDNA-Populationen**

Die zur Verfügung stehenden chemogenetisch definierten Linien von *M. incana* (siehe B.2.2), die bezüglich sieben die Flavonoidbiosynthese beeinflussenden Genen eindeutig charakterisiert sind, wurden für die subtraktive Hybridisierung von zwei differentiellen cDNA-Populationen verwendet. Von den 16 verwendeten Linien besitzen die Linien 01-08 eine F3'H-Aktivität in den Petalen (plus Linien), die Linien 09-16 keine (minus Linien). Die Linien ohne F3'H-Aktivität sind durch jahrzehntelange Züchtung aus den Linien mit F3'H-Aktivität hervorgegangen und unterscheiden sich in Beziehung auf die untersuchten Gene nur durch das Fehlen der F3'H-Aktivität. Somit ist Linie 01, was die verbleibenden 06 Gene angeht, isogen mit der Linie 09, Linie 02 isogen mit Linie 10, usw.. Durch langjährige Selektion des Phänotyps der Blütenfärbung über die sieben untersuchten Gene hinaus, entwickelte sich hinsichtlich der Blütenfärbung ein weitgehend isogener Hintergrund zwischen den jeweiligen Tochter- und Mutterpflanzen. Diese weitgehende Isogenität wurde dazu verwendet, mRNA- bzw. die entsprechenden cDNA-Populationen, von Pflanzen mit einer F3'H-Aktivität subtraktiv mit den cDNA-Populationen von Pflanzen ohne F3'H-Aktivität zu hybridisieren. Ziel dieser subtraktiven Hybridisierung war es, durch selektive PCR-Amplifikation von differentiellen cDNA-Klonen, einen cDNA-Klon, der die F3'H codiert, zu isolieren. Zu diesem Zweck wurde das Clontech „PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit“ verwendet (Clontech, Heidelberg, Deutschland).

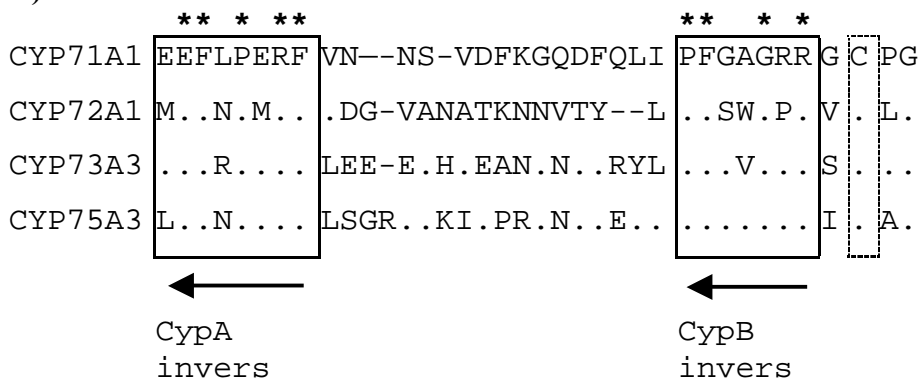
Die subtraktive Hybridisierung wurde in drei verschiedenen Ansätzen wiederholt. Im ersten Ansatz wurde die cDNA aus mRNA aller 8 plus Linien mit einem unspezifischen Oligo(dT)-Primer synthetisiert und mit der auf die gleiche Art synthetisierten cDNA aller 8 minus Linien subtraktiv hybridisiert.

Beim zweiten Ansatz wurde für die cDNA-Synthese ebenfalls mRNA von allen plus und minus Linien verwendet, jedoch erfolgte die cDNA-Synthese mit zwei Cytochrom P450 spezifischen Primern, so dass hauptsächlich Cytochrom P450 spezifische cDNA synthetisiert wurde. Bei diesen Primern handelt es sich um die Primer CypA invers und CypB invers, die entsprechend zweier hoch konservierter Bereiche pflanzlicher Cytochrom P450-Proteine bzw. P450-Gene in „antisense“ Orientierung konstruiert wurden (Akashi et al., 1996). Dabei wurde ein Proteinalignment von 4 pflanzlichen Cytochrom P450 Proteinen zugrundegelegt (Abb. 14).

Primer CypA invers wurde anhand der konservierten Domäne C mit bislang noch unbekannter Funktion hergestellt, Primer CypB invers anhand der in pflanzlichen P450 Proteinen am höchsten konservierte Domäne D, welche die Hämbindungsregion darstellt (siehe A.3.1). In den Positionen der entsprechenden Nukleotidsequenzen, wo bei allen Genen eine unterschiedliche Base auftrat, wurden Deoxyinosine als Basenanaloga verwendet, welche mit allen 4 Basen in etwa gleichstarke Bindungen eingehen. In Positionen, wo zwei oder drei verschiedene Basen auftraten, wurden „Wobbles“ verwendet (Abb. 14b).

Bei den zugrunde gelegten Cytochrom P450-Enzymen handelte es sich um CYP71A1 (*Persea americana*), CYP72A1 (*Catharanthus roseus*), CYP73A3 (*Medicago sativa*) und CYP75A3 (*Petunia hybrida*). Die Funktion von CYP71A1 und -72A1 sind bislang nicht bekannt, bei CYP73A3 handelt es sich um einen cDNA-Klon, der eine Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) codiert, CYP75A3 codiert eine Flavonoid 3',5'-Hydroxylase (F3',5'H). Beim dritten Ansatz erfolgte die cDNA-Synthese ebenfalls durch CypA und -B invers, jedoch wurde nur von der Plus-Linie 04 cDNA synthetisiert und mit cDNA von allen 8 Minus-Linien subtraktiv hybridisiert.

**A)**



**B)**

CYPA invers	AA(CT)CT(CT)(AT)(CT)IGGIII(AG)(AT)AI(GT)(CT)
CYPB invers	C(GT)I(GC)(GT)ICCIIIIC(CT)(AG)AAIG(GC)IA(AGT)

**Abb. 14:** Konstruktion von Reverse Transkriptase Primern für die cDNA-Synthese zweier differentieller mRNA-Populationen. a) Proteinalignment von CYP71A1, CYP72A1, CYP73A3 und CYP75A3. \* = absolut konservierte Aminosäurereste, . = Übereinstimmung mit der obersten Aminosäuresequenz von CYP71A1. Das Häm bindende Cystein ist mit gestrichelten Rahmen gekennzeichnet. b) Nukleotidsequenz der antisense RT Primer CypA und CypB (I = Deoxyinosin).

Nach der Synthese von doppelsträngiger cDNA wurden die beiden cDNA-Populationen mit *RSAI* verdaut. Anschließend teilte man die plus cDNA-Population (Tester Populationen) in zwei gleichgroße Ansätze auf und ligierte an die stumpfen Enden der verdauten cDNA jeweils die Adapter 1 und 2r (siehe Anhang G.1). Adapter 1 bestand aus 44 Bp, Adapter 2r aus 40 Bp. Die äußeren 22 Basen beider Adapter besaßen die gleiche Sequenz, während sich die inneren Bereiche, bestehend aus 22 bzw. 20 Bp, voneinander unterschieden (Abb.15). Die minus cDNA-Population (Driver-Population) wurde nicht mit einem Adapter ligiert.

Nach der Adapterligation erfolgte die erste Hybridisierung. Dabei wurden die separaten Testerpopulationen mit ihren unterschiedlichen Adaptoren hitzedenaturiert und jeweils mit einem 30igfachen Überschuss von hitzedenaturierter cDNA der minus Linien (Driver-Population) für 8 Stunden bei 68 °C inkubiert. Innerhalb dieser 8 Stunden sollte unter den gegebenen Bedingungen (Temperatur, Zusammensetzung des Reaktionspuffer) nur eine unvollständige Renaturierung komplementärer Schwesterstränge erfolgen und daher neben doppelsträngiger cDNA auch Einzelstränge auftreten. Durch den Überschuss an eingesetzter minus cDNA konnte man davon ausgehen, dass viele Einzelstränge der plus cDNA (**a**) mit den komplementären Einzelsträngen der minus cDNA Hybridmoleküle bildeten (**c**), wobei nur der Strang der plus cDNA über einen anligierten Adapter verfügte. Neben diesen Hybridmolekülen sollten aufgrund der hohen Konzentration am häufigsten renaturierte doppelsträngige cDNA der minus Population auftreten (**d2**). In Folge der geringen Konzentration seltener renaturierte doppelsträngige cDNA der plus Population (**b**). Außerdem traten von beiden Populationen Einzelstränge auf (**a** und **d1**).

Nach der achtstündigen Inkubation erfolgte die zweite Hybridisierung, in der die bei 68 °C inkubierten Ansätze unter Zugabe eines Überschusses an hitzedenaturierter minus cDNA vereinigt wurden. Besonders wichtig war dabei, dass der entstandene Gesamtansatz nicht zu sehr abkühlte und sofort wieder bei 68 °C inkubiert wurde, damit die Renaturierung der DNA-Moleküle nicht durch sinkende Temperatur beschleunigt wurde. Bei der über Nacht dauernden Inkubation bei 68 °C sollte sich nun die entscheidende Sorte von DNA-Hybridmolekülen bilden. Dabei renaturierten bei der ersten Hybridisierung einzelsträngig gebliebene plus cDNA-Moleküle eines Hybridisierungsansatzes (**a**) mit komplementären einzelsträngigen cDNA-Molekülen des anderen Ansatzes (**a'**). Die komplementären Schwesterstränge der so entstandenen Hybridmoleküle (**e**) trugen somit unterschiedliche Adapter an ihren 5'-Enden.

Am Ende der zweiten Hybridisierung wurden der 12 µl Gesamtansatz mit 200 µl Puffer verdünnt. Von diesem verdünnten Ansatz wurden unterschiedliche Mengen unter verschiedenen Bedingungen durch PCR amplifiziert. Dabei wurde nur ein einziger Primer verwendet (PCR primer 1), dessen Sequenz gleich dem äußeren, 22 Bp umfassenden, Bereich der anligierten Adapter 1 und 2r war (siehe Anhang G.1). Vor der eigentlichen PCR-Amplifikation musste der PCR-Ansatz für 5 min bei 75 °C vorinkubiert werden, damit die komplementären Stränge der einsträngigen Adapter an beiden Enden der entstandenen doppelsträngigen DNA-Moleküle aufgefüllt werden konnten.

Bei der eigentlichen PCR-Amplifikation sollte es bei der Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Moleküle zu einer PCR-Suppression kommen, die durch das Zusammenfallen der einzelsträngigen Moleküle verursacht wurde und es den PCR Primern dadurch nicht mehr ermöglichte, sich anzulagern. Diese Sandwichstruktur wurde dabei durch intramolekulare Anlagerung der Adapter bzw. der entsprechenden komplementären Enden der einzelsträngigen DNA-Moleküle verursacht (**b** und **b'**). In den Hybridmolekülen, die über unterschiedliche Adapter verfügten (**e**), sollte die Ausprägung der Sandwichstruktur geringer ausgeprägt sein als in den Molekülen mit gleichen Adaptern (**b**), da nur die äußeren gleich aufgebauten Bereiche der Adapter daran beteiligt waren. Im Vergleich zu der Anlagerung der kleinen und sehr beweglichen Primer sollte daher in diesem Fall die PCR-Suppression nur schwach ausgeprägt sein. Im Falle von Molekülen mit gleichen Adaptern, bzw. nach dem Auffüllen der Enden mit komplementären Enden der Einzelstrangenden über die gesamte Adapterlänge, sollte es hingegen zu einer nahezu kompletten PCR-Suppression kommen (**b** und **b'**). DNA-Moleküle ohne Adapter (**d**), oder zum Zeitpunkt des Auffüllens der komplementären Enden noch einzelsträngig vorliegende Moleküle (**a**), wurden überhaupt nicht amplifiziert. Doppelsträngige Moleküle, bei denen nur ein Schwesterstrang über einen Adapter verfügte, wurden nach dem komplementären Auffüllen dieses Adapters lediglich linear amplifiziert (**c**).

Die primären PCR-Ansätze wurden 1 : 10 verdünnt und durch eine zweite PCR mit „nested“ Primern erneut amplifiziert, um die differentiell exprimierten cDNA Klone weiter anzureichern. Die verwendeten Primer Nested PCR primer 1 und Nested PCR primer 2r entsprechen in ihrer Nukleotidsequenz den inneren Bereichen (22 bzw. 20 Bp) der entsprechenden Adapter (siehe Anhang G.1).

Nach der PCR wurden die Amplifikate in geeignete PCR-Klonierungsvektoren kloniert und anschließend durch *Dotblot* -, *Northernblot*- und Sequenzanalyse verifiziert.



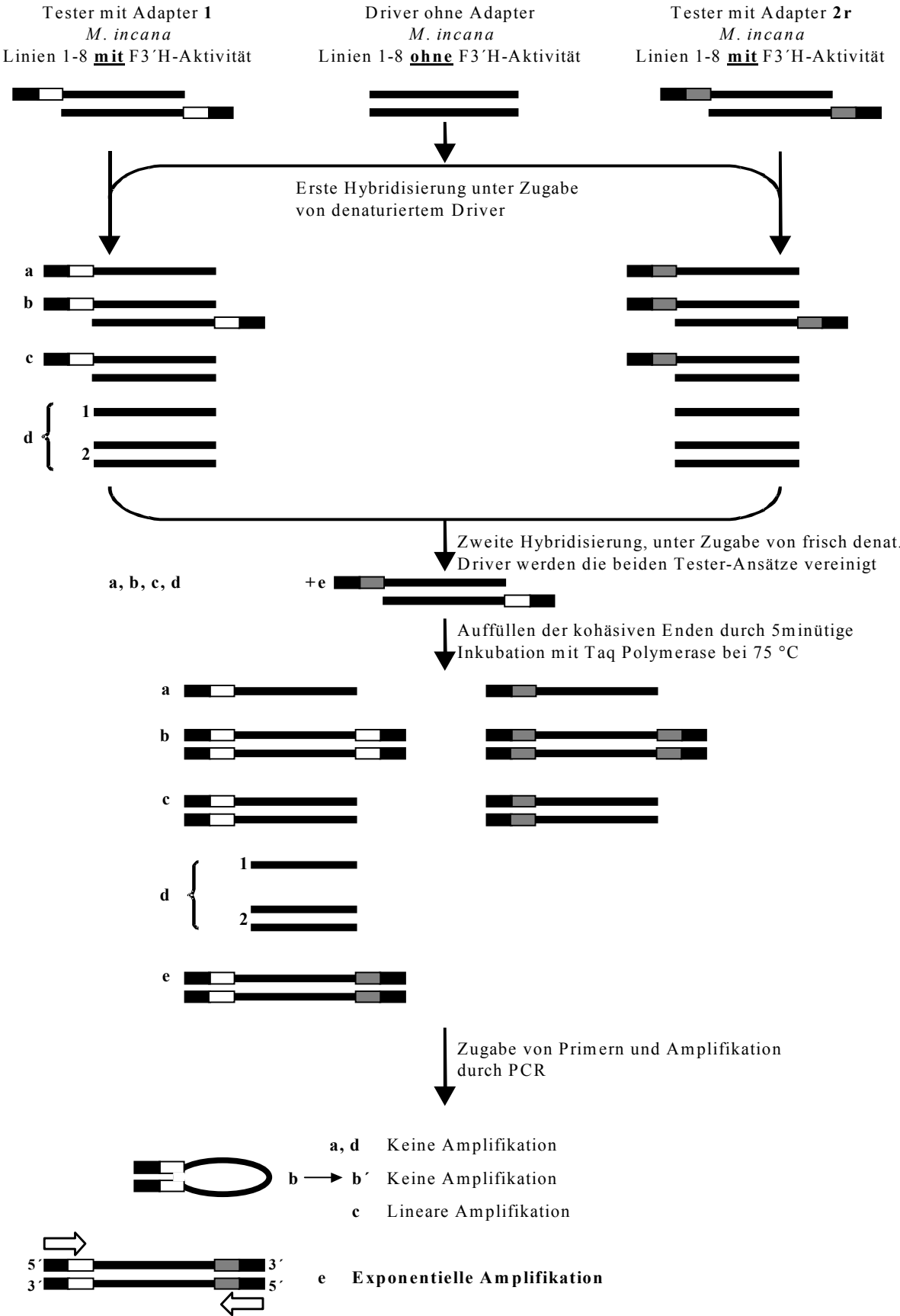


Abb. 15: Schematische Darstellung der subtraktiven Hybridisierung zweier differentieller cDNA-Populationen.

Aus der Kombination der beiden Hybridisierungsschritte sollten auf diese Weise nur adapterligierte plus cDNA-Moleküle, die in der ersten Hybridisierung einzelsträngig blieben und in der zweiten Hybridisierung mit ebenfalls einzelsträngigen plus cDNA-Molekülen doppelsträngige Hybridmoleküle mit unterschiedlichen Adaptern an den 5'-Enden bilden, exponential amplifiziert werden. Die erste Hybridisierung diente dabei zur Anreicherung seltener Transkripte, die aufgrund ihrer geringen Konzentration im ersten Hybridisierungsansatz langsamer renaturierten als häufig vorkommende Transkripte und daher anteilig länger einzelsträngig blieben. Bei der zweiten Hybridisierung sollten dann nur diese einzelsträngig verbliebenen Moleküle aus den zwei Hybridisierungsansätzen im vereinigten Ansatz die Hybridmoleküle mit unterschiedlichen Adaptern bilden und als einzige exponentiell amplifiziert werden. Durch zwei, statt nur einem Hybridisierungsschritt sollte es daher nicht nur möglich sein, differentiell exprimierte cDNA Klone zu isolieren, sondern dabei auch seltene Transkripte zu berücksichtigen. Die exakte Durchführung der subtraktiven Hybridisierung erfolgte weitgehend nach den Angaben des Herstellers. Das Manual kann unter <http://www.clontech.com/techinfo/manuals/PDF/PT11171.pdf> bezogen werden.

### **B.5.8 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)**

Zur Erzeugung von „full-length“ cDNA aus cDNA-Fragmenten wurde eine schnelle Amplifikation von cDNA-Enden durchgeführt (Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE). Dabei handelt es sich um eine spezielle RT-PCR-Technik, bei der mit Hilfe von genspezifischen Primern, die anhand der bereits bekannten Sequenz konstruiert wurden, die fehlenden 5'-und 3'-Enden des Fragmentes durch PCR amplifiziert werden. Je nachdem, ob das 5'- oder das 3'-Ende gesucht wird, unterscheidet man zwischen dem 5'- und dem 3'-RACE.

#### **B.5.8.1 5'-RACE mit A- und C-Tailing**

Das 5'-RACE mit A- und C-Tailing erfolgte nach modifizierten Protokollen von Frohmann et al. (1988, 1993) mit Hilfe des „5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA, Version 2.0“ der Firma GIBCO BRL (Eggenstein). Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe eines genspezifischen Primers (GSP 1) durchgeführt (siehe auch B.5.6.2). Nach erfolgter cDNA-Synthese wurde die RNA durch einen RNase-Enzymmix verdaut und der Ansatz danach durch das mitgelieferte „GlassMax“ Reinigungssystem gereinigt. Dabei handelt es sich um Affinitätschromatographie, die dazu dient, alle Nukleinsäuren (inklusive Primer), die kleiner als 200 Bp sind, aus dem Ansatz zu entfernen. Um sicher zu gehen, dass die synthetisierte cDNA von der Silicamatrix ausreichend stark gebunden wird, sollte man daher die Position des cDNA-Synthese-Primer so wählen, dass ein mindestens 300 Nukleotide großes cDNA-Molekül synthetisiert wird. Nach der Reinigung wurden durch die terminale Transferase dATPs oder dCTPs an das 3'-Ende der cDNA angehängt. In der Regel erzeugt die terminale Transferase längere Oligo(dA)-, als Oligo(dC)-Enden (Kato et al., 1967), was sich bei der nachfolgenden PCR nachteilig auswirken kann. Daher sollte im Regelfall das C-Tailing dem A-Tailing vorgezogen werden. Nach dem Tailing erfolgte die erste PCR mit einem zweiten, weiter innen liegenden, genspezifischen Primer (GSP 2) und mit einem Primer, der sich an das Oligo(dA)- oder an das Oligo(dC)-Ende anlagerte. Im Falle des A-Tailings war dies der „Adapterprimer“ (AP), der auch beim 3'-RACE verwendet wurde (siehe B.5.8.3). Dieser Primer besitzt ein dT<sub>17</sub>-Ende, das sich an das Oligo(dA)-Ende anlagert und einen über- bzw. abstehenden 20 Bp großen Adapteranteil (siehe G.1).

Im Falle des *C-Tailings* war dies der „Abridged Anchor Primer“ (AAP). Das an das Oligo(dC)-Ende der cDNA bindende Ende dieses Primers besteht aus 16 Nukleotiden mit 10 Deoxyguanidinen und 6 Deoxyinosinen (siehe Anhang G.1). Die Verwendung von Deoxyinosinen liegt darin begründet, dass ein ausschließlich aus Deoxyguanidinen bestehender Bindungsbereich gegenüber dem, bei der ersten PCR außerdem verwendeten zweisekzifischen Primer (GSP 2), eine wesentlich höhere Schmelztemperatur besitzen würde und daher seine Verwendung vermehrt zu unspezifischen Amplifikationen führen könnte. Außer der bindenden Region besitzt AAP den gleichen 20 Basenpaar großen Adapteranteil wie AP.

Nach der ersten PCR erfolgte mit dem 1:100 verdünnten Ansatz eine zweite PCR („nested“ PCR), die bei verschiedenen *Annealing*-Temperaturen im Gradiententhermozykler durchgeführt wurde (siehe B.5.6.3). Dabei wurde ein dritter, am weitesten innen liegender, genspezifischer Primer (GSP 3) und der „Abridge Universal Anchor Primer“ (AUAP) verwendet. Die Nukleotidsequenz von AUAP entspricht der des Adapteranteils von AAP und AP. Zum Teil waren weitere PCRs mit immer weiter innen liegenden genspezifischen Primern und AUAP notwendig, da das zu erwartende Amplifikat nicht deutlich genug zu erkennen war. Alle weiteren PCRs wurden im Gradiententhermozykler bei verschiedenen *Annealing*-Temperaturen durchgeführt.

Nach jeder PCR wurde der Ansatz durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Abhängig davon wie viele unspezifische Amplifikate neben dem vermuteten Fragment auftraten, wurde der PCR-Ansatz direkt oder erst nach Aufreinigung in einen geeigneten PCR-Klonierungsvektor inkloniert (siehe B.5.9.1). Auch zwischen den beiden PCR-Ansätzen wurde zum Teil dieser Aufreinigungsschritt durchgeführt.

#### **B.5.8.2 RLM-RACE**

Das RLM-RACE wurde mit dem „GeneRacer™ Kit“ der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Unter RLM-RACE (**R**NA **L**igase-**M**ediated **R**apid **A**mplification of 5' and 3' cDNA ends) versteht man eine RACE-Technik, die sich grundlegend von den „normalen“ RACE-Techniken unterscheidet. Hier findet die notwendige Modifikation durch *Tailing* oder Adapterligation nicht nach der cDNA-Synthese statt, sondern zuvor durch eine Modifikation der eingesetzten mRNA.

Dabei führt die Tatsache, dass mRNA-Moleküle mit einem vollständigen und undegradierten 5'-Ende eine 7-Methylguanosingruppe besitzen dazu, dass ausschließlich „full-length“ mRNA bzw. daraus synthetisierte cDNA im weiteren Verlauf amplifiziert werden. Die 7-Methylguanosingruppe wird im Verlauf der posttranskriptionalen Modifikation eukaryontischer mRNA (Processing) über eine Triphosphatbrücke an das 5'-Ende angehängt (Capping). Neben der Funktion einer Signalstruktur beim „Einfädeln“ der mRNA in die Ribosomen wird vermutet, dass die 7-Methylguanosingruppe die mRNA vor der Degradierung durch Exonukleasen schützt.

Beim RLM-RACE wird die eingesetzte mRNA zunächst mit einer aus der Darmschleimhaut von Kälbern gewonnenen alkalischen Phosphatase (calf intestinal phosphatase, CIP) behandelt. Dieses Enzym entfernt frei zugängliche Phosphatgruppen am 5'-Ende von Nucleinsäuren. Da die 7-Methylguanosingruppe das 5'-Ende vor Dephosphorylierung schützt, werden nur 5'-Enden von bereits degradiertem mRNA dephosphoryliert. Nach dem Entfernen der CIP durch Phenol-Chloroform-Extraktion werden die 7-Methylguanosingruppen durch die Tabaksäure-Pyrophosphatase (Tobacco Acid Pyrophosphatase, TAP) entfernt und es verbleiben frei zugängliche Monophosphatgruppen an den 5'-Enden der mRNA zurück. An diese Phosphatgruppen wird mit Hilfe der T4-RNA-Ligase ein 44 Nucleotide großer RNA-Adapter anligiert. Da die T4-RNA-Ligase nur 5'-Enden mit einer Monophosphatgruppe mit der Hydroxylgruppe des RNA-Adapters verbinden kann, werden nur „full-length“ mRNA mit einem Adapter versehen. Nach der Adapterligation erfolgt eine cDNA-Synthese durch einen genspezifischen Primer (GSP 1). Anschließend wird die cDNA mit einem weiteren genspezifischen Primer (GSP 2) und einem 23 Nucleotide großen Primer, dessen Sequenz homolog zu der Sequenz der äußeren 23 Nucleotide des RNA-Adapters ist, durch PCR amplifiziert. In den meisten Fällen war schon nach der ersten PCR ein deutliches Amplifikat mit der zu erwartenden Größe zu erkennen und konnte ohne weitere Aufreinigung in geeignete PCR-Klonierungsvektoren inkloniert werden (siehe B.5.9.1). Selten war eine zweite PCR mit „nested“ Primern notwendig, die mit verschiedenen *Annealing*-Temperaturen im Gradiententhermozykler durchgeführt wurde (siehe B.5.6.3). Eine Aufreinigung des PCR Ansatzes war in keinem Fall notwendig.

### **B.5.8.3 3'-RACE**

Das 3'-RACE stellt ein verhältnismäßig einfaches Verfahren dar, um fehlende 3'-Enden von klonierten DNA-Fragmenten durch eine spezielle RT-PCR zu amplifizieren. Beim 3'-RACE erfolgt die cDNA-Synthese (siehe B.5.8.3) genauso, wie bei der PCR mit *CYP*-spezifischen Primern (siehe B.5.6.4), mit Hilfe eines modifizierten Oligo(dT)-Primers (adapter primer, AP). Dieser Primer besitzt ein dT<sub>17</sub>-Ende, das sich an das Oligo(dA)-Ende anlagert, und einen über- bzw. abstehenden, 20 Basenpaar großen Adapteranteil (siehe Anhang G.1). Das Einführen dieses Adapteranteils bei der cDNA-Synthese ermöglicht bei der anschließenden PCR höhere *Annealing*-Temperaturen und somit eine höhere Spezifität. Dabei wird neben einem genspezifischen Primer, der anhand der bereits bekannten Sequenz konstruiert wird, ein 20 Nukleotide großer Primer verwendet, dessen Sequenz dem bei der cDNA-Synthese eingeführten Adapteranteil entspricht. Die errechnete Schmelztemperatur dieses Primers liegt, je nach verwendetem Algorithmus, zwischen 66 und 79,3 °C, was zusammen mit einem entsprechend konstruierten genspezifischen Primer hohe *Annealing*-Temperaturen bei der PCR im Gradiententhermozykler ermöglichte (siehe B.5.6.3). In der Regel reichte eine PCR aus, um ein deutliches Amplifikat mit der zu erwartenden Größe zu erkennen und ohne weitere Aufreinigung des PCR-Ansatzes direkt in geeignete PCR-Klonierungsvektoren einzuklonieren (siehe B.5.9.1).

## **B.5.9 DNA-Klonierungstechniken**

### **B.5.9.1 Klonierung von PCR-Produkten**

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte in speziellen PCR-Klonierungsvektoren, die linearisiert einzeln überhängende Deoxythymidine bzw. Uridine an ihren 3'-Enden tragen, nach den Angaben des jeweiligen Herstellers (siehe B.3.3). Abhängig von der bei der PCR verwendeten thermostabilen DNA-Polymerase wurde an unterschiedlich großen Anteilen von PCR-Produkten ein einzelnes überhängendes Deoxyadenosin angehängt und diese anschließend leicht in die PCR-Klonierungsvektoren einligiert (siehe B.5.6.3).

Bei ausschließlichem Gebrauch von „Proof Reading“ Polymerasen mit 3'→5'-Exonukleaseaktivität, die mehr als 95 % Amplifikate mit glatten Enden erzeugen, wurde dem Ansatz nach erfolgter PCR eine Einheit *Taq*-Polymerase zugegeben und 8-10 min bei 72 °C im Thermozykler inkubiert. Durch diese Postamplifikation wurden die zur Klonierung benötigten überhängenden Deoxyadenosine an ausreichend vielen Amplifikaten angehängt. PCR-Ansätze, die überwiegend nur ein Amplifikat mit der erwarteten Größe enthielten, konnten ohne weitere Aufreinigung in die PCR-Vektoren kloniert werden. Bei starker Kontamination mit Primerdimeren oder unspezifischen Amplifikaten unter 150 Basenpaaren, reichte im allgemeinen die Reinigung mit „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche, Schweiz) aus. Bei Kontamination mit Amplifikaten über 150 Basenpaaren wurde das gesuchte Fragment wie unter B.5.9.2 beschrieben aus einem Agarosegel eluiert und anschließend in einen geeigneten PCR-Vektor einligiert. Nach der Ligation wurden die Vektoren in *E. coli* transformiert (siehe B.3.4).

#### **B.5.9.2 Subklonierung in vorgeschchnittene Plasmide**

Zur Herstellung von Transformationskonstrukten zur Transformation von Hefen (siehe B.4.3.2) oder zur Transformation von Blütenblättern mit Hilfe der Partikelkanone (siehe B.5.11) mussten die zuvor in PCR-Klonierungsvektoren klonierten (siehe B.5.9.1) cDNA-Klone in die entsprechenden Vektoren subkloniert werden. Dabei wurden die Gene mit geeigneten Restriktionsenzymen aus dem PCR-Klonierungsvektor ausgeschnitten und in die Hefeexpressionsvektoren bzw. den „Schussvektor“, die mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten worden waren, inkloniert. Zuvor wurden das ausgeschnittene Insert und der geschnittene Vektor in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch „QIAquick Gel Extraction Kit“ oder durch „QIAex II Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) aus dem Gel eluiert. Anschließend wurden Insert und Vektor mit der T4-DNA-Ligase (Promega, MBI Fermentas, Roche) in verschiedenen Mengenverhältnissen und unter unterschiedlichen Bedingungen nach Angaben der Hersteller miteinander ligiert und in *E. coli* transformiert (siehe B.3.4). Die korrekte Orientierung der ORFs in den einzelnen Expressionsvektoren wurde anhand interner Restriktionsschnittstellen des cDNA-Klons und Schnittstellen im Vektor durch den Endonukleasenverdau überprüft.

### B.5.9.3 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte im Minimaßstab durch das „Plasmid Miniprep Kit - Quantum Prep<sup>®</sup>“ (Biorad, USA), im Midi- und Maximaßstab mit dem „Plasmid Purification Midi-“ bzw. „Maxi-Prep“ (Qiagen, Hilden).

### B.5.10 DNA-Sequenzierung

Zu Beginn dieser Arbeit wurde DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruch- oder Dideoxy-Methode (Sanger et al., 1977) mit radioaktivem [ $\alpha^{35}\text{S}$ ] dATP durchgeführt. Dabei wurde das Sequenzier-Kit „Sequenase<sup>®</sup> Version 2.0“ (Amersham, Braunschweig) verwendet. Als Sequenzierprimer dienten die mit den Klonierungsvektoren mitgelieferten Sequenzierprimer des jeweiligen Herstellers (siehe B.3.3). Im weiteren Verlauf wurden Sequenzierungen von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg, <http://www.mwg-biotech.com/>) und TopLab (Martinsried, <http://www.toplab.de/>) durchgeführt.

### B.5.11 Transformation von Blütenblättern mit der Partikelkanone

Drei in dieser Arbeit klonierte Gene sollten mit Hilfe einer Partikelkanone in Blütenkronblätter von *Petunia hybrida* transformiert werden. Dabei wurden verschiedene Blütenstadien der Linie RI01 verwendet. Diese nahezu farblose, blass rosa gefärbte Mutante trägt die homozygot rezessiven Allele *ht1* und *hf1* und besitzt daher keine F3'- und F3',5'-H-Aktivität. Aus diesem Grund kommt in den Blütenblättern dieser Linie nur das 4'-hydroxylierte Dihydrokaempferol vor. Da die Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR) in *P. hybrida* nur Flavonole akzeptiert, die am B-Ring 3',4'-(Dihydroquercetin) oder 3',4',5'-hydroxyliert (Dihydromyricetin) sind, unterbleibt in dieser Linie die Anthocyan synthese (Meyer et al., 1987). Durch die Transformation von Sepalen mit cDNA-Klonen, welche die F3'- und/oder die F3',5'H codieren, sollte es daher möglich sein, die entsprechenden hydroxylierten Flavonole zu erzeugen und dadurch eine Anthocyan synthese zu ermöglichen.



Die Transformation der Blütenkronblätter von *P. hybrida* wurde in Zusammenarbeit und unter der Leitung von Dirk Börstling, Mitarbeiter des Lehrstuhls, durchgeführt.

Dabei wurden die drei zu transformierenden Gene zunächst in den Vektor pGun einkloniert (siehe B.3.3), der einen doppelten 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus vor der multiplen „cloning site“ besitzt. Zu diesem Zweck wurde der offene Leserahmen der drei Gene durch RT-PCR amplifiziert und in den geschnittenen Vektor einkloniert (siehe B.5.9.2). Anschließend wurden diese Konstrukte auf Goldpartikel aufgelagert und mit Hilfe der Partikelkanone Biolistic<sup>®</sup> PDS-1000/He (Biorad, USA) durch einen starken Heliumüberdruck auf die Blütenblätter geschleudert. Die Verwendung des Edelgases Helium zur Erzeugung des Überdruckes und von Gold als Trägerpartikel liegt in der biologischen Inertheit dieser Elemente begründet.

Die Partikelkanone ist im wesentlichen aus drei Kammern aufgebaut. In der oberen, wird durch den Heliumzufluss aus einer Druckflasche ein starker Überdruck aufgebaut. Die mittlere und untere sind durch eine Plexiglastür frei zugänglich und werden durch ein Mittelstück mit integriertem Schraubeinsatz voneinander getrennt.

Die Beschichtung der Goldpartikel mit der DNA erfolgte durch das sogenannte „coating“. Dabei wurden Goldpartikel mit einem Durchmesser von 1 µm (Biorad, USA) in Ethanol oder Glycerin zunächst fein suspendiert. Anschließend wurde das zu transformierende Plasmid zu dem suspendierten Gold zugegeben und unter Zugabe von Spermidin als DNA-Schutzsubstanz mit CaCl<sub>2</sub> gefällt. Dabei lagerten sich die DNA-Moleküle an die Goldpartikel an. Die Goldpartikel wurden anschließend mit verschieden starkem Druck auf die auf Nährmedium gebetteten Blüten geschleudert. Dazu wurde die Gold-DNA-Suspension auf eine Kunststoffträgerscheibe pipettiert und kurz angetrocknet, wobei darauf zu achten war, dass die Suspension nicht vollkommen austrocknete. Der Plastikträger wurde dann zusammen mit einem metallenen Rückhaltesieb in den runden Schraubeinsatz gelegt, der die mittlere von der unteren Kammer trennt. In einen zweiten Schraubeinsatz, der die Überdruckkammer von der mittleren Kammer trennt, wurde eine Berstscheibe eingelegt, die bei Erreichen eines bestimmten Druckes barst. Nach dem Positionieren der Blütenblätter in der unteren Kammer wurde dort durch eine Elektrovakuumpumpe ein Unterdruck erzeugt. Ab einem gewissen Unterdruck wurde die Heliumzufuhr an einer Druckflasche geöffnet und kurz darauf, bei Erreichen eines bestimmten Drucks, platzte die Berstscheibe. Dadurch wurde der Druck in der mittleren Kammer schlagartig erhöht, die mit den Gold-DNA-Partikel beschichtete Trägerscheibe platzte und die Partikel wurden durch den Schraubeinsatz

hindurch auf die darunter liegenden Blüten geschleudert. Das wenige Millimeter unterhalb der Trägerscheibe befindliche Rückhaltesieb hielt dabei die Trümmer der Trägerscheibe zurück und ließ nur die feinen Partikel hindurch. Die genaue Handhabung der Partikelkanone und eine detaillierte Beschreibung von der Präparation der Gold-DNA-Partikel können aus dem Handbuch der Partikelkanone entnommen werden.

### **B.5.12 Heterologe Genexpression in Hefe**

Um die Funktion der Genprodukte der klonierten *CYP*-cDNA-Klone nachzuweisen wurden diese heterolog in Hefen exprimiert. Dazu wurden die offenen Leserahmen dieser Klone mit „end-to-end“ PCR-Primern durch PCR amplifiziert, in geeignete PCR-Vektoren zwischenkloniert (siehe B.5.9.1) und anschließend in Hefeexpressionsvektoren subkloniert (siehe B.5.9.2). Mit den transformierten Hefen wurden sowohl *in vivo* Enzymtests, als auch *in vitro* Enzymtests mit isolierten Mikrosomen durchgeführt (siehe B.6.2).

### **B.5.13 Allgemeine molekularbiologische Standardmethoden**

Alle weiteren nicht näher beschriebenen molekularbiologischen Standardmethoden erfolgten nach Sambrook et al. (1989) und Bertram und Gassen (1991).

## **B.6 Proteinbiochemische Methoden**

### **B.6.1 Präparation von Hefemikrosomen**

Unter Mikrosomen versteht man kleine geschlossene Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 100 nm, die bei der Homogenisierung von Zellen bzw. Geweben aus dem endoplasmatischen Reticulum entstehen. Je nachdem ob bei der Homogenisierung raues oder glattes endoplasmatisches Reticulum zerstört wird, unterscheidet man raue und glatte Mikrosomen. Raue Mikrosomen sind an der Außenseite mit Ribosomen besetzt, d.h. die Orientierung der Membran bleibt erhalten.

Die Präparation von Hefemikrosomen erfolgte 14-18 Stunden nach der Galaktoseinduktion der Hefen (siehe B.4.3) nach einem modifizierten Protokoll von Pompon et al. (1996). Zunächst wurden die 250 ml Kulturen durch 5minütige Zentrifugation (2500 g, RT) in passenden Zentrifugenbehältnissen geerntet, in 27 ml TEK-Puffer (0,1 M KCl; 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA) resuspendiert und erneut wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig dekantiert und mit eiskaltem TES-B-Puffer (50 mM Tris, pH 7,4; 1 mM EDTA; 0,6 M Sorbitol; 2 mM DTT) resuspendiert. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Hefesuspension wurde nun in ein dicht verschraubbares 50 ml Kunststoffreaktionsgefäß (Falcon, Nalgene oder vergleichbares) pipettiert und mit 10 g säuregewaschenen Glasperlen ( $\varnothing$  425-600  $\mu$ m, Sigma) versetzt. Anschließend wurden die Hefen durch heftiges Schütteln aufgebrochen. Dabei wurde das Gefäß jeweils 30 Sekunden heftigst geschüttelt und anschließend für 30 Sekunden auf Eis abgekühlt. Dieser Vorgang wurde zunächst 20 mal wiederholt, dann erfolgte eine mikroskopische Kontrolle, ob der Großteil der Hefezellen aufgeschlossen worden war. Dies war daran zu erkennen, dass die zuvor runden bzw. ovalen Hefezellen nun unter dem Lichtmikroskop ein kantiges und eckiges Erscheinungsbild hatten. In der Regel waren die meisten Hefezellen nach 20maligem Schütteln aufgebrochen, im Zweifelsfall wurde der Vorgang noch 10 mal wiederholt. Nach dem Aufschluss wurden dem Ansatz weitere 5 ml TES-B zugegeben und nach kurzem Anzentrifugieren (bis 800 rpm mit quickstart) der Gefäße der Überstand abgenommen und in ein für höhere g-Werte geeignetes Zentrifugenröhrchen überführt. Der Ansatz wurde noch drei weitere Male mit jeweils 5 ml TES-B gewaschen und die vereinigten Überstände für 10 min (18000 g, 4 °C) zentrifugiert, um Zelltrümmer und restliche Glasperlen zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand in einen passenden Messzylinder, in dem 940  $\mu$ l 4 M wässrige NaCl-Lösung (final  $\approx$ 0,15 M) vorgelegt war, überführt und mit TES-B auf 25 ml aufgefüllt. Nach gründlichem Mischen wurde der Ansatz in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß gegossen und 2,5 g PEG 4000 (Fluka) zugegeben. Das PEG wurde dann mit Hilfe eines Teflonstabes vollständig gelöst, der Ansatz anschließend für 15 min auf Eis inkubiert und danach 10 min zentrifugiert (13000 g, 4 °C). Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Mikrosomen enthaltende Pellet mit 2,5 ml TES-B gewaschen (5 Minuten zentrifugiert bei 13000 g und 4 °C) und anschließend mit 2,5 ml TEG (50 mM Tris, pH 7,4; 1 mM EDTA; 2 mM DTT; 20 % (v/v) Glycerin) im Potter homogenisiert. Der Ansatz wurde in 200  $\mu$ l Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

## B.6.2 Cytochrom P450 Enzymtests

Zum Nachweis der F3'H- und der F3',5'H-Aktivität der heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klone wurden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Enzymtests durchgeführt. Die Bestimmung der Substratumsätze erfolgte wie in Kapitel B.5.5.3 beschrieben.

### B.6.2.1 *In vivo* Enzymtests (Bioconversion)

Bei den *in vivo* Enzymtests wurde 0,06 nmol radioaktiv markiertes Substrat (Naringenin oder Dihydrokaempferol), welches in ca. 100 µl Ethylacetat gelöst war, in ein 15 ml Reaktionsgefäß ca. 6-8 Stunden unter dem Abzug exponiert bis das gesamte Ethylacetat verdampft war. Anschließend wurden 3 ml einer frisch mit Galaktose induzierten Hefekultur zu dem Reaktionsgefäß gegeben und für weitere 14 bis 18 Stunden bei 28 °C und 250 rpm kultiviert (siehe B.4.3). Die Kultur wurde danach auf zwei Eppendorfgefäße (2 ml Safe-lock) aufgeteilt, mit 200 µl Ethylacetat versetzt, intensiv 1 Minute gevortext und nachfolgend in einer Tischzentrifuge 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Dieser Extraktionsschritt wurde mit 100 µl Ethylacetat wiederholt. Beide Oberphasen wurden auf Zellulosedünnschichtplatten (Schleicher & Schüll, Dassel) aufgetragen und in CAW (Chloroform-Essigsäure-Wasser, 10 : 9 : 1)-Laufmittel chromatographiert. Als Vergleichssubstanzen wurden radioaktiv markiertes Naringenin (NAR), Dihydrokaempferol (DHK), Eriodyctiol (ERI) und nicht radioaktives Pentahydroxyflavanon (PHF), Dihydroquercetin (DHQ) und Dihydromyricetin (DHM) verwendet. Nach der 4-8stündigen Chromatographie wurden die Platten für mindestens 10 Stunden unter dem Abzug abgedampft und je nach Intensität der Signale für 2-8 Stunden auf speziellen Photoplatten (Fuji Photo Film, Japan) exponiert. Die Analyse der Autoradiogramme erfolgte wie in Kapitel B.5.5.3 beschrieben.

### B.6.2.2 *In vitro* Enzymtests mit Hefemikrosomen

Soweit nicht anders angegeben erfolgten die mit Hefemikrosomen durchgeführten Enzymtests wie folgt:

Gesamtvolumen: 200  $\mu$ l; Reaktionstemperatur: 25  $^{\circ}$ C; Reaktionsdauer: 30 min bei offenen Eppendorfgefäßen

140  $\mu$ l 0,1 M Tris-HCl-Puffer; pH 7,5

0,03 nmol [ $^{14}$ C]-Naringenin, oder [ $^{14}$ C]-Dihydrokaempferol

5-50  $\mu$ l Mikrosomenfraktion (z.T. mit Tris-HCl-Puffer verdünnt)

10  $\mu$ l NADPH ( 1 nmol)

Bei der Zugabe unterschiedlich großer Mengen an mikrosomalem Protein wurden die Reaktionsansätze bei einem konstanten Reaktionsvolumen von 200  $\mu$ l entsprechend mit Tris-HCl-Puffer aufgefüllt. Nach der Inkubation wurden die Ansätze wie in B.6.2.1 beschrieben mit jeweils 200 und 100  $\mu$ l Ethylacetat extrahiert und anschließend chromatographisch analysiert.

### B.6.2.3 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität der F3'H und der F3',5'H

Die spezifische Enzymaktivität ( $E_{akt}$ ) wurde anhand der Substratumsätze (siehe B.5.5.3), der eingesetzten Proteinmenge (siehe B.6.4) und der Reaktionszeit ermittelt:

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

mit

Sub: Gesamtmenge Substrat im Testansatz

Sub\*: gemessener Relativwert für [ $^{14}$ C]-markiertes Substrat

Prod\*: gemessener Relativwert für [ $^{14}$ C]-markiertes Produkt

$t^{-1}$ : Reaktionszeit

$p^{-1}$ : Menge an mikrosomalem Gesamtprotein

Bei den F3',5'H-Enzymtests wurden die beiden möglichen Produkte (3'- und 3',5'-hydroxyliert) bei der Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität zusammengefasst.

### B.6.3 Bestimmung der Cytochrom P450-Reduktase-Aktivität

Die Bestimmung der Cytochrom P450-Reduktase-Aktivität in der mikrosomalen Proteinfraktion erfolgte nach Urban et al. (1990, 1994).

Testansatz: 1 ml 50 mM; Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 mM KCN (frisch ansetzen); 16 µM Cytochrom c; bei Raumtemperatur.

Gestartet wurde die Reaktion mit ca. 3-50 µg mikrosomalem Protein. Die Änderung der Absorption bei 550 nm wurde alle 5 Sekunden gemessen und der  $\Delta A_{550}$ -Wert im linearen Bereich des Reaktionsverlaufs bestimmt. Die spezifische Enzymaktivität wurde anschließend nach folgender Formel berechnet:

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

mit  $\Delta A_{550}$  = Absorptionsänderung bei 550 nm  
 $\epsilon^{550}$  = differentieller Absorptionskoeffizient von Cytochrom c  
 (red./ox.;  $\epsilon^{550} = 21.000 \text{ M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ )  
 $V$  = Reaktionsvolumen (1ml)  
 $t^{-1}$  = Reaktionszeit  
 $p^{-1}$  = Menge an mikrosomalem Protein

### B.6.4 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Mikrosomenpräparationen wurde mit Rinderserumalbumin als Eichsubstanz nach Bradford (1976) durchgeführt.

## B.7 Computeranalysen

Die Analyse und Verwaltung der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm Omega 1.2 (Oxford Molecular, Großbritannien). Zur Analyse der Sequenzrohdaten wurde das Programm Chromas 1.62 (Technelysium Pty Ltd, Australien) verwendet. Die neueste Version dieses Programms kann unter <http://www.technelysium.com.au/chromas.html> bezogen werden. Weitere Programme, die zur Edition und Analyse von Sequenzdaten eingesetzt wurden, sind im einzelnen: ClustalW (1.81) zur Anfertigung von Nuklein- und Proteinalignments (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>; Thomson et al., 1994); Protein Engine zur Translation von Nukleotidsequenzen (<http://www.ebi.ac.uk/translate/> Translation Machine). Einen Überblick über diese und weitere vom „European Bioinformatics Institute (EMBL)“ im Internet zur Online-Verwendung zur Verfügung gestellten Programme ist unter <http://www.ebi.ac.uk/Tools/index.html> zu erhalten.

Die Genbankrecherchen wurden mit den Programmen „basic Blast“ und „advanced Blast“ (Altschul et al., 1990 und 1997; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) durchgeführt, die von dem US-amerikanischen „National Center for Biotechnology Information (NCBI)“ zur Verfügung gestellt werden. Zur Erstellung phylogenetischer Stammbäume wurde das Programm „TreeView“ (Page, 1996) verwendet, das von der Universität von Glasgow (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) bezogen werden kann. Zur Berechnung von Molekulargewichten von Proteinen und Nukleinsäuren wurde das online zur Verfügung stehende Programm <http://paris.chem.yale.edu/extinct.noframes.html> „Biopolymer Calculator“ des Department of Chemistry der Yale University (USA) verwendet.

## C. Ergebnisse

### C.1 Ansatz zur Klonierung der F3'H bei *Matthiola incana* durch subtraktive Hybridisierung zweier differentieller cDNA-Populationen

#### C.1.1 Isolierung von CYP-spezifischen cDNA-Fragmenten

Bei der subtraktiven Hybridisierung von cDNA-Populationen mit F3'H-Aktivität gegen cDNA-Populationen ohne F3'H-Aktivität wurden insgesamt über 300 durch PCR amplifizierte Fragmente kloniert und nachfolgend verifiziert (siehe B.5.7). Dabei wurden die klonierten Fragmente zunächst durch DNA-Sequenzierung analysiert. Kleinere Fragmente (< 500 Bp) wurden daneben auch durch *Northernblot* - und *Dotblot*-Analyse verifiziert, da bei einer Genbankrecherche mit DNA-Sequenzen von kleineren Fragmenten möglicherweise die Sequenzinformation nicht ausgereicht hätte, um auf ein Cytochrom P450-Enzym und somit auf ein mögliches F3'H-spezifisches Fragment hinzuweisen (siehe auch A.3.1).

Bei der subtraktiven Hybridisierung der cDNA aller 8 plus Linien mit der cDNA aller 8 minus Linien, die beide mit unspezifischen Oligo(dT)-Primern synthetisiert wurden, konnten weder differentiell exprimierte noch CYP-spezifische DNA-Fragmente isoliert werden. Auch bei dem Hybridisierungsansatz, in dem die cDNA-Synthese der 8 plus und der 8 minus Linien mit CYP-spezifischen Primern vorgenommen wurde, konnten keine derartigen Fragmente kloniert werden (siehe auch B.5.7).

Nur bei der Hybridisierung, in der die mit CYP-spezifischen Primern synthetisierten cDNA der einzelnen plus Linie Nr. 04 mit der auf gleiche Weise synthetisierten cDNA aller 8 minus Linien (09-16) subtraktiv hybridisiert wurde, konnten zwei CYP-spezifische DNA-Fragmente isoliert werden. Bei diesen Fragmenten handelte es sich um das 734 Bp große DNA-Fragment *PUHT* und das 826 Bp große DNA-Fragment *SPHT*, welche einen offenen Leserahmen von 244 (ORF +3) bzw. 274 (ORF +3) Aminosäureresten aufwiesen. Bei der computergestützten Genbankrecherche dieser offenen Leserahmen zeigte das Fragment *PUHT* mit 77 % identischen Aminosäuren die größte Homologie mit einem „putative Cytochrome P450“ aus *Arabidopsis thaliana* (Acc.: AC003680).



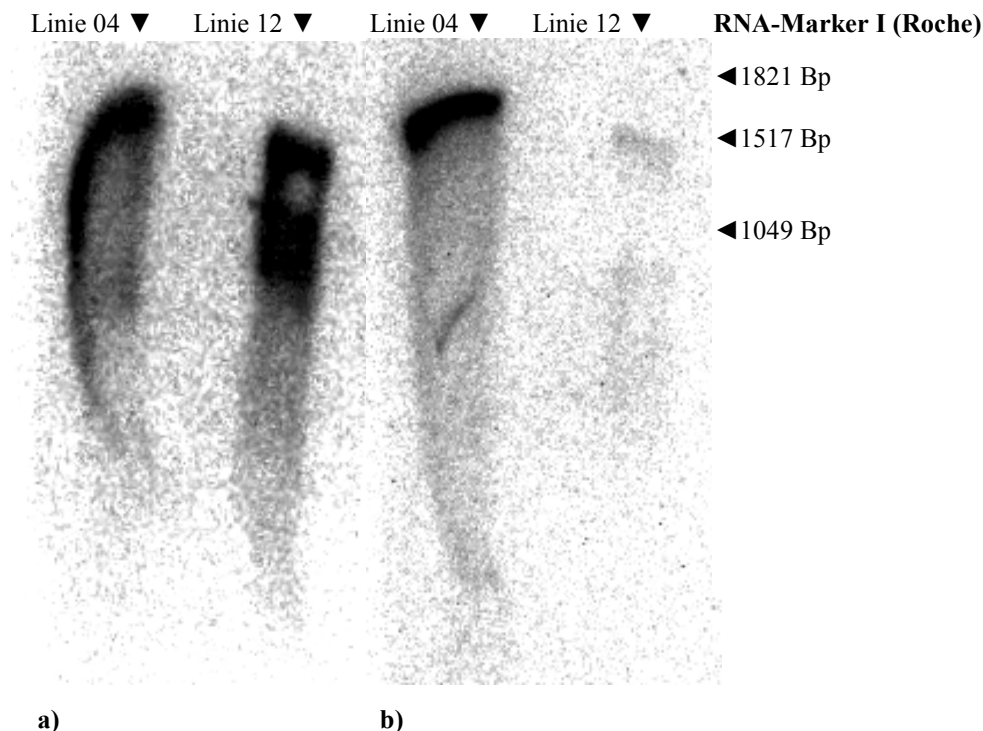
Zum Zeitpunkt der Genbankrecherche waren noch keine F3'H-Sequenzen veröffentlicht, so dass der Hauptanhaltspunkt, ein F3'H-spezifisches Fragment isoliert zu haben, darin bestand, dass dieses Fragment zu den pflanzlichen *CYP*-Genen bzw. den entsprechenden cDNA gehörte. Dieses wurde von den mehr als 50 erzielten Sequenzen bestätigt, da sie ausnahmslos zu pflanzlichen *CYP*-Genen gehörten. Neben der Zugehörigkeit zu den *CYP*-Genen erwartete man aufgrund der großen funktionellen Ähnlichkeit der Genprodukte eine große Homologie eines möglichen F3'H-Genfragments mit den bereits veröffentlichten F3',5'H-Sequenzen. Das Fragment *PUHT* zeigte mit 45 % identischen Aminosäuren die größte Homologie zu der F3',5'H von *Catharanthus roseus* (Acc.: AJ011862) und kam daher zu dem damaligen Zeitpunkt durchaus als F3'H-spezifisches Genfragment in Betracht.

Der offene Leserahmen des Fragments *SPHT* zeigte mit 77 % identischen Aminosäuren die größte Ähnlichkeit zu einem „flavonoid 3', 5'-hydroxylase-like protein“ *Arabidopsis thaliana* (Acc.: AL161533.2). Die Autoren dieser Sequenzveröffentlichung verweisen auf eine große Homologie ihres Gens zu dem Gen der F3',5'H aus *Campanula medium*, die mit 37 % identischen Aminosäuren beider Aminosäuresequenzen jedoch vergleichsweise niedrig erschien. Da außerdem bekannt war, dass *A. thaliana* über eine F3'H-, aber nicht über eine F3',5'H-Aktivität verfügt, war die Ähnlichkeit von *SPHT* zu diesem Gen nur ein gering einzuschätzender Hinweis auf ein mögliches F3'H-spezifisches cDNA-Fragment. Das Fragment *SPHT* zeigte seinerseits innerhalb der veröffentlichten F3',5'H-Sequenzen ebenfalls die höchste Homologie zu der F3',5'H-cDNA aus *Campanula medium*, die jedoch mit 29 % identischen Aminosäuren noch wesentlich geringer war als bei der cDNA aus *A. thaliana*.

### **C.1.2 Verifikation der *CYP*-cDNA-Fragmente durch *Northernblot*-Analyse**

Ob die isolierten Fragmente *PUHT* (734 Bp) und *SPHT* (826 Bp) differentiell exprimiert werden, wurde durch *Northernblot*-Analyse überprüft. Dabei wurden jeweils 10 µg mRNA der Linie 04 mit F3'H-Aktivität und der Linie 12 ohne F3'H-Aktivität eingesetzt und mit radioaktiv markierten DNA-Sonden beider Fragmente hybridisiert. Die Hybridisierungen wurden unter äußerst stringenten Bedingungen durchgeführt (siehe auch B.5.1.3).

In Abbildung 16 ist das Ergebnis der beiden Hybridisierungen dargestellt. Bei der Hybridisierung des *Northernblots* mit beiden DNA-Sonden wurde ein und dasselbe *Blot* verwendet. Die Hybridisierung mit *PUHT* zeigt in beiden RNA-Bahnen ein deutliches Signal um ca. 1750 Bp und einen „Schmier“ bei kleineren mRNA-Molekülen. Der *Blot* wurde nach der Hybridisierung mit *PUHT* „gestrippt“ und anschließend mit der *SPHT*-Sonde hybridisiert. Bei dieser Hybridisierung war nur ein einziges deutliches Signal um ca. 1750 Bp in der mRNA-Bahn von Linie 04 zu erkennen.



**Abb. 16:** *Northernblot*-Analyse mit jeweils 10 µg mRNA der *M. incana* Linien 04 und 12. **a)** Hybridisierung mit radioaktiv markiertem Fragment *PUHT* (734 Bp). **b)** Hybridisierung mit radioaktiv markiertem Fragment *SPHT* (826 Bp). Weitere Erläuterungen, siehe Text.

Die Ergebnisse der *Northernblot*-Analyse legten den Schluß nahe, dass nur *SPHT* differenziell exprimiert wird und *PUHT* nicht. Bei dem nachfolgenden 3'-RACE beider Fragmente wurde das Ergebnis der *Northernblot*-Analyse bestätigt (siehe C.1.3), so dass man davon ausgehen kann, dass es sich bei dem DNA-Fragment *SPHT* tatsächlich um einen Teil eines differenziell exprimierten *CYP*-Gens handelt.

### C.1.3 Schnelle Amplifikation der cDNA-Enden (RACE) der isolierten Fragmente

Das 3'-Ende beider Fragmente wurde mit Hilfe des 3'-RACE generiert (siehe B.5.8.3). Dabei wurde neben dem Adapterprimer (AP) jeweils ein genspezifischer Primer (3'G1) verwendet. Die Amplifikation der 3'-Enden erfolgte in einem Gradiententhermozykler bei *Annealing*-Temperaturen zwischen 50-60 °C bzw. zwischen 55-65 °C und ansonsten unter Standardbedingungen.

Im Falle von *PUHT* wurde ein 788 Bp und im Falle von *SPHT* ein 1176 Bp großes Fragment amplifiziert, welche beide ein Poly(A)<sup>+</sup>-Ende aufwiesen. In beiden Fällen konnte die Amplifikation dieser Fragmente ohne Probleme und zuverlässig reproduziert werden. Bei Kontrollen mit cDNA aus den Linien 04 und 12 wurden die Ergebnisse der *Northernblot*-Analyse eindeutig bestätigt.

Während das 3'-RACE-Fragment von *PUHT* in beiden Linien amplifiziert werden konnte, war dies bei *SPHT* nur in der Linie 04 möglich. Auch bei der späteren PCR-Amplifikation des vollständigen cDNA-Klons von *SPHT* war dies in der Linie 04 möglich, in der Linie 12 jedoch nicht. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass es sich bei *CYP SPHT* um ein differentiell exprimiertes *CYP*-Gen handelt, das in der Linie 04 aber nicht in der Linie 12 exprimiert wird (siehe auch folgendes Kapitel C.1.4).

Das 5'-RACE beider Fragmente erwies sich als ausgesprochen schwierig und langwierig. Das 5'-RACE wurde sowohl mit C-, als auch mit *A-Tailing* durchgeführt (siehe B.5.8.1). Bei beiden Fragmenten konnten so gut wie keine eindeutigen Amplifikate amplifiziert werden. Bei der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Ansätze war im erwarteten Größenbereich lediglich ein verdichteter „Schmier“ zu erkennen, der aus dem Agarosegel eluiert und anschließend in PCR-Klonierungsvektoren einkloniert wurde. Die unterschiedlich großen Fragmente, die in den Klonierungsvektor einkloniert worden waren, wurden nachfolgend durch Sequenzierung analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass es sich bei nahezu allen Fragmenten um 5'-RACE spezifische Fragmente der gesuchten Gene handelte, die unterschiedlich weit zum Startcodon ATG hin amplifiziert wurden. Nach mehreren 5'-RACE-Ansätzen konnte bei dem Fragment *SPHT* ein vollständiges 5'-Ende generiert werden, welches das Startcodon und einen 14 Bp umfassenden *Leader*-Bereich beinhaltet.

Bei dem Fragment *PUHT* war es trotz mehrfacher Ansätze nicht möglich, ein vollständiges 5'-Ende zu isolieren. Auch die Verwendung der noch weiter innen liegenden genspezifischen Primer 5'G4 und 5, die aufgrund der Sequenzinformation der unvollständigen 5'-Fragmente konstruiert werden konnten, führten nicht zur Generierung eines vollständigen 5'-Endes.

#### C.1.4 Verifikation der vollständigen cDNA-Klone

Von den beiden klonierten *CYP*-Fragmenten konnte nur aus dem Fragment *SPHT* ein vollständiger cDNA-Klon erzeugt werden. Der vollständige *SPHT*-Klon wurde durch PCR mit „end-to-end“ Primern aus cDNA der Linie 04 amplifiziert und komplett durchsequenziert. Dieser cDNA-Klon hat eine Größe von 1758 Nukleotiden und besitzt einen offenen Leserahmen, der 504 Aminosäuren codiert. Bei der Genbankrecherche zeigte der vollständige *SPHT*-Klon, wie bereits das bei der subtraktiven Hybridisierung isolierte 826 Bp große Fragment, die größte Homologie zu einem „flavonoid 3', 5'-hydroxylase-like protein“ *Arabidopsis thaliana* (Acc.: AL161533.2 [siehe auch C.1.1]). Mit 82 % identischen Aminosäuren ist die Homologie beider ORFs so hoch, dass sie in einer *CYP*-Unterfamilie einzuordnen sind. Aufgrund der geringen Homologie zu der in Zwischenzeit veröffentlichten cDNA-Sequenz der F3'H aus *Petunia hybrida* wurde zunächst auf die Expression des vollständigen *SPHT*-Klons in einem geeigneten Expressionsvektor verzichtet und später, nach der Klonierung der tatsächlichen F3'H aus *M. incana*, ganz aufgegeben.

Bei dem Fragment *PUHT* konnte nur ein 1639 Bp großes cDNA-Fragment aus den verschiedenen RACE-Fragmenten konstruiert werden, das einen codierenden Bereich von 487 Aminosäuren aufweist (siehe auch C.1.3). Bei der Genbankrecherche wies dieses Fragment, wie bereits das bei der subtraktiven Hybridisierung isolierte 734 Bp große Fragment, mit 75 % identischen Aminosäuren die größte Homologie mit einem „putative Cytochrome P450“ aus *Arabidopsis thaliana* (Acc.: AC003680 [siehe auch C.1.1]) auf. Gegenüber allen *CYP*-cDNA-Klonen, die bei der Genbankrecherche gefunden wurden, fehlte dem *PUHT*-Klon am 5'-Ende ein cDNA-Abschnitt, der ca. 10-20 Aminosäuren codiert. Ein ATG-Startcodon am 5'-Ende konnte im postulierten offenen Leserahmen des Fragmentes ebenfalls nicht gefunden werden.

Gegenüber dem *CYP*-Gen aus *A. thaliana* fehlte dem *PUHT*-Fragment ein cDNA-Abschnitt, der 14 Aminosäuren codiert. Weitere Versuche, das vollständige 5'-Ende des cDNA-Klons zu isolieren, wurden aus den gleichen Gründen, wie bereits beim *SPHT*-Fragment erläutert, nicht mehr unternommen (s.o.).

Die Adapter und Primer, die bei der subtraktiven Hybridisierung verwendet wurden, sind im Anhang G.1 aufgeführt (siehe B.5.7). Die Nukleotidsequenz von *PUHT* ist mit der entsprechenden Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens im Anhang G.2. zusammen mit allen verwendeten genspezifischen Primern und den *RSAl*-Schnittstellen dargestellt.

## C.2 Klonierung einer F3'- und/oder einer F3',5'H durch heterologes Screening der cDNA-Genbank von *Callistephus chinensis*

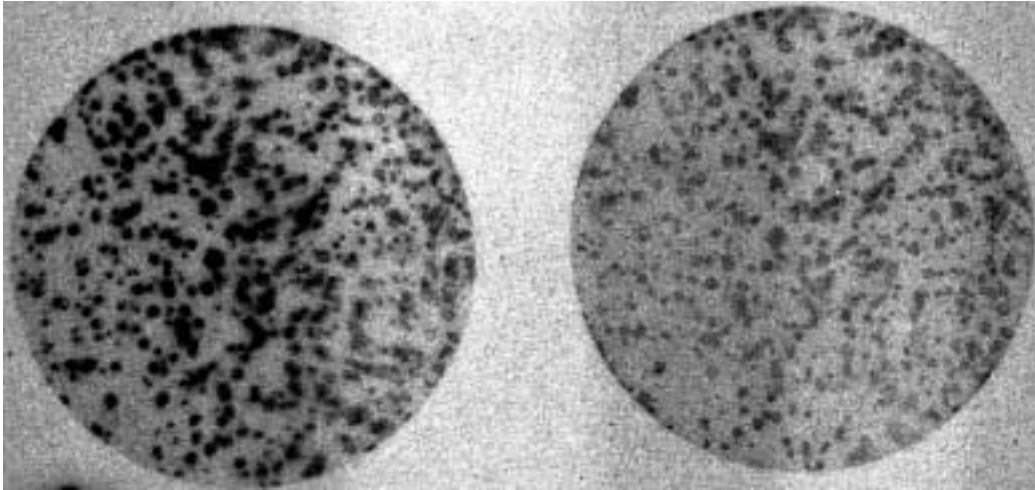
Bei dem heterologen *Screening* der cDNA-Bibliothek der Sommeraster (*Callistephus chinensis*) wurden jeweils ca.  $10^5$  rekombinante Lambda NM1149 Phagen mit zwei F3',5'H „full-length“ cDNA-Klonen aus *Petunia hybrida* und einem F3'H „full-length“ cDNA-Klon aus *Arabidopsis thaliana* hybridisiert (siehe B.5.4).

Die Hybridisierung der Phagen mit den beiden F3',5'H cDNA-Klonen aus *P. hybrida* wurde bei vier verschiedenen Hybridisierungstemperaturen durchgeführt. Ausgehend von 64 °C wurde die Hybridisierungstemperatur schrittweise um jeweils 2 °C bis auf 58 °C reduziert (siehe B.5.5). Bei den höheren Temperaturen (64 und 62 °C) konnten in der ersten *Screening*-Runde nur sehr schwache Signale detektiert werden, die nach dem Ausplattieren der entsprechenden Plaques in der zweiten *Screening*-Runde völlig verschwanden. Bei den niedrigeren Temperaturen (60 und 58 °C) konnten einige geringfügig stärker ausgeprägte Signale beobachtet werden, die zum Teil auch in der zweiten und dritten *Screening*-Runde auftraten.

Die in der dritten *Screening*-Runde isolierten Phagen trugen Inserts zwischen 500 und 2000 Bp. Nach der Sequenzierung und der nachfolgenden Genbankrecherche zeigte keines der isolierten Inserts eine signifikante Homologie zu einem der bekannten F3',5'H-cDNA-Klone oder zu irgendeinem anderen pflanzlichen CYP-cDNA-Klon.

Es musste daher davon ausgegangen werden, dass die verwendeten cDNA-Sonden aus *P. hybrida* eine zu geringe Homologie mit der gesuchten F3',5'H aus *Callistephus chinensis* besitzen, um bei geeigneten Hybridisierungstemperaturen spezifisch mit dieser zu hybridisieren. Eine weitere Verringerung der Hybridisierungstemperatur kam in Anbetracht der bereits bei 58 °C zahlreich auftretenden unspezifischen Signale nicht in Frage.

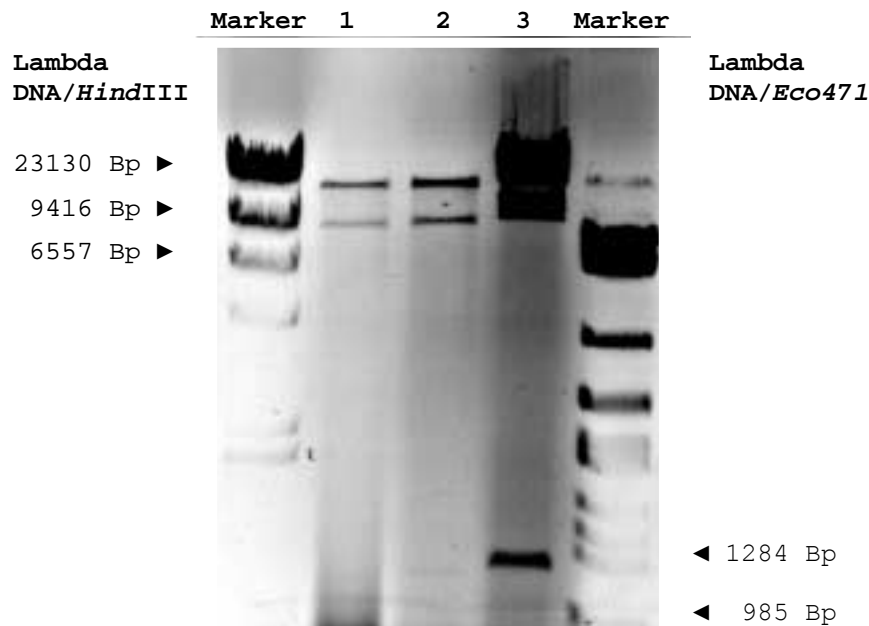
Die Hybridisierung der Phagen mit dem F3'H-cDNA-Klon aus *A. thaliana* wurde bei einer Hybridisierungstemperatur von 58 °C durchgeführt. Um Hybridisierungsartefakte zu reduzieren, wurden von den ausplattierten Phagen in der ersten und zweiten *Screening*-Runde doppelte Membranabzüge angefertigt und nur Plaques, die auf beiden Abzügen eindeutige Hybridisierungssignale aufwiesen, erneut in den weiteren *Screening*-Runden amplifiziert (Abb. 17).



**Abb. 17:** Doppelte Membranabdrücke der zweiten *Screening*-Runde von einer im Phagen Lambda NM1149 erstellten cDNA-Bibliothek von *C. chinensis*. Die Membrane wurden mit einer F3'H-cDNA-Sonde aus *A. thaliana* hybridisiert.

Bereits in der ersten *Screening*-Runde traten zahlreiche, deutlich ausgeprägte Hybridisierungssignale auf. Die dem stärksten Signal entsprechenden Plaques wurden erneut ausplattiert und hybridisiert. Von den Phagen, die auch in der dritten *Screening*-Runde auf beiden Abdrücken stark ausgeprägte Signale zeigten, wurde die DNA isoliert und die Insertgröße durch einen *EcoRI* Restriktionsverdau bestimmt. Die Größe der isolierten Fragmente lag zwischen ca. 1000 und 5000 Bp, dabei wiesen die meisten Fragmente eine Größe zwischen ca. 1000 und 2500 Bp auf. Auffallend viele Fragmente besaßen eine Größe zwischen 1150 und 1250 Bp (Abb. 18).

Alle Inserts mit einer Größe zwischen 1000 und 2000 Bp wurden durch PCR mit Phagen spezifischen Primern amplifiziert, in geeignete PCR-Klonierungsvektoren kloniert und nachfolgend sequenziert. Bei der anschließenden Sequenzanalyse konnte bei mehreren Fragmenten ein offener Leserahmen (ORF) mit CYP-spezifischer Aminosäuresequenz festgestellt werden. Es handelte sich dabei um Fragmente zweier verschiedener *CYP*-Gene, wobei von einem Gen ein vollständiger cDNA-Klon isoliert werden konnte. Dieser Klon *CYPCcpHt1* verfügt über einen offenen Leserahmen, der 510 Aminosäuren codiert und eine Homologie von 62 % identischen Aminosäuren bzw. 61 % identischen Nukleotiden mit der F3'H von *A. thaliana* aufweist. Die Nukleotidsequenz mit dem entsprechenden offenen Leserahmen ist zusammen mit allen verwendeten Primern in Anhang G.3 dargestellt.



**Abb. 18:** Elektrophoretische Auftrennung (0,8 % Agarose) von isolierter rekombinanter Phagen-DNA nach einem *EcoRI* Restriktionsverdau. Deutlich sind die beiden großen Arme der linearen Phagen-DNA zu erkennen. Auf Bahn 1 und 2 sind die freigesetzten Inserts schwach, in Bahn 3 deutlich zu erkennen.

Von dem zweiten *CYP*-Gen *CYPCcpHt2* konnten nur unvollständige Fragmente isoliert werden, die alle eine Größe zwischen 1100 und 1200 Bp aufwiesen (s.o.). Alle Fragmente verfügten über unterschiedlich lange Poly(A)<sup>+</sup>-Enden und über einen offenen Leserahmen, der maximal 298 Aminosäuren codiert. Bei der Genbankrecherche zeigte dieser offene Leserahmen eine Homologie von 67 % identischen Aminosäuren und 65 % identischen Nucleotiden mit der F3'H von *A. thaliana*.

Mit dem zuvor isolierten cDNA-Klon *CYPCcpHt1* zeigte *CYPCcpHt2* eine Nucleotidhomologie von 79 %. Gegenüber der F3'H aus *A. thaliana* fehlte bei dem ORF von *CYPCcpHt2* am 5'-Ende ein Bereich, der 217 Aminosäuren codiert. Um diesen Bereich zu isolieren, wurde ein 5'-RACE durchgeführt.



### C.2.1 RLM-RACE zur Gewinnung eines „full-length“ cDNA-Klons

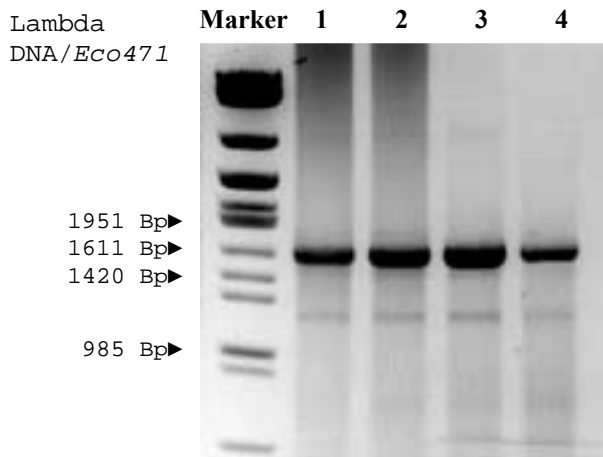
Aufgrund der großen Homologie zu *CYPCcpHt1* wurde bei den durchgeführten 5'-RACE-Versuchen eine unspezifische cDNA-Synthese mit einem Oligo(dT<sub>16</sub>)-Primer durchgeführt und die PCR-Primer in den Teil des *Trailer*-Bereichs des Fragments gelegt, der bei allen Fragmenten identisch war und der sich deutlich von dem *Trailer*-Bereich von *CYPCcpHt1* unterschied.

Wie bereits bei den aus *M. incana* isolierten *CYP*-Fragmenten konnte durch ein RACE mit C- und A-*Tailing* kein komplettes 5'-Ende isoliert werden (siehe C.1). Der Versuch, das komplette 5'-Ende zu isolieren, wurde nach mehreren Ansätzen, in denen lediglich unvollständige Anteile des gesuchten 5'-Endes isoliert werden konnten, zunächst eingestellt.

Durch den späteren Einsatz des neuen RLM-RACE-Verfahrens (siehe B.5.8.2 und D.5.1) konnte auf Anhieb ein komplettes 5'-Ende mit Startcodon und einem 22 Bp großen *Leader*-Bereich isoliert werden. Durch die Verwendung von genspezifischen PCR-Primern, die jenseits des codierenden Bereiches am 3'-Ende lokalisiert waren, wurde dabei der gesamte codierende Bereich des cDNA-Klons amplifiziert. Bereits bei der ersten PCR-Amplifikation wurde ein deutliches 1634 Bp großes Fragment amplifiziert, welches sich leicht klonieren ließ und eine weitere PCR-Amplifikation mit „nested“ Primern überflüssig machte.

Abbildung 19 verdeutlicht die, verglichen mit anderen RACE-Techniken, sehr viel höhere Effizienz des RLM-RACE-Verfahrens. Bereits der Einsatz von 1 µl der unspezifisch synthetisierten und 1 : 4 verdünnten cDNA reichte aus, um den vollständigen ORF des cDNA-Klons inklusive *Leader*- und Teilen des *Trailer*-Bereichs zu amplifizieren.

Theoretisch lassen sich somit durch das RLM-RACE-Verfahren mit einem einzigen cDNA-Ansatz (80 µl) bis zu 80 fehlende 5'-Enden verschiedener cDNA-Klone einer Pflanze isolieren (siehe auch D.5.1).



**Abb. 19:** RLM-RACE des cDNA-Fragments *CYPCcpHt2* aus *C. chinensis*. Bei den vier RACE-Ansätzen wurden 1, 2, 4 und 8  $\mu$ l cDNA eingesetzt (Bahnen 1-4). Jeweils 20  $\mu$ l der PCR-Ansätze (50  $\mu$ l) wurden in einem 1,5 %igen Agarosegel analysiert. Bereits bei dem PCR-Ansatz 1 ist ein deutliches Amplifikat zu erkennen, dessen Quantität in Ansatz 2 und 3 deutlich zunimmt und sich bei PCR-Ansatz 4 wieder deutlich vermindert, was auf die zu hohe Konzentration der eingesetzten cDNA zurückzuführen ist (weiter Erläuterungen, siehe Text).

Der vollständige 1704 Bp große cDNA-Klon *CYPCcpHt2* verfügt über einen offenen Leserahmen, der 518 Aminosäuren codiert. Die Aminosäuresequenz zeigt eine Homologie von 66 % identischen Aminosäuren mit der F3'H aus *A. thaliana*. Die Homologie der Nukleinsäuren beider Klone liegt mit 64 % identischen Nukleotiden etwas darunter. *CYPCcpHt2* weist an Position 678-682 der Nukleotidsequenz eine interne *EcoRI*-Schnittstelle auf, die genau oberhalb des 5'-Endes der bei dem Genbank-Screening isolierten Fragmente liegt. Man kann daher davon ausgehen, dass bei der Erstellung der Genbank trotz Methylierung der cDNA aufgrund der internen *EcoRI*-Schnittstelle von *CYPCcpHt2* überwiegend zwei einzelne Fragmente in die Phagen-DNA inkloniert worden waren (siehe auch B.5.4.1). Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *CYPCcpHt2*, sowie alle verwendeten Primer sind im Anhang G.3 dargestellt.

### C.3 Klonierung der F3',5'H aus *Lycianthes rantonnetii* durch PCR-Amplifikation mit einem F3',5'H-spezifischen Primer

Da für die Klonierung der F3',5'H aus *L. rantonnetii* weder eine Genbank noch chemogenetisch charakterisiertes Pflanzenmaterial zur Verfügung stand, wurde der Versuch unternommen die F3',5'H mit Hilfe eines F3',5'H-spezifischen Primers durch PCR zu isolieren. Der verwendete F3',5'H-spezifische Primer HFDM wurde anhand von bekannten F3',5'H-cDNA-Sequenzen konstruiert und zusammen mit einem unspezifischen Amplifikationsprimer (AUAP) bei der PCR eingesetzt wurde (siehe B.5.6.4). Dabei wurde HFDM von der höchst konservierten Domäne D abgeleitet, welche die Hämbindungsregion der CYP-Enzyme darstellt und die sich ca. 15 % vor dem C-Ende dieser Enzyme befindet (siehe A.3.1). Ziel war es, mit Hilfe dieses Primers ein ca. 250 bis 500 Bp großes F3',5'H-spezifisches cDNA-Fragment zu isolieren.

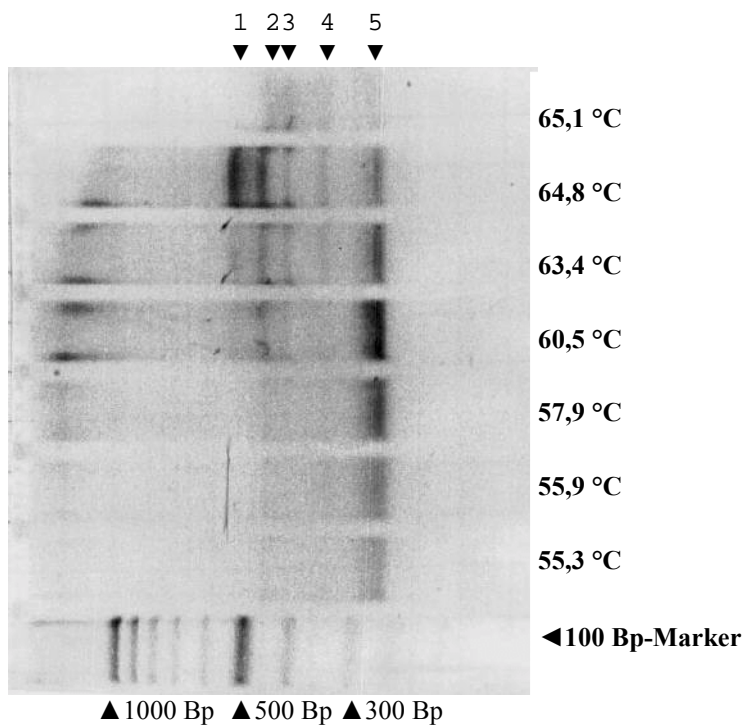
Bei der Anfertigung des Primers wurden an den Positionen, an denen bei dem Nukleinsäurealignment 2 verschiedene Nukleotide auftraten, „Wobbles“ eingesetzt. An Positionen, bei denen 3 verschiedene Nukleotide auftraten, wurden Deoxyinosine verwendet, welche an allen 4 Basen annähernd gleich stark binden. Bei den für das Nukleinsäurealignment verwendeten F3',5'H-cDNA-Sequenzen handelte es sich um die sieben verschiedenen cDNA-Sequenzen aus sechs verschiedenen Pflanzenarten, die zu dem Zeitpunkt der Primerkonstruktion bekannt gewesen waren (Abb. 20).

<i>Eustoma russellianum</i>	GGAAATGATTTTGAGCTGATCCCATTGGAGCTGGAAGAAG
<i>Eustoma grandiflorum</i>	GGAAATGATTTTGAGCTGATCCCATTGGAGCTGGAAGAAG
<i>Gentiana triflora</i>	GGAAACCATTTTGAATTGATCCCATTGGTGCTGGACGAAG
<i>Campanula medium</i>	GGTAATCATTTTGAGTTAATCCCATTGGGGCTGGACGAAG
<i>Petunia hybrida(Hf1)</i>	GGGAACGATTTTGAATTGATACCATTGGTGCTGGACGAAG
<i>Petunia hybrida(Hf2)</i>	GGGAACGACTTTTGAATTGATACCATTGGTGCTGGACGAAG
<i>Solanum melongena</i>	GGAAATGATTTTGAATTGATTCCATTGGTGCTGGACGAAG
	** *
	GGIAACGACTTTGAACTAATICCATTGGIGCTGGAAGAAG
	TC T GT G A C

**HFDM:** GGIAA (CT) (GC) A (CT) TTTGA (AG) (CT) T (AG) ATICCATTGGIGC (TA) GGA (AC) GAAG

**Abb. 20:** Nukleinsäurealignment von sieben F3',5'H-cDNA-Sequenzen zur Anfertigung eines F3',5'H-spezifischen PCR-Primers. \* = absolut konservierte Nukleotide. Darunter ist der konstruierte PCR-Primer HFDM dargestellt, der an nicht konservierten Positionen entweder ein Deoxyinosin (I) oder ein „Wobble“ besitzt (siehe auch weitere Erläuterungen im Text).

Die PCR-Amplifikation von unspezifisch synthetisierter cDNA aus *L. rantonnetii* mit HFDM und AUAP erfolgte in einem Gradiententhermozykler bei verschiedenen *Annealing*-Temperaturen und mit unterschiedlicher Zusammensetzung der PCR-Ansätze (siehe B.5.6). Nach der Optimierung der PCR waren bei der Analyse der PCR-Ansätze durch Agarosegelelektrophorese 5 deutlich sichtbare Banden zu erkennen (Abb. 21). Diese Banden, die in einem Größenbereich zwischen ca. 250 und 450 Basenpaaren auftraten, wurden aus dem Agarosegel eluiert, in geeignete PCR-Klonierungsvektoren kloniert und die entsprechenden DNA-Fragmente nachfolgend sequenziert.



**Abb. 21:** PCR-Amplifikation von cDNA aus *L. rantonnetii* mit den Primern HFDM und AUAP im Gradiententhermozykler bei *Annealing*-Temperaturen zwischen 55,5 und 65,1 °C. Jeweils 20 µl der PCR-Ansätze (50 µl) wurden in einem 3 %igen *Low-Melt*-Agarosegel analysiert. Die fünf inklonierten Banden sind am oberen Bildrand gekennzeichnet (siehe auch weitere Erläuterungen im Text).

### C.3.1 Verifikation CYP-spezifischer Fragmente

Bei der Sequenzanalyse von 5 DNA-Fragmenten, die den inklonierten Banden entsprechen, konnte bei zwei dieser Fragmente ein CYP-spezifischer offener Leserahmen (ORF) festgestellt werden. Es handelte sich dabei um zwei DNA-Moleküle mit einer Länge von 389 bzw. 361 Bp (ohne AUAP), die den Banden 2 und 3 entsprachen.

Das 389 Bp große Fragment *CYPLrpHf2* wies einen ORF von 80 Aminosäuren auf, das 361 Bp große Fragment *CYPLrpHf3* einen ORF von 81 Aminosäuren. Beide Fragmente besaßen außerdem ein Poly(A)<sup>+</sup>-Ende, das sich jeweils an einen nicht codierenden *Trailer*-Bereich anschloss. Bei der anschließenden Genbankrecherche zeigte *CYPLrpHf2* mit 81 % identischen Aminosäuren (bezogen auf die gesamten 80 AS) die größte Homologie zu der F3',5'H aus *Solanum melongena* (Acc.: CAA50155). Unmittelbar danach folgten alle weiteren F3',5'H-Aminosäuresequenzen, wobei die geringste Homologie mit der F3',5'H aus *Campanula medium* mit 75 % identischen Aminosäuren (bezogen auf die ersten 77 AS) immer noch sehr hoch war.

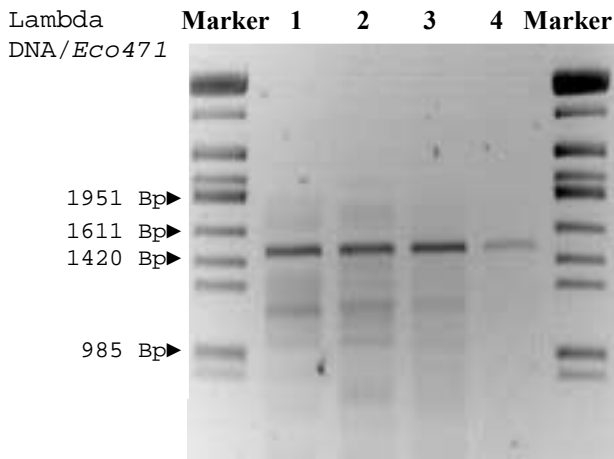
Das Fragment *CYPLrpHf3* besaß mit 73 % identischen Aminosäuren (bezogen auf die ersten 80 AS) die größte Homologie mit einem „probable cytochrome P450“ aus *Nicotina tabacum* (Acc.: CAA64635). Bezogen auf die ersten 68 Aminosäuren des ORFs zeigte das Fragment sogar mit 80 % identischen Aminosäuren eine noch höhere Homologie zu einem weiteren „cytochrome P450“ aus *Nicotina tabacum* (Acc.: CAA65580). Die größte Homologie zu einer F3',5'H zeigte das Fragment mit 52 % identischen Aminosäuren (bezogen auf die ersten 80 Aminosäuren) zu der F3',5'H aus *Eustoma russellianum* (Acc.: BAA03439).

Die Nukleotidsequenzen der isolierten cDNA-Fragmente *CYPLrpHf2* und *CYPLrpHf3* sind mit dem entsprechenden offenen Leserahmen im Anhang G.2. dargestellt.

### C.3.2 RLM-RACE eines putativen F3',5'H cDNA Klons

Von den beiden isolierten *CYP*-Fragmenten aus *L. rantonnetii* wurde nur aus dem Fragment *CYPLrpHf2* ein vollständiger cDNA-Klon durch 5'-RACE erzeugt, da es sich wahrscheinlich nur bei diesem DNA-Molekül um ein F3',5'H-spezifisches cDNA-Fragment handelte.

Wie bereits bei cDNA-Fragmenten aus *M. incana* und *C. chinensis* scheiterten alle Versuche, den kompletten cDNA-Klon durch herkömmliches C- und A-Tailing zu isolieren (siehe C.1.3 und C.2.1). Erst mit dem Einsatz des RLM-RACE-Verfahrens (siehe B.5.8.2 und D.5.1) ließ sich das vollständige 5'-Ende des Klons bereits beim ersten Versuch problemlos isolieren (Abb. 22).



**Abb. 22:** RLM-RACE des cDNA-Fragments *CYPLrpHf2* aus *L. rantonnetii*. Bei den vier RACE-Ansätzen wurden 1, 2, 4 und 8  $\mu$ l cDNA eingesetzt. Jeweils 20  $\mu$ l der PCR-Ansätze (50  $\mu$ l) wurden in einem 1,5 %igen Agarosegel analysiert. In den ersten drei PCR-Ansätzen ist ein deutliches Amplifikat mit einer Größe von ca. 1550 Bp zu erkennen. Im 4. Ansatz ist die Menge des Amplifikates deutlich vermindert, was auf die zu hohe Konzentration der eingesetzten cDNA zurückzuführen ist (weitere Erläuterungen, siehe Text).

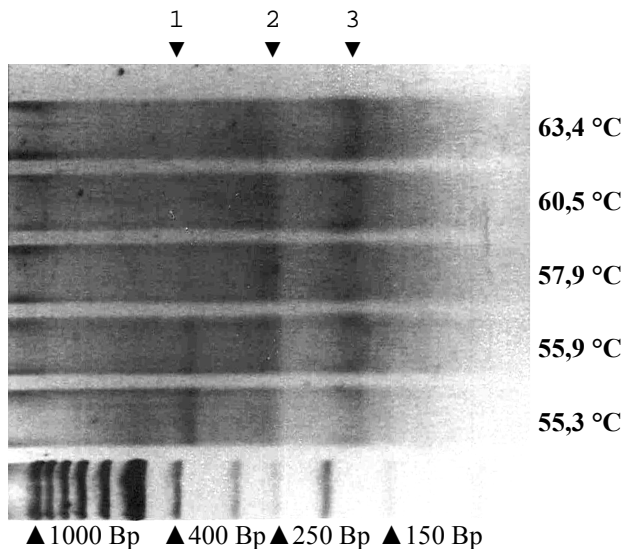
Das isolierte 1516 Bp große Molekül verfügte über einen 53 Bp großen *Leader*, gefolgt von einem Startcodon und einem durchgehenden offenen Leserahmen, der in dem überlappenden Bereich mit der bereits bekannten Sequenz vollkommen übereinstimmte. Die korrekte Position des Startcodons wurde durch eine erneute Genbankrecherche bestätigt, bei der bei allen verglichenen F3',5'H-Aminosäuresequenzen das Startcodon an ähnlichen Positionen zu finden war. Im Gegensatz zu dem 81 Aminosäuren großen Fragment zeigte der vollständige ORF mit 86 % identischen AS nicht die größte Übereinstimmung mit der F3',5'H aus *S. melongena*, sondern mit jeweils 87 % identischen AS mit den beiden F3',5'Hs aus *P. hybrida*. Diese große Homologie ist damit zu erklären, dass es sich bei *P. hybrida* ebenfalls um ein Nachtschattengewächs (Solanaceae) handelt. Mit durchschnittlich über 76 % ident. AS zeigte *CYPLrpHf2* auch zu allen anderen F3',5'Hs eine sehr große Übereinstimmung (siehe C.7), so dass mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen wurde, dass es sich bei *CYPLrpHf2* ebenfalls um eine F3',5'H handelte. Der vollständige cDNA-Klon *CYPLrpHf2* (Acc.: AF313490) ist zusammen mit allen verwendeten Primern im Anhang G.3 dargestellt.

#### **C.4 Ansatz zur Klonierung einer F3',5'H bei *Pelargonium zonale* durch PCR-Amplifikation mit einem F3',5'H-spezifischen Primer**

Zur Klonierung eines F3',5'H spezifischen cDNA-Fragments aus *Pelargonium zonale* durch PCR wurde der gleiche *CYP*-spezifische Primer HFDM verwendet, mit dem bereits ein F3',5'H-cDNA-Fragment aus *L. rantonnetii* isoliert werden konnte. Die Konstruktion dieses *CYP*-spezifischen Primers, die durch ein Nukleinsäurealignement von 7 bereits bekannten F3',5'H-cDNA-Sequenzen ermöglicht wurde, ist in Kapitel C.3 ausführlich beschrieben.

Bei der PCR-Amplifikation wurde unspezifisch synthetisierte cDNA, die mit Hilfe eines modifizierten (dT)17-Primers AP aus Poly(A)<sup>+</sup>-mRNA aus *P. zonale* hergestellt wurde, verwendet (siehe B.5.6.2). Neben dem *CYP*-spezifischen PCR-Primer HFDM wurde als komplementärer Primer der unspezifische Amplifikationsprimer (AUAP) eingesetzt, der dem Adapteranteil des verwendeten Reverse-Transkriptase-Primers AP entspricht (siehe B.5.6.4).

Aufgrund der zahlreichen Schwierigkeiten, die bei der RNA-Präparation von *P. zonale* auftraten, und welche zusätzliche Reinigungs- und Fällungsschritte, sowie einen DNase-Verdau der RNA notwendig machten, war die Qualität und Ausbeute der synthetisierten cDNA äußerst gering (siehe B.5.1.1). Aus diesem Grund erwies sich die spezifische PCR-Amplifikation eines F3',5'H- bzw. *CYP*-spezifischen cDNA-Fragments als äußerst schwierig. Nach zahlreichen Optimierungen konnte eine verstärkte Amplifikation von cDNA-Molekülen in dem zu erwartenden Größenbereich erzielt werden, wobei sich jedoch bei der Analyse der PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese nur diffuse Banden ausbildeten. Lediglich in einem Bereich knapp unter 400 Bp war in den ersten zwei PCR-Ansätzen mit niedrigeren *Annealing*-Temperaturen eine deutlich abgegrenzte Bande zu erkennen. In den Größenbereichen zwischen 250-320 Bp und 150-200 Bp bildeten sich dagegen nur breite Banden mit etwas verdichteten Bereichen aus (Abb. 23). Alle drei Bereiche wurden aus dem Agarosegel eluiert und in geeignete PCR-Klonierungsvektoren inkloniert.



**Abb. 23:** PCR-Amplifikation von cDNA aus *P. zonale* mit den Primern HFDM und AUAP im Gradiententhermozykler bei *Annealing*-Temperaturen zwischen 55,3 und 63,4 °C. Jeweils 30 µl der PCR-Ansätze (50 µl) wurden in einem 3 %igen *Low-Melt*-Agarosegel analysiert. Die drei einklonierten Banden sind am oberen Bildrand gekennzeichnet (siehe auch weitere Erläuterungen im Text).

#### C.4.1 Verifikation *CYP*-spezifischer Fragmente

Von allen drei Klonierungsansätzen wurden zahlreiche unterschiedlich große Fragmente isoliert und sequenziert. Nur bei zwei DNA-Fragmenten konnte ein *CYP*-spezifischer offener Leserahmen festgestellt werden. Dabei verfügten die 287 Bp bzw. 375 Bp großen Fragmente *CYPPzpHt1* und *CYPPzpHt2* über einen gleichgroßen codierenden Bereich, der 79 Aminosäuren codiert und über ein Poly(A)<sup>+</sup>-Ende. Bei der anschließenden Genbankrecherche zeigte der ORF von *CYPPzpHt1* mit 59 % identischen Aminosäuren (bezogen auf die ersten 79 AS) die größte Homologie zu der F3',5'H aus *Eustoma grandiflorum* (Acc.: AAB17562). Der ORF von *CYPPzpHt2* zeigte mit 56 % identischen Aminosäuren (bezogen auf die ersten 79 AS) eine nur geringfügig niedrigere Homologie zu dem gleichen Enzym. Durch den Sequenzvergleich von *CYPPzpHt1* und *CYPPzpHt2* stellte sich heraus, dass die Nukleotidsequenz zu 99 % und die entsprechende Aminosäuresequenz des ORF mit 98 % identisch waren (Abb. 24 A). Im Bereich des ORF unterschieden sich nur 3 von 240 Nukleotiden. Davon fielen zwei in den Bereich des 41 Bp langen PCR-Primers HFDM, der in diesen Positionen degeneriert war, so dass im Bereich des ORF nur ein einziges Nukleotid bei beiden Sequenzen verschieden war. Dadurch unterschied sich die entsprechende Aminosäuresequenz beider Fragmente in Position 51 (Abb. 24 B).



Aufgrund der großen Übereinstimmung beider Sequenzen nach dem Stopcodon im nicht codierenden *Trailer*-Bereich, war davon auszugehen, dass es sich nicht um Allele oder unterschiedliche Gene handelte, sondern vielmehr um einen Lesefehler der DNA-Polymerase bei der PCR. Die unterschiedliche Länge des *Trailer*-Bereichs war auf unterschiedliche Prozessierung der mRNA zurückzuführen. Die Nukleotidsequenzen von *CYPPzpHt1* und *CYPPzpHt2* mit den dazugehörigen Aminosäuresequenzen sind im Anhang G.2. abgebildet.

## A)

```

CYPPzpHt1  GGGAACGACTTTGAACTGATGCCATTTGGGGCTGGAAGAAGGATATGCGCCGGGATGAGCCTAGGGCTACGCATG  75
CYPPzpHt2  GGGAATGACTTTGAACTGATGCCATTTGGGGCTGGAAGTAGGATATGCGCCGGGATGAGCCTAGGGCTACGCATG  80
          *****

CYPPzpHt1  GTTCAATTGCTCACTGCGACTCTTCTTCACGCCTTTAATTGGGATCTTCCGCAAGGTCAAATACCCAGGAGCTA  150
CYPPzpHt2  GTTCAATTGCTCACTGCGACTCTTCTTCACGCCTTTAATTGGGATCTTCCGCAAGGTCAAATACCCAGGAGCTA  150
          *****

CYPPzpHt1  AATATGGACGAGGCTTATGGACTCACACTTCAAAGAGCTTACCTTTACATGTGCGCCACGTCCAAGGCTACCC  225
CYPPzpHt2  AGTATGGACGAGGCTTATGGACTCACACTTCAAAGAGCTTACCTTTACATGTGCGCCACGTCCAAGGCTACCC  225
          * *****

CYPPzpHt1  TCTCATTTGTATTGATCTATAACTTGAATTTCATGTCATGCTTGTAAAAAAAAAAAAAAAA-----  287
CYPPzpHt2  TCTCATTTGTATTGATCTATAACTTGAATTTCATGTCATGTTTTGTAATGGCTGGATTAATAAAATTCATCACTTGTA  300
          *****

CYPPzpHt1  -----
CYPPzpHt1  ACTACAAAACTAGATAGCTAGTTGCGTGTGTTATGATGATGATATTTTGCTGTACTGTAAAAAAAAAAAAAAAA  375

```

## B)

```

CYPPzpHt1  GNDFELMPFAGRRICAGMSLGLRMVQLLTATLLHAFNWDLPQGQIPQELNMDEAYGLTLQRASPLHVRPRPRLPSHLY  79
CYPPzpHt2  GNDFELMPFAGRRICAGMSLGLRMVQLLTATLLHAFNWDLPQGQIPQELSMDEAYGLTLQRASPLHVRPRPRLPSHLY  79
          *****

```

**Abb. 24:** A) Nukleinsäurealignment der PCR-Fragmente *CYPPzpHt1* und *CYPPzpHt2* aus *P. zonale*. Die ersten 41 Nukleotide, die dem PCR-Primer HFDM entsprechen sind eingerahmt. Unterschiedliche Nukleotide und das Stopcodon sind fett dargestellt. B) Aminosäurealignment des ORF der Fragmente *CYPPzpHt1* und *CYPPzpHt2*. Die unterschiedlichen Aminosäuren in Position 51 sind fett dargestellt. \* = identische Aminosäuren; . = Aminosäuren aus gleichen Gruppen.

#### C.4.2 RLM-RACE eines putativen F3'H cDNA-Klons

Die Gewinnung eines vollständigen cDNA-Klons aus den klonierten Fragmenten *CYPPzpHt1* und *CYPPzpHt2* durch herkömmliches 5'-RACE mit C- und A-Tailing blieb auch nach mehreren Versuchen ohne Erfolg und wurde daher zunächst wegen der sehr arbeitsaufwendigen RNA-Präparation bei *P. zonale* für längere Zeit zurückgestellt (siehe auch C.1.3; C.2.1 und C.3.2).

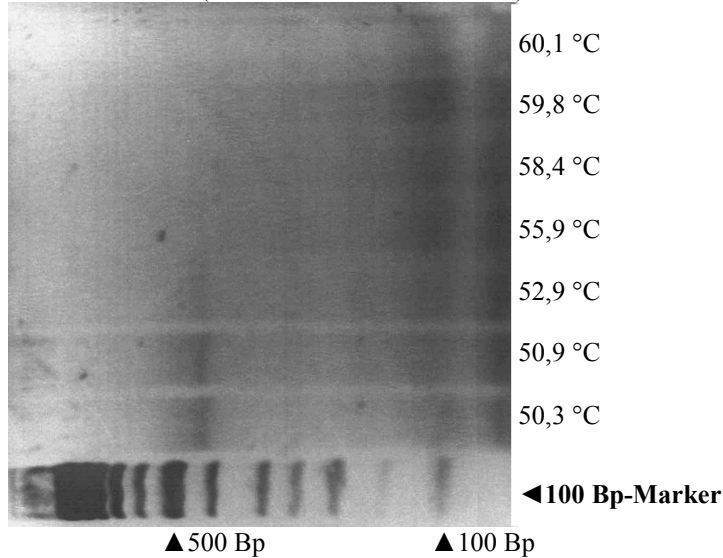
Mit dem Einsatz des neu auf dem Markt erschienenen RLM-RACE-Verfahrens konnte zu einem späteren Zeitpunkt das vollständige 5'-Ende von einem der beiden Fragmente sofort im ersten Ansatz isoliert werden (siehe B.5.8.2 und D.5.1). Bei der späteren PCR-Amplifikation des vollständigen Klons mit „end-to-end“ Primern und der nachfolgenden Sequenzierung zeigte der Klon die gleiche Sequenz wie das Fragment *CYPPzpHt2* (siehe C.4.1). Der vollständige cDNA-Klon *CYPPzpHt2* besitzt eine Länge von 1704 Bp mit einem ORF, der 511 Aminosäuren codiert. Bei einer erneuten Genbankrecherche zeigte dieser ORF mit 72 % identischen Aminosäuren (bezogen auf 492 Aminosäuren) die größte Homologie zu einer gerade zu diesem Zeitpunkt veröffentlichten F3'H-Sequenz aus *Petunia hybrida* (Acc.: AF155332). Mit der F3',5'H aus *Eustoma grandiflorum* zeigte der vollständige cDNA-Klon *CYPPzpHt2* mit nur noch 52 % identischen Aminosäuren (bezogen auf 487 Aminosäuren) eine deutlich geringere Homologie, so dass man davon ausgehen konnte, dass es sich bei diesem Klon wahrscheinlich um einen F3'H- und nicht um einen F3',5'H-cDNA-Klon aus *P. zonale* handelte.

## C.5 Ansatz zur Klonierung der F3'H bei *Matthiola incana* durch differentielle PCR-Amplifikation mit einem F3',5'H-spezifischen Primer

Da es nicht gelungen war, ein F3'H-spezifisches cDNA-Fragment aus *M. incana* durch subtraktive Hybridisierung zweier differentieller cDNA-Populationen zu isolieren (siehe C.1), wurde der Versuch unternommen, durch PCR-Amplifikation mit Hilfe des F3',5'H-spezifischen Primers HFDM ein entsprechendes Fragment zu isolieren (siehe C.3). Aufgrund der großen funktionellen Ähnlichkeit der F3'H und der F3',5'H und der Zugehörigkeit beider Enzyme zu den CYP-Enzymen sollte es möglich sein, mit diesem F3',5'H-spezifischen Primer ebenfalls ein F3',5'H spezifisches Fragment durch PCR zu amplifizieren. Da HFDM zudem von der bei CYP-Enzymen grundsätzlich stark konservierten Hämbindungsregion abgeleitet wurde und da bereits mit diesem Primer ein F3'H-spezifisches cDNA-Fragment aus *P. zonale* isoliert wurde, war von einer hinreichenden Homologie auszugehen (siehe C.4). Bei der PCR-Amplifikation von unspezifisch synthetisierter cDNA der Linie 04 mit F3'H-Aktivität traten jedoch zunächst keine PCR-Produkte in dem erwarteten Größenbereich auf.

Nach verschiedenen Modifikationen der PCR und einer Verringerung der *Annealing*-Temperatur wurde ein ca. 400 Bp großes DNA-Molekül verstärkt amplifiziert (Abb. 25). Neben diesem Fragment traten nur noch vermehrt PCR-Produkte mit einer Größe um 50 und 100 Bp auf, bei denen es sich vermutlich um Primerdimere bzw. um einen Überschuss an Primer handelte. Die dicht oberhalb der 400 Bp großen Bande des DNA-Markers liegende Bande wurde aus dem Agarosegel eluiert, in einen PCR-Klonierungsvektor kloniert und nachfolgend sequenziert. Die Nukleotidsequenz des 366 Bp großen Fragments *CYP-MipHt* zeigte dabei einen *CYP*-spezifischen ORF, der 77 Aminosäuren codiert, gefolgt von einem *Trailer*-Bereich und einem Poly(A)<sup>+</sup>-Ende. Zusammen mit dem hinter dem Poly(A)<sup>+</sup>-Ende liegenden 20 Bp langen Adapteranteil, der komplementär zu dem unspezifischen Amplifikationsprimer AUAP ist, hatte das PCR-Amplifikat eine Gesamtlänge von 386 Bp. Aufgrund der höheren Salzkonzentration der PCR-Ansätze gegenüber dem verwendeten DNA-Molekulargewichtsmarker war die Migrationsgeschwindigkeit des Fragmentes durch das 3 %ige *Low-Melt*-Agarosegel vermindert, so dass das DNA-Fragment daher ein größere Länge aufzuweisen schien als es tatsächlich besaß (Abb. 25).

*Matthiola incana* (Linie 04 mit F3'-H-Aktivität)



**Abb. 25:** PCR-Amplifikation von cDNA aus *M. incana* (Linie 04) mit den Primern HFDM und AUAP im Gradientthermozykler bei *Annealing*-Temperaturen zwischen 50,3 und 60,1 °C. Jeweils 20 µl der PCR-Ansätze (50 µl) wurden in einem 3 %igen *Low-Melt*-Agarosegel analysiert (siehe auch weitere Erläuterungen im Text).

Bei der Genbankrecherche zeigte der 77 Aminosäuren umfassende ORF von *CYPMipHt* mit 88 % identischen Aminosäuren (bezogen auf 67 AS) die größte Homologie zu einem „Putative cytochrome P450“ aus *Arabidopsis thaliana* (Acc. : AC006193). Zu der kurz zuvor im Dezember 1999 veröffentlichten F3'H aus *A. thaliana* (Acc. : AL133421) zeigte er mit 38 % identischen Aminosäuren (bezogen auf 73 AS) hingegen nur eine verhältnismäßig geringe Homologie. Mit der zweiten in der Zwischenzeit veröffentlichten F3'H-Sequenz aus *Petunia hybrida* (Acc. : AF155332) verfügte der ORF von *CYPMipHt* über eine ähnlich geringe Homologie. Da dies auch auf die veröffentlichten F3',5'H-Sequenzen traf, war davon auszugehen, dass es sich bei *CYPMipHt* nicht um ein F3'H-spezifisches Fragment handelte. Diese Annahme wurde zusätzlich dadurch erhärtet, dass es gelang, *CYPMipHt* unter gleichen Bedingungen auch aus Levkojenlinien ohne F3'H-Aktivität zu isolieren. Es wurde daher kein Versuch unternommen, den vollständigen cDNA-Klon von *CYPMipHt* zu isolieren. Die Nukleinsäuresequenz von *CYPMipHt* mit der entsprechenden Aminosäuresequenz ist in Anhang G.2. dargestellt.

Bei einem Vergleich des Nukleinsäurealignments der bekannten F3',5'H-Sequenzen mit einem Alignment der mittlerweile bekannten F3'H-Sequenzen zeigte sich, dass die Häm-bindungsregion (Domäne D), von der der verwendete 41-mer HFDM abgeleitet wurde (siehe C.3), bei den Flavonoid 3',5'-Hydroxylasen auf Nukleinsäure-Ebene wesentlich stärker konserviert ist als bei den Flavonoid 3'-Hydroxylasen.

Während bei den F3',5'H-Sequenzen über die Länge dieser 41 Nukleotide 30 identische Basen auftraten, waren es bei den F3'H-Sequenzen nur 23. Hinzu kam, dass bei dem F3',5'H-Alignment 7 Sequenzen zugrunde lagen, bei dem F3'H-Alignment hingegen nur 5. Bei diesen 5 Sequenzen handelte es sich um die zwei Sequenzen, die im Zuge des Genbank-Screenings aus *C. chinensis* isoliert werden konnten (siehe C.2), dem F3'H-cDNA-Klon aus *P. zonale* (siehe C.4) und den kurz zuvor veröffentlichten F3'H-cDNA-Sequenzen aus *P. hybrida* und *A. thaliana* (s.o.). Der aufgrund des Alignments dieser Sequenzen angefertigte Primer HTDM (Abb. 25) wies auf 14 Positionen eine andere Nukleotidsequenz auf als HFDM. Außerdem wurde HTDM angesichts der geringeren Homologie der F3'H-Sequenzen innerhalb dieses Bereiches gegenüber HFDM um 3 Nukleotide auf 44 Nukleotide verlängert:

```

A. thaliana          GGAAGCGATTTTCGAGCTAATACCGTTCGGAGCTGGGAGGAGAAT
P. hybrida          GGGAAATGACTTTTGAAGTCATACCATTGGAGCTGGACGTAGGAT
C. chinensis (CYPcPht1) GGAAATGATTTTGAGGTCATACCATTGGGGCCGGGAGAAGAAT
C. chinensis (CYPcPht2) GTAAATGATTTTGAAGTCTTGCCATTGGGGCCGGACGAAGGAT
P. zonale (CYPPzPht2) GGTAATGACTTTGAGCTCATACCATTGGTGCCGGACGGAGGAT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
GGIAGCGACTTTCGAGCTCATGCCGTTTCGGIGCCGGGCGIAGGAT
T AT T AG AT A A T T AA A

```

**HTDM:** G(GT)IA(GA)(CT)GACTT(CT)GA(GA)(CG)T(CA)(AT)T(GA)CC(GA)TT(CT)GGIGC(C  
T)GG(GA)(CA)GIAG(GA)AT

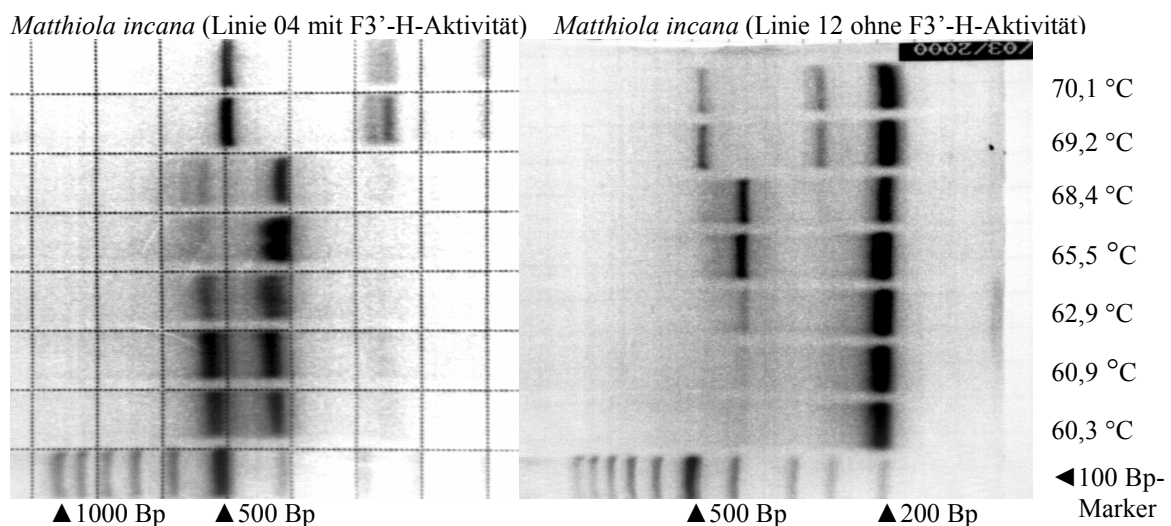
**Abb. 26:** Nukleinsäurealignment von fünf F3'H-cDNA-Sequenzen zur Anfertigung des F3'H-spezifischen PCR-Primers HTDM. \* = absolut konservierte Nukleotide, I = Deoxyinosin. Positionen (Wobbles), in denen bei der Primersynthese jeweils eins von zwei unterschiedlichen Nukleotiden eingebaut sein können, sind in Klammern dargestellt (siehe auch weitere Erläuterungen im Text).

### C.5.1 Differentielle PCR-Amplifikation

Bei der PCR-Amplifikation von cDNA aus den Petalen von *M. incana* mit dem PCR-Primer HTDM und dem unspezifischen Amplifikationsprimer AUAP (siehe B.5.6.4) wurden cDNA aus einer Levkojenlinie mit F3'H-Aktivität (Linie 04) und cDNA aus einer Levkojenlinie ohne F3'H-Aktivität (Linie 12) amplifiziert. Die PCR-Reaktionen wurden unter möglichst gleichen Bedingungen durchgeführt. Bei der PCR mit cDNA der Linie 04 sollte dabei mindestens ein zusätzliches Amplifikat auftreten, welches einem F3'H-spezifischen Fragment entspräche und welches bei der PCR mit cDNA der Linie 12 nicht auftrat. Bei einem direkten Vergleich beider PCR-Ansätze sollte sich dieses Amplifikat leicht identifizieren und isolieren lassen.

Die PCR im Gradiententhermozykler wurde zunächst bei *Annealing*-Temperaturen zwischen 55,3 und 65,1 °C durchgeführt und zeigte bei der Analyse der PCR-Produkte bereits deutlich eine differentielle Bande mit einer Größe von ca. 500 Bp, die nur in dem Ansatz mit cDNA der Linie 04 auftrat. Bei der anschließenden PCR mit *Annealing*-Temperaturen zwischen 60,3 und 70,1 °C bildete sich diese Bande noch deutlicher heraus (Abb. 27). Neben dieser Bande traten noch zwei weitere nicht differentielle Banden mit einer Größe von ca. 200 und 400 Bp in beiden Ansätzen auf. Bei den Reaktionsansätzen mit den höchsten *Annealing*-Temperaturen von 69,2 und 70,1 °C trat außerdem bei beiden Ansätzen ein aus zwei Banden bestehendes Muster auf. Diese stark ausgeprägten Banden mit einer Größe von ca. 260 bzw. ca. 480 Bp traten auch in Kontrollversuchen nur bei sehr hohen *Annealing*-Temperaturen auf, während sie bei nur geringfügig niedrigeren Temperaturen gänzlich fehlten.

Es schien sich daher bei dem abrupten Auftreten dieser Banden um PCR-Artefakte zu handeln, wie man sie häufig bei hohen *Annealing*-Temperaturen beobachten kann. Von den PCR-Produkten wurde zunächst nur die ca. 500 Bp große differentielle Bande aus dem Agarosegel eluiert, in einen geeigneten PCR-Klonierungsvektor kloniert und nachfolgend sequenziert.



**Abb. 27:** Gradienten-PCR mit cDNA einer plus Linie mit F3'-H-Aktivität (Linie 04) und einer minus Linie ohne F3'-H-Aktivität (Linie 12). Beide cDNA-Populationen wurden unter Standardbedingungen mit dem Adapterprimer AUAP und dem F3'-H-spezifischen Primer HTDM bei *Annealing*-Temperaturen zwischen 60,3-70,1 °C amplifiziert. (weitere Erläuterungen siehe Text).

### C.5.2 Verifikation eines putativen F3'H-cDNA-Fragments

Bei der Sequenzanalyse des cDNA-Fragments, welches der differentiellen Bande im Agarosegel entsprach, stellte sich heraus, dass es sich dabei um ein 442 Bp großes Fragment handelte, das zusammen mit dem 20 Bp großen unspezifischen Adapteranteil eine Gesamtgröße von 462 Bp besaß. Dass das Fragment in dem in Abb. 27 dargestellten linken Agarosegel eine erheblich größere Fragmentgröße zu besitzen schien, hängt vor allem mit der im Vergleich zu den DNA-Molekulargewichtsmarkern höheren Salzkonzentrationen der PCR-Ansätze zusammen. Außerdem spielt die Salzkonzentration des Elektrophoresepuffers und wie häufig dieser schon verwendet wurde eine Rolle. Besonders in hoch auflösenden, hochkonzentrierten *Low-Melt*-Gelen können diese Faktoren die Migrationseigenschaften von Nukleinsäuren stark beeinflussen, wobei die Unterschiede des Laufverhaltens mit zunehmender Dauer der Elektrophorese immer geringer ausgeprägt sind und sich immer mehr angleichen.

Dies ist auch in Abb. 27 bei dem Vergleich der beiden Gele deutlich zu erkennen. In dem rechten Agarosegel, bei dem die Elektrophorese über einen längeren Zeitraum durchgeführt wurde, schienen die nicht differentiellen Banden eine wesentlich größere Fragmentlänge zu besitzen als die entsprechenden Banden im linken Gel. Besonders deutlich war dies bei dem ca. 400 Bp großen Fragment ausgeprägt. Während es im linken Gel knapp oberhalb der 400 Bp-Bande des Markers zu erkennen war, befand es sich im rechten Gel deutlich unterhalb dieser Bande. Bei späteren Analysen dieses Fragments stellte sich heraus, dass es sich in beiden Fällen um das Fragment *CYPMipHt* handelte, welches bereits zuvor mit Hilfe des F3',5'H-spezifischen Primers HFDM isoliert werden konnte (s.o. bei C.5). Dabei war dieses Fragment mit einer tatsächlichen Länge von 386 Bp inklusive Adapteranteil deutlich kleiner als die 400 Bp-Bande des Molekulargewichtsmarkers.

Bei dem differentiellen 442 Bp großen Fragment *CYPL4pHT* konnte ein durchgehender *CYP*-spezifischer ORF festgestellt werden, der 84 Aminosäuren codiert. Dem ORF folgt ein nicht codierender *Trailer*-Bereich mit Poly(A)<sup>+</sup>-Ende. Bei der Genbankrecherche zeigte der ORF von *CYPL4pHt* bezogen auf die gesamten 84 Aminosäuren mit 89 % identischen Aminosäuren eine sehr große Homologie zu dem F3'H-cDNA-Klon aus *A. thaliana*. Deutlich geringer, aber immer noch sehr hoch fiel mit 64 % identischen Aminosäuren (bezogen auf die ersten 79 Aminosäuren) die Übereinstimmung mit dem F3'H-cDNA-Klon aus *P. hybrida* aus.

Mit den putativen F3'H-cDNA-Fragmenten *CYPCcpHt1*, *CYPCcpHt2* und *CYPPzpHt2* zeigte *CYPL4pHt* mit 65 %, 69 % und 64 % identischen Aminosäuren bezogen auf den gesamten ORF ebenfalls eine sehr große Homologie, so dass mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen war, dass mit der Isolierung des differentiellen PCR-Produkts auf Anhieb ein F3'H-spezifisches Fragment kloniert wurde.

### C.5.3 RLM-RACE eines putativen F3'H cDNA-Klons

Wie bereits bei cDNA-Fragmenten aus *C. chinensis* (siehe C.2.1), *L. rantonnetii* (siehe C.3.2) und *P. zonale* (siehe C.4.2) konnte mit dem hocheffizienten RLM-RACE-Verfahren auf Anhieb ein vollständiger cDNA-Klon generiert werden (siehe B.5.8.2 und D.5.1). Der vollständige cDNA-Klon *CYPL4pHt* hat eine Größe von 1748 Bp und besitzt einen ORF, der 513 Aminosäuren codiert.

Wie bereits das Fragment, zeigte auch der vollständige Klon bezogen auf den gesamten ORF mit 88 % identischen Aminosäuren die größte Homologie zu der F3'H-cDNA-Sequenz aus *A. thaliana*. Zu der F3'H-Sequenz aus *P. hybrida* zeigte es eine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz von 66 %. Zu den vollständigen Klonen *CYPCcpHt1*, *CYPCcpHt2* und *CYPPzpHt1* zeigte der ORF von *CYPL4pHt* mit 63 %, 64 % und 65 % identischen Aminosäuren ähnlich große Übereinstimmungen (siehe C.7). Bei der PCR-Amplifikation des gesamten ORF mit „end-to-end“ Primern zeigte sich, dass *CYPL4pHt* nur mit cDNA der 8 plus Linien (01-08) von *M. incana*, die über eine F3'H-Aktivität verfügen, amplifiziert werden konnte. Mit cDNA der acht minus Linien (09-16) konnte *CYPL4pHt* hingegen nicht amplifiziert werden. Die vollständige Nuklein- und Aminosäuresequenz von *CYPL4pHt* (Acc. : AF313491), sowie alle verwendeten Primer sind im Anhang G.3 abgebildet.



## C.6 Klonierung weiterer F3'H- und F3',5'H-spezifischer cDNA-Fragmente aus weiteren Pflanzen

Bei dem Versuch F3'H- bzw. F3',5'H-spezifische cDNA-Klone aus weiteren Zierpflanzen zu isolieren, konnte lediglich aus der Hortensie (*Hydrangea macrophylla*) ein einzelnes CYP-spezifisches cDNA-Fragment isoliert werden. Dieses 361 Bp große Fragment *CYPHm1* codiert einen ORF von 73 Aminosäuren und wurde mit Hilfe des F3',5'H-spezifischen Primers HFDM durch PCR-Amplifikation von unspezifisch synthetisierter cDNA kloniert (siehe B.5.6.4 und C.3). Bei der Genbankrecherche zeigte *CYPHm1* mit 54 % identischen Aminosäuren (bezogen auf den gesamten ORF) die größte Homologie zu einer „(S)-N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase“ (Acc.: AF134590) aus *Papaver somniferum*. Die größte Homologie zu der Aminosäuresequenz einer F3'- oder einer F3',5'H zeigte das Fragment zu der in dieser Arbeit klonierten F3',5'H aus *C. chinensis* (siehe C.2). Da die Homologie mit 45 % identischen Aminosäuren (bezogen auf 72 AS) jedoch weit unter dem erwarteten Wert lag, wurde kein Versuch unternommen, einen „full-length“ Klon zu isolieren. Die Nukleotidsequenz von *CYPHm1* ist zusammen mit dem putativen ORF im Anhang G.2. dargestellt.

## C.7 Sequenzanalyse von F3'H- und F3',5'H-cDNA

Zu Beginn dieser Arbeit waren noch keine F3'H-Sequenzen veröffentlicht. Im Verlauf der Arbeit wurden nacheinander die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der F3'H von *P. hybrida* (Brugliera et al., 1999) und von *A. thaliana* (Schoenbohm et al., 2000) veröffentlicht (siehe auch Anhang G.5). Der Sequenzvergleich dieser und der 4 in dieser Arbeit klonierten F3'H-Sequenzen zeigt, dass die F3'H-Sequenzen sowohl auf DNA- als auch auf Protein-Ebene eine große Homologie aufweisen. Die durchschnittliche Homologie der F3'H-Sequenzen liegt auf DNA-Ebene bei 65,1 % und auf Protein-Ebene bei 68,0 %. Wenn die Homologie zwischen den beiden Sequenzen aus *C. chinensis* nicht berücksichtigt wird, beträgt die durchschnittlich Übereinstimmung 64,5 % auf DNA-Ebene und auf 67,5 % auf Protein-Ebene.

Es muss darauf hingewiesen werden, dass bei der Klassifizierung von CYP-Sequenzen ausschließlich strukturelle Kriterien berücksichtigt werden, die nicht zwingend eine Aussage über die Funktion der entsprechenden Enzyme machen. Es ist besonders bei CYP-Enzymen bekannt, dass innerhalb einer Unterfamilie kleinste strukturelle Unterschiede die Funktion der Enzyme entscheidend verändern können (Lindberg und Negishi, 1989). Dieses ist offensichtlich bei der F3',5'H aus *C. chinensis* (CYPCcpHt1) der Fall, welche aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in die F3'H-Sequenzen eingruppiert wird, jedoch eindeutig eine F3',5'H ist. Auffallend ist, dass die beiden Sequenzen aus *C. chinensis* auf DNA-Ebene mit 77 % Übereinstimmung eine höhere Übereinstimmung zeigen als auf Protein-Ebene mit 74 %. Alle anderen Sequenzen zeigen im paarweisen Vergleich auf DNA-Ebene eine niedrigere Homologie als auf Protein-Ebene.

**Tab. 9:** Homologiematrix der F3'H-Sequenzen

	<b>At</b>	<b>Ph</b>	<b>Mi</b>	<b>Cc1</b>	<b>Cc2</b>	<b>Pz</b>
<b>At</b>	-	61	88	61	64	61
<b>Ph</b>	66	-	62	66	69	61
<b>Mi</b>	88	66	-	60	62	61
<b>Cc1</b>	62	66	63	-	77	61
<b>Cc2</b>	66	74	64	74	-	63
<b>Pz</b>	65	70	65	63	68	-

Im oberen Teil der Matrix ist die Homologie der Sequenzen in % auf DNA-Ebene wiedergegeben (es wurde nur der codierende Bereich der cDNA berücksichtigt), im unteren Teil auf Protein-Ebene.

**At:** *Arabidopsis thaliana*, **Ph:** *Petunia hybrida*, **Mi:** *Matthiola incana*, **Cc1:** *Callistephus chinensis* (CYPCcpHt1), **Cc2:** *Callistephus chinensis* (CYPCcpHt2), **Pz:** *Pelargonium zonale*.

Zu Beginn dieser Arbeit waren bereits 7 F3',5'H-Sequenzen aus *E. russellianum*, *E. grandiflorum*, *G. triflora*, *C. medium*, *P. hybrida* (Hf1), *P. hybrida* (Hf2) und *S. melongena* bekannt (siehe Anhang G.5), von denen der F3',5'H-spezifische Primer HFDM abgeleitet wurde (siehe C.3). Im Verlauf der Arbeit wurde die Sequenz von *C. roseus* veröffentlicht (Kaltenbach et al., 1999).

Der Sequenzvergleich dieser 8 mit der in dieser Arbeit klonierten F3',5'-cDNA-Sequenz aus *L. rantonnetii* zeigt eine durchschnittliche Übereinstimmung der Sequenzen von 71,8 % auf DNA-Ebene und 74,6 % auf Protein-Ebene. Wenn die Homologien zwischen den, als allelische Varianten anzusehenden, cDNA-Sequenzen von *E. russellianum* und *E. grandiflorum* und zwischen den beiden *P. Hybrida*-Sequenzen Hf1 und Hf2 nicht berücksichtigt werden, beträgt die durchschnittliche Übereinstimmung 70,4 % auf DNA- und 73,3 % auf Protein-Ebene. Damit zeigen die F3',5'H-Sequenzen in jedem Fall eine deutlich höhere Übereinstimmung auf DNA- und Protein-Ebene als die F3'H-Sequenzen.

**Tab.10:** Homologiematrix der F3',5'H-Sequenzen

	<b>Ph1</b>	<b>Ph2</b>	<b>Sm</b>	<b>Er</b>	<b>Eg</b>	<b>Gt</b>	<b>Cm</b>	<b>Cr</b>	<b>Lr</b>
<b>Ph1</b>	-	94	80	68	68	67	68	74	84
<b>Ph2</b>	94	-	79	67	67	68	67	75	84
<b>Sm</b>	82	82	-	66	66	67	62	68	87
<b>Er</b>	74	73	70	-	98	75	64	73	67
<b>Eg</b>	74	73	71	98	-	75	63	70	67
<b>Gt</b>	74	75	68	77	77	-	66	72	67
<b>Cm</b>	67	67	65	64	63	63	-	69	63
<b>Cr</b>	76	78	73	76	76	74	68	-	69
<b>Lr</b>	87	87	86	71	71	71	66	74	-

Im oberen Teil der Matrix ist die Homologie der Sequenzen in % auf DNA-Ebene wiedergegeben (es wurde nur der codierende Bereich der cDNA berücksichtigt), im unteren Teil auf Protein-Ebene.

**Ph1:** *Petunia hybrida* (Hf1), **Ph2:** *Petunia hybrida* (Hf2), **Sm:** *Solanum melongena*, **Er:** *Eustoma russellianum*, **Eg:** *Eustoma grandiflorum*, **Gt:** *Gentiana triflora*, **Cm:** *Campanula medium*, **Cr:** *Catharanthus roseus*, **Lr:** *Lycianthes rantonnetii*.

## C.8 Heterologe Expression der klonierten „full-length“ cDNA-Klone in Hefe

Die vollständigen offenen Leserahmen der putativen F3'H-cDNA-Klone aus *Callistephus chinensis* *CYPCcpHt1* und *CYPCcpHt2* (siehe C.2), aus *Pelargonium zonale* *CYPPzpHt1* (siehe C.4) und aus *Matthiola incana* *CYPL4pHt* (siehe C.5), sowie der putative F3',5'H-cDNA-Klon aus *Lycianthes rantonnetii* *CYPLrpHf2* (siehe C.3), wurden zur Verifikation der Genexpression in geeignete Expressionsvektoren (siehe B.4.2) kloniert und in unterschiedlichen Hefestämmen exprimiert. Die verwendeten Hefestämme unterschieden sich in erster Linie hinsichtlich ihrer Cytochrom P450-Reduktase (CPR), die für die Aktivität von CYP-Enzymen von essentieller Bedeutung ist. Für die heterologe Expression der cDNA-Klone wurden sowohl Stämme mit natürlicher hefeeigener CPR als auch Stämme, die modifizierte und dadurch leistungsfähigere CPRs enthielten, verwendet (siehe B.4.1).

### C.8.1 Nachweis der CPR-Aktivität in Hefemikrosomen

Der Nachweis der Cytochrom P450-Reduktase-Aktivität wurde bei sämtlichen Mikrosomenpräparationen aus Hefe durchgeführt (siehe B.6.3). Darüber hinaus sollte festgestellt werden, in welchem Ausmaß die Aktivität der getesteten CYP-Enzyme mit der CPR-Aktivität korreliert.

**Tab. 11:** Nachweis der CPR-Aktivität in Hefemikrosomen.

Pflanze	cDNA-Klon	Expressionvektor	Hefestamm	CPR-Aktivität <sup>a)</sup>
<i>C. chinensis</i>	<i>CYPCcpHt1</i>	pYES2 <sup>®</sup>	INVSc1	796,038
<i>C. chinensis</i>	<i>CYPCcpHt2</i>	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup>	INVSc1	545,463
<i>P. zonale</i>	<i>CYPPzpHt1</i>	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup>	INVSc1	739,529
<i>L. rantonnetii</i>	<i>CYPLrpHf2</i>	pYeDP60	W(R)	7422,857
<i>L. rantonnetii</i>	<i>CYPLrpHf2</i>	pYeDP60	WAT11	5343,180
<i>L. rantonnetii</i>	<i>CYPLrpHf2</i>	pYeDP60	WAT21	2922,392
<i>L. rantonnetii</i>	<i>CYPLrpHf2</i>	pYeDP60	INVSc1	324,710
<i>L. rantonnetii</i>	<i>CYPLrpHf2</i>	pYES2 <sup>®</sup>	INVSc1	442,022
<i>L. rantonnetii</i>	<i>CYPLrpHf2</i>	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup>	INVSc1	337,450
<i>M. incana</i>	<i>CYPL4pHt</i>	pYES2 <sup>®</sup>	INVSc1	750,647

a) Reduziertes Cytochrom c [nmol] /min \* mg mikrosomales Protein in 50 mM Tris-HCl Puffer pH 7,4 und 1mM KCN.

In jeder der untersuchten Mikrosomenpräparationen konnte eine deutlich ausgeprägte CPR-Aktivität beobachtet werden (Tab.11). Besonders hohe Umsätze zeigten die von Herrn Dr. D. Pompon zur Verfügung gestellten haploiden *Saccharomyces cerevisiae* Stämme W(R), WAT11 und WAT21 (siehe B.4.1). Bei diesen Stämmen wurde der hefeei-gene CPR-Promotor durch einen Galaktose induzierbaren GAL10-CYC1 Promotor, der durch „genetic engineering“ in das Hefegenom eingeschleust worden war, ausgetauscht. Dabei wurde der CPR-Wildtyp beim Stamm W(R) beibehalten, während bei WAT11 und WAT21 auch das Gen, welches die Wildtyp-CPR codiert durch ein CPR-Gen aus *A. thali-ana* ausgetauscht wurde. Der kommerziell erworbene diploide Hefestamm INVSc1, der nur über die Wildtyp-CPR verfügt, zeigte in allen Ansätzen eine deutlich geringere CPR-Aktivität als die transgenen Stämme.

Dass die CPR-Aktivitäten aller getesteten Hefestämme deutlich über den von Herrn Dr. Pompon angegebenen CPR-Aktivitäten lagen, liegt möglicherweise daran, dass die unter-suchten Hefestämme vor der Mikrosomenpräparation mit Raffinose und nicht mit Glukose angezogen wurden. Raffinose gewährleistet auch während der Hefeinduktion mit Galak-tose eine optimale Energieversorgung der Hefezellen und hat im Gegensatz zu Glukose keinen inhibierenden Einfluss auf die durch Galaktose induzierbaren Promotoren, die die Expression der CPR in den modifizierten Hefestämmen und der klonierten *CYP*-Gene in den Hefeexpressionsvektoren steuern (siehe B.4.1 und B.4.3.).

## C.8.2 Heterologe Expression der putativen F3'H-cDNA-Klone aus *Calistephus chinensis* in Hefe

Um die isolierten cDNA-Klone aus *C. chinensis* heterolog in Hefe zu exprimieren, wurden die offenen Leserahmen von *CYPCcpHt1* und *CYPCcpHt2* mit „end-to-end“ Primern durch PCR amplifiziert und in geeignete Hefeexpressionsvektoren kloniert (siehe Anhang G.3). Aufgrund einer internen *Bam*HI-Schnittstelle bei *CYPCcpHt1* und einer internen *Eco*RI-Schnittstelle bei *CYPCcpHt2* konnten beide Klone nicht ohne weiteres in den Hefeexpressionsvektor YeDP60 kloniert werden, da dieser zwischen dem Promotor und dem Terminator nur eine *Eco*RI- und eine *Bam*HI-Schnittstelle besitzt (siehe B.4.2).

*CYPCcpHt1* wurde daher in den Hefektor pYES2<sup>®</sup> kloniert, der über eine „multiple cloning site“ mit zahlreichen Restriktionsschnittstellen verfügt. Bei der PCR-Amplifikation des ORF wurden dazu mit Hilfe der verwendeten PCR-Primer am 5'-Ende eine *Hind*III-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *Xho*I-Schnittstelle eingefügt. Das PCR-Produkt konnte dadurch in den Hefektor, der mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisiert worden war, einkloniert werden (siehe B.4.2 und B.5.9.2).

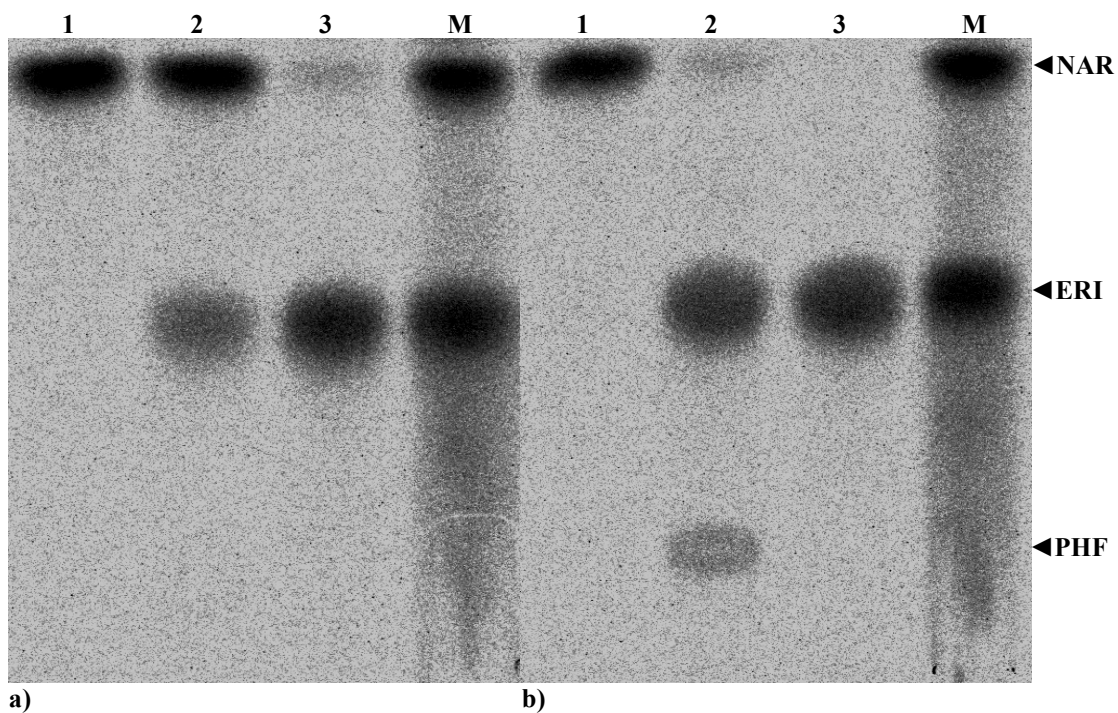
*CYPCcpHt2* wurde ohne Zwischenklonierung direkt nach der PCR-Amplifikation durch T/A-Cloning in den Hefektor pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> einkloniert (siehe B.4.2). Die beiden verwendeten Hefeexpressionsvektoren, die nur über einen *URA3* Komplementationsmarker verfügen, wurden in den Uracil auxotrophen Hefestamm INVSc1 transformiert (siehe B.4.1). Mit den transformierten Hefen wurden sowohl *in vivo* Enzymtests (siehe B.6.2.1) als auch Enzymtests mit Mikrosomenpräparationen (siehe B.6.2.2) durchgeführt.

Bei den durchgeführten *in vivo* Enzymtests konnte in keinem der transformierten Hefekulturen eine F3'H- oder F3',5'H-Aktivität nachgewiesen werden. Nach mehrfacher Wiederholung der Enzymtests und der Kontrollsequenzierung der transformierten Expressionskonstrukte wurden von jeweils einem der beiden Transformationsansätze Mikrosomen präpariert und mit diesen *in vitro* Enzymtests durchgeführt.

In dem Ansatz, in dem die Expression von *CYPCcpHt2* nachgewiesen werden sollte, konnte auch bei diesem Enzymtest keine F3'H- oder F3',5'H-Aktivität, jedoch eine deutliche CPR-Aktivität gemessen werden (siehe C.8.1).

In den Enzymtests mit Mikrosomen aus Hefen, die mit dem in den Expressionsvektor einklonierten ORF von *CYPCcpHt1* transformiert worden waren, konnte eine deutliche Enzymaktivität nachgewiesen werden.

In den in Abbildung 28 dargestellten Enzymtests wurden in einem Test jeweils 5  $\mu$ l 1 : 5 verdünnte Mikrosomenfraktion (Abb. 28a) und im anderen Test jeweils 50  $\mu$ l 1 : 5 verdünnte Mikrosomenfraktion (Abb. 28b) aus drei verschiedenen Präparationen eingesetzt. Dabei handelte es sich um Mikrosomen aus Hefen, in denen die cDNA-Klone *CYPLrpHf2* aus *L. rantonnetii* (Spur 1), *CYPCcpHt1* aus *C. chinensis* (Spur 2) und *CYPL4pHt* aus *M. incana* (Spur 3) exprimiert werden sollten. Die Enzymtests wurden unter Standardbedingungen in geöffneten Eppendorfgläsern durchgeführt (siehe B.6.2.2).

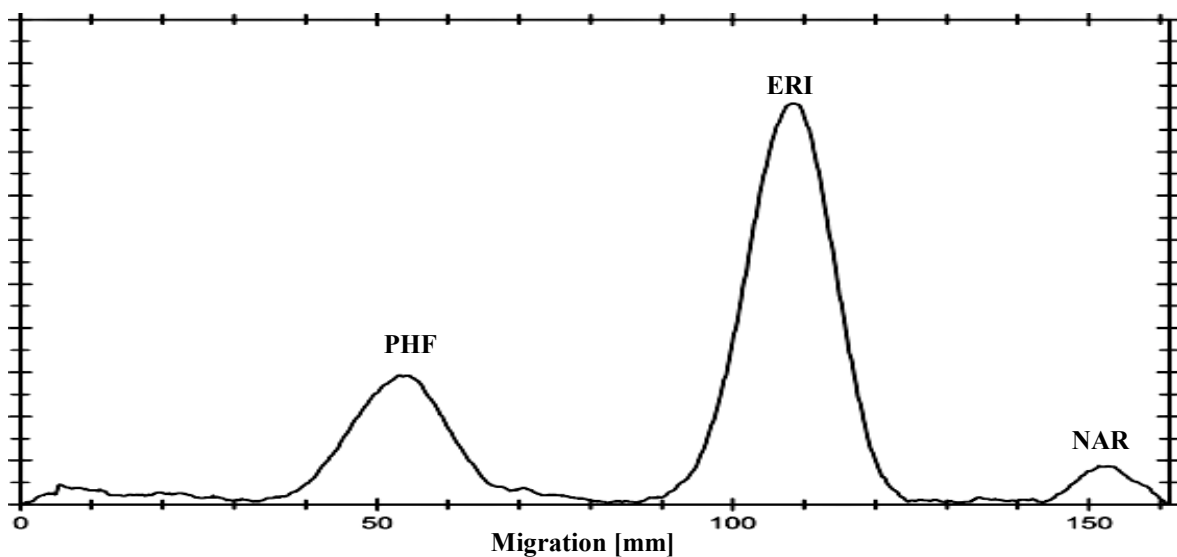


**Abb. 28:** Enzymtests zum Nachweis der Expression des cDNA-Klons *CYPCcpHt1* aus *C. chinensis* in transformierten Hefen im Vergleich zur Expression von Genen aus *L. rantonnetii* und *M. incana*. **a)** Ansätze mit jeweils 5  $\mu$ l 1 : 5 verdünnter Mikrosomenfraktion ( $\hat{=}$  0,7836  $\mu$ g Protein). **b)** Ansätze mit jeweils 50  $\mu$ l 1 : 5 verdünnter Mikrosomenfraktion ( $\hat{=}$  7,836  $\mu$ g Protein). Spur 1: *CYPLrpHf2* aus *L. rantonnetii*; Spur 2: *CYPCcpHt1* aus *C. chinensis*; Spur 3: *CYPL4pHt* aus *M. incana*; **M:** Vergleichssubstanzen (**NAR** = Naringenin, **ERI** = Eriodictyol, **PHF** = Pentahydroxyflavanon).

Der Enzymtest, in dem 5  $\mu$ l verdünnte Mikrosomenfraktion verwendet wurden, zeigte in Spur 2 und Spur 3 einen deutlichen Umsatz des eingesetzten Naringenins zu Eriodictyol. Dabei wurde das Naringenin von den Mikrosomen, in denen *CYPL4pHt* aus *M. incana* exprimiert werden sollte, zu 88,9 % umgesetzt (Spur 3). Die Mikrosomen, in denen die Aktivität von *CYPCcpHt1* aus *C. chinensis* bestimmt werden sollte, setzten das eingesetzte NAR hingegen nur zu 41,5 % um (Spur 2). Die Mikrosomen, in denen *CYPLrpHf2* aus *L. rantonnetii* exprimiert werden sollte, zeigten in beiden Tests keine Enzymaktivität (jeweils Spur 1).

Im zweiten Enzymtest, in dem 50 µl verdünnte Mikrosomenfraktion eingesetzt wurden, setzten die „CYPL4pHt-Mikrosomen“ das gesamte Naringenin zu Eriodictyol um, während von den „CYPCcpHt1-Mikrosomen“ aus dem eingesetzten NAR neben dem 3'-hydroxylierten Eriodictyol auch 3',5'-hydroxyliertes Pentahydroxyflavanon gebildet wurde. Das eingesetzte NAR wurde dabei zu 70,7 % zu ERI und zu 20,0 % zu PHF umgesetzt.

Bezogen auf den Gesamtproteingehalt wurde im ersten Enzymtest bei den „CYPL4pHt-Mikrosomen“ eine spezifische Enzymaktivität von 16,954 pkat/mg Protein ermittelt. Bei den „CYPCcpHt1-Mikrosomen“ wurde im gleichen Test mit 7,378 pkat/mg Protein eine deutlich schwächere Enzymaktivität gemessen. Im zweiten Enzymtest, in dem die 10fache Proteinmenge eingesetzt wurde, fiel die Enzymaktivität der „CYPCcpHt1-Mikrosomen“ mit 1,612 pkat/mg Protein noch wesentlich geringer aus, wobei hier die Enzymaktivität durch die Summe des 3',4'-hydroxylierten Produktes ERI und des 3',4',5'-hydroxylierten Produktes PHF berechnet wurde. Das in diesem Test ermittelte Verhältnis von ERI zu PHF von ca. 3,5 : 1 verringerte sich in weiteren Enzymtests, in denen die Inkubationszeit und die eingesetzte Proteinmenge deutlich erhöht wurde, signifikant, wobei jedoch in sämtlichen Tests jeweils mehr ERI als PHF gebildet wurde. In einem Enzymtest, in dem 50 µl unverdünnte Mikrosomenfraktion ( $\hat{=}$  46,875 µg Protein) eingesetzt und der Versuchsansatz für 90 min bei 30 °C inkubiert wurde, konnte ein Verhältnis der synthetisierten Produkte ERI und PHF von ca. 2,6 : 1 gemessen werden (Abb. 29).

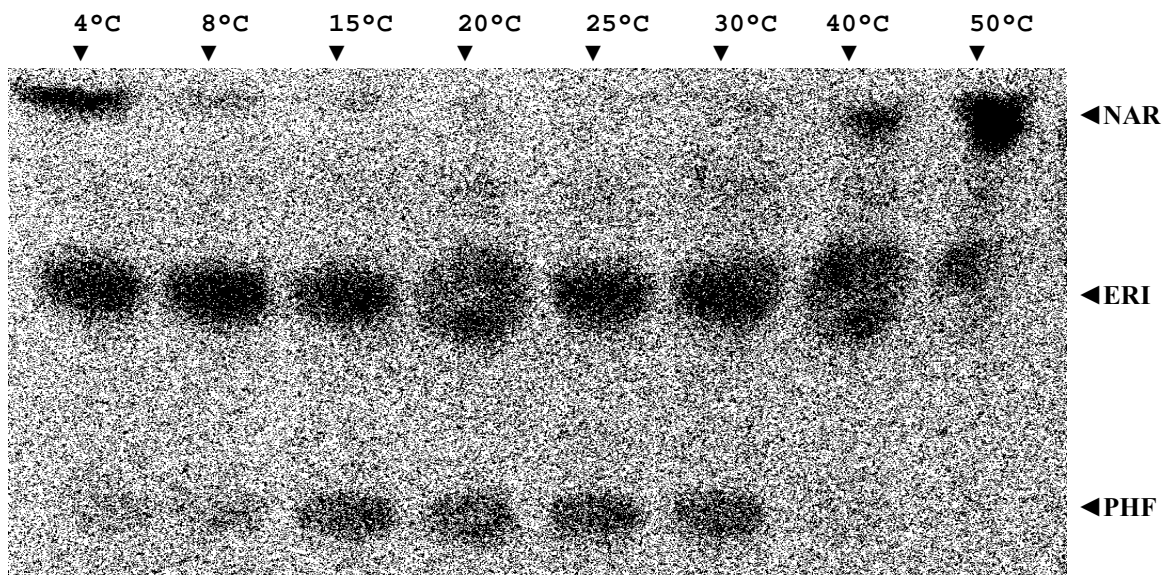


**Abb. 29:** Dünnschichtchromatographische Analyse der durch die Expression von *CYP CcpHt1* aus *C. chinesis* in Hefemikrosomen aus [ $^{14}$ C]-Naringenin synthetisierten Produkte. PHF = Pentahydroxyflavanon, ERI = Eriodictyol, NAR = Naringenin (siehe auch weitere Erläuterungen im Text).



Dabei wurde das eingesetzte NAR zu 69,1 % zu ERI und zu 26,6 % zu PHF umgesetzt. Weder durch eine Erhöhung der eingesetzten Proteinmenge, noch durch Verlängerung der Inkubationsdauer konnte eine weitere Verringerung des Verhältnisses beider Produkte erzielt werden. Auch durch die Variation der Temperatur und des pH-Werts änderte sich das Verhältnis der Produkte nur noch geringfügig.

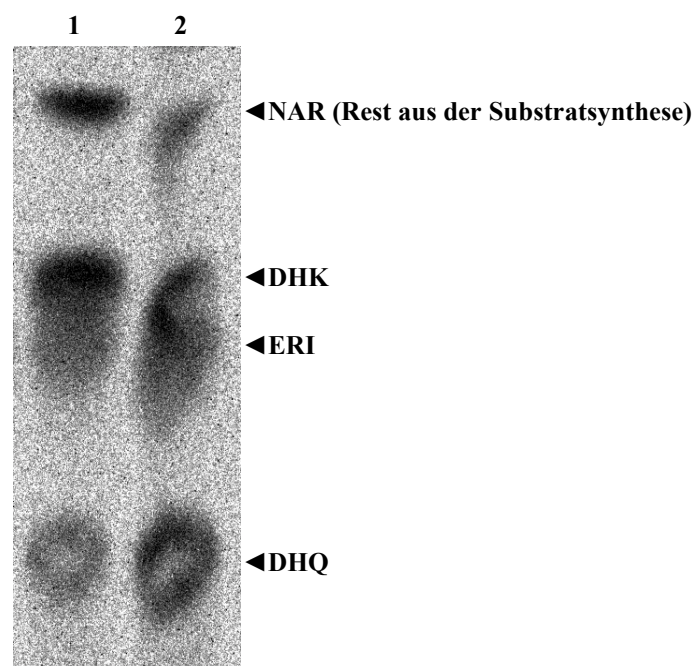
Bei der Bestimmung des Temperaturoptimums zeigte sich, dass am meisten PHF bei einer Temperatur von 25 °C gebildet wurde (Abb. 30). Der Umsatz an eingesetztem NAR war bei einer Inkubation zwischen 15-30 °C annähernd 100 %. Bei einer Inkubation bei 8 °C und bei 40 °C wurde ebenfalls ein Großteil des eingesetzten NAR umgesetzt. Dabei wurde jedoch fast ausschließlich ERI und so gut wie kein PHF gebildet.



**Abb. 30:** Bestimmung des Temperaturoptimums der F3',5'H CYPcPht1 aus *C. chinensis*. Es wurden jeweils 35 µl unverdünnter Mikrosomenfraktion ( $\hat{=}$  32,813 µg Protein) eingesetzt und für 90 min bei unterschiedlichen Temperaturen und ansonsten unter Standardbedingungen inkubiert (siehe B.6.2.2). **NAR** = Naringenin, **ERI** = Eriodictyol, **PHF** = Pentahydroxyflavanon (siehe auch weitere Erläuterungen im Text).

Ein Totalumsatz des eingesetzten NAR konnte in keinem der durchgeführten Enzymtests beobachtet werden, so dass die in diesem Test ermittelte Rate von 98 % gleichzeitig die Größenordnung des maximal erzielbaren Umsatzes darstellt.

Bei Versuchen, in denen DHK als Substrat verwendet wurde, konnte ebenfalls eine deutliche Enzymaktivität gemessen werden. Das dabei eingesetzte DHK war z.T. stark mit NAR aus der Substratsynthese verunreinigt, so dass in solchen Fällen neben DHK auch Naringenin als Substrat für das Enzym diente. Bei dem in Abb. 31 dargestellten Enzymtest wurde eine Mischung aus 54 % DHK und 46 % NAR als Substrat eingesetzt. Im ersten Ansatz wurden 20  $\mu\text{l}$  ( $\cong$  18,75  $\mu\text{g}$  Protein), im zweiten 50  $\mu\text{l}$  ( $\cong$  46,875  $\mu\text{g}$  Protein) unverdünnte Mikrosomenfraktion eingesetzt. Beide Ansätze wurden 60 min bei 30 °C unter Standardbedingungen (siehe B.6.2.2) in offenen Eppendorfgläsern inkubiert.

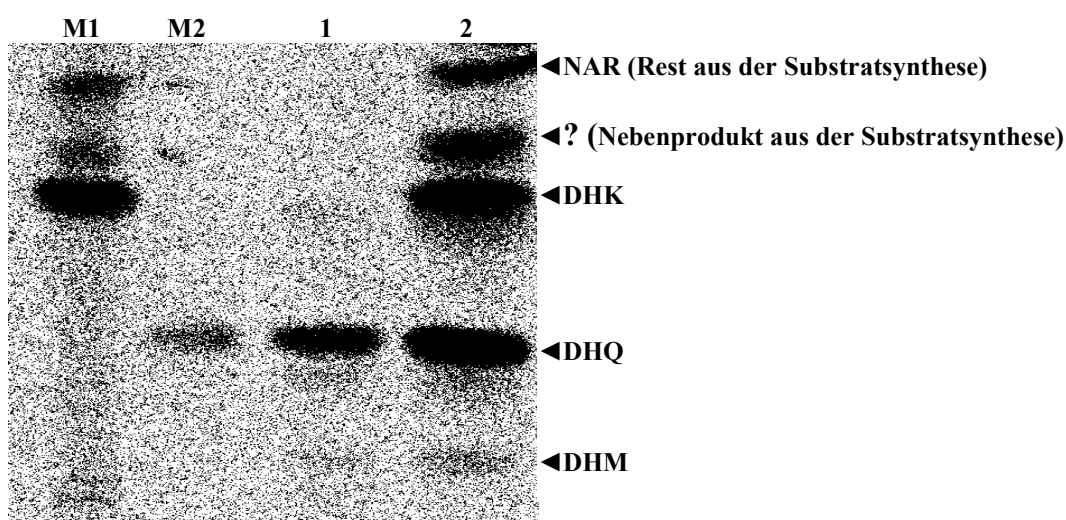


**Abb. 31:** Umsetzung von Dihydrokaempferol zu Dihydroquercetin durch den heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klon *CYPcP11* aus *C. chinensis*. **1** = Ansatz mit 20  $\mu\text{l}$  Mikrosomen ( $\cong$  18,75  $\mu\text{g}$  Protein), **2** = Ansatz mit 50  $\mu\text{l}$  Mikrosomen ( $\cong$  46,875  $\mu\text{g}$  Protein). **NAR** = Naringenin, **DHK** = Dihydrokaempferol, **ERI** = Eriodictyol, **DHQ** = Dihydroquercetin (siehe auch weitere Erläuterungen im Text).

In beiden Ansätzen konnte eine deutliche Bildung von DHQ aus DHK beobachtet werden. Dabei wurde das eingesetzte DHK im ersten Ansatz zu 32 % und im zweiten Ansatz zu 72 % umgesetzt. Zu der Bildung des auch in 5'-Position hydroxylierten DHM kam es unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht. Aus dem ebenfalls eingesetzten NAR wurde ERI gebildet, wobei hier der prozentuale Umsatz des Naringenins im ersten Ansatz mit 54 % deutlich höher lag als der Umsatz des Dihydrokaempferols. Im zweiten Ansatz hingegen lag er mit 76 % jedoch nur noch leicht darüber. Das an der 5'-Position hydroxylierte PHF trat ebenfalls in keinem der beiden Ansätze auf.

In einem weiteren Test, in dem mit 100 µl unverdünnter Mikrosomenfraktion eine außerordentlich große Enzymmenge eingesetzt wurde, konnte die Bildung von 3',4',5'-hydroxyliertem DHM aus 3',4'-hydroxyliertem DHQ und aus 4'-hydroxyliertem DHK gemessen werden (Abb. 32).

Dabei wurden 0,03 nmol radioaktives DHQ und 0,06 nmol radioaktives DHK, welches jedoch stark mit NAR und einem weiteren unbestimmten Nebenprodukt aus der Substratsynthese verunreinigt war, eingesetzt. Beide Ansätze wurden bei 25 °C für 90 min in offenen Eppendorfgefäßen und ansonsten unter Standardbedingungen inkubiert (siehe B.6.2.2).



**Abb. 32:** Bildung von DHM aus DHK und DHQ durch den heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Kon *CYPcPht1* aus *C. chinensis*. In beiden Ansätzen (200 µl) wurden 100 µl Mikrosomenfraktion ( $\hat{=}$  93,75 µg Protein) eingesetzt. **M1** = Vergleichssubstanz DHK, **M2** = Vergleichssubstanz DHQ. **NAR** = Naringenin, **?** = Nebenprodukt aus der Substratsynthese, **DHK** = Dihydrokaempferol, **DHQ** = Dihydroquercetin, **DHM** = Dihydromyricetin (siehe auch weitere Erläuterungen im Text).

Die Bildung von DHM aus dem eingesetzten Substrat war in beiden Ansätzen nur sehr schwach, aber dennoch deutlich zu erkennen. Dabei wurden im ersten Ansatz 5 % des eingesetzten DHQ zu DHM umgesetzt. Im zweiten Ansatz war der Umsatz von DHK zu DHM mit 6 % nur geringfügig stärker ausgeprägt. Diese ungewöhnlich geringen Umsatzraten konnten auch bei weiteren Tests mit variierenden Versuchsbedingungen nicht mehr gesteigert werden. Bei Kontrollversuchen mit Mikrosomenpräparationen aus untransformierten Hefen wurde kein Umsatz von NAR oder DHK beobachtet. Auch in Ansätzen ohne NADPH wurde keines der verwendeten Substrate umgesetzt. Durch die Zugabe des CYP-Hemmstoffes Tetcyclasis mit einer finalen Konzentration von 50 µM konnte die Enzymaktivität ebenfalls vollständig inhibiert werden.

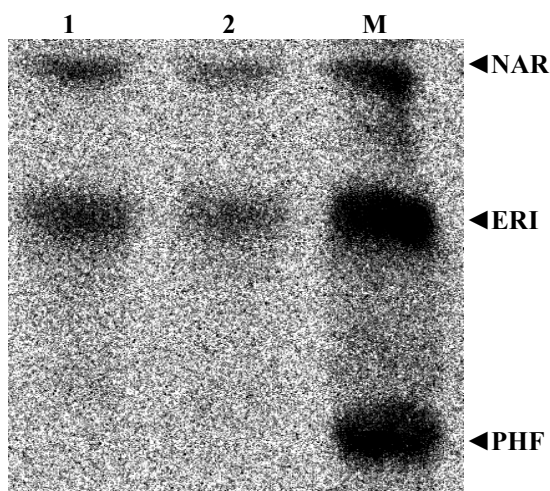
Zusammen mit der Aminosäuresequenz klassifizieren diese Ergebnisse CYP<sub>CpHt1</sub> zweifelsfrei als CYP-Enzym. Obwohl das CYP<sub>CpHt1</sub> aufgrund seiner Aminosäuresequenz als F3'H klassifiziert werden muss, handelt es sich bei diesem Enzym jedoch eindeutig um eine F3',5'H. In Tabelle 12 sind die in den Enzymtests maximal erzielten Substratumsätze zusammengefasst.

**Tab.12:** Maximale Substratumsätze durch die F3',5'H CYP<sub>CpHt1</sub> aus *C. chinensis*.

<b>3'-hydroxyliertes Substrat</b>	<b>3',4'-hydroxyliertes Produkt [%]</b>	<b>3',4',5'-hydroxyliertes Produkt [%]</b>
Naringenin	Eriodictyol [69]	Pentahydroxyflavanon [29]
Dihydrokaempferol	Dihydroquercetin [72]	Dihydromyricetin [6]
<b>3',4'-hydroxyliertes Substrat</b>		
Eriodictyol	-	Pentahydroxyflavanon [16]
Dihydroquercetin	-	Dihydromyricetin [5]

### C.8.3 Heterologe Expression des putativen F3',5'H-cDNA-Klons *CYPLrpHf2* aus *Lycianthes rantonnetii* in Hefe

Zur heterologen Expression von *CYPLrpHf2* in Hefe wurde der cDNA-Klon in die drei zur Verfügung stehenden Hefeexpressionsvektoren einkloniert (siehe B.4.2). Dazu wurden durch die bei der PCR verwendeten „end-to-end“ Primer am 5'-Ende des cDNA-Klons eine *Bam*HI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *Eco*RI-Schnittstelle eingefügt. Mit dem in die Hefevektoren pYES2<sup>®</sup> und pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> einklonierten cDNA-Klon wurde der Uracil auxotrophe Hefestamm INVSc1 transformiert. Der in den Vektor YeDP60 einklonierte Klon wurde zusätzlich in die Adenin auxotrophen Stämme W(R), WAT11 und WAT21 eingebracht. Neben den mit allen transformierten Hefen durchgeführten *in vivo* Enzymtests wurden außerdem von zwei INVSc1-Kulturen, die mit *CYPLrpHf2*-pYES2<sup>®</sup> bzw. mit *CYPLrpHf2*-pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> transformiert worden waren, Mikrosomen präpariert und mit diesen *in vitro* Enzymtests durchgeführt. Bei den *in vivo* Enzymtests konnte nur bei einer Expressionskonstrukt-Hefestamm-Kombination eine Aktivität nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um INVSc1-Kulturen, die mit dem Expressionskonstrukt *CYPLrpHf2*-pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> transformiert worden waren. Dabei trat jedoch, wie aufgrund der Aminosäuresequenz von *CYPLrpHf2* zu vermuten war, keine F3',5'H-Aktivität, sondern nur eine F3'H-Aktivität auf. In den zwei durchgeführten Parallelansätzen, welche von zwei unterschiedlichen Transformationsansätzen stammten, wurde das eingesetzte NAR zu ERI umgesetzt (Abb. 33).



**Abb. 33:** *In vivo* Enzymtest (Bioconversion) mit *CYPLrpHf2*-pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup>-Konstrukt transformierten INVSc1-Kulturen. **1** und **2** = Parallelansätze, **M** = Vergleichssubstanzen. **NAR** = Naringenin, **ERI** = Eriodictyol, **PHF** = Pentahydroxyflavanon (siehe auch weitere Erläuterungen im Text)..

Im gleichen Versuch diente das bereits eindeutig als F3',5'H verifizierte CYPcPht1 aus *C. chinensis* als Positivkontrolle (siehe C.8.2). Unter den gegebenen Versuchsbedingungen wurde auch bei diesem Enzym nur eine F3'H-Aktivität gemessen, so dass die Ergebnisse dieses *in vivo* Tests keine eindeutigen Rückschlüsse zuließen, ob es sich bei CYPLrPht2 um eine F3'H oder eine F3',5'H handelt. Die Inkubation der Kulturen mit dem radioaktiv markierten Substrat erfolgte bei 28 °C für 16 Stunden und ansonsten unter standardisierten Bedingungen (siehe B.6.2.1). In beiden Ansätzen wurde mit 57,5 % (Ansatz 1) und 56,5 % (Ansatz 2) nahezu der gleiche Anteil an eingesetztem NAR umgesetzt. Bei einer Wiederholung dieser *in vivo* Tests mit denselben Hefekulturen, konnte zwar ein geringerer, jedoch deutlich erkennbarer Umsatz von NAR zu ERI gemessen werden.

Im Gegensatz zu den *in vivo* Tests konnte bei keiner der beiden Mikrosomenpräparationen eine Enzymaktivität gemessen werden. Unerwarteterweise traf dies auch bei der Mikrosomenpräparation von der Kultur, bei der zuvor eine F3'H-Aktivität gemessen wurde, zu (s.o.). Bei Enzymtests mit Mikrosomen aus untransformierten Kulturen der verwendeten Hefestämme und bei entsprechenden *in vivo* Enzymtests mit diesen Kulturen wurde keine Enzymaktivität gemessen.

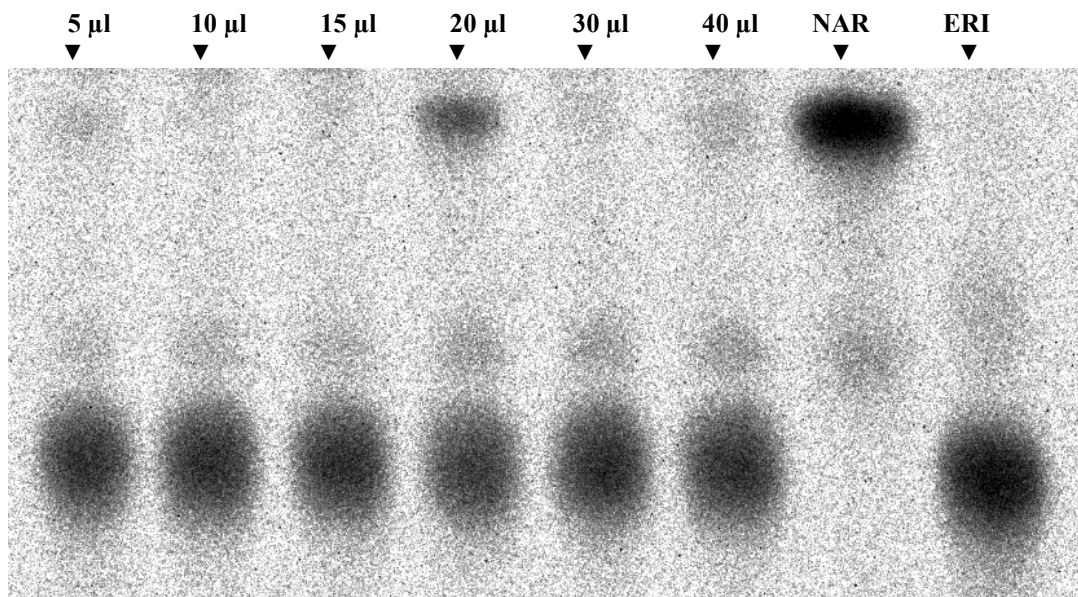
#### **C.8.4 Heterologe Expression des putativen F3'H-cDNA-Klons CYPPzPht2 aus *Pelargonium zonale* in Hefe**

Um den ORF des cDNA-Klons *CYPPzPht2* heterolog in Hefe zu exprimieren, wurde dieser mit Hilfe der PCR amplifiziert und nachfolgend direkt durch T/A-Cloning in den Expressionsvektor pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> inkloniert. Die bei der PCR verwendeten „end-to-end“ Primer fügten dabei am 5'-Ende des ORF eine *EPstI*-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *EBst681*-Schnittstelle ein. Durch einen Fehler beim Primerdesign wurde dabei jedoch das TGA-Stopcodon des ORF zerstört (siehe G.3), so dass das Genprodukt durch den Primer um 2 und aufgrund der Vektorsequenz um weitere 33 AS bis zum TGA-Stopcodon des Vektors verlängert wurde.

Da der Hefeexpressionsvektor pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> speziell für derartige Fälle konzipiert wurde und dabei aufgrund seiner V5 Epitop- und Polyhistidin(6x)-Region einige Vorteile bietet, wurde zunächst versucht, bei dem unbeabsichtigt verlängerten Protein eine spezifische Enzymaktivität nachzuweisen (siehe B.4.2).

Bereits im ersten *in vivo* Enzymtest (siehe B.6.2.1) konnte eine eindeutige F3'H-Aktivität gemessen werden. Dabei wurde das eingesetzte NAR zu über 50 % zu Eriodictyol umgesetzt (Daten nicht dargestellt).

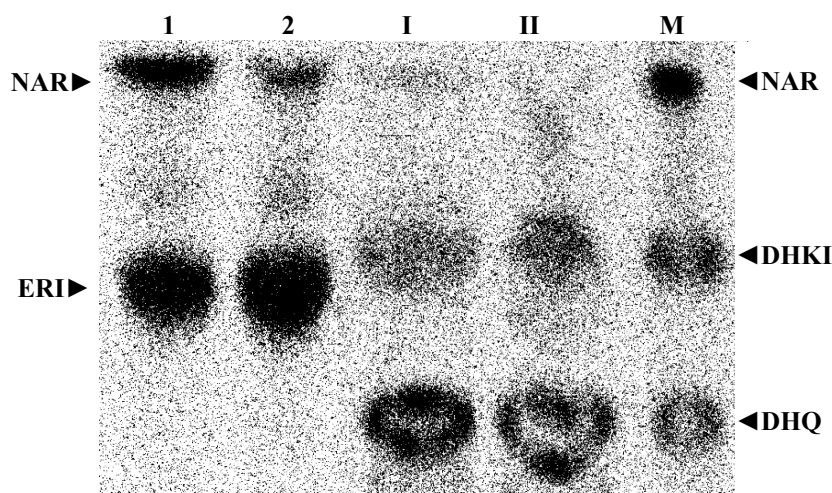
Die Mikrosomen, die aus dieser Kultur präpariert wurden, zeigten erwartungsgemäß eine stark ausgeprägte F3'H-Aktivität, wobei es bereits nach der Zugabe von 5  $\mu$ l ( $\hat{=}$  3,857  $\mu$ g Protein) unverdünnter Mikrosomen und einer Inkubationsdauer von 30 min unter Standardbedingungen zu einem Totalumsatz des eingesetzten Naringenins kam (Abb. 34).



**Abb. 34:** Umsetzung von Naringenin zu Eriodictyol durch den heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klon *CYPpHf2* aus *Pelargonium zonale*. Unterschiedliche Mengen an unverdünnter Mikrosomenfraktion wurden mit radioaktiv markiertem NAR unter Standardbedingungen inkubiert (siehe B.6.2.2). **NAR** = Vergleichssubstanz Naringenin, **ERI** = Vergleichssubstanz Eriodictyol. (siehe auch weitere Erläuterungen im Text).

Unter den gleichen Versuchsbedingungen wurde auch DHK von 5  $\mu$ l Mikrosomen vollständig zu DHQ umgesetzt (Daten nicht dargestellt).

Nach Verkürzung der Reaktionsdauer und der Verwendung geringerer Mengen an Mikrosomen konnte gezeigt werden, dass diese NAR deutlich besser umsetzten als DHK (Abb. 35). In diesem Test wurde das eingesetzte NAR mit 10 bzw. 25  $\mu\text{l}$  1 : 10 verdünnten Mikrosomen inkubiert. Bei den beiden Ansätzen mit DHK wurden jeweils 25  $\mu\text{l}$  1 : 10 verdünnte Mikrosomen verwendet. Das verwendete radioaktiv markierte DHK war in diesem Fall nicht mit NAR aus der Substratsynthese verunreinigt, so dass der Test eine zuverlässige Aussage über die unterschiedliche Umsatzrate der beiden Substrate lieferte. Die Reaktionsdauer des Versuchs betrug 15 min und wurde ansonsten unter Standardbedingungen durchgeführt. Das eingesetzte NAR wurde von 10  $\mu\text{l}$  ( $\hat{=}$  0,776  $\mu\text{g}$  Protein) verdünnten Mikrosomen zu 61 % und von 25  $\mu\text{l}$  ( $\hat{=}$  1,929  $\mu\text{g}$  Protein) zu 89 % zu ERI umgesetzt. In den beiden Parallelansätzen wurde das eingesetzte DHK von 25  $\mu\text{l}$  verdünnten Mikrosomen zu 59 bzw. 61 % zu DHQ umgesetzt.



**Abb. 35:** Vergleich des Umsatzes von NAR und DHK durch den heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klon *CYPPzHf2* aus *Pelargonium zonale*. **1** = Ansatz mit NAR als Substrat und Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  verdünnter Mikrosomenfraktion, **2** = Ansatz mit NAR als Substrat und Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  verdünnter Mikrosomenfraktion. **I + II** = Parallelansätze mit DHK als Substrat und jeweils 25  $\mu\text{l}$  verdünnter Mikrosomenfraktion. **M** = Vergleichssubstanzen (siehe auch weitere Erläuterungen im Text).

In Versuchen mit höheren Substratkonzentrationen und verkürzter Reaktionszeit wurden noch größere Unterschiede in der Umsatzrate von NAR und DHK durch die F3'H aus *Pelargonium zonale* festgestellt. Die maximalen Umsätze, die gemessen wurden, betragen bei NAR 17,379 pkat/mg Protein und bei DHK 11,541 pkat/mg Protein.

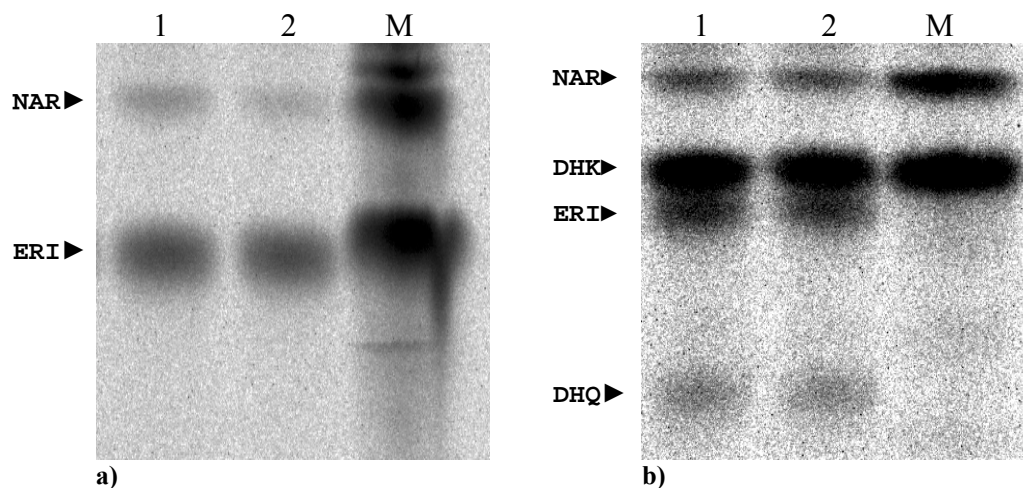
In Kontrollversuchen mit nicht transformierten Hefen und in Ansätzen ohne NADPH wurden die eingesetzten Substrate nicht umgesetzt.



### C.8.5 Heterologe Expression des putativen F3'H-cDNA-Klons *CYPL4pHt* aus *Matthiola incana* in Hefe

Aufgrund einer internen *EcoRI*-Schnittstelle innerhalb des ORF von *CYPL4pHt* war eine einfache Klonierung des cDNA-Klons in den Hefeexpressionsvektor YeDP60 nicht möglich (siehe B.4.2). Daher wurde der ORF von *CYPL4pHt* durch PCR mit „end-to-end“ Primern, die am 5'-Ende eine *XbaI* und am 3'-Ende eine *SacI*-Schnittstelle in den offenen Leserahmen einführen, amplifiziert und nachfolgend über einen Zwischenklonierungsschritt mit Hilfe eines herkömmlichen PCR-Klonierungsvektors in den Hefektor pYES2<sup>®</sup> inkloniert (siehe B.4.2 und B.5.9.2). Das *CYPL4pHt*-pYES2<sup>®</sup>-Konstrukt wurde anschließend in den Hefestamm INVSc1 eingebracht, um die Expression des putativen CYP-cDNA-Klons in den transformierten Hefen zu ermöglichen. Dabei wurden sowohl *in vivo* Enzymtests mit lebenden Kulturen, als auch *in vitro* Enzymtests mit Mikrosomen aus diesen Kulturen durchgeführt.

Bereits bei den durchgeführten *in vivo* Enzymtests (siehe B.6.2.1) konnte bei allen getesteten Kulturen eine deutliche F3'H-Aktivität beobachtet werden. In zwei Parallelansätzen wurden jeweils sieben mit Galaktose induzierte Kulturen mit radioaktivem NAR oder mit radioaktivem DHK als Substrat versetzt (Abb. 36). Das verwendete DHK war dabei jedoch mit 32,5 % zu einem hohen Anteil mit NAR aus der Substratsynthese verunreinigt.



**Abb. 36:** *In vivo* Enzymtest (Bioconversion) mit *CYPL4pHt*-pYES2<sup>®</sup>-Konstrukt transformierten INVSc1-Kulturen. Die Hefekulturen wurden in der frühen exponentiellen Wachstumsphase mit Galaktose induziert und anschließend mit dem zugegebenen radioaktiven Substrat für weitere 16 Stunden bei 28 °C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. **a)** NAR = Naringenin als Substrat. **b)** DHK = Dihydrokaempferol als Substrat. **M** = Vergleichssubstanzen (siehe auch weitere Erläuterungen im Text).

In den Ansätzen, in denen ausschließlich NAR eingesetzt wurde, betrug der Substratumsatz durchschnittlich 81 %. In den Ansätzen mit beiden Substraten wurden durchschnittlich 22 % DHK und 31 % NAR umgesetzt.

Vollständiger Umsatz von NAR und DHK zu ERI bzw. DHQ trat in Enzymtests mit der Mikrosomenfraktion der zuvor *in vivo* getesteten Hefekultur auf. Dabei wurde NAR von den Mikrosomen deutlich stärker umgesetzt als DHK (Daten nicht dargestellt). Die maximal unter optimierten Bedingungen ermittelten Enzymaktivitäten betragen bei NAR als Substrat 16,954 pkat/mg Protein und bei DHK als Substrat 9,788 pkat/mg Protein.

Da die Resultate der *in vivo* Tests in bezug auf die Substratverwertbarkeit in den *in vitro* Tests im wesentlichen bestätigt wurden, konnten die in den *in vivo* Tests gemessenen geringen DHK-Umsätze zumindest nicht ausschließlich mit einer geringeren Aufnahme des DHK in die Hefezelle begründet werden. Bei untransformierten Hefen wurde sowohl in *in vivo*, als auch in *in vitro* Tests kein Umsatz der verwendeten Substrate festgestellt.

## D. Diskussion

Die beiden Cytochrom P450-Enzyme Flavonoid 3'- und Flavonoid 3',5'-Hydroxylase stellen zwei wichtige Enzyme im Flavonoidbiosyntheseweg dar. Sie katalysieren die Hydroxylierung des B-Rings an den entsprechenden Positionen und schaffen dadurch die Grundlage für alle weiteren Modifikationen des B-Rings. Innerhalb einzelner Flavonoidklassen beeinflusst ihre Aktivität die nachfolgenden Syntheseschritte und somit letztlich die Zusammensetzung der in der Pflanze auftretenden Flavonoide.

Eine entscheidende Rolle spielen beide Enzyme in bezug auf die Färbung anthocyanhaltiger Blüten. Die unterschiedliche Struktur der über 500 bislang identifizierten Anthocyane beruht im Wesentlichen auf der unterschiedlichen Anzahl von Hydroxylgruppen an ihrem A- und B-Ring und auf dem Grad der Methylierung dieser Hydroxylgruppen. Ungeachtet der großen strukturellen Vielfalt der in der Natur vorkommenden Anthocyane unterscheiden sich die am häufigsten auftretenden und am weitesten verbreiteten Anthocyane nur hinsichtlich der Modifikation ihres B-Rings voneinander, was die besondere Bedeutung der F3'- und der F3',5'H für die Färbung von Blüten und anderen Pflanzenteilen verdeutlicht.

Der jahrzehntelang unternommene Versuch zahlreicher Züchter, das trotz der beinahe unbegrenzten Mannigfaltigkeit der in der Natur auftretenden Pflanzenfarben enge Farbspektrum einiger wichtiger Zierpflanzen zu erweitern, erlangt mit der enzymologischen und molekularbiologischen Erforschung dieser Enzyme eine neue Dimension.

Durch die Charakterisierung beider Enzyme und die Klonierung der entsprechenden Gene wird die gezielte Manipulation der Blütenfarbe durch „genetic engineering“ ermöglicht. Neben einer enormen Zeitersparnis kann mit diesem Verfahren eine gezieltere und zumeist auch effektivere Beeinflussung der Blütenfarbe erreicht werden, ohne dabei, wie es bei der klassischen Züchtung häufig der Fall ist, zahlreiche wichtige und zum Teil durch langwierige Züchtung gewonnene Eigenschaften der Zierpflanzen zu verändern.

Über die ökonomisch vielversprechende Nutzung der F3'- und der F3',5'H zur Erzeugung neuer Blütenfarben bei wirtschaftlich bedeutsamen Zierpflanzen hinaus, können beide Enzyme in Zukunft zur biotechnologischen Produktion zahlreicher Flavonoide eingesetzt werden und diese dadurch in beliebiger Menge für die medizinische Forschung und für die Nahrungsmittelindustrie verfügbar zu machen.

## D.1 Klonierung einer F3'H-cDNA aus *Matthiola incana*

Aufgrund früherer Untersuchungen ist bekannt, dass die Bildung 3'-hydroxylierter Flavonoide in der Levkoje von dem Gen *b* kontrolliert wird (siehe B.2.2). Eine F3'H-Aktivität konnte nur in Linien, die über ein dominantes Allel  $b^+$  verfügen, jedoch nicht in homozygot rezessiven Linien (*bb*) nachgewiesen werden.

Bei verschiedenen Pflanzen konnte gezeigt werden, dass Mutationen bei Genen, die am Flavonoidbiosyntheseweg beteiligt sind, häufig die Transkription betreffen (Britsch et al., 1992; Forkmann und Heller, 1999; Martens und Forkmann, 1999). In der Annahme, dass es sich bei den homozygot rezessiven Levkojenlinien (*bb*) ebenfalls um Transkriptionsmutanten handelt, kamen für die Klonierung eines F3'H-cDNA-Klons in erster Linie Techniken in Betracht, welche die differentielle Expression von mRNAs untersuchen.

Von den am häufigsten verwendeten Methoden boten sich neben den älteren und weniger präzisen Methoden der differentiellen Hybridisierung von Genbanken und der differentiellen PCR-Amplifikation mit unspezifischen Primern vor allem die moderneren Methoden DD-RT-PCR (**D**ifferential **D**isplay-**RT-PCR**) und RDA von cDNA (**R**epresentational **D**ifference **A**nalysis) als die geeigneten Verfahren zur Klonierung eines differentiell exprimierten F3'H-cDNA-Klons aus *M. incana* an.

Der wesentliche Vorteil von RDA gegenüber DD-RT-PCR ist, dass ausschließlich differentiell exprimierte mRNAs bzw. die entsprechenden cDNAs angereichert und isoliert werden, während nicht differentiell exprimierte mRNAs unberücksichtigt bleiben. Dadurch wird im Gegensatz zu dem von Liang und Pardee entwickelten DD-RT-PCR (Liang und Pardee, 1992), bei dem differentielle und nicht differentielle cDNAs im gleichen Ausmaß angereichert werden, sowohl die Zahl der in Frage kommenden cDNAs als auch das Auftreten falscher Positive drastisch vermindert. Außerdem sollten durch die Modifizierung des Verfahrens auch seltene Transkripte, die möglicherweise durch DD-RT-PCR nicht erfasst worden wären, detektiert werden (siehe B.5.7).

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur subtraktiven Hybridisierung von cDNA-Populationen stellt eine für die Analyse von mRNA, bzw. der entsprechenden cDNA, adaptierte Weiterentwicklung des ursprünglich von Lisitsyn und Wigler zur Analyse von genomischer DNA entwickelten RDA dar (Lisitsyn et al., 1993).

Die Fokussierung auf ausschließlich differentiell exprimierte *CYP*-Gene konnte durch die Verwendung *CYP*-spezifischer Primer zur cDNA-Synthese aus den differentiellen mRNA-Populationen nur in einem geringen Ausmaß erreicht werden. Die beiden isolierten *CYP*-cDNA-Fragmente stammten aus den insgesamt 100 untersuchten Fragmenten des letzten Hybridisierungsansatzes (siehe C.1).

Auch bei Berücksichtigung der Möglichkeit, dass die Größe einiger untersuchter Fragmente aufgrund des im Verfahren durchgeführten Restriktionsverdau zu gering ausgefallen war und/oder dass sie aus einem zu gering konservierten Bereich der *CYP*-Gene stammten, um bei Sequenzanalyse als *CYP*-spezifisches cDNA-Fragment identifiziert zu werden, blieb die erzielte Einschränkung auf *CYP*-cDNA-Klone weit unter den Erwartungen.

Dies ist vermutlich in erster Linie auf die nicht stark genug ausgeprägte Spezifität der verwendeten Primer zurückzuführen, da diese um möglichst alle *CYP*-cDNA-Klone zu erfassen, mit zahlreichen „Wobbles“ und Deoxyinosinen konstruiert wurden (siehe B.5.7). Mit einem mindestens 2 %igen Anteil von *CYP*-spezifischen Fragmenten an den untersuchten Fragmenten, zeigt der letzte Hybridisierungsansatz dennoch eine deutliche Anreicherung von *CYP*-cDNA-Klonen.

Dass es dennoch nicht gelang einen F3'H-spezifischen cDNA Klon durch die subtraktive Hybridisierung zu isolieren, liegt wahrscheinlich darüber hinaus an dem verwendeten Pflanzenmaterial, das nicht in ausreichendem Maß über die notwendige Isogenität verfügte. Obwohl bei der Züchtung der Levkojen-Linien durch die Selektion abweichender Phänotypen für einen weitgehend isogenen Hintergrund gesorgt wurde, war dieser Status nur in bezug auf die untersuchten, den Flavonoidbiosyntheseweg betreffenden Gene eindeutig gewährleistet. Da zahlreiche nicht untersuchte und nicht den Phänotyp beeinflussende Gene unberücksichtigt geblieben waren, konnte nicht von einer vollkommenen Isogenität zwischen den einzelnen Linien ausgegangen werden.

Um dies zu kompensieren, wurde im letzten Hybridisierungsansatz eine plus cDNA-Population, die aus einer einzigen Levkojenlinie stammte, gegen eine minus cDNA-Population, die aus allen 8 zur Verfügung stehenden minus Linien stammte, subtraktiv hybridisiert. Dadurch sollte erreicht werden, dass möglichst alle in der plus Linie exprimierten Gene von den entsprechenden Genen aus einer der 8 minus Linien neutralisiert werden und im Idealfall nur der F3'H-cDNA-Klon aus der plus Linie angereichert wird.

Wie die Klonierung des differentiell exprimierten *CYP*-cDNA-Klons *SPHT* zeigt, konnte mit dieser Vorgehensweise ein differentiell exprimiertes *CYP*-Gen isoliert werden, welches jedoch nicht dem gesuchten F3'H-cDNA-Klon entsprach und dessen Auftreten daher die mangelnde Isogenität des verwendeten Pflanzenmaterials verdeutlicht.

Die Ergebnisse der letzten Hybridisierung lassen jedoch vermuten, dass bei einer Fortsetzung dieses Verfahrens auch mit dem zur Verfügung stehenden Pflanzenmaterial früher oder später der gesuchte F3'H-cDNA-Klon hätte isoliert werden können.

Dass es sich bei den minus Linien tatsächlich wie zuvor vermutet um Transkriptionsmutanten handelt, zeigte sich schließlich bei der Klonierung eines F3'H-cDNA-Klons durch vergleichende PCR mit einem F3'H-spezifischen Primer (siehe C.5). Der dabei isolierte differentielle cDNA-Klon ließ sich durch PCR nur in plus Linien amplifizieren und wurde durch die Expression in Hefe zweifelsfrei als F3'H-cDNA-Klon identifiziert.

## **D.2 Klonierung zweier F3'H-spezifischer cDNAs aus *Callistephus chinensis***

Aus *C. chinensis* konnten durch das Screenen einer cDNA-Bibliothek zwei F3'H-spezifische cDNA-Klone isoliert werden (siehe C.2). Überraschenderweise konnte kein F3',5'H-spezifischer cDNA-Klon isoliert werden, obwohl in RR-Genotypen große Mengen von Delphinidylglukosiden auftreten und eine F3',5'H-Aktivität eindeutig nachgewiesen wurde (Forkmann, 1977; Stotz, 1983). Im Gegensatz dazu konnten durch den Einsatz eines F3'H-cDNA-Klons aus *A. thaliana* als DNA-Sonde unmittelbar die beiden F3'H-spezifischen Klone isoliert werden. Da es auch nach mehrmaligen Versuchen nicht gelang, mit Hilfe zweier F3',5'H-cDNA-Sonden aus *P. hybrida* einen entsprechenden Klon aus der cDNA-Bibliothek zu isolieren, muss davon ausgegangen werden, dass ein derartiger Klon in *C. chinensis* nicht existiert. Diese Annahme wird zusätzlich dadurch erhärtet, dass innerhalb der bekannten F3',5'H-Sequenzen die geringste Homologie zwischen zwei F3',5'Hs aus unterschiedlichen Pflanzen in etwa so groß ist, wie zwischen dem cDNA-Klon aus *A. thaliana* und den damit klonierten F3'H-spezifischen Fragmenten.

Bei der heterologen Expression beider Klone in Hefe konnte nur bei einem der beiden Klone eine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Dabei zeigte *CYPCcpHt1* jedoch eindeutig eine F3',5'H-Aktivität und nicht wie aufgrund der Aminosäuresequenz angenommen eine F3'H-Aktivität.

Damit stellt dieses CYP-Enzym die einzig bisher bekannte F3',5'H dar, die nicht in die Unterfamilie CYP75A, sondern als CYP75B5 in die gleiche Unterfamilie eingeordnet wurde, wie die F3'Hs aus *A. thaliana* und *P. hybrida* (Dr. D. Nelson, persönliche Mitteilung).

Im Gegensatz zu zwei, von insgesamt drei bisher *in vitro* exprimierten F3',5'H-cDNA-Klonen, wurde bei der Expression von *CYPCcpHt1* eine stärkere 3'-Hydroxylase- als 5'-Hydroxylase-Aktivität gemessen. Bei der heterologen Hefeexpression von *CYPCcpHt1* war das maximal erzielbare Verhältnis von 3',4',5'-hydroxylierten zu 3',4'-hydroxylierten Produkten mit 1 : 2 genau umgekehrt proportional zu dem Verhältnis, wie sie bei Enzymtests auftraten, in denen ein F3',5'H-cDNA-Klon aus *C. roseus* exprimiert wurde (Kaltenbach et al., 1999). Das für die meisten F3',5'H-Enzyme *in vitro* am besten zu verwertende NAR wurde von der ebenfalls heterolog in Hefe exprimierten F3',5'H aus *P. hybrida* sogar vollständig zu dem 3',4',5'-hydroxylierten PHF umgesetzt (Holton, 1993). Demgegenüber zeigte ein in Hefe exprimierter F3',5'H-cDNA-Klon aus *Gentiana triflora* die gleichen Umsatzraten wie *CYPCcpHt1* (Tanaka et al., 1996).

Die Ergebnisse der Hefeexpression von *CYPCcpHt1* decken sich mit früheren Untersuchungen, die mit der Mikrosomenfraktion einer RR-Linie aus *C. chinensis* durchgeführt wurden. Die in diesem Delphinidintyp charakterisierte F3',5'H zeigte die gleichen Umsatzraten wie sie bei der Expression von *CYPCcpHt1* gemessen wurden (Stotz, 1983). Schon zu dem damaligen Zeitpunkt standen die Ergebnisse der F3',5'H-Enzymtests in einem scheinbaren Widerspruch zu den *in vivo* angetroffenen Verhältnissen. Sie konnten zwar das Auftreten von Delphinidin und Cyanidin in RR-Linien erklären, jedoch nicht die gegenüber dem Cyanidin wesentlich höhere Konzentration an Delphinidin. Bislang wurde davon ausgegangen, dass die Modifikation des B-Rings bei *C. chinensis* durch den Locus R mit multiplen Allelen R/r'/r kontrolliert wird (Forkmann, 1977), wobei in RR-Linien Delphinidin, in r'r'-Linien Cyanidin und in rr-Linien Pelargonidin das bei weitem überwiegende Anthocyanidin darstellt. Delphinidin tritt in rr-Linien nicht und in r'r'-Linien nur in einem geringen Ausmaß auf.

Mit dem Auftreten des zweiten aus der cDNA-Bibliothek isolierten F3',5'-spezifischen cDNA-Klons *CYPCcpHt2* müssen die Verhältnisse, wie sie bei *C. chinensis* anzutreffen sind neu überdacht werden. Möglicherweise sind doch zwei Gene, statt nur ein einziges mit verschiedenen Allelen für die Hydroxylierungen am B-Ring verantwortlich. Demzufolge könnte es sich bei *CYPCcpHt2* um einen Klon handeln, der eine F3',5' codiert, welche in allen drei Genotypen exprimiert wird und dort das Auftreten von Cyanidin erklärt.

Die F3',5' *CYPCcpHt1* würde in diesem Fall nur im Cyanidin- und im Delphinidintyp auftreten, wo sie aufgrund unterschiedlich starker Expression, die z.B. durch eine Mutation des Promotors verursacht sein könnte, die entsprechenden Konzentrationsverhältnisse von Cyanidin und Delphinidin in den jeweiligen Typen verursachen würde.

Eine mögliche Erklärung für das überwiegende Vorhandensein von Delphinidin in den RR-Typen wäre die *in vivo* auftretende synergistische Wirkung beider Enzyme. Die Ergebnisse der Enzymtests mit *CYPCcpHt1* weisen darauf hin, dass die Hydroxylierung des eingesetzten Substrats an der 5'-Position erst erfolgt, nachdem ein Großteil des Substrats bereits an der 3'-Position hydroxyliert wurde (siehe C.8.2). Da die Aktivität des Enzyms *in vitro* jedoch schnell abnimmt, könnte dadurch wesentlich weniger Substrat an der 5'-Position hydroxyliert werden als dies *in vivo* bei dem Zusammenwirken beider Enzyme der Fall sein würde.

Gegen diese Hypothese spricht, dass in den *in vitro* Enzymtests auch bei dem ausschließlichen Einsatz von 3',4'-hydroxylierten Substraten keine höhere Ausbeute an 3',4',5'-hydroxylierten Produkten erzielt wurde. Da jedoch in den r'r'-Typen beträchtliche, und selbst in den RR-Typen geringe Mengen an Pelargonidin auftreten, wäre es möglich, dass mit Abnahme des 4'-hydroxylierten Substrats auch die Aktivität der F3',5' sinkt, bzw. ab einer gewissen Konzentration sogar vollkommen zum Erliegen kommt. Daneben könnten noch weitere Faktoren, wie z.B. die fortlaufende Enzymproduktion, oder eine *in vivo* höhere Enzymaktivität der F3',5', für die hohen Delphinidinkonzentrationen in den RR-Typen verantwortlich sein.

Eine vollständige Aufklärung könnte vor allem der Nachweis einer Enzymaktivität des durch den zweiten cDNA-Klon *CYPCcpHt2* codierten Enzyms bringen. Sollte sich dabei herausstellen, dass es sich um eine funktionstüchtige F3',5' handelt, müsste die Expression dieses Klons in den rr- und r'r'-Linien über RT-PCR und/oder durch *Northernblot*-Analyse nachgewiesen werden.



Dabei sollte der Nachweis der exprimierten Gene vorzugsweise durch RT-PCR durchgeführt werden, da die so möglicherweise isolierten „full-length“ cDNA-Klone durch Sequenzanalyse eindeutig identifiziert und charakterisiert werden könnten. Desweiteren müsste mit den gleichen Verfahren überprüft werden, ob der F3',5'H-cDNA-Klon *CYPCcpHt1* auch in den rr- und r'r'-Linien exprimiert wird. Bei einem Nachweis der Expression müssten Studien über deren Stärke und Kontrolle durchgeführt werden, ggf. auch durch die Isolierung des genomischen Klons. Mit den Ergebnissen dieser Untersuchungen sollte es möglich sein alle Fragen, die bezüglich der Modifikation des B-Rings von Flavonoiden bei *C. chinensis* noch offen sind, zu beantworten.

### **D.3 Klonierung einer putativen F3',5'H-cDNA aus *Lycianthes rantonnetii***

Bei dem Protein, das von dem „full-length“ cDNA-Klon *CYPLrpHf2* aus *L. rantonnetii* codiert wird, handelt es sich bezüglich der putativen Aminosäuresequenz um eine „typische“ F3',5'H (siehe auch C.3). Die höchste Homologie zeigt dieses Protein erwartungsgemäß zu den ebenfalls aus Solanaceen isolierten F3',5'Hs aus *S. melongena* und *P. hybrida*. Mit durchschnittlich mehr als 76 % identischen Aminosäuren bezogen auf den gesamten ORF zeigt es auch zu allen anderen F3',5'Hs eine überdurchschnittlich hohe Übereinstimmung. Auch von der Vollständigkeit des offenen Leserahmens des Enzyms kann aufgrund dessen Länge und der Lage des Startcodons ausgegangen werden.

Trotz dieser klaren Verhältnisse gelang es nicht, eine F3',5'H-Aktivität für dieses Enzym nachzuweisen. Es konnte lediglich eine F3'H-Aktivität in einem der transformierten Hefestämme beobachtet werden. Dabei wurde NAR zu ERI nur von lebenden Hefezellen umgesetzt. Bei Enzymtests mit Mikrosomen dieser und weiterer transformierter Hefestämme hingegen konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Dass bei diesem *in vivo* Enzymtest „nur“ eine F3'H-Aktivität nachgewiesen wurde, ist nicht verwunderlich, da verschiedene F3',5'Hs bei Enzymtests mit Pflanzenrohextrakten, Pflanzenmikrosomen (Stotz, 1983) und auch bei Enzymtests mit Mikrosomen aus transgenen Hefen (Tanaka et al., 1996) eine stärkere F3'H- als F3',5'H-Aktivität aufweisen.

Hinzu kommt, dass die Substratumsätze von CYP-Enzymen bei *in vivo* Tests verglichen mit Tests mit Hefemikrosomen grundsätzlich geringer ausfallen und dass die Aktivität einiger CYP-Enzyme bei diesen Tests überhaupt nicht nachgewiesen werden kann (Pompon et al., 1996). Um so erstaunlicher ist es daher, dass in den Mikrosomenfraktionen der verschiedenen Hefestämme überhaupt keine Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte, was am ehesten mit einer misslungenen Mikrosomenpräparation zu erklären wäre. Diese Möglichkeit ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da bei allen Mikrosomenpräparationen eine stark ausgeprägte CPR-Aktivität gemessen wurde, und bei einigen Transformationsansätzen sogar regelrechte Spitzenwerte auftraten (siehe C.8.1). Daher kommt auch eine fehlende oder zu gering ausgefallene CPR-Expression in den transgenen Hefen als Begründung für die fehlende Enzymaktivität nicht in Betracht.

Eine Erklärung könnte die mögliche Inkompatibilität des hefeeigenen Cyt  $b_5$  mit dem pflanzlichen CYP-Enzym sein. Seit längerem ist bekannt, dass verschiedene CYP-Enzyme Cyt  $b_5$  als wichtigen Cofaktor für ihre Enzymaktivität benötigen und dass die Homologie des hefeeigenen Cyt  $b_5$  mit pflanzlichen und tierischen Cyt  $b_{5S}$  nicht ausreicht, um effektiv mit den entsprechenden CYP-Enzymen aus diesen Organismen zusammenzuwirken (Urban et al., 1990 und 1996). Zumindest bei einigen F3',5'Hs könnte ein Cyt  $b_5$  für die volle Aktivität des Enzyms eine wichtige Rolle spielen, wie Versuche mit Mutanten von *P. hybrida*, die nicht über ein funktionstüchtiges Cyt  $b_5$  verfügten und infolge dessen eine sehr viel geringere F3',5'H-Aktivität aufwiesen, zeigten (De Vetten et al., 1999). Diese Inkompatibilität des Cyt  $b_5$  würde jedoch nicht allein die Diskrepanz zwischen den *in vivo* und den *in vitro* Enzymtests erklären.

Da der Nachweis der Enzymaktivität bei zwei Parallelansätzen aus zwei unterschiedlichen Transformationsansätzen durchgeführt wurde und die Ergebnisse der Tests reproduzierbar waren, ist eine Verwechslung der Hefekulturen oder der Transformationskonstrukte, mit denen die Hefen transformiert wurden, auszuschließen. Auch ein möglicher Substratumsatz von untransformierten Hefen konnte durch die grundsätzlich durchgeführten Kontrollversuche bei diesen und bei allen anderen Enzymtests ausgeschlossen werden.

Eine denkbare Begründung für das beobachtete Phänomen könnte eine sehr geringe Expression und/oder eine ebenfalls sehr geringe spezifische Aktivität des Enzyms sein. Da F3',5'Hs bei *in vitro* Enzymtests nur eine kurze Lebensdauer aufweisen (Stotz, 1983), könnte es sein, dass eine Verlängerung der Inkubation, bei der unter diesen Umständen eine Enzymaktivität nachweisbar wäre, nicht realisierbar ist.

Die geringe Stabilität von CYP-Enzymen bei *in vitro* Enzymtests ist zumindest z.T. auf die durch die CPR gebildeten Sauerstoffradikale und Peroxide zurückzuführen (Pompon et al., 1996). Durch die intakten Detoxifizierungssysteme in lebenden Hefezellen und die damit verbundene längere Lebensdauer des Enzyms in den *in vivo* Enzymtests könnte dagegen bei sehr langen Inkubationen eine Enzymaktivität beobachtet werden. Möglicherweise sind aber auch weitere, bislang noch unbekannte Cofaktoren, die nur in lebenden Organismen gewährleistet sind, für die Funktion dieses Enzyms von Bedeutung, oder das für die Funktion von CYP-Enzymen wichtige stöchiometrische Verhältnis aller beteiligten Komponenten ist aufgrund einer geringen Genexpression in den Mikrosomenpräparationen nicht gegeben (Urban et al., 1990 und 1996). Aufklärung über diese Fragen könnte vor allem eine Konzentrationsbestimmung der F3',5'H in den Mikrosomenfraktionen der Hefen über Kohlenmonoxyd-Differenzspektren und vergleichende Enzymtests mit Pflanzenrohextrakten und Pflanzenmikrosomen aus *L. rantonnetii* bringen.

#### **D.4 Klonierung einer F3'H-cDNA aus *Pelargonium zonale***

Die Klonierung der F3'H-cDNA *CYPPzpHt2* aus *P. zonale* erwies sich aufgrund der in den Petalen in hoher Konzentration auftretenden störenden Inhaltsstoffe als ausgesprochen schwierig. Mit herkömmlichen Methoden war es nicht möglich, ausreichende Mengen an qualitativ hochwertiger RNA zu isolieren. Durch ein modifiziertes Verfahren, welches mit Hilfe einer speziell dafür entwickelten Matrix die störenden Inhaltsstoffe absorbierte, gelang es schließlich, RNA und daraus den Klon *CYPPzpHt2* zu isolieren (siehe B.5.1.1).

Die gleichen Inhaltsstoffe, bei denen es sich hauptsächlich um polyphenolische Verbindungen (Gallotannine) handelt, werden dafür verantwortlich gemacht, dass es bislang trotz mehrfacher Versuche nicht gelang, die Aktivität einer F3'- oder einer F3',5'H in Pflanzenrohextrakten oder Mikrosomen nachzuweisen. Da in den Petalen von *P. zonale* jedoch hohe Konzentrationen an 3'- und 3',5'-hydroxylierten Anthocyanen auftreten, wurde der Versuch unternommen, durch Klonierung und Expression der entsprechenden cDNAs diese Enzyme bzw. die dazugehörigen Gene zu identifizieren (siehe C.4).

Mit der Klonierung von *CYPPzpHt2* und der heterologen Hefeexpression dieser cDNA konnte somit erstmalig die Existenz eines F3'H-codierenden Gens und des davon abgeleiteten Proteins nachgewiesen werden.

Obwohl bei der Klonierungsstrategie zunächst das Ziel verfolgt wurde eine F3',5'H zu isolieren, ist die Klonierung einer F3'H als ein größerer Erfolg zu werten, da im Gegensatz zu den 5'-hydroxylierten Flavonoiden das Auftreten von 3'-hydroxylierten Flavonoiden nicht zwingend die Existenz einer F3'H voraussetzt (siehe A.1.2).

Dass bei der Expression der als CYP75B8 klassifizierten (Dr. D. Nelson persönliche Mitteilung) F3'H *CYPPzpHt2* der ORF versehentlich um 33 AS verlängert wurde, stellt sich im Nachhinein zumindest zum Teil als ein glücklicher Umstand heraus, da er die Aufreinigung und die Konzentration des Enzyms ermöglicht (siehe C.8.4). Um jeden eventuellen Einfluss, den die Verlängerung des Proteins auf die Enzymaktivität haben könnte, auszuschließen, muss die Expression jedoch mit dem tatsächlichen ORF des Enzyms wiederholt werden.

## D.5 Ableitung einer Proteinkonsensussequenz für die F3'H und für die F3',5'H

Um die strukturellen Eigenschaften der F3'Hs und der F3',5'Hs mit deren funktionellen Eigenschaften zu korrelieren, wurde durch die entsprechenden Proteinalignments eine Protein-Konsensussequenz für jedes der beide Enzyme ermittelt. Darüber hinaus wurde eine gemeinsame Konsensussequenz für beide Enzyme durch ein Alignment mit allen bislang bekannten F3'- und F3',5'Hs bestimmt. Das für die Erstellung der Alignments verwendete Programm ClustalW (Thompson et al., 1994) berücksichtigte dabei neben identischen Aminosäuren (= Aminosäuren, die an einer bestimmten Position im Alignment bei allen Sequenzen gleich sind), auch konservierte und halbkonservierte Aminosäuren bei der Darstellung der Konsensussequenz. Als Bewertungskriterium wurde die Proteinvergleichsmatrix PAM250 zugrundegelegt (siehe D.6). Die einzelnen Alignments und eine Übersicht der verwendeten Sequenzen sind im Anhang G.4 und G.5 dargestellt.

Durch die Erstellung der Konsensussequenzen sollten in erster Linie F3'H- und F3',5'H-spezifische Proteinstrukturen lokalisiert werden. Außerdem sollten bei den beiden funktionell eng verwandten Enzymen durch die Ermittlung gleicher bzw. unterschiedlicher Sequenzabschnitte möglicherweise die Proteinstrukturen identifiziert werden, die für die Hydroxylierung der Substrate an der 3'- und an der 5'-Position verantwortlich sind.

Dabei spielte die Sequenz der F3',5'H *CYPCcpHt1* eine wichtige Rolle. Diese F3',5'H, welche aufgrund ihrer Struktur in die CYP-Unterfamilie der F3'Hs (CYP75B) eingruppiert wurde, könnte aufgrund geringfügiger Abweichungen ihrer Aminosäuresequenz gegenüber den übrigen Sequenzen innerhalb dieser Unterfamilie, bei gleichzeitiger Homologie zu F3',5'H-Sequenzen der CYP75A-Unterfamilie, den oder die Sequenzbereiche offenbaren, die für die Hydroxylierung an der 5'-Position verantwortlich sind.

Zur Ermittlung einer F3'H-Konsensussequenz wurde ein Proteinalignment mit den vier in dieser Arbeit klonierten F3'H-cDNA-Sequenzen (inkl. *CYPCcpHt1*, s.o.) und den zwei bislang veröffentlichten Sequenzen aus *P. hybrida* (Brugliera et al., 1999) und *A. thaliana* (Schoenbohm et al., 2000) angefertigt. Für die Erstellung einer F3'H-Konsensussequenz wurden 9 bereits veröffentlichte F3',5'H (siehe G.5) und die F3',5'H-Sequenz *CYPLrpHf1* aus *L. rantonnetii* verwendet.

Die mit durchschnittlich 68 % identischen Aminosäuren (siehe C.7) sehr große Homologie der F3'H-Sequenzen spiegelt sich entsprechend in der Konsensussequenz dieser Proteine wider. Bereits nach ca. 40 Aminosäureresten „downstream“ beginnt der erste stark konservierte Bereich, bei dem es sich um die prolinreiche Region handelt. Neben dieser für pflanzliche CYP-Enzyme typischen Region, lassen sich auch die 4 Domänen, die insbesondere für pflanzliche CYP-Enzyme der A-Gruppe charakteristisch sind, leicht lokalisieren (siehe A.3.1). Die als Hämbindungsregion identifizierte Domäne D ist bei allen Sequenzen 100 %ig konserviert (siehe G.4.1).

Außer diesen Regionen fällt ein weiterer hoch konservierter 22 AS umfassender Bereich auf (Abb. 37). Dieser Bereich (Anfang zwischen Aminosäureposition 108-118) beginnt bei allen F3'H- und auch bei den F3',5'H-Sequenzen mit den Aminosäuren Alanin und Tyrosin (AY).

## A)

<b>F3',5'H <i>Callistephus chinensis</i></b>	109-AYNYQDMVFAPYGPQWTMFRKI-130
F3'H <i>Callistephus chinensis</i>	108-AYNYQDLVFAPYGPRWRMLRKI-129
F3'H <i>Petunia hybrida</i> Ht1	110-AYNYQDLVFAPYGPRWRMLRKI-131
F3'H <i>Pelargonium zonale</i>	110-AYNYHDLVFAPYGPRWRLFRKI-131
F3'H <i>Arabidopsis thaliana</i>	110-AYNYQDLVFAPYGHRWRLRKI-131
F3'H <i>Matthiola incana</i>	109-AYNYQDLVFAPYQQRWRMLRKI-130

\*\*\*\*:\*:\*\*\*\*\* :\* :\*\*\*\*

## B)

F3',5'H <i>Eustoma russellianum</i>	114-AYNAQDMVFADYGPRWKLRLK-135
F3',5'H <i>Eustoma grandiflorum</i>	114-AYNAQDMVFADYGPRWKLRLK-135
F3',5'H <i>Gentiana triflora</i>	118-AYNAQDMVFAHYGPKWKLRLK-139
F3',5'H <i>Catharanthus roseus</i>	115-AYNAQDMVFAHYGPKWKLRLK-136
F3',5'H <i>Petunia hybrida</i> Hf1	110-AYNAQDMVFAHYGPRWKLRLK-131
F3',5'H <i>Petunia hybrida</i> Hf2	110-AYGAQDMVFAHYGPRWKLRLK-131
F3',5'H <i>Lycianthes rantonnetii</i>	114-AYDAQDMVFAHYGPRWKLRLK-135
F3',5'H <i>Solanum melongena</i>	113-AYNAQDMVFAPYGPRWKLRLK-134
F3',5'H <i>Campanula medium</i>	115-AYNAQDMVFAEYGPKWKLRLK-136

\*\* .\*\*\*\*\* \*\* :\*\*\*\*\*

## C)

F3',5'H <i>Eustoma russellianum</i>	114-AYNAQDMVFADYGPRWKLRLK-135
F3',5'H <i>Eustoma grandiflorum</i>	114-AYNAQDMVFADYGPRWKLRLK-135
F3',5'H <i>Gentiana triflora</i>	118-AYNAQDMVFAHYGPKWKLRLK-139
F3',5'H <i>Catharanthus roseus</i>	115-AYNAQDMVFAHYGPKWKLRLK-136
F3',5'H <i>Petunia hybrida</i> Hf1	110-AYNAQDMVFAHYGPRWKLRLK-131
F3',5'H <i>Petunia hybrida</i> Hf2	110-AYGAQDMVFAHYGPRWKLRLK-131
F3',5'H <i>Solanum melongena</i>	113-AYNAQDMVFAHYGPRWKLRLK-134
F3',5'H <i>Lycianthes rantonnetii</i>	114-AYDAQDMVFAHYGPRWKLRLK-135
F3',5'H <i>Campanula medium</i>	115-AYNAQDMVFAEYGPKWKLRLK-136
F3'H <i>Arabidopsis thaliana</i>	110-AYNYQDLVFAPYGHRWRLRKI-131
F3'H <i>Matthiola incana</i>	109-AYNYQDLVFAPYQQRWRMLRKI-130
F3'H <i>Pelargonium zonale</i>	110-AYNYHDLVFAPYGPRWRLFRKI-131
<b>F3',5'H <i>Callistephus chinensis</i></b>	<b>109-AYNYQDMVFAPYGPQWTMFRKI-130</b>
F3'H <i>Callistephus chinensis</i>	108-AYNYQDLVFAPYGPRWRMLRKI-129
F3'H <i>Petunia hybrida</i> Ht1	110-AYNYQDLVFAPYGPRWRMLRKI-131

\*\* . :\*:\*\*\* \*\* :\* :\*\*\*\*

**Abb. 37:** Proteinalignment einer 22 AS umfassenden Region, die möglicherweise mit der 5'-Hydroxylierung in Zusammenhang steht. \* = identische AS; : = konservierte AS; ` = halbkonservierte AS (siehe auch weitere Erläuterungen im Text).

Bei den F3'H-Sequenzen ist die Homologie dieses Abschnitts mit 68,2 % identischen Aminosäuren geringfügig größer als die durchschnittliche Übereinstimmung der vollständigen Sequenzen (siehe C.7). Auffällig ist, dass sich die Sequenz von CYP CcpHt1 aus *C. chinensis* in diesem Bereich überdurchschnittlich stark von den übrigen F3'H-Sequenzen unterscheidet (Abb. 37 A).

Auf 3 der 22 Positionen weicht nur die Sequenz von CYP CcpHt1 von der Konsensussequenz ab, die ohne Berücksichtigung dieses Enzyms mit 81,8 % identischen Aminosäuren bei den übrigen 5 F3'H-Sequenzen eine wesentlich höhere Übereinstimmung aufweisen würde. Innerhalb der F3',5'H-Sequenzen ist der 22 AS große Abschnitt mit 86,4 % identischen AS sogar noch stärker konserviert (Abb. 37 B).

Mit 50 % identischen AS der Konsensussequenz aller 15 F3'H- und F3',5'H-Sequenzen zeigt der Bereich darüber hinaus eine größere Homologie als die durchschnittliche Übereinstimmung einer F3'H mit einer F3',5'H (46,7 %), was jedoch verglichen mit den großen Homologien innerhalb der beiden Unterfamilien sehr gering erscheint.

Bei der genaueren Betrachtung der 3 Substitutionen bei CYP CcpHt1 in diesem Bereich fällt auf, dass die erste Substitution, bei der anstelle eines Leucins (L) ein Methionin (M) auftritt, genau der Konsensussequenz der F3',5'H-Sequenzen an dieser Position entspricht (Abb. 37 C). An der Position der zweiten Substitution, bei der anstatt eines Arginins (R) ein Glutamin (Q) vorkommt, sind auch die F3',5'H-Sequenzen nicht identisch, sondern nur konserviert (s.o.). Die dritte Substitution, bei der anstelle eines Arginins (R) ein Threonin (T) auftritt, stimmt auch mit den F3',5'H-Konsensussequenzen nicht überein, wo an dieser Position ein Lysin (K) auftritt.

Zusammenfassend sprechen drei eng mit einander in Beziehung stehende Umstände dafür, dass es sich bei diesem stark konservierten Proteinabschnitt um die oder eine Proteinstruktur handeln könnte, die für die Hydroxylierung der Flavonoide an der 5'-Position verantwortlich ist. Erstens ist diese Region sowohl bei den F3'H- als auch bei den F3',5'H überdurchschnittlich stark konserviert. Zweitens weicht die CYP CcpHt1-Sequenz innerhalb dieses Bereichs auffallend stark von den übrigen F3'H-Sequenzen ab und drittens zeigt die CYP CcpHt1-Sequenz, verglichen mit den anderen F3'H-Sequenzen, die größte Übereinstimmung mit der F3',5'H-Konsensussequenz in diesem Bereich. Kein anderer konservierter Sequenzbereich von CYP CcpHt1 zeigt gegenüber den Konsensussequenzen der F3'Hs und der F3',5'Hs ähnliche Beziehungen.

Bei den F3',5'Hs, die eine durchschnittliche Homologie von 74,6 % identischen Aminosäuren aufweisen, lassen sich die prolinreiche Region und die vier Proteindomänen (A-D) ebenso leicht lokalisieren wie bei den F3'Hs (siehe G.4.2). Darüber hinaus wurden jedoch keine größeren Bereiche innerhalb der Konsensussequenz gefunden, die nur für die F3',5'Hs und nicht für die F3'Hs charakteristisch wären.

Innerhalb des gemeinsamen Alignments aller F3'- und F3',5'Hs zeigt, neben den bereits erwähnten, nur ein weiterer Abschnitt eine besonders große Übereinstimmung aller Sequenzen (siehe G.4.3). Dieser Abschnitt mit der Konsensussequenz [-KALLL-] liegt unmittelbar vor der ebenfalls stark konservierten putativen Sauerstoffbindungsregion (Domäne A). Vor diesem Abschnitt erstreckt sich ein Bereich, der auffallend gering konserviert ist. Neben der 100 %ig konservierten Hämbindungsregion (Domäne D) sind die beiden benachbarten Proteinbereiche die am stärksten konservierten Regionen innerhalb der F3'H/F3',5'H-Konsensussequenz. Aufgrund der unmittelbaren Nachbarschaft zur putativen Sauerstoffbindungsregion handelt es sich bei dem [-KALLL-]-Motiv möglicherweise um die Substratbindungsstelle der F3'- und der F3',5'Hs. Außer diesem konnte kein weiterer größerer konservierter Bereich, der für F3'Hs und F3',5'Hs charakteristisch wäre, gefunden werden.



### D.5.1 Prolinreiche Region der isolierten CYP-Enzyme und 5'-RACE

Neben funktionellen Aspekten, ist die Protein - bzw. die davon hergeleitete cDNA-Struktur der isolierten CYP-Enzyme auch für den Umgang der CYP-cDNA-Fragmente bezüglich des 5'-RACE-Verfahrens von großer Bedeutung. Da bei den verschiedenen Verfahren zur Klonierung von CYP-cDNAs nur selten „full-length“ Klone isoliert werden, besteht die Notwendigkeit die fehlenden 3'- und 5'-Enden durch geeignete Techniken zu generieren. Die dafür am häufigsten verwendeten Verfahren sind die sogenannten RACE-Techniken (siehe B.5.8).

Während das 3'-RACE zur Erzeugung fehlender 3'-Enden eine sehr einfache und effiziente Methode darstellt, kann es bei den herkömmlichen 5'-RACE zur Erzeugung fehlender 5'-Enden zu zahlreichen Komplikationen kommen, die auf die mRNA- bzw. cDNA-Strukturen zurückzuführen sind und die dazu führen, dass nur unvollständige 5'-Enden erzeugt werden. Dabei spielen vor allem die Sekundärstruktur der mRNA und der G:C-Gehalt der cDNA, insbesondere an den 5'-Enden, eine wesentliche Rolle.

Bei 5 der insgesamt 6 in dieser Arbeit beschriebenen „full-length“ cDNAs wurden unterschiedliche 5'-RACE-Verfahren zur Erzeugung der fehlenden 5'-Enden eingesetzt. Dabei konnte das fehlende 5'-Ende mit den herkömmlichen 5'-RACE- mit A- und C-Tailing (siehe B.5.8.1) nur in einem einzigen Fall nach großem Arbeitsaufwand isoliert werden (siehe C.1.3). Bei den übrigen cDNAs wurde nach zahlreichen Fehlversuchen, die mit z.T. sehr aufwendiger mRNA-Isolation verbunden waren, die Isolierung der fehlenden 5'-Enden zunächst zurückgestellt.

Da sich aus den gleichen mRNA-Präparationen mit den herkömmlichen 5'-RACE müheelos 5'-Enden von Nicht-CYP-cDNAs isolieren ließen, mussten die Fehlversuche im Zusammenhang mit der cDNA-Struktur der pflanzlichen CYP-cDNAs stehen.

Dabei kam grundsätzlich nur die prolinreiche Region der isolierten CYP-Enzyme in Frage, die bei allen Sequenzen stark ausgeprägt ist (siehe D.5). Diese Region ist besonders G:C reich, da Prolin durch die 4 möglichen CCX Codons codiert wird. Dass sich diese G:C reiche Region insbesondere beim 5'-RACE mit C-Tailing negativ auswirkte, kann daraus geschlossen werden, dass viele unvollständige 5'-Enden gerade bis in diese, ca. 100 Basen-

paare vom ATG-Startcodon entfernte, Region reichten. Dieses wiederholt aufgetretene Phänomen lässt sich mit der Fehlpaarung des G reichen 5'-RACE-Primers erklären, der anstatt an den *C-Tail* zu binden, sich innerhalb der prolinreichen Region anlagert. Um dieses Problem zu umgehen, wurde das 5'-RACE mit *A-Tailing* verwendet, welches jedoch aufgrund seiner geringen Effizienz keine echte Alternative darstellte (siehe B.5.8.1).

Der Einsatz des neuen RLM-RACE-Verfahrens bestätigte die zuvor angestellten Vermutungen (siehe 5.8.2). Mit dieser Methode konnten auf Anhieb die vollständigen 5'-Enden bei den restlichen 4 cDNAs erzeugt werden.

Dabei wurden ausnahmslos mRNA-Präparationen verwendet, mit denen zuvor durch die herkömmlichen Verfahren keine Isolierung der 5'-Enden gelungen war. Durch das RLM-RACE, welches im Gegensatz zu den anderen Methoden hauptsächlich auf RNA-Ebene arbeitet, konnten nicht nur im ersten Versuch die 5'-Enden isoliert werden, sondern das Verfahren lieferte bei allen Ansätzen derart eindeutige Resultate, dass die sonst häufig notwendigen Aufreinigungen der Ansätze vollkommen überflüssig wurden. Zudem stellt das RLM-RACE das einzige RACE-Verfahren dar, welches die vollständige Isolierung des gesamten *Leader*-Bereiches bis zur 7-Methylguanosingruppe gewährleistet. Zur Isolierung fehlender 5'-Enden von pflanzlichen *CYP*-cDNAs, cDNAs mit hohem G:C-Gehalt oder bei besonderem Interesse an dem vollständigen *Leader*-Bereich der cDNA stellt das RLM-RACE somit ein nahezu konkurrenzloses Verfahren dar, welches in seiner Effizienz bislang von keiner anderen Methode erreicht wird.

## D.6 Phylogenetische Verwandtschaft der F3'H und der F3',5'H

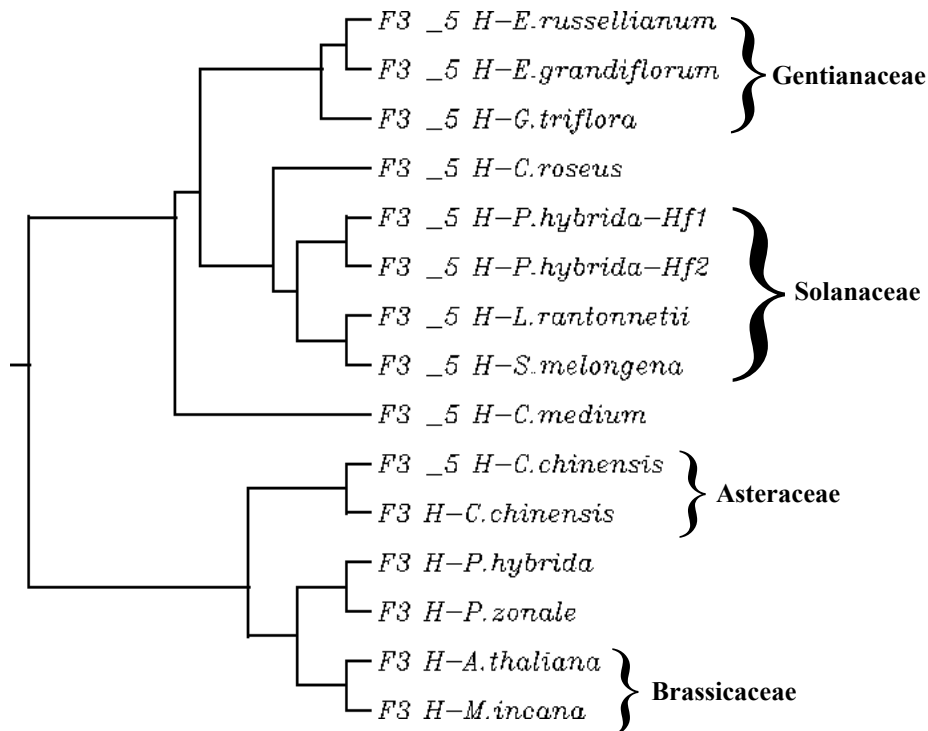
Zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums der F3'Hs und der F3',5'Hs wurden zunächst Proteinalignments durchgeführt. Dabei ist die Wahl der verwendeten Proteinvergleichsmatrix von großer Bedeutung. Die am weitesten verbreiteten Vergleichsmatrizen sind die Identitäts-Matrix, die PAM-Matrix (**P**ercent **A**ccepted **M**utation **M**atrix) und die Blosum-Matrix (**B**locks **S**ubstitution **M**atrix). Die einfachste, jedoch am wenigsten aussagekräftige ist die Identitäts-Matrix. Hier werden alle identischen Aminosäuren mit 1 und alle nicht identischen Aminosäuren mit 0 gewertet.

Bei der PAM-Matrix (Dayhoff et al., 1978; Gonnet et al., 1992) wurde die Häufigkeit bestimmter Aminosäureaustausche bei verwandten Proteinen untersucht. Dabei wurden die Aminosäuresequenzen verwandter Proteine zugrundegelegt, die über eine Homologie von mindestens 85 % identischen Aminosäuren verfügen. Zwei Aminosäuren, die sich im Laufe der Evolution der Proteine besonders häufig gegenseitig ersetzen, bekommen dabei einen besonders hohen Ähnlichkeitsgrad zugewiesen, während solche, die stark konserviert waren einen hohen Selbstähnlichkeitsgrad und niedrigen Ähnlichkeitsgrad mit anderen Aminosäuren zugewiesen bekamen. Um größere evolutionäre Distanzen zu erhalten, wird die Matrix mit einem konstanten Faktor multipliziert, z.B. PAM 250 = PAM1 \*250.

Bei der Erstellung der Blosum-Matrix (Henikoff und Henikoff, 1992) wurden ca. 2000 hoch konservierte Aminosäuremuster aus über 500 Gruppen verwandter Proteine zugrundegelegt. Innerhalb dieser als „blocks“ bezeichneten Muster wird die Wahrscheinlichkeit eines Aminosäureaustauschs in jeder einzelnen Position ermittelt. Dabei repräsentieren häufig auftretende Aminosäuresubstitutionen einen höheren Verwandtschaftsgrad zwischen den Aminosäuren als seltene Substitutionen in stark konservierten Bereichen. In der am häufigsten verwendeten Blosum62-Matrix wurden Sequenzen mit mindestens 62 % identischen Aminosäuren zu einer Proteinfamilie zusammengefasst und die Häufigkeit der Aminosäuresubstitutionen innerhalb eines „blocks“ ermittelt. Aus dem Durchschnitt dieser Werte wurde schließlich die Proteinvergleichsmatrix Blosum62 erstellt.

Aus den bei dem Proteinalignment unter Verwendung der jeweiligen Proteinvergleichsmatrix erhaltenen evolutionären Distanzdaten der paarweise miteinander verglichenen Aminosäuresequenzen, wurde anschließend mit Hilfe der am weitesten verbreiteten „Neighbor-joining Method“ von Saitou und Nei (Saitou und Nei, 1987) ein phylogenetischer Stammbaum der F3'Hs und der F3',5'Hs berechnet.

Dabei zeigten die Stammbäume, die unter Verwendung der Blosum62-Matrix und der PAM250-Matrix erstellt wurden, den gleichen Aufbau (Abb. 37).



**Abb. 37:** Phylogenetischer Stammbaum der bekannten F3',5'Hs. Der Stammbaum wurde mit Hilfe der Proteinvergleichsmatrix Blosum62 (Henikoff und Henikoff, 1992) und der „Neighbor-Joining“ Methode erstellt (Saitou und Nei, 1987). Die aufgeführten Sequenzen werden mit Referenzen im Anhang G.5 beschrieben.

Die in Abbildung 37 dargestellten phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse der bekannten F3'H- und F3',5'H-Sequenzen entsprechen weitgehend den Verwandtschaftsverhältnissen der untersuchten Pflanzen. Alle F3',5'H-Sequenzen, die aus Pflanzen der Familien der Solanaceae, der Gentianaceae oder der Brassicaceae isoliert wurden, zeigen untereinander einen hohen Verwandtschaftsgrad. Lediglich die Zuordnung der F3',5'H aus *C. chinensis* zu den F3'H-Sequenzen ist äußerst auffällig. Dieses Enzym, welches aufgrund seiner Aminosäuresequenz eigentlich zu den F3'Hs zu zählen ist, zeigt jedoch zu allen anderen F3',5'Hs einen höheren Verwandtschaftsgrad als jede andere F3'H (siehe D.2). Gleichzeitig zeigt das Enzym gegenüber den übrigen F3',5'Hs die größte Homologie zu der F3',5'H aus *C. medium*, welches seinerseits den übrigen F3'Hs phylogenetisch näher steht als jede von den F3',5'Hs, die über eine „typische“ F3',5'H-Aminosäuresequenz verfügen. Innerhalb dieser „typischen“ F3',5'Hs zeigt die F3',5'H aus *C. medium* wiederum den geringsten Verwandtschaftsgrad zu allen anderen Sequenzen.

Auf der anderen Seite zeigt die F3',5'H aus *C. chinensis* mit ihrer F3'H-„typischen“ Sequenz innerhalb der „typischen“ F3'Hs die geringste Verwandtschaft zu allen anderen Sequenzen. Diese Verwandtschaftsverhältnisse lassen den Schluss zu, dass sich die F3',5'H und die F3'H aus einem gemeinsamen Vorläuferenzym heraus entwickelt haben. Die Verhältnisse der F3',5'H aus *C. medium* und aus *C. chinensis* legen nahe, dass es sich bei diesem Vorläuferprotein ursprünglich um eine F3'H gehandelt hat, deren schrittweise Mutation zu der Entstehung der F3',5'H geführt hat. In diesem Sinne stellt die F3',5'H aus *C. chinensis* ein Bindeglied zwischen den F3'Hs und den F3',5'Hs dar, welche zwar aufgrund seiner Aminosäuresequenz zu den F3'Hs zu zählen ist, jedoch bereits über eine, wenn auch schwach ausgeprägte, F3',5'H-Aktivität verfügt. Möglicherweise wurden Mutationen, die zu der Entstehung der F3',5'Hs geführt haben, durch die Coevolution von Blütenbestäubern, die sich auf blaue bzw. bläuliche Blütenfarben spezialisiert haben, begünstigt.

## D.7 Ausblick

Mit der Klonierung der F3'- und F3',5'-cDNAs und der Charakterisierung der davon abgeleiteten Proteine konnten bei zwei der untersuchten Pflanzen bislang noch unerklärte Phänomene bezüglich der B-Ring Hydroxylierung aufgeklärt werden. Dennoch wurden z.T. neue Fragen aufgeworfen, zu deren Aufklärung weitere Untersuchungen notwendig sind. Während die Verhältnisse bei *M. incana* und *P. zonale* bezüglich der 3'-Hydroxylierung weitgehend aufgeklärt werden konnten (siehe D.1 und D.4), bleibt die Frage ob die Hydroxylierung des B-Rings bei *C. chinensis* durch ein einziges oder durch zwei verschiedene Gene kontrolliert wird, noch offen (siehe D.2). Darüber hinaus müssen die auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinenden Resultate der heterologen Hefeexpression des cDNA-Klons *CYPLrpHfl* aus *L. rantonnetii* erneut überprüft werden (siehe D.3).

Neben diesen im Vordergrund stehenden Untersuchungen sind weitere Enzymtests zur Charakterisierung der isolierten Enzyme geplant, in denen insbesondere der Umsatz von Flavonen und Flavonolen getestet werden soll. Außerdem könnte durch den Austausch einzelner Proteindomänen die Substratspezifität der Enzyme näher untersucht werden. Dabei wäre u.a. die Konstruktion eines hybriden Enzyms denkbar, bei der durch den Austausch einer oder mehrerer Domänen eine F3'H in eine F3',5'H überführt werden könnte, bzw. umgekehrt eine F3',5'H die Fähigkeit verlieren würde, 5'-Hydroxylierungen vorzunehmen.

Die Möglichkeiten, die bislang verifizierten cDNA-Klone zu nutzen, sind vielfältig. Bereits seit längerem werden die heterolog in Hefe exprimierten Klone am Lehrstuhl für die Substratsynthese, v.a. von Eriodictyol und Dihydroquercetin, verwendet. Viele weitere Flavonoide wie z.B. das pharmakologisch sehr interessante Flavonol Quercetin lassen sich mit Hilfe der F3'H oder F3',5'H leicht herstellen. Zusammen mit anderen Flavonoidbiosyntheseegenen könnten darüber hinaus zahlreiche in der Natur selten vorkommende Flavonoide wie z.B. das 3',4',5'-hydroxylierte Flavon Tricetin biotechnologisch erzeugt werden und diese Flavonoide dadurch erstmalig in ausreichender Menge und Qualität für medizinische Studien verfügbar gemacht werden. Auch für die Lebensmittelindustrie könnte die biotechnologische Produktion verschiedener Flavonoide in Zukunft von großer Bedeutung sein. Bei zahlreichen Multivitaminpräparaten und anderen „Gesundheitselixieren“ wird seit langem mit dem Zusatz von sogenannten „Bioflavonoiden“ geworben, denen z.T. nicht zu unrecht gesundheitsfördernde Eigenschaften zugeschrieben werden (siehe A.1.1).

Dieses positive Image von Flavonoiden wirkt sich u.a. auch bei den wirtschaftlich bedeutsamen Lebensmittel- und Arzneimittelfarbstoffen aus. Während bei vielen Farbstoffen erwiesen ist, dass sie Lebensmittelallergien auslösen können und viele davon unter dem Verdacht stehen, die Bildung verschiedener Krebsarten und anderer Erkrankungen zu begünstigen, gelten die stark gefärbten Anthocyane allgemein als harmlos. Gemäß der Richtlinie 94/36/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30. Juni 1994 über Farbstoffe, die in Lebensmitteln verwendet werden dürfen, ist im Gegensatz zu vielen synthetischen Farbstoffen, die Zugabe der als E 163 deklarierten Anthocyane bei zahlreichen Lebensmitteln wie z.B. verschiedene Käse- und Essigsorten ohne Mengenbeschränkung bis zum „Quantum satis“ (Sättigung) erlaubt. Vor dem Hintergrund zahlreicher Lebensmittelskandale und dem zunehmenden Trend zu „Bio“-Lebensmitteln könnte die biotechnologische Produktion der bislang aus Weintrauben-, Holunderschalen, Rotkohl, etc. extrahierten Anthocyane zunehmend an Bedeutung gewinnen. Dabei könnte durch den kombinierten Einsatz der F3'- und der F3',5'H mit anderen Flavonoidbiosyntheseenzymen im Gegensatz zu den bisherigen Verfahren die gezielte Herstellung einzelner reiner Anthocyane ermöglicht werden.

Eine weitere wichtige Nutzung der F3'- und der F3',5'H stellt die Transformation wichtiger Zierpflanzen mit den entsprechenden Genen dieser Enzyme dar. Zahlreiche Zierpflanzen mit großer wirtschaftlicher Bedeutung (z.B. Rosen, Chrysanthemen, Gerbera) sind natürlicherweise nicht in der Lage den blauen Blütenfarbstoff Delphinidin zu bilden. Durch die Transformation dieser Arten mit einer F3',5'H-cDNA sollte es möglich sein, blaublühende Linien zu erzeugen. Durch die Transformation von Nelken mit einem F3',5'H-Gen aus *P. hybrida* gelang es der australischen Firma Florigene bereits 1996 die blaublühende Nelkenlinie „Moondust“ und 1998 die Linie "Moonshadow" auf den australischen Markt zu bringen. In Europa konnten die 1998 auf dem europäischen Markt zugelassenen Sorten so gut wie nicht verkauft werden, was einerseits mit der weit verbreiteten Abneigung der Bevölkerung gegenüber genmanipulierten Organismen und andererseits mit der nur wenig überzeugenden blassen Färbung der Linien erklärt werden kann. Es kann dennoch davon ausgegangen werden, dass intensiver blau gefärbte Transformanten wie z.B. eine blaue Rose sich auch in Europa gut vermarkten ließen.

Durch die Transformation einiger bedeutender Zierpflanzen bzw. Hochleistungssorten (z.B. Tulpen-, Hyazinthen-, Rosen-, Gerbera- und Pelargonienarten) mit einem F3'H-Gen könnten ebenfalls völlig neue und interessante Blütenfarben erzeugt werden. Dabei könnte mit Hilfe der „Antisense-Technik“ bzw. der „Co-Suppression“ die Synthese von Cyanidin-derivaten vollständig unterdrückt werden, um so reine Pg- bzw. Dp-Typen zu erzeugen, die bei diesen Linien natürlicherweise nicht vorkommen.

Neben diesen sind viele weitere Beeinflussungen der Blütenfarbe von Zierpflanzen mit F3' und F3',5'H-Genen denkbar. Es sollte jedoch dabei nicht unerwähnt bleiben, dass neben der Beeinflussung der Blütenfarbe auch weitere positive Effekte mit der Manipulation des Flavonoidbiosynthesewegs verbunden sein können. So zeigte der erste 1990 in der Bundesrepublik Deutschland durchgeführte Freilandversuch mit gentechnisch veränderten Pflanzen, bei dem eine weißblühende DFR-Mutante von *P. hybrida* mit einem DFR-Gen aus Mais transformiert wurde, dass die lachsfarbene transgene Petunie gegenüber verschiedenen Pilzerkrankungen weniger anfällig war als die weißblühende Mutante (Saedler et al., 1993). Damit scheinen sich frühere Untersuchungen zu bestätigen, dass Anthocyane bzw. deren Zwischenprodukte eine wichtige Schutzfunktion gegen Krankheitserreger und Schädlinge haben können. Solche Abwehrmechanismen könnten bei Zierpflanzen durch gezielte Genübertragung eingehend untersucht und die daraus gewonnenen Erkenntnisse anschließend ggf. auf Nutzpflanzen übertragen werden.



## E. Zusammenfassung

Flavonoide sind eine wichtige Klasse sekundärer Pflanzenstoffe, die in allen höheren Pflanzen vorkommen. Bis heute sind mehr als 6400 verschiedene Verbindungen bekannt. Anthocyane, farbige Flavonoide, stellen die wichtigsten Blütenfarbstoffe dar. Sie verleihen Blüten eine rosa, rote, malvenfarbige und blaue Färbung und locken Bestäuber an. Darüber hinaus besitzen Anthocyane, wie alle anderen Flavonoide, zahlreiche wichtige Eigenschaften für Pflanzen, wie z.B. der Schutz vor UV-B-Strahlung und Pflanzenschädlingen. Die am weitesten verbreiteten Anthocyane sind durch das Hydroxylierungsmuster des B-Ringes des Flavonoidgrundgerüsts charakterisiert. Die Hydroxylierung des B-Ringes wird durch die Aktivität der zwei Cytochrom P450-Enzyme Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H) und Flavonoid 3',5'-Hydroxylase (F3',5'H) kontrolliert. Ohne die Aktivität eines dieser Enzyme wird hauptsächlich das 4'-hydroxylierte Anthocyan Pelargonidin gebildet, welches für viele rosa und orange Blütenfarben verantwortlich ist. Die Aktivität der F3'H führt vorwiegend zu der Bildung von Cyanidin (3',4'-hydroxyliert) und die Aktivität der F3',5'H vorwiegend zu der Bildung von Delphinidin (3',4',5'-hydroxyliert). Cyanidin verleiht Blüten rote und malvenfarbige Farben, Delphinidin ist das vorherrschende Pigment in vielen blauen Blüten.

Ziel dieser Arbeit war es die F3'H und die F3',5'H durch die Klonierung der entsprechenden cDNA-Klone aus verschiedenen Pflanzen zu isolieren und durch heterologe Expression in Hefe zu charakterisieren. Zu diesem Zweck stand sowohl chemogenetisch definiertes als auch nicht definiertes Pflanzenmaterial zur Verfügung.

Aus chemogenetisch definierten Linien von *Matthiola incana* konnte durch differentielle PCR ein komplementärer cDNA-Klon der F3'H, die vom Genlocus B kontrolliert wird, isoliert werden. In Enzymtests setzte das als CYP75B7 klassifizierte Enzym das 4'-hydroxylierte Naringenin (NAR) zu 3',4'-hydroxyliertem Eriodictyol (ERI) und das 4'-hydroxylierte Dihydrokaempferol (DHK) zu 3',4'-hydroxyliertem Dihydroquercetin (DHQ) um. Es konnte darüber hinaus durch Northernblot-Analyse eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei den homozygot rezessiven *Matthiola*-Linien (*bb*) ohne F3'H-Aktivität um Transkriptions-Mutanten handelt.

Zwei F3'H codierende cDNA-Sequenzen wurden aus einer cDNA-Genbank von *Calistephus chinensis* mit Hilfe einer F3'H cDNA-Sonde aus *Arabidopsis thaliana* isoliert. Bei der heterologen Expression des Klons *CYPCcppHt1* zeigte das entsprechende Protein eine eindeutige F3',5'H-Aktivität, obwohl es aufgrund seiner Aminosäuresequenz nicht zu der Unterfamilie der F3',5'Hs CYP75A sondern in die Unterfamilie der F3'Hs CYP75B gehört. In den durchgeführten Enzymtests war das als CYP75B5 klassifizierte Enzym in der Lage NAR und DHK sowohl in 3'-Position als auch in 5'-Position zu hydroxylieren. Somit ist dies der erste Bericht über die Isolierung eines Enzyms mit einer F3'H spezifischen Aminosäuresequenz, das über eine F3',5'H-Aktivität verfügt.

Bei der heterologen Expression des zweiten cDNA-Klons *CYPCcpHt2* konnte bislang keine spezifische Enzymaktivität des codierten Enzyms, welches als CYP75B6 klassifiziert wurde, beobachtet werden.

Eine weitere F3'H konnte aus *Pelargonium zonale* isoliert werden. Dabei wurde mit einem CYP-spezifischen Primer, der von der Hämbindungs-Region bekannter F3',5'H Sequenzen abgeleitet wurde, ein entsprechendes cDNA-Fragment durch PCR amplifiziert. Mit Hilfe des neuen RLM-RACE-Verfahrens konnte ein vollständiger cDNA-Klon generiert werden, der anschließend heterolog in Hefe exprimiert wurde. Sowohl in *in vivo* Enzymtests mit lebenden Hefezellen (Bioconversion) als auch in *in vitro* Enzymtests mit Hefemikrosomen setzte das als CYP75B8 klassifizierte Enzym NAR zu ERI und DHK zu DHQ um.

Da die F3'H in Pflanzenextrakten von *P. zonale* aufgrund interferierender Inhaltsstoffe bisher nicht nachgewiesen werden konnte, ist dies der erste Nachweis der Existenz einer F3'H und des entsprechenden Gens in *P. zonale*.

Durch den Einsatz des CYP-spezifischen Primers konnte außerdem ein F3',5'H-spezifisches cDNA-Fragment aus *Lycianthes rantonnetii* kloniert werden. Nach einem RLM-RACE wurde der offene Leserahmen des vollständigen Klons in Hefe exprimiert. Dabei zeigte das als CYP75A9 klassifizierte Enzym nur in den *in vivo* Enzymtests mit lebenden Hefen eine Enzymaktivität, aber nicht in Enzymtests mit Hefemikrosomen. Außerdem offenbarte das Enzym nur eine F3'H-Aktivität aber keine F3',5'H-Aktivität, so dass bislang nicht feststeht, ob es sich um eine F3'H oder um eine F3',5'H handelt.

Durch die Klonierung und Charakterisierung der F3'H und der F3',5'H können viele neue und interessante Blütenfarben bei wirtschaftlich bedeutenden Zierpflanzen erzeugt werden. Darüber hinaus ermöglichen sie zusammen mit anderen Enzymen aus dem Flavonoidbiosyntheseweg die biotechnologische Produktion einer Vielzahl von verschiedenen Flavonoiden, die dadurch in ausreichender Menge und Reinheit der medizinischen Forschung und der Nahrungsmittelindustrie zur Verfügung gestellt werden können.

## E. Summary

Flavonoids are an important class of secondary metabolites present in all higher plants. Up to today more than 6400 different compounds are known. Anthocyanins, coloured flavonoids, represent the major pigments in flowers. They confer pink, red, mauve and blue to flowers and attract pollinators. Furthermore, Anthocyanins possess like all the other flavonoids various important properties for plants, such as protection against UV-B radiation and pests. The most prevalent Anthocyanins are characterized by the hydroxylation pattern of the B-ring of the basic flavonoid skeleton. The hydroxylation of the B-Ring is controlled by the activities of the two cytochrome P450 enzymes flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) and flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3',5'H). Without the activity of one of these enzymes the 4'-hydroxylated Anthocyanin Pelargonidin is mainly generated which is responsible for many pink and orange flower colours. The activity of the F3'H predominantly leads to the production of the Cyanidin (3',4'-hydroxylated) and the activity of the F3',5'H predominantly leads to the production of delphinidin (3',4',5'-hydroxylated). Cyanidin gives flowers red and mauve colours, delphinidin is the main pigment in many blue flowers.

The aim of this thesis was to isolate the F3'H and the F3',5'H by cloning of the corresponding genes from several plants and to characterize them by means of heterologous expression in yeast. For that purpose both chemogenetic defined and none defined plant material have been available.

From chemogenetically defined lines of *Matthiola incana* a complementary cDNA clone of the F3'H that is controlled by the genetic locus *B* was isolated by means of differential PCR. In enzyme tests the enzyme classified as CYP75B7 converted the 4'-hydroxylated Naringenin (NAR) to 3',4'-hydroxylated Eriodictyol (ERI) and the 4'-hydroxylated Dihydrokaempferol (DHK) to 3',4'-hydroxylated Dihydroquercetin (DHQ). It could also clearly be shown through Northern blot analysis that the recessive lines of *Matthiola* (*bb*) without F3'H activity are transcription mutants.

Two F3'H coding cDNA sequences were isolated from a cDNA library of *Callistephus chinensis* by using a F3'H cDNA labelled probe of *Arabidopsis thaliana*. During the heterologous expression of the clone *CYPCcpHt1* the corresponding protein showed a definite F3',5'H activity even though it does not belong due to its amino acid sequence to the sub-

family of the F3',5'Hs CYP75A but to the subfamily of the F3'Hs CYP75B. In the enzyme tests carried out the enzyme classified as CYP75B5 was able to hydroxylate NAR and DHK in the 3'-position as well as in the 5'-position. Thus, this is the first report on an isolation of an enzyme with a F3'H specific amino acid sequence which has a F3',5'H activity.

Up to now the heterologous expression of the second clone *CYPCcpHt2* has revealed no specific activity of the encoded enzyme which was classified as CYP75B6 .

Another F3'H was isolated from *Pelargonium zonale*. For that purpose a corresponding fragment was amplified by PCR with a *CYP*-specific primer which derived from the heme-binding region of known F3',5'H sequences. By using the new RLM method a full-length cDNA clone could be generated and heterologous expressed in yeast afterwards. *In vivo* enzyme tests (bioconversion) as well as *in vitro* enzyme tests showed the conversion of NAR to ERI and DHK to DHQ catalysed by the enzyme classified as CYP75B8. Since a F3'H activity could never be demonstrated in plant extracts of *P. zonale* due to interfering compounds this is the first evidence of the existence of a F3'H and of the corresponding gene in *P. zonale*.

By using the same *CYP*-specific Primer a cDNA fragment from *Lycianthes rantonnetii* was also cloned by PCR. After a RLM-RACE the open reading frame of the full-length clone was expressed in yeast. The enzyme classified as CYP75A9 showed only a enzyme activity in the *in vivo* enzyme tests with living yeast, but not in enzyme tests with yeast microsomes. Additionally, the enzyme revealed only a F3'H activity, but no F3',5'H activity, so it is not certain at the moment whether this enzyme is a F3'H or a F3',5'H.

Because of the cloning and characterization of the F3'H and the F3', 5'H many new and interesting flower colours can be created in economically important ornamental plants. Moreover, together with other enzymes of the flavonoid biosynthetic pathway they enable the biotechnological production of a multiplicity of different flavonoids, which can thereby be made available in sufficient quantity and purity for medical research and food industry.

## F. Literatur

- Ahn, K., Szczesna-Skorupa, E. and Kemper B.** (1993) The amino-terminal 29 amino acids of cytochrome P450 2C1 are sufficient for retention in the endoplasmatic reticulum. *J. Biol. Chem.* **268**: 18726-18733.
- Akashi, T., Aoki, T., Takahashi, T., Kameya, N., Nakamura, I., 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.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J.** (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Asen, S., Stuart, N. W., and Cox, E. L.** (1963) Sepal Color of *Hydrangea macrophylla* as Influenced by the Source of Nitrogen Available to Plants. *Proc. Amer. Soc. of Hort. Sci.* **82**: 504-507.
- Aviv, H., Leder, P.** (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proceedings of the National Academic of Science, USA*, **69**: 1408-1412
- Bässler, K.-H., Grün, D. L. und Pietrzik, K.** (1992) *Vitamin-Lexikon*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart: 297-306.
- Beggs, C. J., Schneider-Ziebert, U. and Wellmann, E.** (1986) UV-B radiatio and adaptive mechanisms in plants. In: *Stratospheric Ozone Reduction, Solar Ultraviolet Radiation and Plant Life*. Hrsg. R. C. Worrest und M.M. Caldwell. NATO ASI Series, Vol. G 8. Springer Verlag, Berlin, p. 235-250.
- Beneveniste, I., Gabriac, B. and Durst, F.** (1986) Purification and characterisation of the NADPH-cytochrome P-450 (cytochrome c) reductase from higher-plant microsomal fraction. *Biochem. J.* **235**: 365-373.
- Beneveniste, I., Lesot, A., Hasenfratz, M. P., Kochs, G., Durst, F.** (1991) Multiple forms of NADPH-cytochrome P450 reductase in higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**: 105-112.
- Benthásáth, A., Rusznyák, St., and Szent-Györgyi, A.** (1937) Vitamin P. *Nature* **139**: 326-327.
- Benton, W. D., Davis, R.W.** (1977) Screening  $\lambda$ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* **196**: 180-182.

- Bertram, S. und Gassen, H. G.** (1991) Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Hrsg. Sabine Bertram und Hans Günter Gassen. Gustav Fischer Verlag Stuttgart-Jena-New York 1991.
- Birch A. J. and Donovan F. W.** (1953) Studies in relation to biosynthesis. I. Some possible routes to derivatives of orcinol and phloroglucicol. *Aust. J. Chem.* **6**: 360.
- Bloor, S. J.** (1999) Novel pigments and copigmentation in the blue marguerite daisy. *Phytochemistry-Oxford* **50**: 1395-1999.
- Bohm, B.** (1994) The minor flavonoids. In: *The Flavonoids: Advances in research since 1986*, ed. J. B. Harborne, Chapman & Hall, London: 387-440.
- Bohm, B.** (1998) Introduction To Flavonoids. In: *Chemistry and Biochemistry of Organic Natural Products*. Hrsg. B. Ravindranath, Harward Academic Publishers.
- Böhm, H., Boeing, H., Hempel, J., Raab, B. und Kroke, A.** (1998) Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien in der Nahrung und ihre möglichen Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen. *Z. Ernährungswiss.* **37**: 147-163.
- Bolwell, G. P., Bozak, K. and 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 protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Britsch, L., Rhunau-Brich, B and Forkmann, G.** (1992) Molecular cloning, sequence analysis and *in vitro* expression of flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase from *Petunia hybrida*. *J. Biol. Chem.* **267**: 5380-5387.
- Brouillard, R. und Dangels, O.** (1992) : Polyphenol interactions: The copigmentation case: Thermodynamic data from temperature variation and relaxation kinetics: Medium effect. *Canadian Journal of Chemistry* **70**: 2174-2189.
- Brouillard, R. und Dangels, O.** (1994) Flavonoids and flower colour. In: *The Flavonoids: Advances in research since 1986*, ed. J. B. Harborne, Chapman & Hall, London: 565-588.
- Brouillard, R., Mazza, G., Saad, Z., Albrecht-Gary, A. M. and Cheminat A.** (1989) The copigmentation reaction of anthocyanins: A microprobe for the structural study of aqueous solutions. *Journal of the American Society* **111**: 2604-2610.
- Brouzeix, M.** (1993) Influence des proanthocyanidols du raisin et du vin sur la santé. In : *Polyphenolic Phenomena*. Hrsg. A. Scalbert. INRA Editions, France: 187-197.
- Brugliera, F., Barri-Rewell, G., Holton, T.A. and 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.

- Bruschi, L., Copeland, E. L. und Clifford, M. N.** (1999) Unexpected hyperchromic interactions during the chromatography of theaflavins and simple flavonoids. *Food Chemistry* **67**: 143-146.
- Burbulis, I. E., Iacobucci, M., and Shirley, B. W.** (1996) A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect the male sterility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8**: 1013-1025.
- Caldwell, M. M., Robberecht, R., and Flint, S. D.** (1983) Internal filters: Prospects for UV-acclimation in higher plants. *Physiol. Plantarum* **58**: 445-450.
- Cholerton, S., Daly, A. K., and Idle, J. R.** (1992) The role of individual human cytochromes P450 in drug metabolism and clinical response. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**: 434-439.
- Chopra M., Fitzsimons P. E., Strain J. J., Thurnham, D. I. and Howard A. N.** (2000) Nonalcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting plasma antioxidant and carotenoid concentrations. *Clin. Chem.* **46**: 1162-1170.
- Cody, M. M.** (1984) Substances without vitamin status. In: *Handbook of vitamins*. Dekker, New York, p. 582.
- Constant J.** (1997) Alcohol, ischemic heart disease, and the French paradox. *Coron. Artery Dis.* **8**: 645-649.
- Criqui M. H. and Ringel, B. L.** (1994) Does diet or alcohol explain the French paradox. *Lancet* **344**: 1719-1723.
- Daff, S. N., Chapman, S. K., Turner K. L., Holt, R. A., Govindaraj S, Poulos, T. L., Munro, A. W.** (1997) Redox control of the catalytic cycle of flavocytochrome P-450 BM3. *Biochemistry* **36**: 13816-13823.
- Darling, D. C., Brickell, P.M.** (1996) *Nucleinsäure-Blotting*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg 1996.
- Davies, A. J. and Mazza, G.** (1993) Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**: 716-720.
- Dayhoff, M. O., Schwartz, R. M., and Orcutt, B. C.** (1978) A model of evolutionary change in proteins. matrices for detecting distant relationships In M. O. Dayhoff, (ed.), *Atlas of protein sequence and structure*, Vol. **5**: 345-358 National biomedical research foundation Washington DC.
- De Vetten, N., Ter Horst, J., Van Schaik, H.-P., De Boer, A., Mol, J. and Koes, R.** (1999) A cytochrome *b5* is required for full activity of the flavonoid 3',5'-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 778-783.



- De-Eknamkul, W., Tanahashi, T. and Zenk, M. H.** (1992) Enzymic 10-hydroxylation and 10-O-Methylation of dihydrosanguarine in dihydrochelirubine formation by *Eschscholtzia*. *Phytochemistry* **31**: 2713-2717.
- Dolphin, D.** (1985) Cytochrome P450: substrate and prosthetic group free radicals generated during the enzymatic cycle. *Philos. Trans. R. Soc. London* **B 311**: 579-591.
- Donaldson, R. P. and Luster, G. L.** (1991) Multiple forms of plant cytochromes P-450. *Plant Physiology* **96**: 669-674.
- Dong, J-Z. and D.I. Dunstan** (1996) A reliable method for extractions of RNA from various conifer tissues. *Plant Cell Reports* **15**: 516-519.
- Dooner, H. K., Robbins, P. and Jorgensen, R. A.** (1991) Genetic and developmental control of Anthocyanin Biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* **25**: 173-199.
- Durst, F.** (1991) Biochemistry and Physiology of Plant Cytochrome P-450. In: *Frontiers in Biotransformation, Vol. 4. Microbial and Plant Cytochromes P-450: Biochemical Characteristics, Genetic Engineering and Practical Implications.* Hrsg. K. Ruckpaul und H. Rein. Akademie Verlag, Berlin: 191-240.
- Durst, F. and Nelson, D. R.** (1995) Diversity and evolution of plant P450 and P450-reductases. *Drug Metabolism and Drug Interactions* **12**: 189-206.
- Durst, F., 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 Publishing House, England: 171-187.
- Duthie S. J. and Dobson V. L.** (1999) Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidativ attack in vitro. *Eur. J. Nutr.* **38**: 28-34.
- Elstner, E. F.** (1996) Die Sauerstoffaktivierung als Basis pflanzlicher Stressreaktionen. In: *Stress bei Pflanzen.* Hrsg. Ch. Brunhold, A. Rügsegger, R. Brändle, UTB für Wissenschaft: 347-362.
- Enoch, H. G., Strittmatter, P.,** (1979) Cytochrome b5 reduction by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.* **254**: 8976-8981.
- Feinberg, A. P., Vogelstein, B.** (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* **132**: 6-13.
- Forkmann, G.** (1977) Anthcyan pigments in *Callistepus chinensis*. *Phytochem.* **16**: 299-301.
- Forkmann, G.** (1980) The B-ring hydroxylation pattern of the intermediates of anthcyanin synthesis in pelargonidin- and cyanidin-producing lines of *Matthiola incana*. *Planta* **148**: 157-161.

- 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. *Opinion in Biotechnology* **4**: 159-165.
- Forkmann, G. und Heller, W.** (1999) Biosynthesis of Flavonoids. In: *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Vol. 1, ed. Ushio Sankawa. Elsevier, Amsterdam, p. 714-748.
- Formica, J. V. and Regelson W.** (1995) Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* **33**: 1061-1080.
- Frank, M. R., Deyneka, J. M. and Schuler. M. A.** (1996) Cloning of wound-induced cytochrome P450 monooxygenases expressed in Pea. *Plant Physiol.* **110**: 1035-1046.
- Frear, D. S.** (1995) Wheat microsomal cytochrome P450 monooxygenases: characterization and importance in the metabolic detoxification and selectivity of wheat herbicides. *Drug Metabolism and Drug Interactions* **12**: 329-357.
- Frear, D. S., Swanson, H. R. and Tanaka, F. S.** (1969) N-demethylation of substituted 3-(phenyl) 1-methyl-ureas: isolation and characterization of microsomal mixed function oxidase from cotton. *Phytochem.* **8**: 2157-2169.
- Fritsch, H. and Grisebach** (1975) Biosynthesis of Cyanidin in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Phytochem.* **14**: 2437-2442.
- Frohmann, M. A.** (1993) Rapid Amplification of Complementary DNA Ends for Generation of Full-Length Complementary DNAs: Thermal RACE. *Methods in Ezymology* **218**:340-356.
- Frohmann, M. A., Dush M. K. und Martin, G.R.** (1988) Rapid produktion of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Science USA* **85**: 8998-9002.
- Garfinkel, D.** (1958) Studies on pig liver microsomes. I. enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. of Biochem. and Biophys.* **77**: 493-509.
- Gietz, D., Jean, A. S., Woods, R. A., and Schiestl, R. H.** (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells . *Nuc. Acids Res.* **20**: 1425.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, R. H., and Woods, R. A.** (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG Procedure. *Yeast* **11**: 355-360.
- Giniger, E., Barnum, S.M., and Ptashne, M.** (1985) Specific DNA Binding of GAL4, a Positiv Regulatory Protein of Yeast. *Cell* **40**: 767-774.

- Giuliano, G., Bartley, G.E. und Scolnik P.A.** (1993) Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *The Plant Cell* **5**: 379-387.
- Gonnet, G. H., Cohen, M. A., and Benner, S. A.** 1992 Exhaustive matching of the entire protein sequence database. *Science* **256**: 1443-1445.
- Gonzalez, F. J.** (1994) Regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450. In: Assessment of the use of single cytochrome P450 enzymes in drug research. Hrsg. M. R. Watermann und M. Hildebrand. Springer Verlag, Berlin: 21-42.
- Gonzalez, F. J.** (1998) The study of xenobiotic-metabolizing enzymes and their role in toxicity in vivo using targeted gene disruption. *Toxicol. Lett.* **102-103**: 161-166.
- Goto, T. and Kondo, T.** (1991) Structure and molecular stacking of anthocyanins: Flower color variation. *Angewandte Chemie International Edition* **30**: 17-33.
- Govindaraj, S. and Poulus, T. L.** (1997) The Domain Architecture of Cytochrome P450BM-3. *J. Biol. Chem.* **272**: 7915-7921.
- Green A. E. S.** (1983) The penetration of ultraviolet radiation to the ground. *Physiol. Plantarum* **58**: 351-359.
- Grisebach, H.** (1962) Die Biosynthese der Flavonoide. *Planta Medica* **10**: 385-397.
- Grisebach, H.** (1968) Recent investigations on the biosynthesis of flavonoids. In: Recent advances in phytochemistry. Vol. 1, ed. T. J. Mabry, R. E. Alston and V. C. Runeckles. Appleton-Century-Crofts, New York, p. 379-406.
- Groves, J. T. and Han, Yuan-Zhang** (1995) Models and mechanisms of cytochrome P450 action. In: Cytochrome P450-Structure, Mechanism and Biochemistry. Hrsg. P. R. Ortiz de Montellano. 2nd Edition, Plenum Press, New York: 3-48.
- Guengerich, F. P.** (1990) Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**: 97-153.
- Hagmann, M.L., Heller, W. and Grisebach, H.** (1983) Induction and characterization of a microsomal flavonoid 3'-hydroxylase from parsley cell cultures. *Eur. J. Biochem.* **134**: 547-554.
- Halkier, B. A.** (1997) Catalytic reactivities and structure/function relationships of cytochrome P450 enzymes. *Phytochem.* **43**: 1-21.
- Hallahan, D. L. and West, J. M.** (1995) Cytochrome P-450 in plant/insect interactions: Geraniol-10-hydroxylase and the biosynthesis of iridoid monoterpenoids. *Drug Metabolism and Drug Interactions* **12**: 369-382.
- Harborne, J. B.** (1976) Function of Flavonoids in Plants. In: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Hrsg. T. W. Goodwin, Academic Press, New York: 736-778.

- Harborne, J. B. and Grayer, R. J.** (1994) Flavonoids and Insects. In: *The Flavonoids: Advances in research since 1986*, ed. J. B. Harborne, Chapman & Hall, London: 589-618.
- Harborne, J. B. and Williams, C.A.** (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem.* **55**(2000): 481-504.
- Hasemann, C. A., Kurumbail, R. G., Boddupalli, S.S., Peterson, J.A., Deisenhofer, J.** (1995) Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* **3**:41-62.
- Heller, W. and Forkmann G.** (1994) Biosynthesis of flavonoids. In: *The Flavonoids: Advances in research since 1986*, ed. J. B. Harborne, Chapman & Hall, London: 499-536.
- Heller, W., Britsch, L., Forkmann G., and Grisenbach, H.** (1985a) Leucoanthocyanidines as intermediates in anthocyanidinbiosynthesis in flowers of *Matthiola incana* R.Br. . *Planta* **163**:191-193.
- Heller, W., Forkmann G., Britsch, L.** (1985b) Enzymatic reduction of (+)dihydroflavonols to flavan-3,4,-cis-diols with flower extracts from *Matthiola incana* and its role in anthocyan biosynthesis. *Planta* **165**: 284-287.
- Hemleben, V.** (1981) Anthocyan carrying structures in specific Genotypes of *Matthiola incana*. *Z. Naturforsch.* **36c**: 925-927.
- Henikoff, Steven and Jorga G. Henikoff** (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**(109): 15-19.
- Hess, D.** (1968): *Biochemische Genetik*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg
- Hodgson, E., Rose, R. L., Goh, D. K., Rock, G. C. and Roe, R. M.** (1993) Insect cytochrome P450: metabolism and resistance to insecticides. *Biochem. Soc. Trans.* **21**: 1060-1065.
- 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. Cornish E. C.** (1993) Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature* **366**: 276-279.
- Holton, T.A. and Lester, D.R.** (1996). Cloning of novel cytochrome P450 gene sequences via PCR amplification. *Methods in Enzymology* **272**: 275-283.
- Horecker, B.L.** (1950) Triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver. *J. Biol. Chem.* **183**: 593-605.
- Iyanagi, T, Mason, H. S.** (1973) Some properties of hepatic reduced nicotinamide adenine dinucleotid phosphate-cytochrome c reductase. *Biochem.* **12**:2297-3008.

- Kaltenbach, M., Schroeder, G., Schmelzer, E. Lutz, V. and Schroeder, J.** (1999) Flavonoid hydroxylase from *Catharanthus roseus*: cDNA, heterologous expression, enzyme properties and cell type specific expression in plants. *Plant J.* **19**: 183-193.
- Kammerer, L., De-Eknamkul, W. and Zenk, M. H.** (1994) Enzymic 12-hydroxylation and 12-O-methylation of dihydrochelirubine in dihydromacarpine formation by *Thalictrum bulgaricum*. *Phytochemistry* **36**: 1406-1416.
- Kappert, H.** (1949) Die Genetik des incana-Charakters und der Anthcyanbildung bei der Levkoje. *Züchter* **19**: 289-297.
- Kato, H., Kodama, O., and Akatsuka, T.** (1994) Characterization of an Inducible P450 Hydroxylase involved in the Rice Diterpene Phytoalexin Biosynthetic Pathway. *Arch. of Biochem. and Biophys.* **316**: 707-712.
- Kato, K. -I., Gonçalves, J. M., Houts, G. E., and Bollum, F. J.** (1967) Deoxynucleotide-polymerizing enzymes of calf thymus gland. II. Properties of the terminal deoxynucleotidyltransferase. *J. Biol. Chem.* **22**: 2780-2789.
- Klingenberg, M.** (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch. of Biochem. and Biophys.* **75**: 376-86.
- Koukol, J. and E. E. Conn** (1961) The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J. Biol. Chem.* **236**: 2692.
- Kutchan, T.** (1995) Alkaloid biosynthesis – the basis for metabolic engineering of medical plants. *Plant Cell* **7**: 1059-1070.
- Lahann, H., Purucker, H.** (1974) Bioflavonoide, “Vitamin P”. In: Fermente, Hormone, Vitamine. Hrsg. R. Ammon und W. Dirscherl. Thieme Verlag Stuttgart: 962-983.
- Larcher, W.** (1995) Ökophysiologie der Pflanzen. 5. Aufl., Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co, Stuttgart: 264-322.
- Lathe, R. and Lecocq J. P.** (1977). Overproduction of viral protein during infection of a *lyc* mutant of *E. coli* with *imm434*. *Virology* **83**: 204-206.
- Le Marchand, L., Murphy, S. P., Hankin, J. K., Wilkens, L. R. and Kolonel L. N.** (2000) Intake of flavonoids and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**: 154-160.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M.** (1993) Principles of Biochemistry. Second Edition. Worth Publishers, New York, USA.
- Lewis. D. F. V.** (1996) *Cytochromes P450: Sturcture, Function and Mechanism*. Taylor and Francis, London.
- Li, J., Ou-Lee, T.-M., Raba, R., Amundson, R.G., Last. R.L.** (1993) *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* **5**: 171-179.

- Liang, P. and Pardee, A.** (1992) Differential Display of eukaryotic messenger RNAs by means of polymerase chain reaction. *Science* **276**: 2054-2057.
- Lindberg, R.L.P., Negishi, M.** (1989) Alternation of mouse P450<sub>coh</sub> substrate specificity by mutation of a single aminoacid residue. *Nature* **39**: 632-634.
- Lisitsyn, N., Lisitsyn, N. and Wigler, M.** (1993) Cloning the differences between two complex genomes. *Science* **259**: 946-951:
- Livingstone, D. R.** (1998) The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. A* **120**, 43-49.
- Lock, E. A., Reed, C. J.** (1998) Xenobiotic metabolizing enzymes of the kidney. *Toxicol. Pathol.* **26**: 18-25.
- Lois, R.** (1994) Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana* L. I. Mechanisms of UV-resistance in *Arabidopsis*. *Planta* **194**: 498-503.
- Lois, R. and Buchanan, B. B.** (1994) Severe sensitivity to ultraviolet radiation in an *Arabidopsis* mutant deficient in flavonoid accumulation. II. Mechanisms of UV-resistance in *Arabidopsis*. *Planta* **194**: 498-503.
- Lu, A. Y., Coon M. J.** (1968) Role of hemoprotein P-450 in fatty acid omega-hydroxylation in a soluble enzyme sytem from liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **237**: 2652-2660.
- Lu, A. Y., Junk, K. W., Coon M. J.** (1969) Resolution of the cytchrome P-450-containing omega hydroxylation system of liver microsomes. *J. Biol. chem.* **244**: 37143721.
- Lupien, S., Karp, F., Ponnampereuma, K., Wildung, M., Croteau, R.** (1995) Cytochrome P450 limonene hydroxylases of *Mentha* species. *Drug Metabolism and Drug Interactions* **12**: 245-260.
- Mansuy, D.** (1998) The great diversity of reactions catalyzed by chytochromes P450. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **121**: 5-14.
- Markham, K. R., Franke, A., Given D. R. and Brownsey, P.** (1990) In: 15<sup>th</sup> Symp. Groupe Polyphénols, Sraßbourg, France, p. 230.
- Martens, S. und Forkmann, G.** (1999) Cloning and expression of Flavone Synthase II from *Gerbera* Hybrids. *The Plant Journal* **20** (5): 611-618.
- Meijer, A.H., Souer, E., Verpoorte, R., Hoge, J.H.C.** (1993) Isolation of cytochrome P450 cDNA clones from the higher plant *Catharanthus roseus* by a PCR strategy. *Plant Mol. Biol.* **22**: 379-383.

- Menting, J.G.T., Scopes, R.K. and Stevenson T.W.** (1994) Characterization of a flavonoid 3',5'-hydroxylase in microsomal membrane fraction of *Petunia hybrida* flowers. *Plant Physiol.* **106**: 633-642.
- Meyer, K., Cusomano J. C., Somerville, C. Chapple, C. C. S.** (1996) Ferulate 5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6869-6874.
- Meyer, P., Heidmann, I., Forkmann, G. and Saedler, H.** (1987) A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* **330**: 677-678.
- Meyer, P., Heidmann, I., Meyer zu Altenschildesche, H. und Saedler, H.** (1991) Stabilität der Genexpression in transgenen Petunien. *BioEngineering* **4**: 18-22.
- Middleton, E. and 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*, ed. J. B. Harborne, Chapman & Hall, London: 619-652.
- 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.
- Murphy, P. J. and West, C. A.** (1969) The role of mixed function oxidases in kaurene metabolism. *Arch. of Biochem. and Biophys.* **133**: 395-407.
- Murray, N. E.** (1993): Phage Lambda and molecular cloning. In: Hendrix et al. : *Lambda II*. Cold spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York: 395-432.
- Nadler, S. G., Strobel, H. W.** (1988) Role of electrostatic interactions in the reaction of NADPH-cytochrome P-450 reductase with cytochromes P-450. *Arch. Biochem. Biophys.* **261**: 418-429.
- Nadler, S. G., Strobel, H. W.** (1991) Identification and characterization of an NADPH-cytochrome P450 reductase derived peptide involved in binding to cytochrome P450. *Arch. Biochem. Biophys.* **290**: 277-284.
- Nasreen, A., Rueffer, M., Zenk, M. H.** (1996) Cytochrome P-450-dependent formation of isoandrocybine from autumnaline in colchicine biosynthesis. *Tetrahedron Letters* **37**: 8161-8164.
- Nebert, D. W. and Nelson, D. R.** (1991) P450 Gene Nomenclature Based on Evolution. *Meth. in Enzymol.* **206**: 3-11.
- Nelson, D. R.** (1999) Cytochrome P450 and the individuality of species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **369**: 1-10.

- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I.C. and Nebert, D. W.** (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**: 1-42.
- Newton, C. R. und Graham, A.** (1994) PCR. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg 1994.
- Nielsen, K.M. and Podivinsky E.** (1997) cDNA cloning and endogenous expression of a flavonoid 3'5'-Hydroxylase from petals of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). *Plant Science* **129**: 167-174.
- Nisimoto, Y.** (1986) Localization of cytochrome c-binding domain on NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.* **261**:14232-14239.
- Omura, T., Sato, R.** (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: II. Solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.* **239**: 2370-2385.
- Oprian, D. D., Coon, M. J.** (1982) Oxidation-reduction states of FMN and FAD in NADP-cytochrome P-450 reductase during reducing by NADPH. *J. Biol. Chem.* **257**: 8935-8944.
- Ortiz de Montellano, P.R.,** Hrsg. (1995) Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry. 2nd Ed., Plenum Press, New York.
- Oswald, N.** (2000) Chemische und enzymologische Untersuchungen zum Flavonoidbiosyntheseweg bei *Zantedeschia*. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, TU-München.
- Page, R. D. M.** (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**: 357-358.
- 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.
- Porter, T. D., Kasper, C. B.** (1986) NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase: flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide domains evolved from different flavoproteins. *Biochemistry* **25**:1682-1687.
- Robberecht, R.** (1989) Environmental photobiology. In: *The Science of Photobiologie*. Hrsg. K. C. Smith, Plenum Press, New York: 135-154.
- Robinson, R.** (1936) The formation of anthocyanin in plants. *Nature* **137**: 172.
- Rogders, E. H. and Grant M. H.** (1998) The effect of the flavonoids, quercetin, myricetin and epicatechin of the growth and enzyme activities of MCF7 human breast cancer cells. *Chem. Biol. Interact.* **116**: 213-228.



- Roshchina, V. V. and Roshchina, V. D.** (1993) Excretory function of higher plants. Springer Verlag, Berlin.
- Rüegsegger, A.** (1996) UV-B-Strahlung. In: Stress bei Pflanzen. Hrsg. Ch. Brunhold, A. Rüegsegger, R. Brändle, UTB für Wissenschaft: 103-118.
- Saedler, H., Gieffers, W. und Meyer, P.** (1993) Design of horizontal disease resistance in petunia by transferring the A1 gene of maize. Vorträge Pflanzenzüchtung, Heft **25**: 228-241.
- Saitou, N. and Nei, M.** (1987) The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.*: **4**(4):406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> ed. Cold spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Schacter B. A., Nelson, E. B., Marver, H. S., Masters, B. S.** (1972) Immunochemical evidence for an association of heme oxygenase with the microsomal electron transport system. *J. Biol. Chem.* **247**: 3601-3607.
- Scherer, G., Telford, J., Baldari, C. and Pirotta, V.** (1981) Isolation of cloned genes differentially expressed at early and late stages of *Drosophila* embryonic development. *Dev. Biol.* **86**: 438-447.
- Schiestl, R. H. and Gietz, R. D.** (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acid as a carrier. *Curr. Genet.* **16**: 339-346.
- Schoenbohm, C., Martens, S., Eder, C., Forkmann, G., and Weisshaar, B.** (2000) Identification of the *Arabidopsis thaliana* Flavonoid 3'-Hydroxylase Gene and Functional Expression of the Encoded P450 Enzyme. *Biol. Chem.* **381**: 749-753.
- Schuler, M. A.** (1996) Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Critical Reviews of Plant Science* **15**: 235-284.
- Schwarz-Sommer, Zs.** (1990) *Deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: The protein shows homology to transcription factors. *EMBO J.* **9**: 2007-2013.
- Schweizer, P. und Métraux, J. P.** (1996) Pilz-, Bakterien- und Virusbefall. In: Stress bei Pflanzen. Hrsg. Ch. Brunhold, A. Rüegsegger, R. Brändle, UTB für Wissenschaft, p. 325-343.
- Schwinn K. E.** (1994) Novel flavonoid 3'-Hydroxylase activity in *Petunia*. Abstracts of the XVIIth international conference of the Groupe Polyphénols. Palma de Mallorca.

- Schwinn, K. E., Davies, K. M., Deroles S. C., Markham, K. R., Miller, R. M., Bradley, J. M., Manson, D. G. and Given, N K.** (1997) Expression of an *Antirrhinum majus* UDP-glucose:flavonoid-3-O-glucosyltransferase transgene alters flavonoid glycosylation and acylation in *lisianthus* (*Eustoma grandiflorum* Grise.). *Plant Science* **125**: 53-61.
- Seitz, C.** (2000) Blütenfarben bei *Osteospermum* und Möglichkeiten der züchterischen Beeinflussung. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, TU-München.
- Seyffert, W.** (1960) Über die Wirkung von Blütenfarbgenen bei der Levkoje, *Matthiola incana*. R. Br. . Z. Pflanzenzücht. **44**: 4-29.
- Seyffert, W.** (1962) Genetische Untersuchungen an *Matthiola incana*. I. Genlokalisierung bei Kopplung mit einem Letalfaktor und Interaktion mit einem frei spaltenden Gen. *Biol. Zbl.* **81**: 253-266.
- Seyffert, W.** (1971) Simulation of quantitative characters by genes with biochemically definable action. II. The material. *Theor. Appl. Genet.* **41**: 285-291.
- Seyffert, W.** (1982) Beiträge zur Genetik und Enzymologie der Flavonoide. *Biol. Zbl.* **101**: 465-483.
- Sherman, F.** (1991) Getting started with Yeast. *Methods in Enzymology* **194**: 3-21.
- Shimada, Y., Nakano-Shimada, R., Ohbayashi, M., Okinaka, Y., Kiyokawa, S. and Kikuchi, Y.** (1999) Expression of chimeric P450 genes encoding flavonoid-3',5'-hydroxylase in transgenic tobacco and petunia plants. *FEBS Lett.* **461**(3): 241-245.
- Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F. und Bresinsky, A.** (1991) Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Begründet von E. Strasburger, F. Noll, H. Schenck und A. F. W. Schimper. 33. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Sligar, S. G., Gelb, M. H. and Heimbrook, D. C.** (1984) Bioorganic chemistry and cytochrome P450-dependent catalysis. *Xenobiotica* **14**: 63-86.
- Sommer, H., Beltran, J.-P., Huijser, P., Pape, H., Lönning, W.-E., Saedler, H. and Schwarz-Sommer, Zs.** (1990) *Deficiens*, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: The protein shows homology to transcription factors. *EMBO J.* **9**: 605-613.
- Song, W.-C., Funk, C. D. and Brash, A. R.** (1993) Molecular cloning of an allene oxide synthase: A cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Proc. Natl. Acad. Science USA* **96**: 1750-1755.
- Spribille, R. und Forkmann, G.** (1984) Conversion of dihydroflavonols to flavonols with enzyme extract of flower buds from *Matthiola incana*. *Z. f. Naturforsch.* **36c**: 737-741.

- Stadler, R. and Zenk, M. H.** (1993) The purification and characterization of a unique cytochrome P-450 enzyme from *Berberis stolonifera* plant cell cultures. *J. Biol. Chem.* **268**: 823-831.
- Stich, K., Ebermann, R., Forkmann, G.** (1988) Einfluss Ctochrom P-450-spezifischer Inhibitoren auf die Aktivität von Flavonoid 3'-Hydroxylase und Flavonsynthese II bei verschiedenen Pflanzen. *Phyton (Austria)* **28**: 237-247.
- Stotz, G** (1983) Enzymologie und Genetik der Oxidationsreaktionen in der Flavonoid-Biosynthese höherer Pflanzen. Dissertation 1983, Universität Tübingen, Lehrstuhl für Genetik.
- Stotz, G. und Forkmann, G.** (1982) Hydroxylation of the B-ring in the 3'- and 5'-position with enzyme extracts from flowers of *Verbena hybrida*. *Z. Naturforsch.* **36c**: 19-23.
- Strack, D. and Wray, V.** (1994) The anthocyanins. In *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986.* (J.B. Harborne, ed.). Chapman and Hall.
- Strobel, H. W., Geng, J., Kawashima H. and Wang, H.** (1997) Cytochrome P450-dependent biotransformation of drugs and other xenobiotic substrates in neural tissue. *Drug Metab. Rev.* **29**: 1079-1105.
- Szczesna-Skorupa, E., Ahn, K., Chen, C. D., Doray, B., Kemper, B.** (1995) The Cytoplasmic and N-terminal Transmembrane Domains of Cytochrome P450 Contain Independent Signals for Retention in the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* **270**: 24327-24333.
- Takeda, K., Kubota, R., and Yagioka, C.** (1985) Copigments in the blueing of Sepal colour of *Hydrangea macrophylla*. *Phytochem.* **24**: 1207-1209.
- Takeda, K., Tomoko, Y., Takahashi, A. and Timberlake, C.F.** (1990) Stable blue complexes of Anthocyanin-3-p-Coumaroyl- or 3-Caffeoyl-Quinic Acid involved in the Blueing of *Hydrangea* Flower. *Phytochemistry* **29**: 1089-1091.
- Tamburini, P. P., Schenkman J. B.** (1986) Differences in the mechanism of functional interaction between NADPH-cytochrome P-450 reductase and its redox partners. *Mol. Pharmacol.* **30**: 178-185.
- Tanaka, Y., Yonekura, K., Fukuchi-Mizutani, M., Fukui, Y., Fujiwara, H., Ashikari, T. and Kusumi, T.** (1996) Molecular and Biochemical Characterization of Three Anthocyanin Synthetic Enzymes from *Gentiana triflora*. *Plant Cell Physiol.* **37**(5): 711-716.
- Teramuara, A. H.** (1986) Interaction between UV-B radiation and other stresses in plants. In: *Stratospheric Ozone Reduction, Solar Ultraviolet Radiation and Plant Life.* Hrsg. R. C. Worrest und M.M. Caldwell. NATO ASI Series, Vol. G 8. Springer Verlag, Berlin, p. 327-343.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994)** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Thompson, W. R., Meinwald, J., Aneshansley, D. and Eisner, T. (1972)** Flavonols: pigments responsible for ultraviolet absorption in nectar guide of flower. *Science* **177**: 528-530.
- Toguri, T., Umemoto, N., Kobayashi, O. and Ohtani, T. (1993)** Activation of anthocyanin synthesis genes by white light in eggplant hypocotyl tissues, and identification of an inducible P-450 cDNA. *Plant Molec. Biol.* **23**: 933-946.
- Tonaka, Y. Yonekura, K., Fukuchi-Mizutani, M., Fukui, Y., Fujiwara, H., Ashikari, T. and Kusumi, T. (1996)** Molecular and biochemical characterization of three anthocyanin synthetic enzymes from *Gentiana triflora* *Plant Cell Physiol.* **37**: 711-716.
- Urban, P., Cullin, C. and Pompon, D. (1990)** Maximizing the expression of mammalian cytochrome P450 monooxygenase activities in yeast cells. *Biochimie* **72**: 463-472.
- Urban, P., Truan, G., Bellamine, A., Laine, R., Gautier, J. C. and Pompon, D. (1994)** Engineered yeast simulating P450-dependent metabolisms: tricks, myths and reality. In *Drug Metabolism and Drug Interactions*. Hrsg. N. Kingsley, Freund Publishing House, England, Vol. **11**: 169-200.
- Vermilion, J. L., Ballou, D. P., Massey, V., Coon, M. J. (1981)** Separate roles for FMN and FAD in catalysis by liver microsomal NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.* **10**: 266-277.
- Wellmann, E. (1983)** UV-radiation in photomorphogenesis. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*. Hrsg. W. Shropshire und H. Mohr, Springer Verlag, Berlin Vol. **16B**: 745-756.
- Werck-Reichhart, D. (1995)** Cytochromes P450 in phenylpropanoid metabolism. In: *Drug metabolism and drug interactions*. Hrsg. F. Durst und d. P. O'Keefe. Freund Publishing House, England: 221-243.
- West, R.W.J., Yocum, R.R., and Ptashne, M. (1984)** *Saccharomyces cerevisiae* *GAL1-GAL10* Divergent Promotor Region: Location and Function of the Upstream Activator Sequence UAS<sub>G</sub>. *Mol. Cell. Biol.* **4**: 2467-2478.
- Wierig, H., de Vlaming, P., Cornu, A. and Maizonnier, D. (1979)** *Petunia* genetics. I.-List of genes. *Ann. Amélior. Plantes* **29** (5): 611-622.
- Wigand, C. M., Dangels, Oliver and Brouillard, R. (1992)** Complexation of a fluorescent anthocyanin with purines and polyphenols. *Phytochemistry* **31**: 4317-4324.

- Williams, CH. Jr., Kamin, H.** (1962) Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver. *J. Biol. Chem.* **237**: 587-597.
- Wilson, M.I., Greenberg, B.M.** (1993) Protection of the D1 photosystem II reaction center protein from degradation in ultraviolet radiation following adaptation of *Brassica napus* L. to growth in ultraviolet-B. *Photochem. Photobiol* **57**: 556-563
- 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.
- Ylstra, B., Muskens, M., and Van Tunen, A. J.** (1996) Flavonols are not essential for fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **32**: 1155-1158.

## G. Anhang

### G.1 Verwendete Primer und Adapter

Von den verwendeten PCR- und Reverse-Transkriptase-Primer sind hier nur die unspezifischen Standardprimer und die Primer, die zur Isolierung der DNA-Sonden benötigt wurden, aufgeführt. Die genspezifischen 5'- und 3'-RACE-Primer, sowie die spezifischen „end-to-end“-Primer sind zusammen mit den entsprechenden cDNA-Klonen in Anhang G.2 und G.3 dargestellt.

#### PCR – und Reverse-Transkriptase-Primer

Name	Nukleotidsequenz
AAP	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG-3'
AP	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T-3'
AUAP	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'
CYPA invers	5'-AA(CT)CT(CT)(AT)(CT)IGGIII(AG)(AT)AI(GT)(CT) -3'
CYPB invers	5'-C(GT)I(GC)(GT)ICCIIIIC(CT)(AG)AAIG(GC)IA(AGT) -3'
Hf2 5'	5'-ATG GTG CTA CTT AGT GAG CTT GCT GCA-3'
Hf2 3'	5'-TCA AGC TAA AGG TGC ATA AAC ATC AAT-3'
HFDM	5'-GGIAA(CT)(GC)A(CT)TTTGA(AG)(CT)T(AG)ATICCATTTGGIGC TA)GGA(AC)GAAG-3'
HTDM	5'-G(GT)IA(GA)(CT)GACTT(CT)GA(GA)(CG)T(CA)(AT)T(GA)CC GA)TT(CT)GGIGC(C T)GG(GA)(CA)GIAG(GA)AT-3'
Nested PCR primer 2R	5'-AGC GTG GTC GCG GCC GAG GT-3'
PCR primer 1	5'-TCG AGC GGC CGC CCG GGC AGG T-3'
pLGT10H	5'-CCT TTT GAG CAA GTT CAG CCT GG-3'
pLGT10R	5'-GGT GGC TTA TGA GTA TTT CTT CC-3'
Oligo(dT)-Primer	5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT VN-3'

#### Adapter zur subtraktiven Hybridisierung zweier differentieller cDNA-Populationen

Name	Nukleotidsequenz
Adaptor 1	5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CTC GAG CGG CCG CCC GGG CAG GT-3'
Adaptor 2r	5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAG CGT GGT CGC GGC CGA GGT-3'

## G.2. CYP-cDNA-Fragmente

Nicht differentiell exprimiertes CYP-cDNA-Fragment *PUHT* aus *Matthiola incana*:

F I L S C F P I F S T A R S K W R S L H A T A T P P G P	28
TTTATCTTATCATGTTTCCCTATCTTCTCCACCGCAAGATCCAAATGGAGATCTCTTCATGCCACCGCAACACCGCCGGGACCT	84
P R L P I I G N I H Q I G K N P H R S F A D L S K T Y G	56
CCACGGCTACCAATCATAGGAAATATACATCAAATCGGAAAAACCCACACCGCTCTTTCGCGGACCTCTCAAAAATTATGGA	168
P I M S F K F G C L N T V V I T S P E G A R E V L R T H	84
CCAATCATGAGTTTAAAGTTTGATGTTTAAACACTGTGGTCATAACTTCACCGGAAGGTGCAAGAGAGGTTCTAAGAACACAT	252
D Q I L A A H F S P N S I R S I N H H D F S V L W L P S	112
GACCAAATCTTGGCTGCTCATTTTTTCGCCCTAACTCGATACGATCCATCAATCATCAGACTTTTCCGTGCTTGGCTTCCATCA	336
<AAAAAGCGGATTGAGCTATGCTAGG 5'G5	
T S A R W R L L R K L S V T Y L F S P Q R I E A S K A L	140
ACGTGCTGCTGTTGAGACTGTTGAGAAAACGTGTGTGACTTACCTCTTCTCGCCCAACGTATCGAAGCCAGTAAAGCTCTG	420
<TTGCATAGCTTCGGTCATTTCGAGAC	
R M K K V Q E L V R F M S E S S E R E E V V D I S R Y I	168
CGGATGAAGAAAGTCAAGAGCTTGTAAAGATTCATGAGTGAAAGCAGCGAGAGAGAAGAAGTTGTTGATATTTCTCGGTACATC	504
GCC 5'G4	
F S S Q F L I S Y R N L F F S D G F Q D K V I A V T E A	196
TTTTCATCACAGTTCTTAATATCATATCGGAACCTATTTTTTTCTGATGGGTTTCAGGACAAGGTGATTGCTGTCCGGAAGCT	588
I G N P D L S N Y F P F L G F L D L Q G N R K K L K V C	224
ATAGGGAACCCAGACCTTTCTAACTACTTTCCATTTCTAGGGTTTCTTGATCTCCAAGGTAATAGAAAGAAGTTGAAGGTTTGC	672
S D M L F R V F R G F I D A K I A E K P L R S S H N D G	252
TCTGATATGCTGTTTAGGGTTTCCGTGGGTTTCATCGACGCTAAAATAGCCGAAAAACCACTGAGGAGTAGCCATAATGATGGC	756
S E S D F V D A L L D L T E G D K T E L N T S N I E H L	280
TCCGAAAGCGATTTTGTGGATGCGCTTCTCGATCTCACTGAAGGAGATAAAACAGAACTCAACACAAGCAATATTGAACACCTT	840
L F D L F A A G T D T N S I T V E W A M A E L L R N P N	308
CTCTTTGACCTGTTTGCAGCTGGCACAGACACAAACTCTATTACCGTGAATGGGCAATGGCAGAGTTACTTCGAAACCCCTAAT	924
3'G1 GTTTCAGCTGGCACAGACACAAA>	
<TTACCGTCTCAATGAAGCTTTGGG 5'G3	
I M A K A Q A E L D R V I G E N G V V Q E S D I S E L P	336
ATAATGGCAAAGGCTCAAGCCGAGCTCGATCGTGTGATAGGCGAAAACGGCGTTCAGAGTCAAGATTTTTCAGAAATGCGC	1008
<TTCTCAGTCTATAAAGTCTTAACGG 5'G2	
Y L Q A V V K E T F R L H P A G P L L V P R K A E S D V	364
TATTTACAAGCGGTTGTAAGAAGAACTTTCCGGTTACATCCGGCTGGCCCACTTCTCGTCCCGGAAAAGCAGAGTCCGATGTG	1092
<AAAGCCAATGTAGG 5'G1	
E V L G F L V P K D T Q V L V N V W A I G R D P N V W E	392
GAGGTTCTTGATTTCTTGTGCCTAAAGACACTCAGGTTCTTGTGAACGTGTGGCTATAGGAAGAGACCCGAATGTGTGGGAG	1176
N P S Q F E P E R F L E K E I D V K G T D Y E L T P F G	420
AATCCGAGCCAGTTTGGAGCCAGAGAGGTTCTTGGAGAAAGAAATTGACGTGAAAGGTACAGATTATGAGCTTACTCCTTTTGG	1260
A G R R I C P G L P L A V K I V P L M L S S L L Y S F D	448
GCCGACGTAGAATTTGTCCAGGGTTGCCTTTGGCTGTGAAGATTGTGCCTCTTATGCTTTCTTCGCTTCTTATTCTTTGAC	1344
W K L P N G V V P K D L D M D E T F G I T L H K T N P L	476
TGGAAGCTTCCAAACGGCGTCGTTCCCTAAAGACTTGGACATGGACGAGACCTTTGGTATCACATTACATAAAACCAACCCGTTA	1428
H A V L V K K R A I D *	487
CATGCCGTTCTCGTCAAGAAACGTGCTATTGATTTGAACAGTGCATGTTATATTTCTTTTGTGTTAGTACGAATCTAATAGTTT	1512
CAAATTTTATAGCCATAATACTATATAGTATGGTGACAGTAAATCCTTTTCTTTTGGGGTGTGTTTTTTGTGGTTGTTTTTA	1596
TAAAACCTTACTTACAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1639

Der unterstrichene Sequenzbereich stellt das bei der differentiellen Hybridisierung isolierte, nicht differentiell, 734 Bp große DNA-Fragment dar. Die RSAI-Schnittstellen (GTAC) sind fett dargestellt (siehe auch C.1).

Unvollständige cDNA 1639 Nukleotide

Unvollständiger offener Leserahmen: Start 1 - Stop 1464

Codierender Bereich: 1461 Nukleotide = 487 Aminosäurereste

5'-RACE-Primer: 5'G1, 2, 3, 4 und 5

3'-RACE-Primer: 3'G1

**Nukleotidsequenz und putativer offener Leserahmen von *CYPLrpHf2* aus *Lycianthes rantonnetii*:**

G N D F E L I P F G A G R R I C A G T R M G I V M V E Y 28  
 GGAATCATTGAACTGATGCCATTTGGGGCTGGACGAAGGATTTGTGCAGGGACAAGGATGGGAATAGTGATGGTGAATAT 84  
 I L G T L V H S F D W K F S N D V K E I N M E E S F G L 56  
 ATATTGGGAACCTTTGGTTCATTCATTTGATTGGAAATTTCAAATGATGTTAAGGAGATTAATATGGAGGAATCTTTTGGTTTA 168  
 A L Q K A V P L E A M V T P R L P F D V Y Y T N \* 80  
 GCTTTGCAAAGGCTGTCCCTCTTGAAGCTATGGTTACCCCAAGGCTGCCTTTTCGATGTTTATTATACAAATGAAATCTTATT 252  
 TGGTTCAATTATTGAAATAATAATCGTTGTAGTCTAAGAAGCCTTCTTAGTTACGTATAGTGTAACCTATCTGCTGAAAACT 336  
 ATAACCTAAGTAATCAAGTGTAGCTATATCTAAACACAAAAA 389

**Nukleotidsequenz und putativer offener Leserahmen von *CYPLrpHf3* aus *Lycianthes rantonnetii*:**

G N D F E L M P F G A G R R M C P A Y G L G L K V V H A 28  
 GGAACGATTTGAACTGATGCCATTTGGGGCTGGAAGAAGGATGTGTCTGCCTACGGCTTGGGGCTTAAGGTGGTTCACGCC 84  
 T L A N L V H G F K W S L P H N M T P E D L N M E E I F 56  
 ACCTTAGCTAATCTTGTACATGGGTTAAATGGTCATTGCCTCATAATATGACACCTGAGGACCTCAACATGGAGGAGATTTT 168  
 G L S I P R K I P L S A V I E P R L P L Y L Y S A \* 81  
 GGTCTCTATACCAAGAAAGATTCCACTTCTGCTGTGATTGAGCCAAGACTTCCACTATATCTTACTCTGCTTGATTCTGC 252  
 ACTAATGTTTACATCAATAAATGTTCTTCTCTGATTGTAATGGTGGACATATCCACTAAGGTTTACATCAATGCTCTACATG 336  
 TTTTGTGACAAAAA 361

**Nukleotidsequenz und putativer offener Leserahmen von *CYPPzpHt1* aus *Pelargonium zonale* x Hybriden:**

G N D F E L M P F G A G R R I C A G M S L G L R M V Q L 28  
 GGAACGACTTTGAACTGATGCCATTTGGGGCTGGACGAAGGATATGCGCCGGGATGAGCCTAGGGCTACGCATGGTCAATTG 84  
 L T A T L L H A F N W D L P Q G Q I P Q E L N M D E A Y 56  
 CTCCTGCGACTCTTCTTACGCCCTTAAATGGGATCTCCGCAAGGTCAAATACCCAGGAGCTAAATATGGACGAGGCTTAT 168  
 G L T L Q R A S P L H V R P R P R L P S H L Y \* 79  
 GGACTCACACTTCAAAGAGCTTACCTTTACATGTGCGCCACGTCCTCAAGGCTACCTCTCATTGTTGATTGATCTATAACTGA 252  
 ATTTTCATGTCATGCTTGTAAAAA 287

**Nukleotidsequenz und putativer offener Leserahmen von *CYPPzpHt2* aus *Pelargonium zonale* x Hybriden:**

G N D F E L M P F G A G R R I C A G M S L G L R M V Q L 28  
 GGAATGACTTTGAACTGATGCCATTTGGGGCTGGAAGTAGGATATGCGCCGGGATGAGCCTAGGGCTACGCATGGTCAATTG 84  
 L T A T L L H A F N W D L P Q G Q I P Q E L S M D E A Y 56  
 CTCCTGCGACTCTTCTTACGCCCTTAAATGGGATCTCCGCAAGGTCAAATACCCAGGAGCTAAGTATGGACGAGGCTTAT 168  
 G L T L Q R A S P L H V R P R P R L P S H L Y \* 79  
 GGACTCACACTTCAAAGAGCTTACCTTTACATGTGCGCCACGTCCTCAAGGCTACCTCTCATTGTTGATTGATCTATAACTGA 252  
 ATTTTCATGTCATGTTTGTAAATGGCTGGATTAATAAAATTCATCACTTGTAACTACAAAACCTAGATAGCTAGTTGCGTGTGTTA 336  
 TGATGATGATATTTGCTGFACTGTAAAAA 375



**Nukleotidsequenz und putativer offener Leserahmen von *CYPMipHt* aus *Matthiola incana*:**

G N D F E L I P F G A G R R I C P G I G L A M L H L E Y	28
GGAAATGATTTTGAATTAATACCATTTGGAGCAGGGAGAAGGATCTGTCCAGGGATTTGGGCTAGCGATGCTGCATCTGGAGTAC	84
Y V A N M V K E F E W K E V E G H E V D L T E K V E F T	56
TATGTGGCCAATATGGTGAAGGAGTTCGAGTGGAAAGGAGTGAAGGTCATGAAGTTGATTTGACGGAGAAGGTGGAGTTCCACC	168
V V M K N P L K A R A V P R R G Q V V L S *	77
GTCGTCATGAAGAATCCGCTTAAGGCTCGTGCTGTGCCAAGGAGAGGACAAGTGGTCTGTGCGTAGAAAAGACTAGTCTTCTTCT	252
TTTAATAATAAATAGTTAGGAAGAGTTGATGGTAATTGTGTACTTTGTTTCGTGAAGGTACCCGTCCTAATAAATGATAGAAG	336
TACTGCTTTTATTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA	366

**Nukleotidsequenz und putativer offener Leserahmen von *CYPL4pHT* aus *Matthiola incana*:**

G S D F E L I P F G A G R R I C A G L S L G L R T I Q L	28
GGGAGCGATTTTCGAGCTCATACCGTTTCGGAGCTGGGCGGAGAATCTGTCCAGGGCTGAGTTTAGGGTTACGGACGATTCAGTTG	84
L T A T L V H G F E W E L A G G V T P E K L N M E E T Y	56
CTGACAGCGACGCTGGTTTCATGGATTTGAATGGGAATTGGCCGGAGGAGTTACGCCGGAGAAGCTGAATATGGAGGACATAT	168
G I T V Q R A V P L I V H P K P R L A L N V Y G V G S G	84
GGGATTACTGTGCAAGAGCGGTTCCCTTTGATTGTGCATCCTAAGCCTAGGTTGGCTCTGAATGTTTATGGAGTTGGATCGGGT	252
*	
TAAATGGGAGTTTTTGGTTGCTGAGAAGGTTGATCTTGACCCTGGAAATTAAGCTTATTACTGGAATTCCTTAATAAAAAA	336
TAAGTCTAAAATCAAGTAATTTATTGAAATATGGTGAATTTGTTGCAAGTTTGTACCCCTATATGTTATGTTGTTTTTTGGAA	420
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	442

**Nukleotidsequenz und putativer offener Leserahmen von *CYPHm1* aus *Hydrangea macrophylla*:**

G N H F E V M P F G A G R R M C P G Q V M A V K Q V H L	28
GGGAACCATTTTGAGGTGATGCCATTTGGGGCTGGACGTAGAATGTGTCCCGGACAAGTCATGGCTGTCAAGCAAGTTCACTTG	84
I L A N L I H F F D W S L P N D G D P L Q L D M N E K F	56
ATTTTGGCCAATCTGATCCATTTCTTTGATTGGTCTCTTCCTAATGATGGTGATCCTTTGCAACTGGACATGAATGAAAAATTT	168
G V S L Q K E Q P L L L I P K E K *	73
GGAGTAAGCTTGCAAGGAACAACCATTACTACTCATTCTAAAGAAAAATGATGATCTCAAAGAATTGTTTCTTGTATAG	252
TAATTTGTGTTGCTTGTGATCCATTATATGATGTTTTGATGTTATATGTGTTAAATTGAAATTGTTCTGTAAAAGCACTAAAA	336
AAAAAAAAAAAAA	344

### G.3. „Full-length“ CYP-cDNA-Klone

#### Nukleotidsequenz und offener Leserahmen von *SPHT* $\triangleq$ differentiell exprimiertes Cytochrom P450-

##### Enzym CYP706A8 (Acc.: AF313492) aus *Matthiola incana*:

M L A A Y A I P I L T A I L S I F W Y L L K R	23
AGATTAGGCAGAAAATGTTGGCCGCTTACGCAATCCCATCTCACTGCCATCTTGTGCGATTTTCTGGTACCTCTTGAAACGCG	84
E5' ATGTTGGCCGCTTACGCAATCCCATCTCTC>	
V Q R R P P L P P G P R G L P I V G N L P F L D P D L H	51
TGCAACGGCGACCACCTCTACCACCAGGACCGCGAGGGCTACCTATTGTGGGCAACCTCCCGTTTCTTGACCTGACCTGCACA	168
T Y F T S L A Q T H G S I F K L N L G S K L T V V I S S	79
CCTACTTCACAAGCCTTGCTCAGACTCACGGTTCAATCTTCAAACCAATCTCGGATCAAACTAACGGTCGTTATCAGCTCTC	252
P S L A R E I L K D Q D I N F A N H D V P L T G R A A T	107
CGTCGCTGGCTCGAGAGATCCTTAAAGATCAAGACATCAATTTTCGCAAACCATGACGTTCCCTTTGACGGGCCGAGCAGCTACCT	336
Y G G L D I L W S P Y G A E W R M L R K V C L L K L L S	135
ATGGCGGTCTGGACATCCTTTGGTCACCATATGGAGCCGAATGGAGAATGCTTAGAAAAGTTTGTCTTCTTAAGCTCTTAGCC	420
<TATACCTCGGCTTACCTCTTACGAATC 5'G3	
R K T L D S F Y E L R R K E I R E R T R F L Y K Q S R G	163
GAAAACTTTGGATCTTTTCTACGAGCTTCGACGCAAAGAATCCGAGAAAAGAACCAGATTCTATACAAGCAAAGTCGAGGAG	504
<AAACCTAAGAAAGATGCTCGAAGC 5'G2 <TTGGTCTAAAGATATGTTCTGTTTC 5'G1	
E A P V N V G D Q L F L T M M N L T M N M L W G G S V K	191
AAGCGCCGTTGAATGTCGGAGATCAGTTGTTTTGACGATGATGAATCTAACGATGAATATGCTATGGGGGGATCTGTGAAAG	588
3'G1 TGAAAG	
A E E M A S V G T E F K G V I S E I T R L I G E P N V S	219
CAGAGGAGATGGCGAGTGTGGAACAGAGTTAAAGGGGTCATTTCTGAGATAACTAGGCTTATAGGTGAGCCTAATGTTTCCG	672
CAGAGGAGATGGCGAGTGTGGA->	
D F F P W L A R F D I Q G L V K S M R V S A R Q L D A V	247
ATTTTTCCCATGGCTAGCGAGATTCGATATTCAGGGCTTGTGAAGAGCATGCGTGTGTCTGCTCGACAGCTTGATGCGGTTCT	756
F D R A I K Q M Q Q I T S S D G E C K D F L Q Y L M K L	275
TCGATCGAGCCATCAAGCAGATGCAACAGATAACAAGTAGTGATGGTGAATGCAAAGACTTTTTCGAATATTTGATGAAGTTGA	840
K D Q E S D S E V P I T L N H V K A V L T D M V V G G T	303
AGGACCAAGAAAGTGACTCGGAGGTTCCCTATTACCCTTAATCATGTCAAAGCCGTACTCACGGATATGGTGGTTCGGTGGTACGG	924
D T S M N T V E F A M A E L I N K P E L M K K A Q Q E L	331
ATACATCAATGAATACGGTAGAATTTGCTATGGCCGAGCTAATAACAAACCAGAGTTGATGAAGAAAGCGCAACAAGAGCTAG	1008
D Q V V G K D N I V E E S H I T K L P Y I V A I M K E T	359
ACCAAGTTGTAGGAAAAGACAACATTTGTGGAAGAATCACACATCACTAAACTTCCTTACATTGTAGCCATTATGAAAGAGACAC	1092
L R L H P T L P L L V P R R P A E A A V V G G Y T I P K	387
TTAGACTTCAACCAACCCTTCTTTGTTAGTCCCTCGCCGCTCGCGGAAGTGCAGTGGTGGGAGGCTACACCATTCTAAAG	1176
D T K I F I N V W C I Q R D P N V W E K P T E F R P E R	415
ACACTAAGATCTTCAATGTTTGGTGTATTCAGAGAGATCCAAACGTGTGGGAAAACCGACTGAGTTTCGTCCCGAGAGGT	1260
F L D N N K P R D F T G T D Y S Y F P F G S G R R I C A	443
TTCTTGATAACAATAAGCCTCGTGATTTACCGGAACAGATTATAGCTATTTCCCTTTGGATCCGGCCGGAGAATTTGCGCCG	1344
G V A L A E R M V L Y T L A T L L H S F D W K I P Q G H	471
GTGTAGCACTCGCCGAGAGATGGTTTTGTACTCTCGCGACACTATTGCATTCTGTTTCGATTGGAAGATTCTCAAGGACATG	1428
V L D L E E K I G I V L K L K T P L V A L P V P R L S D	499
TGTTGGATTTGGAAGAGAAAATGGGATTGTCTTGAAGCTCAAGACGCCTCTTGTGCCCTGCCCGTTCCCTAGGTTGTCCGATT	1512
<GGATCCAACAGGCTAA	
S N L Y I *	504
CTAATCTTTATATATAGTATTAGTCAAACTCAAACACACCTTTTTTCAACACCTTTTCTCACATTTTCTTATTGTTACTATTG	1596
GATTAGAAATATAT E3'	
GTAAGTGTGAAGTGTGTTACACTTGTACACACATGTCTGTATCTTTATAAAGTGGTGAAGATAAATTAATAAAGAGTATA	1680
CAAGGAGACTAATCTCTCTCTTTGATTCTCTCTAAAAAATAA	1758

cDNA 1758 Nukleotide

Offener Leserahmen: Start 15 Stop 1529

Codierender Bereich: 1512 Nukleotide = 504 Aminosäurereste

5'-RACE-Primer: 5'G1, 2 und 3

3'-RACE-Primer: 3'G1

End-to-end Primer: E5' und E3'

Nukleotidsequenz und offener Leserahmen von *CYP75B5*  $\triangleq$  Flavonoid 3',5'-Hydroxylase aus *Callistephus chinensis* CYP75B5 (Acc.: AF313489).

M S I L S L L V Y F C I S L L V I I A L V	21
CGGGATTCCCCGGTTTGTAAAAATGAGCATTTTAAGCCTACTAGTCTACTTTTGCATCAGTTTGTAGTAATAATTGCATTGGT	84
EXba <b>TCTAGAATGAGCATTTTAAGCCTACTAGTCTACTTT</b> >	
N M F I T R H T N R L P P G P A P W P V V G N L P H L G	49
TAACATGTTTCATCACCCGTACACCAACCCCTCCCTCCAGGCCCTGCCCATGGCCCGTCGTCGGAAACCTGCCACACCTTGG	168
A I P H H T L A A L A T K Y G P L V Y L R L G F V H V V	77
TGCAATTCCACATCACACTGGCGGCATTGGCAACAAAGTATGGCCGTGGTGTATCTTCGACTCGGGTTCGTTACGTTGGT	252
V A S S P S V A A Q F L K V H D L K F A S R P P N S G A	105
GGTGGCCTCTTCCGTCCGTTGCTGCACAGTTTCTAAAGTTTCATGACTTGAAGTTCGCCAGCAGGCCACCAAATCTGGAGC	336
K H I A Y N Y Q D M V F A P Y G P Q W T M F R K I C K D	133
AAAGCATATCGCGTATAATTACCAGGATATGGTGTTCGACCATATGGTCTCAGTGGACAATGTTTCGCAAGATTGCAAGGA	420
H L F S S K A L D D F R H V R Q E E V A I L A R G L A G	161
TCACCTCTTTTCTAGCAAAGCACTCGATGATTTCCGCCATGTTCCGCCAGGAGGAAGTAGCAATACTCGCACGTGGTTTGGCTGG	504
A G R S K V N L G Q Q L N M C T A N T L A R M M L D K R	189
TGCGGGTCGATCAAAAGTTAACTTAGGCCAACAACCTAACATGTGCACCGCAAACACATTAGCACGAATGATGTTAGACAAGAG	588
V F G N E S G G D D P K A N E F K E M A T E L M F L A G	217
AGTATTTGGCAATGAAAGTGAGGCGATGATCCAAAGGCGAATGAGTTCAGGAAATGGCGACTGAGCTGATGTTTTTGGCAGG	672
Q F N I G D Y I P V L D W L D L Q G I V K K M K K L H T	245
ACAATTCAACATTGGTGACTACATCCCGGTTCTTGACTGGCTGGACTGCAAGGCATTGTGAAAAAGATGAAGAACTGCACAC	756
R F D K F L D V I L D E H K V I A S G H I D M L S T L I	273
TAGATTCGATAAGTTCCTTGACGTAATCTTGATGAACATAAAGTTATAGCGTCGGGTCACATAGACATGTTGAGCACGTTGAT	840
S L K D D T S V D G R K P S D I E I K A L L L E L F V A	301
TTCACTCAAGGATGATACCAGTGTAGACGGAAGGAAACCTTCCGACATCGAAATCAAGGCTCTGCTTCTGGAATTATTCGTAGC	924
G T D T S S N T V E W A I A E L I R Q P H L L K R A Q E	329
GGGAACAGACACATCATCTAATACCGTGAATGGGCAATAGCAGAACTCATTGCCAACCCCATCTGCTGAAACGAGCCCAAGA	1008
E M D S V V G Q N R L V T E M D L S Q L T F L Q A I V K	357
AGAAATGGACAGTGTAGTTGGTCAAACCCGCTAGTAACCGAAATGGACCTGAGCCAACTAACATTCCCTCAAGCCATTGTGAA	1092
E A F R L H P S T P L S L P R I A S E S C E V D G Y Y I	385
GGAAGCCTTAGGCTCCACCATCGACACCACTTTCCCTGCCAAGGATTGCATCCGAGAGCTGTGAGGTGGATGGGTATTACAT	1176
P K G S T L L V N I W A I G R H P E V W T D P L E F R P	413
ACCTAAGGGATCCACTCCTTGTAAACATATGGGCCATTGGCCGACACCAGAAGTGTGGACCGACCCCGCTTGAGTTTCGGCC	1260
T R F L P G G E K P G I V V K V N D F E V L P F G A G R	441
CACTCGGTTCTTACCTGGGGGTGAAAAGCCCGGGATTGTCGTCAGGTAATGATTTTGAAGTCTTGCCATTTGGGGCCGGACG	1344
R I C A G M S L A L R T V Q L L M G T L V Q A F D W E L	469
AAGGATCTGTGCTGGTATGAGCCTAGCCTTGAGAACAGTCCAATTGCTCATGGGAACATTGGTCCAAGCCTTTGATTGGGAATT	1428
A N G I K P E K L N M D E A F G L S V Q R A E P L V V H	497
AGCTAATGGTATAAAGCCAGAGAAGCTCAACATGGACGAAGCCTTTGGGCTAAGCGTTCAAAGGGCTGAACCGTTGGTGGTGA	1512
P R P R L P P H V Y K S G *	510
CCCAAGGCCGAGGTTACCTCCCATGTATACAAAAGCGGTTAAAAAGACTTTTGCCTGTATACATATTACGTATAGTAAACAAA	1596
<TCCAATGGAGGGGTACATATGTTTTTCGCCAATTTCTCGAG ESac	
TTCAACGTTACGCGAACCATTATCAACTGTTGCTTATTAATTAACGAAGAAATATAAATAAAAAATAAA	1667

cDNA 1667 Nukleotide

Offener Leserahmen: Start 23 - Stop 1555

Codierender Bereich: 1530 Nukleotide = 510 Aminosäurereste

End-to-end Primer: EXba und ESac

Nukleotidsequenz und offener Leserahmen von *CYP*CpHt2  $\cong$  putative Flavonoid 3'-Hydroxylase aus *Callistephus chinensis* CYP75B6 (Acc.: AF313488).

M T I L P F I F Y T C I T A L V L Y V L	20
ATTACATCCCCCTCACATGTGCAATGACCAATTTTACCCTTTATTTTCTACACATGTATCACTGCCTTAGTGCTCTATGTATTGC	84
E5' <GCAATGACCAATTTTACCCTTTATTTTCT>	
L N L L T R N P N R L P P G P T P W P I V G N L P H L G	48
TTAACCTTTTGCACCGTAACCCAAACCGCCTTCCCCAGGTCCAACCCCATAGTGGAAACCTACCACACCTTGGCA	168
M I P H H S L A A L A Q K Y G P L M H L R L G F V D V V	76
TGATACCACACCACACTCATTAGCGGCCTTGGCCCAAAGTATGGTCCGCTGATGCACCTACGCCTCGGGTTTGTGACGTGGTGC	252
V A A S A S V A A Q F L K T H D A N F A S R P P N S G A	104
TGGCCGCGTCAGCATCCGTTGCGGCACAATTTCTAAAACTCATGACGCAAACTTTGCAAGTAGACCACCCAACTCTGGAGCCA	336
K H I A Y N Y Q D L V F A P Y G P R W R M L R K I C S V	132
AGCATATTGCCTATAACTATCAAGATCTTGTGTTTCGCACCTTATGGTCCAAGGTGGCGAATGCTTAGGAAAATTTGTTCGGTTC	420
H L F S T K A L D D F R H V R E E E V A I L T R V L V H	160
ACTTGTTTTCCACTAAAGCACTAGACGACTTCCGTCATGTTTCGAGAGGAAGAGGTAGCGATACTGACGCGAGTGTAGTCCATG	504
A G E S A V K L G Q L L N V C T T N A L A R V M L G R R	188
CGGGTGAATCAGCGGTGAAATTAGGACAACACTGAACGTGTGCACCACAACGCGTTAGCACGAGTGATGCTAGGCCGGAGAG	588
V F A D G S E G R G V D P K A D E F K D M V V E L M E L	216
TTTTCGCGGACGGCAGTGAAGGCCGGGAGTCGACCCAAAGCAGATGAGTTC AAGGACATGGTGGTGAACCTATGGAATTAG	672
A G E F N I G D F I P P L D C L D L Q G I T K K M K K L	244
CCGGTGAATTC AACTATAGGTGACTTCATACCACCCTTACTGCTGCTTGTATTGCAAGGCATCACCAAAAAGATGAAGAACTTC	756
H A R F D K F L N I I L D D H K I E K G A A G R R H S D	272
ATGTCGATTCGACAAGTTTCTTAAACATCATCCTAGACGACCATAAAATCGAAAAAGCGCGGCCGCGCCGCTCATAGTGACT	840
L L T T L I S L K D V D A A D D D E E G K L S D I E I K	300
TGCTGACCACGCTGATTTCACTCAAGGATGTTGATGCTGCTGATGATGATGAAGAAGGAACTTTCAGACATTGAAATCAAGG	924
A L L L N L F A A G T D T S S S T V E W A V A E L I R H	328
CTTTGTCTCGAACTTATTTGCTGCAGGAACAGACACATCATCTAGTACCCTGGAATGGGCAGTAGCCGAACCTTATTCGTATC	1008
P E L L K Q A R E E M D I V V G R D R L V T E L D L S R	356
CGGAACCTATTGAAACAAGCAGCGAAGAAATGGATATCGTAGTTGGTCGAGACCGGCTTGTAAACCGAATTGGACTTAAGCCGGC	1092
L T F L Q A I V K E T F R L H P S T P L S L P R M A S E	384
TAACATTCCTACAAGCCATTGTGAAGGAGACCTTTAGGCTCCACCCTTCGACGCCACTCTCCCTTCCAAGGATGGCGTCGGAGA	1176
S C E V D G Y Y I P K G S T L L V N V W A I A R D P K M	412
GTTGCGAGGTGGATGGTACTACATTCCCAAAGGATCCACACTCCTTGTTAATGTATGGGCCATAGCCCGCACCACAAAATGT	1260
W T N P L E F R P S R F L P G G E K P D A D I K G N D F	440
GGACTAACCCACTTGAGTTCAGGCCAGTCGGTCTTACC CGGGGTGAAAAGCCCGATGCAGATATCAAAGGAAATGATTTTG	1344
E V I P F G A G R R I C A G M S L G M R M V Q L L I A T	468
AGGTCATACCATTGGGGCCGGGAGAAGAATATGTGCGGGTATGAGCCTAGGGATGAGAATGGTCCAGTTGCTCATTGCAACAT	1428
L V Q T F D W E L A N G L D P E K L N M E E A Y G L T L	496
TGGTCCAAACCTTTGATTGGGAATTGGCTAATGGTTAGACCCGGAGAAGCTCAACATGGAAGAAGCTTACGGGCTAACCCCTC	1512
Q R A E P L M V H P R P R L S P H V Y E S R *	518
AAAGGGCTGAACCCTTAATGGTGCACCCAAAGGCCAGGCTATCTCCCATGTATATGAAAGTCGTTAAGGACTAAAACGGATTT	1596
<AGGGGTACATATACTTTT CAGCAATTCC E3'	
TGGTGTTTTGGTTAGCCAAGTTGGAAATTCGGCATTGTATTTCAAATGATTATGGAAAGTAATGTCTTTGCTCTTCGAATTGT	1680
<AACCAATCGGTTCAACCTTTAAGCCGTAAAC 5'G2 <ACTAATACCTTTT CATTACAGAAACGAGAAGC 5'G1	
TGGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1704

cDNA 1704 Nukleotide

Offener Leserahmen: Start 24 - Stop 1580

Codierender Bereich: 1554 Nukleotide = 518 Aminosäurereste

5'-RACE-Primer: 5'G1 und G2

End-to-end Primer: EPst und EBst681

**Nukleotidsequenz und offener Leserahmen von *CYPLrpHf2*  $\hat{=}$  putative Flavonoid 3',5'-Hydroxylase aus *Lycianthes rantonnetii* (= *Solanum rantonnetii*) CYP75A9 (Acc. : AF313490)**

	M V L L L I S E L C	10
ATTAAAACTACAAATTATAAGCTTCATATATAGTGTATATATCTTTAATAATCATGGTGCCTACTACTTATTAGTGAGTTGTGTG		84
	EBAM <b>GGATCCATCATGGTGCCTACTACTTATTAGTGAGTTGTGT&gt;</b>	
A S A I I F I I V H I I I S K L I A I G G G R R R R L P		38
CGTCAGCTATAATATTTATCATAGTACATATTATTATTTCAAATTAATAGCCACCGGCTGGGGACGGAGGCAGCGGTTACCAC		168
P G P M G W P V I G A L P L L G T M P H V A L A K M A K		66
CGGGTCCGATGGGGTGGCCGGTGATCGGAGCACTTCCACTTTTAGGTACCATGCCACATGTTGCACTTGCAAAAATGGCCAAAA		252
K Y G P I M Y L K V G T C G M V V A S T P N A A K A F L		94
AATATGGACCAATTATGTATCTAAAAGTTGGAACCTGTGGTATGGTTGTTGCTTCTACCCCTAATGTGCTAAAGCTTCTCTGA		336
K T L D I N F S N R P P N A G A A H L A Y D A Q D M V F		122
AAACACTTGATATCAATTTCTCCAATCGTCCACCTAATGCAGGTGCCACACACTTGGCCTATGATGCTCAAGACATGGTTTTTG		420
A H Y G P R W K L L R K L S N L H M L G G K A L E D W A		150
CACACTATGGACCACGTTGGAAGTTGCTAAGGAAATTGAGCAACTTACACATGCTAGGTGGTAAAGCCTTAGAAGATTGGGCTA		504
N V R A N E L G H M L K S M F D A S R V G D R V V V A D		178
ATGTCCGCGCAATGAGTTAGGCCACATGCTAAAATCGATGTTTCGACGCGAGCCGGTGGGCGGTGCGGTGGTGGTTCGGGATA		588
M L T F A M A N M I G Q V I L S K R V F V E K G A E V N		206
TGTTGACGTTTCGCAATGGCAAACATGATTGGTCAAGTGATATTAAGTAAGAGAGTGTGGTGGAAAAGGGCGGAGGTCAATA		672
E F K D M V V E L M T V A G Y S N I G D F I P Q L A W M		234
AATTTAAGGACATGGTCTGGAATTAATGACAGTAGCGGGTATTTAATATTGGAGATTTATTCTCAATTAGCTTGATGG		756
D L Q G I E K G M K C L H K K F D D L L T K M F D E H K		262
ATTTACAAGGATTGAAAAAGGGATGAAATGTTTGACAAAAAATTTGATGATTTATTGACAAAAATGTTTATGATGAACATAAAG		840
A T R N E R K G K P D F L D V V M A N R D N S E G E R L		290
CAACTACCAATGAAAGAAAGGGAAACCTGATTTTCTTGATGTTGTTATGGCAAATAGAGATAATTTCTGAAGGAGAAAGGCTCA		924
S T N N I K A L L L N L F T A G T D T S S S A I E W A L		318
GTACAAACAATATCAAAGCACTTTTGTGAAATTTGTTTACAGCTGGTACAGACACTTCATCAAGTGAATAGAATGGCACTTG		1008
A E M M K N P Q I L K K V Q Q E M D Q I I G K N R R L I		346
CAGAAATGATGAAAAATCCACAATTTCTCAAGAAAGTACAACAAGAAATGGATCAAATCATTGGAAAAAATAGACGTTTAATTG		1092
E S D I P N L P Y L R A V C K E T F R K H P S T P L N L		374
AATCTGATATTCGAATCTCCCTTATTTACGCGCAGTTTGCAAAGAAACATTTGAAAACACCCTTCCACACCTCTAAATCTCC		1176
P R I S N E P C M V D G Y Y I P K N T R L S V N I W A I		402
CTAGGATATCGAACGAGCCATGCATGGTTCGATGGTTATTACATACCGAAAAACATTAGGCTCAGTGTCAACATATGGGCAATTG		1260
G R D P E V W E N P L E F N P E R F L S G K N V K I D P		430
GACGAGACCTGATGTGGGAGAATCCACTTGAGTTCAATCCTGAGAGGTTCTTGAGTGGAAAAAATGTGAAGATTGACCTC		1344
R G N D F E L I P F G A G R R I C A G T R M G I V M V E		458
GAGGGAATGATTTGAGTTGATTCCATTTGGTGCAGGACGAAGGATTTGTGCAGGGACAAGGATGGGAATAGTGATGGTGAAT		1428
Y I L G T L V H S F D W K F S N D V K E I N M E E S F G		486
ATATATTGGGAACCTTGGTTCATTCATTTGATTGGAAATTTCAAATGATGTTAAGGAGATTAATATGGAGAACTTTTGGTT		1512
	<b>&lt;CTCCTTAGAAAACCAA</b>	
L A L Q K A V P L E A M V T P R L P F D V Y Y T N *		511
TAGCTTTGCAAAAAGGCTGTCCCTCTTGAAGCTATGGTTACCCCAAGGCTGCCTTTTCGATGTTTATTATACAAATTGAAATCTTA		1596
ATCG 5'G2	<TTCCGACGGAAAGCTACAATAATATGTTTAACTCTCGAG ESac	
	<CAAATAATATGTTTA 5'G1	
TTTGGTTTCAATTATTTGAATAATAATCGTTGTTAGTCTAAGAAGCCTTCTAGTTACGTATAGTGTAACTATCTGCTGAAAA		1680
<u>CTATAACTTAAGTAATCAAGTGTAGCTATATCTAAACACAAAAA</u>		1735

cDNA 1735 Nukleotide

Offener Leserahmen: Start 54-1589 Stop

Codierender Bereich: 1533 Nukleotide = 511 Aminosäurereste

5'-RACE-Primer: 5'G1, 2 und 3

End-to-end Primer: EBam und ESac

**Nukleotidsequenz und offener Leserahmen von *CYP75B8*  $\cong$  Flavonoid 3'-Hydroxylase aus *Pelargonium zonale* x Hybriden *CYP75B8* (Acc.: AF315465)**

	M Y N M S L Y L L L G S S A L A F	17
AAGTAGTTGCGATCAATAGATCGATCGATCGAGATGTACAATATGAGTTTGTATCTCCTGCTGGGCTCCTCGGCTCTGCCTTT		84
	EPst <b>CTGCAGATGTACAATATGAGTTTGTATCTCCTGCTG&gt;</b>	
A A Y L V L F S F S K S R R R R L P P G P K A W P I V G N		45
GCGGCCTACTTGGTCTGTCTCATTCTCAAAGTCAAGGAGGAGACTCCC GCCGGCCCCAAGGCATGGCCCATCGTGGGGAAC		168
L P H M G S M P H Q N L A A M A R T Y G P L V Y L R L G		73
CTGCCGCACATGGGATCCATGCCGCACCAGAACCTGGCCGCCATGGCCCGCACCTACGGCCCGCTCGTCTACCTCCGCCTCGGC		252
F V D V V V A L S A S M A S Q F L K T H D S N F S S R P		101
TTCGTCGACGTCGTTGTGGCGCTCTCGGCTTCCATGGCATCGCAGTTCTTGAAGACCCACGACTCCAACCTTCTCCAGCCGGCCC		336
P N A G A K H I A Y N Y H D L V F A P Y G P R W R L F R		129
CCCAACGCCGGAGCTAAGCATATTGCTTACAACATACAGACCTCGTCTTCCGCCCTTATGGCCCGCTGGCGCTTGTTCAGG		420
K I T S I H L F S G K A L D D Y R H V R Q E E V G V L A		157
AAGATCACCTCCATCCATCTCTTCTCCGGCAAGGCCCTCGATGATTACAGACATGTCCGCCAGGAAGAGGTGGGGTATTGGCG		504
S N L A R A V S T I V N L G Q L L N I C A T N A L G R A		185
AGCAATTTAGCGCTGCGGTGTCGACAATAGTGAATTTGGGGCAATTGTTGAACATATGTGCTACCAATGCATTGGGGCGCGCG		588
V I G K K V F K D G T D D V D P K A D E F K S M V V E L		213
GTGATAGGTAAAGAGGTGTTCAAGGACGGTACCGATGATGTTGACCCCAAGGCTGATGAGTTCAAATCAATGGTGTGGAGTTG		672
M V L A G V F N I G D F I P P L D C L D L Q G V A S K M		241
ATGGTGTGGCTGGTGTGTTAACATCGGTGACTTATCCCTCCTCTCGACTGCCTTGACTTGCAAGGCGTGCATCTAAAAATG		756
K N L H K R F D A F L S A I L Q E H N I N S A A S A T P		269
AAGAACCTCCACAAGCGCTTCGACGCCTTCTTAAGCGCCATTCTCCAAGAGCACAACATTAATTCTGCTGCCAGTGCACGCCT		840
S M L T T L I S L K D S V E D S E G G K L T D T E I K A		297
AGTATGTTGACCACGCTCATTTTCGTTGAAGGACAGTGTGGAAGACAGTGAGGGAGGCAAGCTCACGGACACTGAGATAAAAGCT		924
L L L N M F T A G T D T T S S T V E W A I A E L I R Q P		325
TTGCTCTTGAACATGTTACAGGCAGGCACAGACACCACATCCAGCACTGTGCAATGGCCATCGCAGAGCTAATCCGACAACCT		1008
E I L I R A Q K E I D S V V G R D R L V T E L D L S K L		353
GAAATCCTAATCCGTGCCCAAAAAGAGATTGATTCAAGTTGTTGGGCAGAGATAGGCTCGTAACAGAGTTAGATTTAAGCAAACCT		1092
P Y L Q A I V K E T F R L H S S T P L S L P R I A T Q S		381
CCCTACCTTCAAGCTATAGTCAAGGAGACCTTCGGCTCCACTCTTCTACACCTCTCTCCCTTCCACGGATTGCAACTCAAAGT		1176
C E I N G Y H I P K G A T L L V N V W A I A R D P D V W		409
TGCGAAATCAACGGCTACCACATCCCCAAGGGCGTACCCTTTTGTTAACGTATGGGCCATTGCTCGGGATCCCAGCTTTGG		1260
A D P L S F R P E R F L P G S E K E N V D V K G N D F E		437
GCTGATCCCCTCTCTTTCCGCCCTGAGAGGTTTCTTCCCGGGTCTGAAAAAGAGAATGTTGATGTTAAGGGTAATGACTTTGAG		1344
L I P F G A G R R I C A G M S L G L R M V Q L L T A T L		465
CTCATACCATTGTTGTCGGGACGGAGGATATGCGCCGGGATGAGCCTAGGGCTACGCATGGTTCAATGCTCACTGCGACTCTT		1428
	<ATGCGTACCAAGTTAACGAGTGACGCTGA<AA	
	5'G3	
L H A F N W D L P Q G Q I P Q E L N M D E A Y G L T L Q		493
CTTCACGCCCTTAAATGGGATCTCCGCAAGGTCAAATACCCAGGAGCTAAATATGGACGAGGCTTATGGACTCACACTTCAA		1512
GAAGTGCAGAAATTAACCCTAGAAGGCGTTCCAGTTT 5'G2		
R A S P L H V R P R P R L P S H L Y *		511
AGAGCTTACCTTTACATGTGCGCCACGTCCAAGGCTACCTCTCATTTGTATTGATCTATAACTTGAATTTTCATGTCATGTT		1596
TCTCGAAGTGAAATGTACA <GGTGCAGGTTCCGATGGGAGAGTAAACATATCGCGA EBSt681		
	5'G1	
TTGTAATGGCTGGATTAATAAAATTCATCACTTGTAACTACAAAAGTAGATAGCTAGTTGCGTGTGTTATGATGATGATATTTT		1680
GCTGTACTGTAAAAA		1704

cDNA 1704 Nukleotide

Offener Leserahmen: Start 34 - Stop 1569

Codierender Bereich: 1533 Nukleotide = 511 Aminosäurereste

5'-RACE-Primer: 5'G1, 2 und 3

End-to-end Primer: EPst und EBSt681

**Nukleotidsequenz und offener Leserahmen von *CYPL4pHT*  $\cong$  Flavonoid 3'-Hydroxylase aus *Matthiola incana* CYP75B7 (Acc.: AF313491).**

M T T L I L T I L L A T F L S L F I F F L L	22
AGAAAAACACAAAACACTATGACTACTCTCATCCTCACAATCCTACTCGCCACTTTCCTCTCCCTCTTCATCTTCTTCTTCTGCT	84
EXba <b>TCTAGAATGACTACTCTCATCCTCACAATCCTACTC</b>	
R R N R N R N H R L P P G P N P W P I V G N L P H M G P	50
CCGCCGAACCGCAACCGCAACCACCGTCTCCACCAGGCCCAAACCCATGGCCTATAGTCGAAACCTCCCTCACATGGGACC	168
K P H Q T L A A M V T T Y G P I L H L R L G F V N V V V	78
TAAACCTACCAAACCCTAGCCGCTATGGTAACCACCTACGGCCCAATCCTCCACCTCCGCTTAGGGTTCGTCAACGTTGTCTGT	252
A A S K S V A E Q F L K I H D A N F A S R P P N S G A K	106
CGCCGCTCTAAATCCGTGGCAGAGCAGTTCTTGAATCCATGACGCCAATTTTCGCAAGCCGACCACAAACTCCGGAGCCAA	336
H I A Y N Y Q D L V F A P Y G Q R W R M L R K I S S V H	134
ACACATAGCTTATAACTACCAAGATCTTGTCTTTGCGCCTTACGGACAAAGATGGAGAATGTTGAGGAAGATTAGTCTGTGTCA	420
L F S A K A L E D F K H V R Q E E I G R L T R E V A R A	162
TTTTTTTTTCAGCTAAGGCCCTAGAAGATTTCAAACATGTTTCGACAGGAAGAGATTGGAAGGCTTACGCGCAGGTTAGCGCGTGC	504
D T K P V N L G Q L V N M C V V N A L G R E M I G R R L	190
AGACACAAAACCCGTGAACCTTAGGCCAATTGGTGAACATGTGTGTAGTTAACGCGCTTGGCAGAGAGATGATCGGACGTCGACT	588
F G D G A D H K A E E F R S M V T E M M A L A G V F N V	218
ATTCGGCGCAGCGGAGCCGATCACAAGCGGAAG <b>GAATTC</b> CGCATCAATGGTTACCGAAATGATGGCTCTCGCCGGAGTATTCAACGT	672
Eco RI	
G D F V P A L D W L D L Q G V A G K M K R L H K R F D A	246
CGGCGATTTTCGTGCCGCGCTTGTATTGGTTAGATCTACAAGCGTCGCCGTTAAATGAAACGGCTTCACAAGAGATTCGACGC	756
F L S S I L K E H E I N N G G D Q K H T D M L T T L I S	274
TTTTCTATCGTCGATTTTGAAGAGCAGGATTAATAACGGTGGAGATCAAAGCATAAGATATGCTTACTACTTTAATCTC	840
L K G T D F D G D G A S I T D T E I K A L L L N M F T A	302
ACTTAAAGGAAGTATTTTACGGGTGACGGAGCAAGTATCACGGACACTGAGATCAAAGCCTTGCATTGAACATGTTCCACAGC	924
G T D T S A S T V D W A I A E L I R H P H I M K R T Q E	330
TGGAAGTACACGTCAGCAAGTACGGTAGACTGGGCAATAGCTGAACATCCGTCATCCGCATATAATGAAGCGAACCCAAAGA	1008
E L D A V V G R N R P I N E S D L S R L P Y L Q A V I K	358
AGAAGTTCGTCGGTGTGGCCGTAATAGGCCATTAAACAGTACAGACCTTTCTCGGCTTCTTACCTTACGGCGGTTATCAA	1092
E N F R L H P P T P L S L P H I A A E S C E I N G Y H I	386
AGAGAATTTTCAGGCTACATCCACCAACACCACTCTCGTTACCACACATCGCAGCAGAGAGCTGTGAGATCAACGGCTATCATAT	1176
P K G S T L L T N I W A I A R D P E Q W S D P L A F R P	414
CCCGAAAGGATCGACATTTAACAACATATGGGCCATAGCACGTGACCCGGAACAATGGTCCGACCCGTTAGCGTTTCGACC	1260
E R F L P G G E K F G V D V K G S D F E L I P F G A G R	442
CGAGAGATTTCTACCCGTTGGAGAAAAATTCGGAGTCGATGTGAAAGGAAGCGATTTTCGAACTAATACCGTTTCGGAGCGGGGAG	1344
R I C A G L S L G L R T I Q L L T A T L V H G F E W E L	470
GAGAATCTGTGCAGGCTGAGTTTAGGGTTACGGACGATTGAGTTGCTGACAGCGACGCTGGTTCATGGATTGAATGGGAATT	1428
A G G V T P E K L N M E E T Y G I T V Q R A V P L I V H	498
GGCCGAGGAGTTTACCCGAGAGAAGCTGAATATGGAGGAGACATATGGGATTACTGTGCAAAGAGCGGTTCCCTTTGATTGTGCA	1512
<b>&lt;TTCGACTTATACCTCCTCTGTATAC 5'G3</b> <b>&lt;AAACTAACACGT</b>	
P K P R L A L N V Y G V G S G *	513
TCCTAAGCCTAGGTTGGCTCTGAATGTTTATGGAGTTGGATCGGGTTAAATGGGAGTTTTTGGTTGCCTGAGAAGGTTGATCTT	1596
<b>AGGATTCG 5'G2</b> <b>&lt;AGACTTACAAATACCT 5'G1</b>	
<b>&lt;TACAAATACCTCAACCTAGCCCAATTTACCCCTCGAG</b> ESac	
GCACCGTGGAAATTAATAAGCTTATTAAGTTC <b>GAATTC</b> CTTAAAAAATAAGTCTAAAAATCAAGTAATTATTGAAATATGGTGAAT	1680
Eco RI	
TTTGTTCAGATTTGTACCTATTATGTTATGTTGTTTTTTTGGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1748

cDNA 1748 Nukleotide

Offener Leserahmen: Start 19 - Stop 1561

Codierender Bereich: 1539 Nukleotide = 513 Aminosäurereste

5'-RACE-Primer: 5'G1, 2 und 3

End-to-end Primer: EXba und ESac





	<b>C</b>	<b>D</b>	
<b>F3',5'H <i>Callistephus chinensis</i></b>	LLVNIWAIAGRHEVWTDPLEFR <b>PTRF</b> LPGGGEKPGIVVKVNDFEVLP <b>FGAG</b>		440
F3'H <i>Callistephus chinensis</i>	LLVNVWAIARDPKMWTNPLEFR <b>PSRF</b> LPGGGEKPDADIKGNDFEVI <b>PFAG</b>		448
F3'H <i>Petunia hybrida Ht1</i>	LLLVWAIARDPNAWADPLEFR <b>PERF</b> LPGGGEKPKVDVRGNDFEVI <b>PFAG</b>		443
F3'H <i>Pelargonium zonale</i>	LLVNVWAIARDPDVWADPLSFR <b>PERF</b> LPGSEKENVDVKGNDFELI <b>PFAG</b>		444
F3'H <i>Arabidopsis thaliana</i>	LLTNIWAIARDPDQWSDPLAFK <b>PERF</b> LPGGGEKSGVDVKGSDFELI <b>PFAG</b>		441
F3'H <i>Matthiola incana</i>	LLTNIWAIARDPEQWSDPLAFR <b>PERF</b> LPGGGEKFGVDVKGSDFELI <b>PFAG</b>		441
	** *:*:*:*.*.*.* *:::** *:* *:*:*:*.*.* *::.*:*:*:*:*:*		
<b>F3',5'H <i>Callistephus chinensis</i></b>	<b>RRICAG</b> MSLALRTVQLLMGTLVQAFDWELANGIKPEKLNMEAFGLSVQR		490
F3'H <i>Callistephus chinensis</i>	<b>RRICAG</b> MSLGMVMVQLLIATLVQTFDWELANGLDPEKLNMEAYGLTLQR		498
F3'H <i>Petunia hybrida Ht1</i>	<b>RRICAG</b> MNLSGIRMVQLMIATLIHAFNWDLVSGQLPEMLNMEAYGLTLQR		493
F3'H <i>Pelargonium zonale</i>	<b>RRICAG</b> MSLGLRMVQLLTATLLHAFNWDLPQQQIPQELNMEAYGLTLQR		494
F3'H <i>Arabidopsis thaliana</i>	<b>RRICAG</b> LSLGLRTIQFLTATLVQGFDFWELAGGVTPPEKLNMEESYGLTLQR		491
F3'H <i>Matthiola incana</i>	<b>RRICAG</b> LSLGLRTIQLLTATLVHGFDFWELAGGVTPPEKLNMEETYGITVQR		491
	*****.*.*.* *:::** *:*:* * *:* *:*:*:*:*:*:*		
<b>F3',5'H <i>Callistephus chinensis</i></b>	AEPLVVHPRPRLPPHVYKSG--	510	
F3'H <i>Callistephus chinensis</i>	AEPLMVHPRPRLSPHVYESR--	518	
F3'H <i>Petunia hybrida Ht1</i>	ADPLVVHPRPRLAQAYIG---	512	
F3'H <i>Pelargonium zonale</i>	ASPLHVRPRLPSHLY-----	511	
F3'H <i>Arabidopsis thaliana</i>	AVPLVVHPKRLAPNVYGLGSG	513	
F3'H <i>Matthiola incana</i>	AVPLIVHPKRLALNVYGVGSG	513	
	* ** *:*:*:* * : *		

\* = identische AS. : = konservierte AS. · = halbkonservierte AS. **I** = prolinreiche Region. **II** = 22 AS umfassende Region, die möglicherweise mit der 5'-Hydroxylierung im Zusammenhang steht. **III** = putative Substratbindungsregion der F3'- und der F3',5'H. **A-D** = hoch konservierte Protein-Domänen pflanzlicher CYP-Enzyme der A-Gruppe (weitere Erläuterung unter D.5).







F3',5'H <i>Eustoma russellianum</i>	KRVFGSQ-----GSENEFKDMVVELMTVAGYFNIGDFIPISIAWMD	235
F3',5'H <i>Eustoma grandiflorum</i>	KRVFGSQ-----GSENEFKDMVVELMTVAGYFNIGDFIPISIAWMD	235
F3',5'H <i>Gentiana triflora</i>	RRVFNKK-----GAKNEFKDMVVELMTSAGYFNIGDFIPISIGWMD	239
F3',5'H <i>Catharanthus roseus</i>	RRVFNKK-----SLESNEFKDMVVELMTTAGYFNIGDFIPISIAWMD	236
F3',5'H <i>Petunia hybrida Hf1</i>	KRVFVVK-----GVEVNEFKDMVVELMTIAGYFNIGDFIPCLAWMD	231
F3',5'H <i>Petunia hybrida Hf2</i>	KRVFVVK-----GVEVNEFKDMVVELMTTAGYFNIGDFIPCLAWMD	231
F3',5'H <i>Solanum melongena</i>	KRVFVEK-----GKEVNEFKDMVVELMTVAGYFNIGDFIPQIAWMD	234
F3',5'H <i>Lycianthes rantonnetii</i>	KRVFVEK-----GAEVNEFKDMVVELMTVAGYFNIGDFIPQIAWMD	235
F3',5'H <i>Campanula medium</i>	RRPFVITSKLDSSASASASVSEFYQVMVEMELMRMAGLFNIGDFIPYIAWMD	247
F3'H <i>Arabidopsis thaliana</i>	RRLFG-----ADADHKADEFKSMVTEMMALAGVFNIGDFVPSLDLWLD	230
F3'H <i>Matthiola incana</i>	RRLFG-----DGADHKAEEFRSMVTEMMALAGVFNIGDFVPSLDLWLD	229
F3'H <i>Pelargonium zonale</i>	KKVFKDG-----TDDVDPKAEDEFKSMVVELMVLAVFNIGDFIPPLDCLD	233
<b>F3',5'H <i>Callistephus chinensis</i></b>	KRVFVNEK-----GGD--DPKANEFKEMATELMFLAGQFNIGDYIPVLDLWLD	232
F3'H <i>Callistephus chinensis</i>	RRVFADGS---EGRGVDPKAEDEFKDMVVELMELAGEFNIGDFIPPLDCLD	233
F3'H <i>Petunia hybrida Ht1</i>	KRVFADGS---GDV--DPQAAEFKSMVVEMMVAVGFNIGDFIPQIAWMD	233
	:: * . . :*: *.* ** **::**::* : *	
F3',5'H <i>Eustoma russellianum</i>	LQGIQGGMKRLHKKFDALLTRLLEEHTASAHERK-GSPDFLDFVVAN-GD	283
F3',5'H <i>Eustoma grandiflorum</i>	LQGIQGGMKRLHKKFDALLTRLLEEHTASAHERK-GSPDFLDFVVAN-RD	283
F3',5'H <i>Gentiana triflora</i>	LQGIQGGMKRLHKKFDVLLTRLDDHDKRTSQERK-QKPDFLDFVIAN-GD	287
F3',5'H <i>Catharanthus roseus</i>	LQGIQGGMKRLHKKFDALLTKMLEEHKSSSHKPK-EKPDFLDYVLAN-RD	284
F3',5'H <i>Petunia hybrida Hf1</i>	LQGIQGGMKRLHKKFDALLTKMFDEHKATYERK-GKPDFLDVVMEN-GD	279
F3',5'H <i>Petunia hybrida Hf2</i>	LQGIQGGMKRLHKKFDALLTKMFDEHKATSYERK-GKPDFLDVVMEN-RD	279
F3',5'H <i>Solanum melongena</i>	LQGIQGGMKRLHKKFDALLTKMFDEHEATSNERK-GKPDFLDFIMAN-RD	282
F3',5'H <i>Lycianthes rantonnetii</i>	LQGIQGGMKRLHKKFDALLTKMFDEHKATYNERK-GKPDFLDVVMAN-RD	283
F3',5'H <i>Campanula medium</i>	LQGIQGGMKRLHKKFDVLLLNKMIKEHTESAHRK-DNPDFLDLMAATQE	296
F3'H <i>Arabidopsis thaliana</i>	LQGVAGKMKRLHKKRFDALFLSSILKEHEMN-GQDQ-KHTDMLSTLISLKG	278
F3'H <i>Matthiola incana</i>	LQGVAGKMKRLHKKRFDALFLSSILKEHEINNGGDQ-KHTDMLSTLISLKG	278
F3'H <i>Pelargonium zonale</i>	LQGVAGKMKRLHKKRFDALFLSAILQEHNNIN-SAAS-ATPSMLTTLISLKDS	281
<b>F3',5'H <i>Callistephus chinensis</i></b>	LQGIQGGMKRLHKKRFDALFLVILDEHKVIASG---HIDMLSTLISLKDD	278
F3'H <i>Callistephus chinensis</i>	LQGIQGGMKRLHKKRFDALFLVILDEHKVIASG---HIDMLSTLISLKDD	283
F3'H <i>Petunia hybrida Ht1</i>	LQGVAAKMKRLHKKRFDALFLVILEEHKGIKIFG---EMKDLSTLISLKN	280
	::** : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<b>III A</b>		
F3',5'H <i>Eustoma russellianum</i>	NSEGER---LQTVNIKALLNMFAGTDTSSSVIEWALAEELLKNPIILR	329
F3',5'H <i>Eustoma grandiflorum</i>	NSEGER---LHTVNIKALLNMFAGTDTSSSVIEWALAEELLKNPIILK	329
F3',5'H <i>Gentiana triflora</i>	NSDGER---LNTDNIKALLNMFAGTDTSSSVIEWALAEELLKNRITLLT	333
F3',5'H <i>Catharanthus roseus</i>	NSEGER---LTTTNIKALLNMFAGTDTSSSVIEWAISEMLKNPTILK	330
F3',5'H <i>Petunia hybrida Hf1</i>	NSEGER---LSTTNIKALLNMFAGTDTSSSVIEWALAEEMKNPAILK	325
F3',5'H <i>Petunia hybrida Hf2</i>	NSEGER---LSTTNIKALLNMFAGTDTSSSVIEWALAEEMKNPAILK	325
F3',5'H <i>Solanum melongena</i>	NSEGER---LSITNIKALLNMFAGTDTSSSVIEWALTEMMKNPTIFK	328
F3',5'H <i>Lycianthes rantonnetii</i>	NSEGER---LSTTNIKALLNMFAGTDTSSSVIEWALAEEMKNPQILK	329
F3',5'H <i>Campanula medium</i>	NTEGIQ---LNLVNVKALLLDLFTAGTDTSSSVIEWALAEMLNHRQILN	342
F3'H <i>Arabidopsis thaliana</i>	DLDDG--GSLTDTTEIKALLNMFAGTDTSSASTVDWAIABLIRHPDIMV	326
F3'H <i>Matthiola incana</i>	DFDGD--ASITDTTEIKALLNMFAGTDTSSASTVDWAIABLIRHPHIMK	326
F3'H <i>Pelargonium zonale</i>	VEDSEG--GKLTDTTEIKALLNMFAGTDTSSSTVEWAIABLIRQPEILI	329
<b>F3',5'H <i>Callistephus chinensis</i></b>	TSVDG--RKPSDIEIKALLLELFAAGTDTSSSTVEWAIABLIRQPHLLK	325
F3'H <i>Callistephus chinensis</i>	DAADDEEGKLSDIEIKALLNMFAGTDTSSSTVEWAVAEILRHPPELLK	333
F3'H <i>Petunia hybrida Ht1</i>	DADNDG--GKLTDTTEIKALLNMFVAGTDTSSSTVEWAIABLIRNPKILA	328
	::*****:*.*****:.. :*****:.. : ..	
<b>B</b>		
F3',5'H <i>Eustoma russellianum</i>	RAQEEMDQVIGRDRRFLEADISKLPYLQAICK <b>EAFR</b> KHPSTPLNLPR-IA	378
F3',5'H <i>Eustoma grandiflorum</i>	RAQEEMDQVIGRDRRFLEADISKLPYLQAICK <b>EAFR</b> KHPSTPLNLPR-IA	378
F3',5'H <i>Gentiana triflora</i>	RAQEMDRVIGRDRRLLESIPNLPYLQAICK <b>ETFR</b> KHPSTPLNLPRNCI	383
F3',5'H <i>Catharanthus roseus</i>	RAQEEMDQVIGRDRRLMESDIPKLPYLQAICK <b>ETFR</b> KHPSTPLNLPR-IA	379
F3',5'H <i>Petunia hybrida Hf1</i>	KAQAEQDQVIGRDRRLLESIPNLPYLRAICK <b>ETFR</b> KHPSTPLNLPR-IS	374
F3',5'H <i>Petunia hybrida Hf2</i>	KAQAEQDQVIGRDRRLLESIPNLPYLRAICK <b>ETFR</b> KHPSTPLNLPR-IS	374
F3',5'H <i>Solanum melongena</i>	KAQAEQDQVIGRDRRLLESIPNLPYLRAICK <b>EAFR</b> KHPSTPLNLPR-VS	377
F3',5'H <i>Lycianthes rantonnetii</i>	KVQAEQDQVIGRDRRLLESIPNLPYLRAICK <b>ETFR</b> KHPSTPLNLPR-IS	378
F3',5'H <i>Campanula medium</i>	RAHEEMDQVIGRDRRLLESIPNLPYFQAICK <b>ETFR</b> KHPSTPLNLPR-IS	391
F3'H <i>Arabidopsis thaliana</i>	KAQAEQDQVIGRDRRLLESIPNLPYLRAICK <b>ENFR</b> LHPSTPLSLPH-IA	375
F3'H <i>Matthiola incana</i>	RTQAEELDAVGRNRPINESDLRSLPYLQAVIK <b>ENFR</b> LHPSTPLSLPH-IA	375
F3'H <i>Pelargonium zonale</i>	RAQKEIDSVVGRDRRLVTELDLQAVIK <b>ETFR</b> LHSSSTPLSLPR-IA	378
<b>F3',5'H <i>Callistephus chinensis</i></b>	RAQEEMDSVVGQNRRLVTEMDLSQLTFLQAVIK <b>EAFR</b> LHPSTPLSLPR-IA	374
F3'H <i>Callistephus chinensis</i>	QAREEMDIVVGRDRRLVTELDLQAVIK <b>ETFR</b> LHPSTPLSLPR-MA	382
F3'H <i>Petunia hybrida Ht1</i>	QAQAEQDQVIGRDRRLVTELDLQAVIK <b>ETFR</b> LHPSTPLSLPR-IA	377
	::: *:* :*:* :* : * : * : * : * : * : *	



## G.5 Beschreibung der für die Nukleinsäure- und Proteinalignments verwendeten CYP-Enzyme

CYP	Funktion	Herkunft	Accession-Nr.	Referenz
CYP75A1	F3',5'H	<i>Petunia hybrida</i>	Z22544	Holton et al., 1993
CYP75A2	F3',5'H	<i>Solanum melongena</i>	X70824	Toguri et al., 1993
CYP75A3	F3',5'H	<i>Petunia hybrida</i>	Z22545	Holton et. al., 1993
CYP75A4	F3',5'H	<i>Gentiana triflora</i>	D85184	Tonaka et al., 1996
CYP75A5	F3',5'H	<i>Eustoma grandiflorum</i>	U72654	Nielsen, K.M. and Podivinsky, E. 1997
CYP75A6	F3',5'H	<i>Campanula medium</i>	D14590	Shimada, Y. 1993; unveröffentlicht
CYP75A7	F3',5'H	<i>Eustoma russellianum</i>	D14589	Shimada et al., 1999
CYP75A8	F3',5'H	<i>Catharanthus roseus</i>	AJ011862	Kaltenbach et al., 1999
CYP75A9	F3',5'H	<i>Lycianthes rantonnetii</i>	AF313490	Eder, C.M. and Forkmann, G., 2000 unveröffentlicht
CYP75B1	F3'H	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AL133421	Schoenbohm et al. 2000
CYP75B2	F3'H	<i>Petunia hybrida</i>	AF155332	Brugliera et al., 1999
CYP75B5	<b>F3',5'H</b>	<i>Callistephus chinensis</i>	AF313489	Eder, C.M. and Forkmann, G., 2000 unveröffentlicht
CYP75B6	F3'H ?	<i>Callistephus chinensis</i>	AF313488	Eder, C.M. and Forkmann, G., 2000 unveröffentlicht
CYP75B7	F3'H	<i>Matthiola incana</i>	AF313491	Eder, C.M. and Forkmann, G., 2000 unveröffentlicht
CYP75B8	F3'H	<i>Pelargonium x hortorum</i> ( <i>Pelargonium zonale</i> )	AF315465	Eder, C.M. and Forkmann, G., 2000 unveröffentlicht

## Danksagung

Bei allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben möchte ich mich sehr bedanken, besonders bei ...

Herrn Prof. Dr. Gert Forkmann für die Bereitstellung des Themas und seine immerwährende Gesprächs- und Hilfsbereitschaft.

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

den Lehrstuhlsekretärinnen Frau Erna Look und Frau Waltraud Deragisch, die immer außergewöhnlich freundlich und hilfsbereit waren.

dem Gärtnerteam unter der Leitung von Gärtnermeister Richard Dinkel für die Betreuung der Versuchspflanzen.

Florian Steinbacher für seine freundliche und bereitwillige Hilfe bei DV-Angelegenheiten.

allen meinen Kollegen für ihre Unterstützung, vor allem bei Stefan für die großzügige Bereitstellung von Literatur und der Hilfe bei den Enzymtests. Bei Christian, der mir in der ebenfalls sehr bei den Enzymtests behilflich war. Bei Thilo, der mir äußerst liebenswürdig und bereitwillig bei der Korrektur des Manuskripts geholfen hat und dessen Anregungen, Ratschläge und Verbesserungsvorschläge unbezahlbar waren.

Dirk, ohne Ihn wäre es ziemlich hart geworden.

Stefan Pokorny für seine Anteilnahme und sein Verständnis während meiner DV-Ausbildung.

meiner Freundin Katrin und meiner Familie.



## Lebenslauf

**Name:** Eder  
**Vorname:** Christian Markus  
**Anschrift:** Freisingerstraße 60  
85410 Haag  
Tel.: 08167/6050  
**Geburtsort:** Düsseldorf  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch  
**Familienstand:** ledig  
**Eltern:** Mutter: Annemarie Eder, geb. Schumacher, Friseurmeisterin i. R.  
Vater: Joseph Eder, Dipl. Bauingenieur, verstorben am 24.05.1987  
**Geschwister:** ein zweieinhalb Jahre älterer Bruder, Stefan Eder, Softwareentwickler

### Berufsausbildung und Studium:

1973-1977 Grundschole: St. Peter, Neuss-Rosellen  
1977-1986 Gymnasium: Nelly-Sachs-Gymnasium Neuss  
1986-1988 Zivildienst beim Mobilen Sozialen Dienst der Arbeiterwohlfahrt in Düsseldorf  
1989-1996 Studium der Biologie (Diplom), Carl von Ossietzky Universität Oldenburg  
1996 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Paläomikrobiologie: Chemotaxis bei sulfatreduzierenden Bakterien  
10/1996-4/2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau der Technischen Universität München  
10/2000-7/2001 Ausbildung zum objektorientierten Software-Entwickler mit SUN/Java-Zertifizierung