

**Technische Universität München**  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
Lehrstuhl für Zierpflanzenbau

## **Klonierung und Charakterisierung von Flavonoidgenen aus *Osteospermum***

**Christian Seitz**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. G. Wenzel  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. G. Forkmann  
2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl  
3. Priv.-Doz. Dr. R. A. Tórres Ruiz

Die Dissertation wurde am 07.09.04 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 15.12.04 angenommen.

**Aus der vorliegenden Arbeit ging folgende Veröffentlichung hervor:**

SEITZ C, HAUSER A, FORKMANN G und MARTENS S (2004) Cloning and heterologous expression of flavonoid genes of *Osteospermum* hybrids. *Acta Hort.* 651: 107-114

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

„10. Treffen der AG Zierpflanzen“, Berlin-Dahlem, Deutschland, 01.-02.10.2002

„40. Gartenbauwissenschaftliche Tagung“, Freising/Weihenstephan, Deutschland, 26.-28.02.2003

„21st International EUCARPIA Symposium on Classical versus Molecular Breeding of Ornamentals, Freising/Weihenstephan, Deutschland, 25.-29.08.2003

Inhaltsverzeichnis	Seite
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>VI</b>
<b>A. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>A.1 Flavonoide - Biosynthese und Funktionen.....</b>	<b>2</b>
A.1.1 Allgemeine Flavonoidbiosynthese.....	2
A.1.2 Determimierung des Anthocyanmusters.....	5
A.1.3 Bedeutende Seitenwege in Zusammenhang mit der Flavonoidbiosynthese.....	6
A.1.5 Subzelluläre Organisation der Flavonoidbiosynthese.....	7
A.1.4 Ursprung von Flavonoidenzymen.....	9
A.1.5 Funktionen von Flavonoiden in Pflanzen.....	9
A.1.6 Anthocyane als Locksignale.....	12
A.1.7 Gentechnische Modifikation der Flavonoidbiosynthese.....	13
<b>A.2 Flavonoidbiosynthese in <i>Osteospermum</i>.....</b>	<b>15</b>
A.2.1 <i>Osteospermum</i> als Zierpflanze.....	15
A.2.2 Postulierte Flavonoidbiosynthese.....	16
<b>A.3 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>17</b>
<b>B. Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
<b>B.1 Material.....</b>	<b>19</b>
B.1.1 Pflanzenmaterial.....	19
B.1.2 Geräte.....	19
B.1.3 Firmen.....	20
B.1.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	20
B.1.5 Substrate, Cosubstrate und Radiochemikalien.....	21
B.1.6 Chromatographiesysteme.....	21
B.1.7 Puffer und sonstige Lösungen.....	21
B.1.8 Enzyme und Proteine.....	22
B.1.9 Reaktionssysteme und Kits.....	22
B.1.10 Bakterien- und Hefestämme.....	22
B.1.11 Vektoren.....	23
B.1.12 Bakterien- und Hefemedien.....	23
<b>B.2 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>24</b>
B.2.1 Transformation von Mikroorganismen.....	24
B.2.2 Präparation von Plasmid-DNA und Gesamt-RNA.....	24
B.2.3 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäure.....	25
B.2.4 Reverse Transkription.....	25
B.2.5 PCR-Methoden.....	25
B.2.5.1 Synthetische Oligonukleotide.....	25
B.2.5.2 Standard PCR.....	26

B.2.5.3	Konstruktion chimärer Gene.....	26
B.2.5.4	<i>Colony</i> -PCR.....	27
B.2.5.5	RACE-PCR.....	27
B.2.5.6	Klonierungen in Vektoren.....	28
B.2.5.7	DNA-Sequenzierung.....	28
<b>B.3</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>28</b>
B.3.1	Heterologe Genexpression in Hefe.....	28
B.3.2	Bestimmung des Gesamtproteingehalts.....	29
B.3.3	Synthese von radioaktiv markierten Flavonoiden.....	29
B.3.4	Standardenzymtest.....	29
B.3.5	Radioaktivitätsmessung.....	30
<b>B.4</b>	<b>Computergestützte Analyse von DNA- und</b>	
	<b>Aminosäuresequenzen.....</b>	<b>30</b>
<b>C.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>32</b>
<b>C.1</b>	<b>Klonierung und Expression von Flavonoidgenen aus</b>	
	<b><i>Osteospermum</i>.....</b>	<b>32</b>
C.1.1	Allgemeines Vorgehen.....	32
C.1.2	Klonierung von Flavonoidgenen aus <i>Osteospermum</i> .....	33
C.1.2.1	Klonierung eines putativen <i>full-length</i> CHS cDNA-Klons.....	33
C.1.2.2	Klonierung eines putativen <i>full-length</i> F3'5'H cDNA-Klons.....	34
C.1.2.3	Klonierung eines putativen FHT cDNA-Fragments und <i>full-length</i>	
	FLS cDNA-Klons.....	36
C.1.2.4	Klonierung eines putativen <i>full-length</i> DFR cDNA-Klons.....	37
C.1.2.5	Klonierung eines putativen ANS cDNA-Fragments.....	38
C.1.2.6	Klonierung eines putativen FGT cDNA-Fragments.....	39
C.1.3	Heterologe Expression der vollständigen cDNA-Klone in Hefe.....	40
C.1.3.1	Heterologe Expression des putativen CHS cDNA-Klons.....	40
C.1.3.2	Heterologe Expression des putativen F3'5'H cDNA-Klon.....	40
C.1.3.2.1	Protein- und Zeitabhängigkeit der 3'5'-Hydroxylierung <i>in-vitro</i> .....	41
C.1.3.2.2	Substratspezifität der F3'5'H <i>in-vitro</i> .....	43
C.1.3.3	Heterologe Expression des putativen FLS cDNA-Klons.....	44
C.1.3.4	Heterologe Expression des putativen DFR cDNA-Klons.....	44
<b>C.2</b>	<b>Untersuchungen zur Phylogenie von F3'H und F3'5'H und zur</b>	
	<b>molekularen Basis ihres Funktionsunterschieds.....</b>	<b>45</b>
C.2.1	Sequenzvergleich der <i>Osteospermum</i> F3'5'H mit anderen cDNAs von	
	F3'H und F3'5'H.....	46
C.2.2	Phylogenetische Verwandtschaft der F3'H und F3'5'H.....	47
C.2.3	Evolutionsrate der Asteraceae F3'5'Hs.....	49
C.2.4	Konstruktion chimärer Gene aus cDNA-Fragmenten von F3'H und	
	F3'5'H.....	51
C.4.1	Identifizierung unterschiedlicher Aminosäuren als Grundlage für die	
	Konstruktion chimärer Gene.....	51
C.4.2	Konstruktion und heterologe Hefeexpression chimärer Gene.....	52

<b>C.3 Untersuchungen zu der Substratspezifität der DFR und ihrer molekularen Basis.....</b>	<b>54</b>
C.3.1 Konstruktion chimärer Gene aus cDNA-Fragmenten der DFRs aus <i>Fragaria</i> und <i>Osteospermum</i> .....	55
C.3.2 Untersuchungen zur Substratspezifität der DFR <i>in-vitro</i> .....	56
C.3.3 Molekulare Basis der Substratspezifität der DFR.....	58
C.3.3.1 Phylogenetische Verwandtschaft der DFR.....	58
C.3.3.2 Sequenzvergleich zur Identifizierung putativ für die Substratspezifität der DFR entscheidender Aminosäuren.....	60
C.3.4 Evolutionsrate der DFR.....	62
<b>D. Diskussion.....</b>	<b>64</b>
<b>D.1 Die Determinierung des Flavonoidmusters in <i>Osteospermum</i>.....</b>	<b>64</b>
D.1.1 Klonierung von Flavonoidgenen aus <i>Osteospermum</i> .....	65
D.1.2 Funktion und Substratspezifität der Schlüsselenzyme.....	66
D.1.2.1 Chalkonsynthase.....	66
D.1.2.2 Flavonoid 3'5'-Hydroxylase.....	67
D.1.2.3 Dihydroflavonol 4-Reduktase.....	70
D.1.2.4 Flavonolsynthase.....	72
D.1.3. Möglichkeiten und Grenzen der heterologen Hefeexpression.....	73
<b>D.2 Evolution von F3'H und F3'5'H und molekulare Basis ihres Funktionsunterschieds.....</b>	<b>76</b>
D.2.1 Sonderstellung der Asteraceae F3'5'Hs in der Evolution von F3'H und F3'5'H.....	77
D.2.2 Molekulare Basis des Funktionsunterschieds von F3'H und F3'5'H.....	82
<b>D.3 Molekulare Basis und Evolution der Substratspezifität der DFR.....</b>	<b>86</b>
<b>D.4 Ausblick.....</b>	<b>90</b>
<b>E. Zusammenfassung.....</b>	<b>93</b>
<b>E. Summary.....</b>	<b>95</b>
<b>F. Literatur.....</b>	<b>97</b>
<b>G. Anhang.....</b>	<b>112</b>
G.1 Genunspezifische und partiell degenerierte Primer.....	112
G.2 Nukleotidsequenz und offener Leserahmen der <i>full-length</i> cDNA-Klone.....	113
G.3 Nukleotidsequenz und offener Leserahmen der cDNA-Fragmente.....	117
G.4 Nukleotidsequenz und offener Leserahmen der konstruierten chimären cDNAs.....	120
G.5 Verwendete Sequenzen.....	125
<b>Danksagung.....</b>	<b>127</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>128</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. A1:</b>	Flavonoid-Grundgerüst.....	2
<b>Abb. A2:</b>	Schematische Darstellung der Flavon-, Flavonol- und Anthocyanbiosynthese.....	4
<b>Abb. A3:</b>	Wichtige auf Seitenwegen gebildete Flavonoidklassen.....	6
<b>Abb. A4:</b>	Schematisches Modell einer möglichen metabolischen Organisation der Phenylpropan- und Flavonoidbiosynthese.....	8
<b>Abb. A5:</b>	Arten von <i>Osteospermum</i> am Naturstandort.....	15
<b>Abb. A6:</b>	Postulierte Flavonoidbiosynthese in <i>Osteospermum</i> .....	16
<b>Abb. B1:</b>	<i>Osteospermum</i> -Hybrida „Bamba“ .....	19
<b>Abb. B2:</b>	Hefeexpressionsvektor pYes2.1.....	23
<b>Abb. C1:</b>	Schematische Darstellung der Strategie bei der Klonierung des CHS cDNA-Klons.....	33
<b>Abb. C2:</b>	Schematische Darstellung der Strategie bei der Klonierung des F3'5'H cDNA-Klons.....	35
<b>Abb. C3:</b>	Schematische Darstellung der Strategie bei der Klonierung des FLS cDNA-Klons.....	36
<b>Abb. C4:</b>	Schematische Darstellung der Strategie bei der Klonierung des DFR cDNA-Klons.....	38
<b>Abb. C5:</b>	Schematische Darstellung der Strategie bei der Klonierung des ANS cDNA-Fragments.....	39
<b>Abb. C6:</b>	Aktivität des heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klons <i>OCHS1</i> .....	40
<b>Abb. C7:</b>	Aktivität des heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klons <i>OF3'H1</i> .....	41
<b>Abb. C8:</b>	Protein- und Zeitreihen mit rekombinantem Protein des cDNA-Klons <i>OF3'H1</i> .....	42
<b>Abb. C9:</b>	Aktivität des heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klons <i>OFLS1</i> .....	44
<b>Abb. C10:</b>	Aktivität des heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klons <i>ODFR11</i> .....	45
<b>Abb. C11:</b>	Phylogenetischer Stammbaum der bekannten F3'Hs und F3'5'Hs.....	48
<b>Abb. C12:</b>	Enzymtests mit Protein aus der heterologen Hefeexpression chimärer Gene aus cDNA-Fragmenten von F3'H und F3'5'H.....	54
<b>Abb. C13:</b>	Phylogenetischer Stammbaum ausgewählter DFRs.....	59
<b>Abb. C14:</b>	Die putative die Substratspezifität der DFR determinierende Region verschiedener Arten.....	60
<b>Abb. D1:</b>	Schematische Darstellung membrangebundener Cytochrom P450-Proteine.....	76
<b>Abb. D2:</b>	Darstellung der kladistischen Verhältnisse zwischen Gruppen und Untergruppen der Familie der Asteraceae basierend auf morphologischen Merkmalen.....	78

<b>Abb. D3:</b>	Schematische Darstellung der konstruierten chimären Gene aus cDNA-Fragmenten der F3'H und F3'5'H.....	82
<b>Abb. D4:</b>	SRS6 der F3'Hs und F3'5'Hs.....	84
<b>Abb. D5:</b>	Alignment der Aminosäuresequenzen der DFR aus <i>Osteospermum</i> mit verschiedenen Sequenzen der Galaktose 4-Epimerase.....	87

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. A1:</b>	Zusammenhang der Farbpräferenz des bestäubenden Insekts und dem Vorkommen von Anthocyanidinen.....	13
<b>Tab. B1:</b>	Für Enzymtests verwendete Substrate, Kofaktoren und pH-Werte des Reaktionspuffers.....	30
<b>Tab. C1:</b>	Substratspezifität von <i>OF3'H1</i> -Protein.....	43
<b>Tab. C2:</b>	Substratpräferenz von <i>O3'H1</i> -Protein.....	43
<b>Tab. C3:</b>	Homologie-Matrix der Asteraceae F3'H- und F3'5'H-Sequenzen.....	46
<b>Tab. C4:</b>	Homologie-Matrix der <i>Osteospermum</i> F3'5'H und anderer F3'H und F3'5'H-Sequenzen.....	47
<b>Tab. C5:</b>	Geschätzte Substitutionsraten zwischen F3'Hs und F3'5'Hs aus Asteraceae und der F3'H aus <i>Petunia</i> .....	49
<b>Tab. C6:</b>	Relativer Ratentest mit F3'Hs und F3'5'Hs aus Asteraceae.....	50
<b>Tab. C7:</b>	Unterschiede in der Aminosäuresequenz bei Asteraceae F3'5'Hs im Vergleich mit anderen F3'5'Hs und F3'Hs.....	52
<b>Tab. C8:</b>	Chimäre Gene aus cDNA-Fragmenten der <i>Gerbera</i> F3'H und der <i>Osteospermum</i> F3'5'H.....	53
<b>Tab. C9:</b>	Chimäre Gene aus cDNA-Fragmenten der DFRs aus <i>Fragaria</i> und <i>Osteospermum</i> .....	55
<b>Tab. C10:</b>	Substratspezifität verschiedener DFRs <i>in-vitro</i> mit DHK und DHQ als Substrate.....	57
<b>Tab. C11:</b>	Substratspezifität verschiedener DFRs <i>in-vitro</i> mit DHK, DHQ und DHM als Substrate.....	57
<b>Tab. C12:</b>	pH-Abhängigkeit der Substratspezifität der DFR <i>in-vitro</i> .....	58
<b>Tab. C13:</b>	Geschätzte Substitutionsraten zwischen diverser DFRs und der DFR aus <i>Lilium</i> .....	63

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Acc.	Zugangsnummer (accession number)
ANS	Anthocyanidinsynthase
Ap	Apigenin
AS	Aminosäure
FLS	Flavonolsynthase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C4H	Zimtsäure 4-Hydroxylase
CAW	Chloroform-Eisessig-Wasser
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CHI	Chalkonisomerase
CHS	Chalkonsynthase
CoA	Coenzym A
CPR	Cytochrom P450-Reduktase
Cy	Cyanidin
CYP	Cytochrome P450
dATP	Deoxyadenosin 5'-triphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	Deoxycytidin 5'-triphosphat
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
ERI	Eriodictyol
EtOH	Ethanol

EtOAc	Ethylacetat
F3'H	Flavonoid 3'-Hydroxylase
F3'5'H	Flavonoid -Hydroxylase
FGT	UDPG-Flavonoid-3-O-Glukosyltransferase
FHT	Flavanon 3-Hydroxylase
FLS	Flavonolsynthase
FNS I, II	Flavonsynthase I, II
GSP	genspezifischer Primer
Km	Kaempferol
Lu	Luteolin
LCy	Leucocyanidin
LDp	Leucodelphinidin
LPg	Leucodelphinidin
MeOH	Methanol
mRNA	Boten(messenger)-Ribonukleinsäure
My	Myricetin
NaCl	Natriumchlorid
NADP <sup>+</sup>	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotidphosphat
NADPH	reduzierte Form des NADP <sup>+</sup>
NAR	Naringenin
ORF	Open Reading Frame = offener Leserahmen
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
Pg	Pelargonidin
PHF	Pentahydroxyflavanon
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Qu	Quercetin
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolution per minute)
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U Unit	Enzymaktivität (μmol Substratumsatz/min)

## Einleitung

„The weight of a petal has changed the face of the world and made it ours“ schrieb der Naturforscher und Philosoph EISELEY (1959). Tatsächlich stellt die Entwicklung der Blüte eine revolutionäre Neuerung für den weiteren Gang der Evolution dar. Zu Beginn der Kreidezeit setzt eine massive Diversifikation der Angiospermen ein. Sie werden nach dem Aussterben vieler Pflanzen- und Tierarten, inklusive der Dinosaurier am Übergang zum Tertiär, endgültig zur dominierenden Pflanzengruppe. Direkt verbunden mit dem „buchstäblichen Aufblühen der Blütenpflanzen“ (REICHHOLF, 1994) ist eine explosionsartige Diversifikation der Insekten. Die Insekten treten in eine enge, coevolutionäre Interaktion mit den Pflanzen. Sie sorgen für eine gezielte Übertragung des Pollens und werden mit C-reichem Nektar und N-reichem Pollen belohnt. Die Pflanzen entwickeln spezifische Signale (Farbe, Form, Duft) zur Anlockung der bestäubenden Insekten. Den fraglosen Höhepunkt der wechselseitigen Spezialisierung stellt die Imitation des Bestäubers („Begattungs-Mimikry“) durch manche Orchideenarten dar. Die Ausbreitung der Insekten bereitet die Grundlage für die Ausbreitung der Vögel (REICHHOLF, 1994). Ebenfalls nach dem Aussterben der Dinosaurier beginnt die Entwicklung der Säugetiere. Diese hatten noch längere Zeit als die Vögel (seit dem Trias vor mehr als 220 Millionen Jahren) insbesondere in Form eines spitzmausähnlichen, auf Insektenjagd spezialisierten Tiers im „Schatten der Riesenechsen“ (REICHHOLF, 1994) gelebt. Am Ausgangspunkt der bemerkenswerten Coevolution von Blütenpflanzen, Insekten, Vögeln und Säugetieren steht die Verbreitung von Pollen durch Insekten. Nährstoffreicher Pollen diente als Lockspeise und Belohnung für die „Arbeit“ der Insekten. Die Form und vor allem die gelbe bis bräunliche Farbe des Pollens dürfte dabei als Locksignal gedient haben (OSCHE, 1993). Die Farbe geht auf die neben den Sporopolleninen in die Exine eingelagerten Flavonoide und Carotinoide zurück. Die ursprünglichen Funktionen der Farbstoffe sind mechanische Verfestigung, Schutz vor Pathogenbefall und Schutz der generativen Zelle vor UV-Schäden. Es fand damit eine Funktionserweiterung von der Schutz- zur Signalfunktion statt (OSCHE, 1993). Die Entwicklung eines kontrastierenden Hintergrunds ist als Verstärkung der Signalwirkung zu sehen. Für die wichtige Bestäubergruppe der Hymenopteren (v.a. Bienen, Hummeln) stellt ein purpur bis blau ausgefärbtes Perianth einen attraktiven Hintergrund zum „Pollengelb“ dar. Viele weitere Aspekte

der Blütenevolution lassen sich durch Verstärkung und Imitation dieses Primärsignals verstehen (Darstellung und Literatur in OSCHE, 1993).

## A.1 Flavonoide – Biosynthese und Funktionen

Flavonoide erfüllen in Pflanzen eine Vielzahl an Funktionen. Die allgemeine Flavonoidbiosynthese ist chemisch, biochemisch und molekularbiologisch in weiten Teilen aufgeklärt und charakterisiert. Darauf aufbauende gentechnische Eingriffe lieferten und liefern wichtige Erkenntnisse zu Synthese und Funktion von Flavonoiden.

Eine Reihe an Seitenwegen und eine Vielzahl an Syntheseschritten, welche die Grundstrukturen modifizieren, führen zu einer enormen Vielfalt an Flavonoidderivaten. In „The Handbook of Natural Flavonoids“ von HARBORNE und BAXTER (1999) sind ganze 6467 bekannte Flavonoidstrukturen mit entsprechenden Formeln und Daten zu Vorkommen und biologischer Aktivität aufgeführt.

### A.1.1 Allgemeine Flavonoidbiosynthese

Alle wesentlichen Schritte der allgemeinen Flavonoidbiosynthese sind heute genetisch und biochemisch gut charakterisiert (FORKMANN, 1994; FORKMANN und HELLER, 1999). Grundlegende enzymologische Kenntnisse wurden mit Proteinextrakten von pflanzlichen Zellsuspensionskulturen und insbesondere von chemogenetisch definiertem Pflanzenmaterial gewonnen. Mittlerweile sind alle wichtigen Strukturgene und eine Reihe an Regulatorgenen isoliert, auf molekularer Ebene charakterisiert und heterolog exprimiert worden (WINKEL-SHIRLEY, 2001).

Das C<sub>15</sub>-Grundgerüst (Flavan, Abb. A1) besteht aus zwei aromatischen Ringen (A und B) und einem heterozyklischen Pyranring (C). Aus dem Phenylpropanweg stammt die C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>-Einheit, die dem B- und C-Ring zu Grunde liegt. Die C<sub>3</sub>-Seitenkette wird verlängert mit Acetateinheiten aus dem glykolytischen Zuckerabbau.

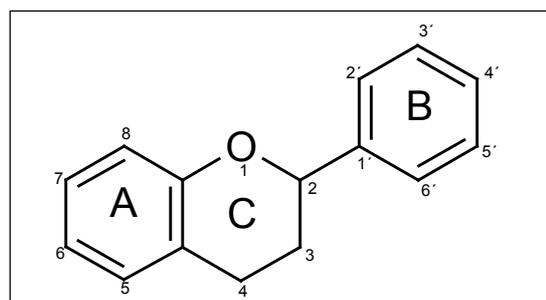


Abb. A1: Flavonoid-Grundgerüst.

Die Eingangsreaktion in die Flavonoidbiosynthese wird katalysiert durch die Chalkonsynthase (CHS; E.C. 2.3.1.74; Abb. 2). Ausgangssubstrat ist 4-Cumaroyl-CoA (vgl. A.1.2), das sich aus Phenylalanin herleitet und durch die Wirkung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL; E.C. 4.3.1.5), der Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H; E.C. 1.14.13.11) und der 4-Cumarsäure : CoA Ligase (E.C. 6.2.1.12) entsteht. Es wird von der CHS schrittweise mit 3 Einheiten Malonyl-CoA unter Abspaltung von CoA und CO<sub>2</sub> zum Tetrahydroxychalkon kondensiert.

Die Chalkonisomerase (CHI; E.C. 5.5.1.6) zyklisiert das Tetrahydroxychalkon stereospezifisch zum 2S-Flavanon Naringenin (NAR). Die Zyklisierungsreaktion kann auch, insbesondere unter alkalischen Bedingungen, spontan ablaufen ohne enzymatische Beteiligung (MOL *et al.*, 1985).

Zwei Enzyme determinieren auf Flavonoidebene das Substitutionsmuster am B-Ring (vgl. A.1.2). Die Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H) fügt eine OH-Gruppe an die 3'-Position des B-Rings an, die Flavonoid 3'5'-Hydroxylase (F3'5'H) zwei OH-Gruppen an die 3'- und 5'-Position. Beide Enzyme (E.C. 1.14.13.21) gehören der Klasse der Cytochrom P450-Proteine an und katalysieren eine O<sub>2</sub>- und NADPH-abhängige Reaktion. Als Substrate kommen sowohl NAR und das Dihydroflavonol Dihydrokaempferol (DHK) als auch das Flavonol Kaempferol (Km) und das Flavon Apigenin (Ap) in Frage, zusätzlich für die F3'5'H potenziell auch die entsprechenden 3'4'-hydroxylierten Verbindungen (KALTENBACH *et al.*, 1999).

Die Dihydroflavonole entstehen durch Hydroxylierung der Flavanone an C3-Position, katalysiert durch die Flavanon 3-Hydroxylase (FHT; E.C. 1.14.11.9). Aus NAR entsteht dadurch DHK, aus Eriodictyol (ERI) Dihydroquercetin (DHQ). Das Pentahydroxyflavanon (PHF) mit drei Hydroxylgruppen am B-Ring wird nur in wenigen Fällen als Substrat von der FHT für die Umsetzung zu Dihydromyricetin (DHM) akzeptiert (FORKMANN und HELLER, 1999). Die FHT gehört zu der Klasse der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (2OD), für die Reaktion werden auch Fe<sup>2+</sup> und Ascorbat als Cofaktoren benötigt.

Die Flavanone können durch Einfügen einer Doppelbindung zwischen C2 und C3 zu den Flavonen umgewandelt werden, die Dihydroflavonole entsprechend zu den Flavonolen. Erstere Reaktion wird meist durch die Flavonsynthase II (FNS II), ein weiteres Cytochrom P450-Protein, katalysiert. Wahrscheinlich auf Vertreter der Apiaceae beschränkt ist die Flavonsynthase I (FNS I), die zu den 2ODs gehört. Entsprechend dem Ausgangssubstrat entstehen die Flavone Apigenin (Ap), Luteolin

(Lu) und Tricetin (Tri). Die Flavonolsynthese (FLS), ebenfalls eine 2OD, katalysiert die Bildung der Flavonole Kaempferol (Km), Quercetin (Qu) und Myricetin (My) aus den entsprechenden Dihydroflavonolen.

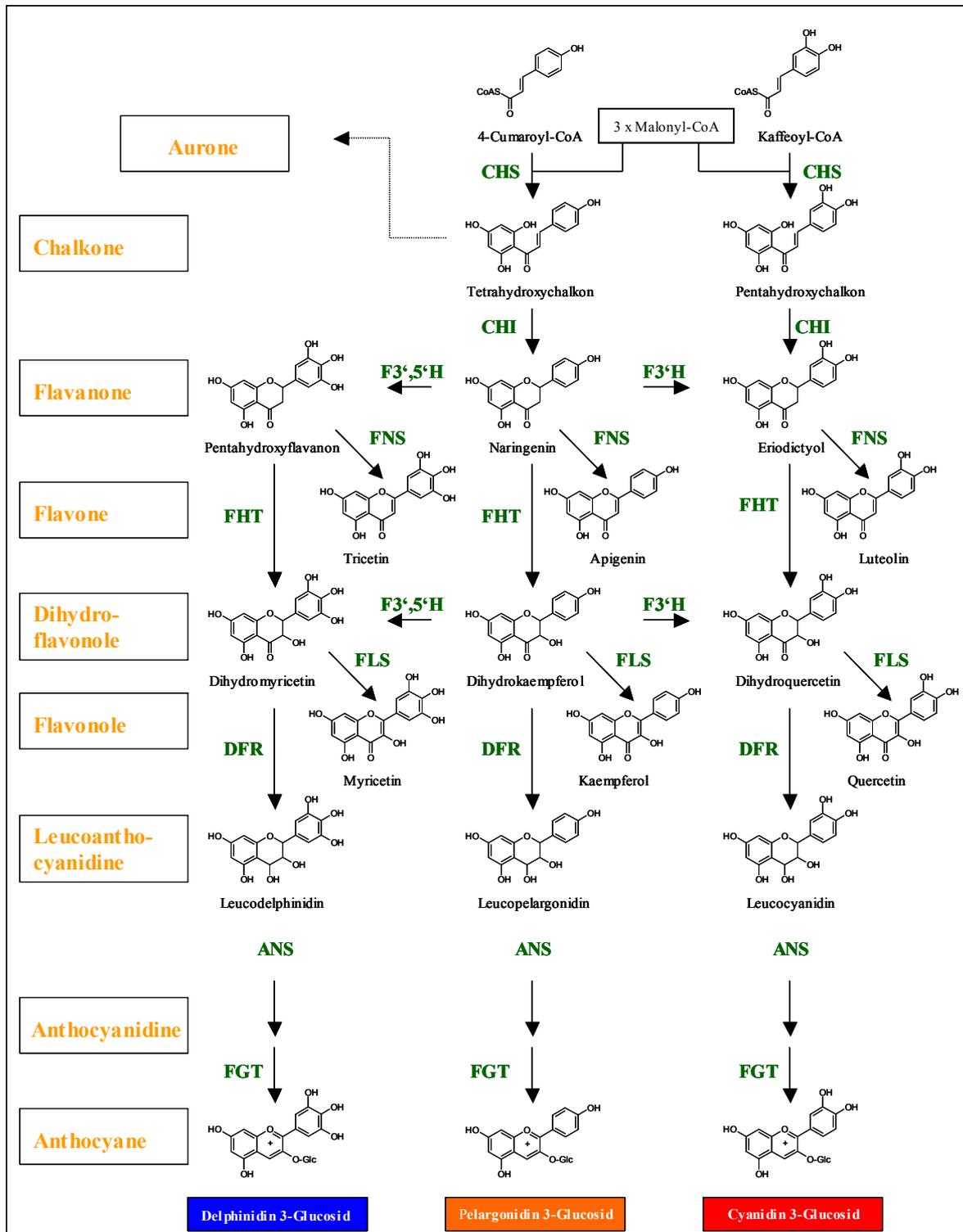


Abb. A2: Schematische Darstellung der Flavon-, Flavonol- und Anthocyanbiosynthese. Verändert nach MARTENS (2000). Die Abkürzungen sind im Text angegeben.

Die Dihydroflavonole dienen auch als Substrat für die Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR; E.C. 1.1.1.219). In einer NADPH-abhängigen und stereospezifischen Reaktion entstehen durch Reduktion der Keto-Gruppe an Position C4 die Leucoanthocyanidine Leucopelargonidin (LPg) aus DHK, Leucocyanidin (LCy) aus DHQ und Leucodelphinidin (LDp) aus DHM. Diese sehr instabilen Intermediate werden durch die 2OD Anthocyanidinsynthase (ANS) und die UDP-Glukose : Flavonoid 3-O-Glukosyltransferase (UFGT; E.C. 2.4.1.91) in die 3-Glukoside von Pelargonidin, Cyanidin und Delphinidin umgewandelt. Die Glykosylierung stabilisiert die Moleküle und erhöht deren Wasserlöslichkeit.

Durch eine Vielzahl weiterer glykosilierender, methylierender, acylierender u.a. Enzyme entsteht eine enorme Vielfalt an Flavonoiden aus den Grundstrukturen.

### A.1.2 Determimierung des Anthocyanmusters

Neben 4-Cumaroyl-CoA akzeptiert die CHS *in-vitro* auch andere Zimtsäure CoA-Ester wie Kaffeoyl-CoA als Substrat (SCHRÖDER, 1999; Abb. A2). Dadurch ist die Synthese von Flavonoiden mit einer *o*-Dihydroxy-Gruppe am B-Ring prinzipiell auch ohne F3'H-Aktivität möglich. Allerdings ist *in-vivo* meist 4-Cumaroyl-CoA das präferierte Substrat, vor allem in Zusammenhang mit der Anthocyanbildung (SCHRÖDER, 1999; HELLER und FORKMANN, 1994). Damit entscheidet in der Regel das Vorhandensein einer F3'H- bzw. F3'5'H-Aktivität über das Vorkommen 3'4'- bzw. 3'4'5'-hydroxylierter Flavonoide.

In Bezug auf die Entstehung des Anthocyanmusters ist auch die Substratspezifität der DFR von Bedeutung. Insbesondere bei Solanaceae-Arten kann ein Zusammenhang zwischen fehlenden Pelargonidinderivaten und einer DHK ausschließenden Substratspezifität der DFR aufgestellt werden (FORKMANN und HELLER, 1999; MARTENS *et al.*, 2002). Anschauliches Beispiel ist die *Petunia*-Linie „RL01“, wo die DFR zwar aktiv ist, aber DHK nicht als Substrat akzeptiert, so dass sich aufgrund fehlender FLS-, F3'H- und F3'5'H-Aktivität DHK akkumuliert.

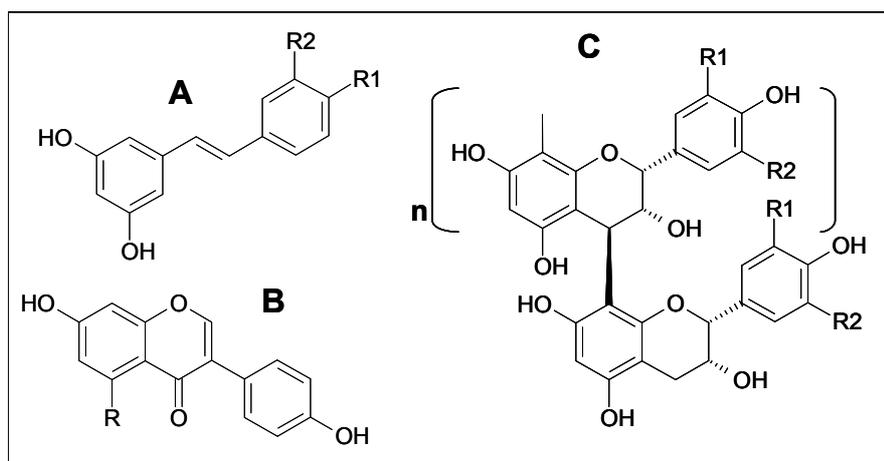
Bislang näher charakterisierte DFR-Enzyme zeigten allgemein einen besseren Umsatz, je höher der Hydroxyierungsgrad am B-Ring des Dihydroflavonols ist (FORKMANN und HELLER, 1999). Dies gilt auch für DFRs aus Pflanzen, die Pelargonidinderivate akkumulieren wie *Callistephus chinensis*. Dagegen wird DHM effizient zu LDp auch von DFRs aus Pflanzen umgesetzt, in denen keine

Delphinidinderivate vorkommen, wie z.B. *Dianthus caryophyllus* oder *Matthiola incana*. Eine Ausnahme von diesen Tendenzen scheint die DFR aus *Fragaria x ananassa* darzustellen. Das rekombinante Protein eines aus Erdbeerfrüchten isolierten cDNA-Klons zeigte einen hohen Umsatz von DHK und einen nur eingeschränkten von DHQ (GOSCH, 2003).

### A.1.3 Bedeutende Seitenwege in Zusammenhang mit der Flavonoidbiosynthese

Mit der Synthese von Stilbenen existiert in einigen Pflanzen ein Alternativweg zur Flavonoidbiosynthese (SCHRÖDER, 1999). Die Stilbensynthase (STS) besitzt eine hohe Ähnlichkeit zur CHS. Sie kondensiert ebenfalls einen Zimtsäure CoA-Ester mit 3 Einheiten Malonyl-CoA, die Zyklisierung des intermediären Tetraketids ist aber verschieden und es erfolgt eine zusätzliche Decarboxylierung. Mit 4-Cumaroyl-CoA als Ausgangssubstrat entsteht Resveratrol, mit Zimtsäure-CoA entsteht Pinosylvin (Abb. A3, A). Erstere Aktivität (E.C. 2.3.1.95) wurde in *Pinus sylvestris* und *Pinus strobus* nachgewiesen, letztere (E.C. 2.3.1.146) in *Arachnis hypogea* (Erdnuss) und *Vitis spec.*

Das durch das enge Zusammenwirken der CHS und einer NADPH-abhängigen Polyketidreduktase entstehende Deoxychalkon (Isoliquiritigenin) dient neben dem Tetrahydroxychalkon als Vorstufe für die Synthese von Auronen und Isoflavonen (HELLER und FORKMANN, 1994).



**Abb. A3: Wichtige auf Seitenwegen gebildete Flavonoidklassen.**  
**A** Stilbene: R1 = R2 = H: Pinosylvin; R1 = OH, R2 = H: Resveratrol  
**B** Isoflavone: R = H: Daidzein; R = OH: Genistein  
**C** Proanthocyanidinmolekül bestehend aus einem 2,3-*cis*-Flavan-3-ol (oben) und einem 2,3-*trans*-Flavan-3-ol (unten)

Die von AKASHI *et al.* (1999) aus *Glycyrrhiza echinata* klonierte 2-Hydroxyisoflavonsynthase katalysiert die Verlagerung des B-Rings von C2 nach C3 zum typischen Isoflavonoidgrundgerüst. Mögliche Ausgangssubstrate sind sowohl NAR als auch Liquiritigenin, die Produkte sind entsprechend die Isoflavone Genistein bzw. Daidzein (Abb. A3, B), welche als Ausgangsverbindungen für die Synthese weiterer Isoflavonoide dienen können (DIXON *et al.*, 1995). Isoflavonoide kommen vor allem in Leguminosen vor.

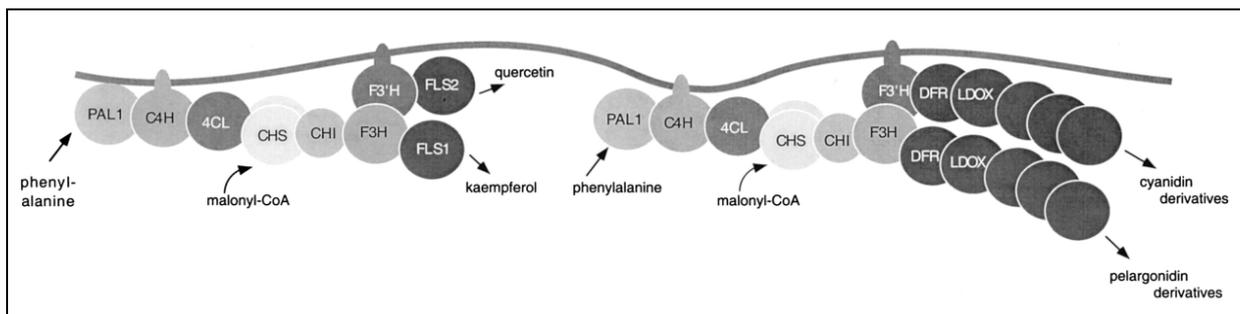
Die Reduktion von Flavanonen zu Flavan 4-olen als Vorstufen für die Bildung von 3-Deoxyanthocyanidinen ist beschränkt auf wenige Familien (z.B. Gesneriaceae, Poaceae) (HELLER und FORKMANN, 1994). Weiter verbreitet dagegen ist das Vorkommen von Proanthocyanidinen. Die Vorstufen (z.B. Catechin und Epicatechin für Procyanidine) dazu entstehen durch Reduktion von Leucoanthocyanidinen an Position C4 zu den 2,3-*trans*-Flavan-3-olen und/oder durch Reduktion von Anthocyanidinen zu den 2,3-*cis*-Flavan-3-olen. Die Vorstufen kondensieren zu den Proanthocyanidinen (kondensierte Tannine, Abb. A3, C). Die entsprechenden für die Leucoanthocyanidinreduktase (LAR) und die Anthocyanidinreduktase (ANR, „BANYULS“) codierenden Gene wurden erst vor kurzem isoliert und charakterisiert (DEVIC *et al.*, 1999; TANNER *et al.*, 2003; XIE *et al.*, 2003).

### A.1.5 Subzelluläre Organisation der Flavonoidbiosynthese

Für eine Reihe von pflanzlichen Primärstoffwechselwegen ist die Aggregation der jeweils involvierten Enzyme zu einem Multienzymkomplex (Metabolon) näher charakterisiert (Literatur in WINKEL-SHIRLEY, 1999). Die Vorteile spezifischer enzymatischer Interaktionen zur Kanalisierung des Stoffflusses liegen auf der Hand. Eine hohe Effizienz eines Stoffwechselwegs wird ebenso gewährleistet wie seine flexible Regulation und Reaktionsfähigkeit auf sich ändernde interne und externe Bedingungen (OVÁDI und SRERE, 1996). Dies legt auch eine entsprechende koordinierte Organisation der Enzyme sekundärer Stoffwechselwege nahe, die aber aufgrund der im Vergleich zum Primärstoffwechsel wohl weniger stabilen Protein-Assoziationen bislang weniger gut untersucht sind (WINKEL-SHIRLEY, 1999).

AMRHEIN und ZENK veröffentlichten 1971 ihre Beobachtung, dass Proteinextrakt aus Buchweizensamen Phenylalanin direkt zu 4-Cumarsäure umsetzt. Dies ließ auf eine enge Assoziation von PAL und C4H schließen. Zudem konnte für die beiden

Enzyme eine koordinierte Induktion durch Licht nachgewiesen werden. Solche Befunde veranlassten STAFFORD (1974) zu der Theorie, dass die Phenylpropan- und die Flavonoidbiosynthese in Multienzymkomplexen auf der cytosolischen Seite des endoplasmatischen Reticulums stattfindet (Abb. A4). Die mikrosomalen Cytochrom P450-Enzyme dienen dabei als Verankerung des Komplexes im endoplasmatischen Reticulum.



**Abb. A4: Schematisches Modell einer möglichen metabolischen Organisation der Phenylpropan- und Flavonoidbiosynthese.**

Aus: WINKEL-SHIRLEY (1999). Die Cytochrom P450-Enzyme C4H und F3'H dienen in diesem Modell als Verankerung der Metabolons im endoplasmatischen Reticulum.

Insbesondere experimentelle Befunde aus Zellfraktionierungen, Analysen der Genexpression und Co-Immunolokalisierungen erhärteten dies (Überblick und Literatur in WINKEL-SHIRLEY, 1999). Überexpression der PAL in Tabak führte zu einer erhöhten Synthese an Chlorogensäure, während die Flavonoidbiosynthese nicht und die Ligninsynthese nur leicht stimuliert wurden, was den kontrollierten Stofffluss verdeutlicht (HOWLES *et al.*, 1996). *Yeast 2-hybrid*-Versuche mit CHS, CHI und DFR lieferten bei *Arabidopsis* konkrete Hinweise dafür, dass die Flavonoidenzyme weniger einen linearen als vielmehr einen globulären Komplex bilden, da auch spezifische Protein-Protein-Interaktionen z.B. zwischen CHS und DFR nachweisbar sind (BURBULIS und WINKEL-SHIRLEY, 1999). Eine direkte Interaktion scheint auch zwischen der CHS und der Polyketidreduktase bei der Bildung von 5-Deoxyflavonoiden für die Isoflavonoidbiosynthese (vgl. A.1.3) und zwischen weiteren Enzymen in deren Verlauf zu bestehen (HE und DIXON, 2000).

#### **A.1.4 Ursprung von Flavonoidenzymen**

Flavonoide sind eng mit der Evolution der Pflanzen verknüpft (COOPER-DRIVER und BHATTACHARYA, 1998). Derivate von Flavonen und Flavonolen waren bereits in den Bryophyten vorhanden, Proanthocyanidine anschließend in den Farnen, während die Zeit der Anthocyane mit den Gymnospermen begann und ihren Höhepunkt mit den Angiospermen fand (MARKHAM, 1988). Das sequenzielle Auftauchen legt eine ebensolche Entwicklung der entsprechenden zur Synthese nötigen Enzyme nahe. Homologien der Flavonoidenzyme mit Enzymen aus dem Primärstoffwechsel legen nahe, dass sie daraus entlehnt worden sind (STAFFORD, 1991; CLEGG *et al.*, 1997). Die CHS ist verwandt mit kondensierenden Enzymen aus der Fettsäurebiosynthese (JEZ *et al.*, 2000). Gene, die CHS-ähnliche Proteine codieren, wurden auch in Mikroorganismen gefunden (FUNA *et al.*, 1999). Aus der CHS selbst scheinen sich durch jeweils relativ wenige AS-Austausche eine Reihe an Enzymen mit veränderter Substratspezifität und modifiziertem Reaktionsmechanismus entwickelt zu haben (Überblick in SCHRÖDER, 1999). Beispiele sind die Stilbensynthase, die 2-Pyrone synthase oder die Valerophenonsynthase. Die in den Phenylpropanweg involvierten Cytochrom P450er scheinen einen gemeinsamen Vorfahren mit Aminosäurehydroxylasen zu besitzen (KAHN und DUST, 2000). Die DFR besitzt einen gemeinsamen Vorfahren mit  $3\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen aus Säugetieren (BAKER und BLASCO, 1992). Vergleichende Sequenzanalysen ergaben, dass zu dieser Superfamilie auch die bakterielle Galaktose 4-Epimerase und Cholesteroldehydrogenase sowie virale ORFs gehören.

#### **A.1.5 Funktionen von Flavonoiden in Pflanzen**

Wie einleitend angedeutet, besitzen Flavonoide meist multiple Funktion. Sie schützen z.B. vor verschiedenen äußeren Gefahren und dienen der Signalgebung. STAFFORD (1991) vermutete, dass die Flavonoide ursprünglich als interne Regulatoren oder chemische Botenstoffe fungierten. Als die synthetische Kapazität ausreichend ausgebildet war zur Akkumulation einer höheren Konzentration dieser Stoffe, konnten sie auch andere Funktionen wie UV-Schutz übernehmen. Der Erwerb dieser Funktion wird als bedeutend beim Übergang der Pflanzen vom Wasser zum Land diskutiert.

Ihre Rolle als (negative) Regulatoren beim polaren Auxintransport wird seit einigen Jahrzehnten näher erforscht (Literatur in MURPHY *et al.*, 2000 und BROWN *et al.*, 2001). Sie wird veranschaulicht durch die starke Wurzelbildung bei Mutanten von *Arabidopsis thaliana*, bei denen die Eingangsreaktion in die Flavonoidbiosynthese durch fehlende CHS-Aktivität blockiert ist (BROWN *et al.*, 2001). Kultivierung dieser Pflanzen auf naringeninhaltigem Medium reduziert die Wurzelbildung dementsprechend. Eine hohe Expression von *chs* korreliert mit einer Akkumulation von Flavonderivaten und der Anreicherung von Auxinen in kortikalen Zellen bei Leguminosen im Zuge der Ausbildung der Wurzelknöllchen bei der Symbiose mit N-fixierenden Bakterien (DJORDJEVIC *et al.*, 1997; MATHESIUS, 2001). Analog scheint eine Anreicherung von Flavonoiden eine hohe lokale Konzentration von Auxinen in Tumorzellen von mit *Agrobacterium tumefaciens* infizierten Pflanzen zu bedingen (SCHWALM *et al.*, 2003).

Bei einigen Pflanzen spielen Flavonole eine entscheidende Rolle bei der Pollenfertilität wie mit CHS-Mutanten bei Mais oder Petunie (MO *et al.*, 1992; POLLACK *et al.*, 1993) und transgenen Petunien mit reduzierter CHS- oder FLS-Aktivität (YLSTRA *et al.*, 1994) gezeigt werden konnte. Dagegen bilden Flavonoidmutanten von *Arabidopsis* fertilen Pollen aus (BURBULIS *et al.*, 1996).

Neben diesen pflanzeninternen Funktionen spielen sie aber auch eine wichtige Rolle als Signalmoleküle bei der Interaktion mit Mikroorganismen. Flavonoide können, wenn auch weniger stark als phenolische Verbindungen wie Acetosyringon, die agrobakterielle Virulenz induzieren (ZERBACK *et al.*, 1989). Sie aktivieren die an der N-Fixierung beteiligten Nodulationsgene der Rhizobien (LONG, 1989) und spielen auch eine Rolle bei der Einleitung der Mykorrhiza-Symbiose (HARRISON und DIXON, 1994).

Breitere Aufmerksamkeit in neuerer Zeit erhielt angesichts des wachsenden Ozonlochs die UV-Schutzfunktion der Flavonoide. Flavonoide absorbieren im UV-Bereich, insbesondere im Bereich der schädlichen UVB-Strahlung zwischen 280 und 315 nm (HARBORNE und WILLIAMS, 2000), so dass ihnen schon seit geraumer Zeit eine UV-Schutzfunktion nachgesagt wird. Tatsächlich kommen Flavonoide gehäuft in den epidermalen Schichten u.a. von Blättern oder Pollen vor (WINKEL-SHIRLEY, 2002; HARBORNE und WILLIAMS, 2000) und bei einer Reihe von Pflanzen konnten Flavonoidderivate identifiziert werden, die eine UV-Schutzfunktion besitzen (Übersicht in HARBORNE und WILLIAMS, 2000). Den unmittelbarsten Hinweis, dass

Flavonoide UV-Schutz liefern, brachten wiederum Flavonoidmutanten von *Arabidopsis*, die einen UV-anfälligen Phänotyp aufwiesen (ORMROD *et al.*, 1995). Umgekehrt gelang kürzlich die Isolierung einer *Arabidopsis* Mutante mit erhöhter Resistenz gegen UVB (BIEZA und LOIS, 2001). Neben einer stärkeren konstitutiven Expression von *chs* wies sie eine gesteigerte Akkumulation von Flavonoid- und anderen phenolischen Derivaten auf. Generell ist aber nicht die Konzentration der angereicherten Flavonoide entscheidend, sondern deren Zusammensetzung. Eine deutlich erhöhte Synthese von 3'4'-hydroxylierten Flavonoiden wie Luteolin oder insbesondere Quercetin gegenüber den einfach hydroxylierten Apigenin oder Kaempferol wurde bei einer Reihe von Pflanzen wie Gerste (LIU und McCLURE, 1995), Birke (LAVOLA *et al.*, 1997) Raps (OLSSON *et al.* 1998), Petunie (RYAN *et al.*, 1998), Weißklee (HOFMANN *et al.*, 2000) aber auch bei dem Lebermoos *Marchantia polymorpha* (MARKHAM *et al.*, 1998) nachgewiesen, was auf die allgemeine weite Verbreitung dieses Phänomens im Pflanzenreich hinweist. Die Induktion der am B-Ring zweifach (*ortho*) hydroxylierten Flavonoide kann mit einer erhöhten antioxidativen Kapazität und besseren Radikalfängereigenschaften dieser Substanzen erklärt werden (MARKHAM *et al.*, 1998; RYAN *et al.* 1998).

Ein bedeutendes Feld sind die antipathogenen Eigenschaften von Flavonoiden. In diesem Zusammenhang sind vor allem die in Leguminosen vorkommenden Isoflavonoide zu nennen (DEWICK, 1994). Maysin (ein C-Glykosylflavon) akkumuliert in Mais nach Befall mit dem Mais-Ohrenkäfer (*Helicoverpa zea*) und steht in Zusammenhang mit Resistenz (BYRNE *et al.*, 1996). Eine Wirkung gegen Pilze zeigen vor allem Flavanone und Flavane, daneben auch Flavone und Flavonole und einige Biflavone und Chalcone (Übersicht in GRAYER und HARBORNE, 1994). Bei gegen Mehltau resistenten Reispflanzen wurde eine im Vergleich zu anfälligen eine erhöhte Bildung von Sakuranetin (ein Methylether von Naringenin) nach Schädlingsbefall festgestellt (DILLON *et al.*, 1997). Andere Verbindungen mit potenziell fungizidem Effekt sind die Stilbene, welche in einigen Gymnospermen und in einer begrenzten Anzahl von Angiospermen vorkommen und 3-Deoxyanthocyanine, die in Mais und Gerste und daneben auch in der dicotylen *Sinningia cardinalis* gefunden wurden (SHIRLEY, 1996).

Weit verbreitet und bedeutend sind die Proanthocyanidine (kondensierte Tannine), welche die Pflanze vor Pilzen, Insekten, Vögeln und generell Herbivoren schützen (GRAYER und HARBORNE, 1994). Ihre Wirkung beruht möglicherweise auf

mehreren Faktoren, darunter ihr abschreckender Geschmack und die Interaktion mit Proteinen und Polysacchariden (Diskussion in GRAYER und HARBORNE, 1994). Die Funktion der Anthocyane in Blüten und Früchten als Signalgeber ist offensichtlich (vgl. A.1.5). Dagegen gab und gibt es eine lebhaftige Debatte über ihre Funktion in vegetativen Geweben, insbesondere in Blättern, z.B. bei der Herbstlaubfärbung (CHALKER-SCOTT, 1999; ARCHETTI, 2000; HOCH *et al.*, 2001; GOULD *et al.*, 2002; STEYN *et al.*, 2002; HOCH *et al.*, 2003). Anthocyane kommen in vegetativen Geweben insbesondere in Form von einfachen Cyanidinglykosiden vor und verleihen ihnen meist rote Farbe (STEYN *et al.*, 2002). Auffallend ist vor allem die rote Färbung bei Keimlingen sowie bei juvenilen und seneszenten Blättern. Unter Stresssituation wie Kälte, Wasser- und Nährstoffmangel oder Verwundung erfolgt zum Teil ebenfalls Anthocyan-synthese. Untersuchungen der neueren Zeit deuten stark darauf hin, dass die grundlegende Funktion der Anthocyane darin besteht, die Photoinhibition in empfindlichem oder gestresstem Gewebe zu reduzieren und möglicherweise auch oxidative Schäden zu verringern.

### **A.1.6 Anthocyane als Locksignale**

Anthocyane sind die wichtigsten farbgebenden Blütenpigmente. Die Grundtypen Pelargonidin, Cyanidin und Delphinidin liefern die Grundlage für orangerote, rote bzw. für lila und blaue Farben. Die Ausprägung der Farbe ist aber stark abhängig von der Art, Modifikation, Menge und Mischung der vorliegenden Anthocyane, dem pH-Wert der Vakuole sowie von der intra- und intermolekularen Copigmentierung mit Zimtsäuren, Flavonoiden, Metallen und Anthocyanen und dem Vorkommen von Vertretern anderer Pigmentklassen (v.a. Chlorophyll und Carotinoide) (BROUILLARD und DANGLES, 1994; HARBORNE, 1995; DAVIES und SCHWINN, 1997).

Für die Ausprägung von blauen Farben auf der Grundlage von Delphinidin und in selteneren Fällen von Cyanidin spielen oft Flavone als Copigmente neben der meist nötigen Anwesenheit von Metallkationen eine entscheidende Rolle (Überblick in HARBORNE und WILLIAMS, 2000).

Es gibt einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem in der Blüte vorkommenden Anthocyantyp, der Blütenfarbe und dem Bestäuber (HARBORNE und SMITH, 1978; SAITO und HARBORNE, 1992; HARBORNE und GRAYER, 1994; HARBORNE, 1995). Von Vögeln bestäubte Blüten sind oft orange bis rot gefärbt und enthalten

Pelargonidin- und/oder Cyanidinderivate, während Insektenblüten oft rosa, blau oder lila gefärbt sind und Delphinidinderivate aufweisen. Die Vogelbestäubung ist auf tropische Regionen beschränkt, in den gemäßigten Breitengraden spielt sie keine Rolle. Allerdings ist in den gemäßigten Zonen die Fruchtverbreitung durch Vögel bedeutend. Die meisten durch Vögel verbreitete Früchte sind rot oder schwarz gefärbt (SCHMIDT *et al.*, 2004).

Auch innerhalb der Insekten gibt es große Unterschiede bei der bevorzugten Blütenfarbe (Tab. A1). Die Bienen als bedeutende Bestäuber werden von blauen und gelben Blütenfarben angezogen. Sie nehmen keine roten Farben wahr, sehen aber zusätzlich im UV-Bereich, so dass in vielen gelben (und weißen) Blüten im UV-Bereich absorbierende und für das menschliche Auge nicht wahrnehmbare Flavonoide als „honey guides“ dienen.

**Tab. A1: Zusammenhang der Farbpräferenz des bestäubenden Insekts und dem Vorkommen von Anthocyanidinen.** Verändert nach HARBORNE und GRAYER (1994).

Insekt	bevorzugte Blütenfarbe	häufig anzutreffende Anthocyanidine
Bienen	intensiv blau oder gelb (inklusive UV-Anteil)	Delphinidin, gelegentlich mit Cyanidin
Käfer	matt, cremefarben oder grün, gelegentlich rot	Cyanidin-Pelargonidin-Mischungen
Schmetterlinge	lebhaftes pink und violett	Delphinidin-Cyanidin-Mischungen
Fliegen	mattbraun, purpur oder grün	Cyanidin
Motten	rot, blassrosa und weiß	Cyanidin
Wespen	violett und braun	Delphinidin

### A.1.7 Gentechnische Modifikation der Flavonoidbiosynthese

Aufgrund der detaillierten Kenntnisse um die Flavonoidbiosynthese wurde diese bald nach den ersten gelungenen *Agrobacterium*-vermittelten Transformationen (HORSCH *et al.*, 1985) Objekt gezielter Modifikationen. MEYER *et al.* (1987) ermöglichten durch Transformation der DHK-reduzierenden DFR aus Mais in *Petunia* die Synthese von Pelargonidinderivaten in den Blüten der Linie „RL01“ (vgl. A.1.2). Ebenfalls bei *Petunia* konnte durch Transformation einer Antisense-cDNA die CHS-Aktivität gehemmt und dementsprechend die Anthocyanakkumulation reduziert werden (VAN DER KROL *et al.*, 1988). Überraschenderweise ergab sich der gleiche Effekt teilweise auch bei der Verwendung einer Sense-Version von *chs* (NAPOLI *et al.*, 1990). Erwartet hatte man eine generelle Intensivierung der Anthocyanbiosynthese.

Nähere Analysen zeigten eine Reduktion in der mRNA-Akkumulation sowohl der endogenen als auch der über die Transformation eingeführten *chs*, so dass das Phänomen als „Cosuppression“ bezeichnet wurde.

Nachdem die erste Klonierung einer *f3'5'h* durch HOLTON *et al.* (1993) gelungen war, erschien die Realisierung von blauen Blütenfarben bei Pflanzen ohne natürliche F3'5'H-Aktivität wie bei der Rose, Chrysantheme oder Nelke möglich (TANAKA *et al.*, 1998; FORKMANN und MARTENS, 2001). Die Expression einer *f3'5'h* in diesen Pflanzen führte zwar zur Induktion der Synthese von Delphinidderivaten, allerdings nicht zu den erhofften blauen Farben. Dies unterstreicht die Rolle von Faktoren wie Copigmentierung bei der Ausprägung der Blütenfarbe (vgl. A.1.6). Die Bedeutung von Flavonen als Copigmente bei der Entstehung blauer Farben verdeutlichen die Ergebnisse aus der Transformation von *Torenia*-Hybrida mit Antisense-*dfr*. Hier führte ein erhöhtes Verhältnis von akkumulierten Flavonen gegenüber Anthocyanen zu einer blauerer Farbe (AIDA *et al.*, 2000).

Die Menge und Zusammensetzung von kondensierten Tanninen bei *Lotus corniculata* konnte durch Transformation mit der *dfr* aus *Antirrhinum majus* in Sense- und Antisense-Richtung verändert werden (CARRON *et al.*, 1994; BAVAGE *et al.*, 1997). Bei mit dem Transkriptionsfaktor *Sn* aus Mais transformierten Pflanzen war der Gehalt an kondensierten Tanninen deutlich und auch der an Anthocyanen leicht erhöht (ROBBINS *et al.*, 2003).

Das bislang am häufigsten für die Transformation verwendete Regulatorgen ist *Lc* („leaf colour“) aus Mais. Damit konnte bei einer Reihe an Pflanzen wie Tomate, Tabak, Petunie und *Arabidopsis* die Anthocyansynthese erhöht oder induziert werden (LLOYD *et al.*, 1992; MOONEY *et al.*, 1995; BRADLEY *et al.*, 1998), in Lisianthus und Pelargonie dagegen nicht (BRADLEY *et al.*, 1999).

Transgener Reis, der das CHS-Gen aus Mais exprimiert, zeigte eine höhere Resistenz gegenüber Mehltau (GANDIKOTA *et al.*, 2001). Die Expression der Stilbensynthase (STS) zur Erhöhung der Pathogenresistenz bietet sich an, da sie die gleichen Substrate wie die CHS, die im gesamten Pflanzenreich vorkommt, verwendet. Der erste Bericht über die Transformation eines für die STS codierenden Gens stammt aus dem Jahr 1990 von HAIN *et al.* Durch die Expression der STS aus Erdnuss konnte in Tabak die Synthese von Resveratrol induziert werden. Eine höhere STS-Aktivität konnte mit dem STS-Gen aus Wein erreicht werden und die transgenen Tabakpflanzen zeigten eine erhöhte Resistenz gegen *Botrytis cinerea*

(HAIN *et al.*, 1993). In der Folge konnte durch die Verwendung des STS-Gens aus Wein auch bei Tomate, Reis oder Weizen gute Erfolge in Bezug auf Pathogenresistenz erzielt werden (Literatur in ESSENBERG, 2001).

Komplexer im Vergleich zur Ein-Schritt-Synthese des Resveratrols ist die Synthese der Isoflavonoide. Aber auch hier gibt es in neuerer Zeit gentechnische Ansätze, die Synthese von Isoflavonoiden auch in Nichtleguminosen zu etablieren (Literatur in WINKEL-SHIRLEY, 2001). In Luzerne konnte durch Überexpression der Isoflavon 7-O-Methyltransferase die Synthese von 4'-O-methylierten Isoflavonoiden und die Pathogenresistenz erhöht werden (HE und DIXON, 2000).

## A.2 Flavonoidbiosynthese in *Osteospermum*

### A.2.1 *Osteospermum* als Zierpflanze

*Osteospermum* ist eine neue Zierpflanze, die erst in den letzten Jahren eine größere Verbreitung auf dem Markt fand (CHEEK, 1997; WILLKOMMEN, 1999). Sie gehört zur Familie der Asteraceae, Untergruppe Calenduleae. Die heute kultivierten Sorten sind meist Hybriden. Die elterlichen Arten stammen aus Südafrika (v.a. östliches Südafrika und Küstengebiete; Abb. A5) (CHEEK, 1997; KÖHLEIN, 2000).



**Abb. A5: Arten von *Osteospermum* am Naturstandort.**

Rechts *O. jucundum* (aus: POOLEY, 1998); links: *O. pinnatum* (aus: LE ROUX und SCHELPE, 1981)

*Osteospermum* ist eine mehrjährige, robuste und halbharte Staude. Die Kultur ist unproblematisch, durch eine Kühlebehandlung kann sie prinzipiell jederzeit zum Blühen gebracht werden (PEARSON *et al.*, 1995; HASS-TSCHIRSCHKE, 1996). Die Vermehrung erfolgt vegetativ über Stecklinge. Züchterisch ist *Osteospermum* noch wenig bearbeitet. Chemogenetisch definiertes Material existiert nicht. *Osteospermum* wurde bereits mehrmals

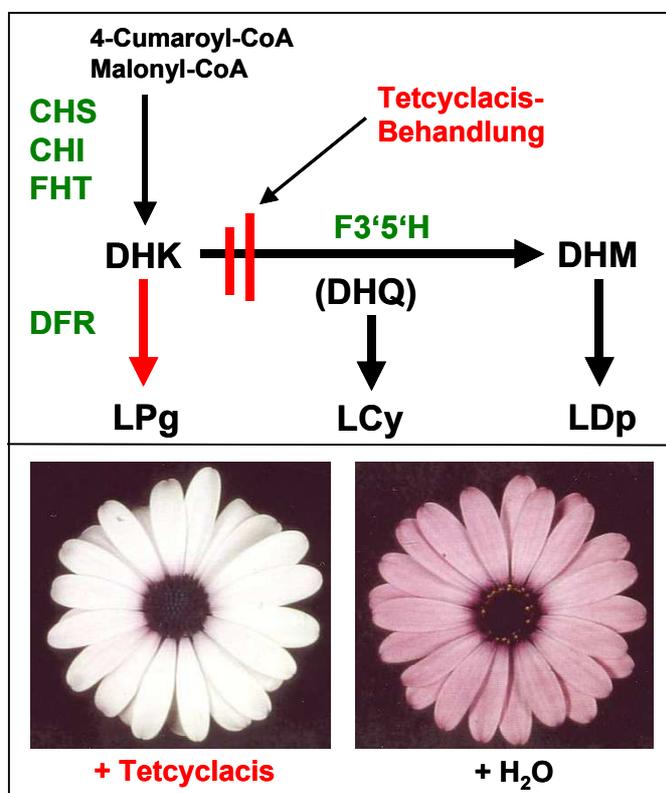
erfolgreich transformiert, z.B. mit den *rol*-Genen, Virusresistenzgenen oder *gfp* (ALLAVENA *et al.*, 2000; MERCURI *et al.*, 2002).

## A.2.2 Postulierte Flavonoidbiosynthese

Das Farbspektrum der Petalen reicht von weiß über gelb zu hellrosa bis dunkellila. In einer vorangegangenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass die gelbe Farbe auf Carotinoide zurückgeht, während die verschiedenen Rosa- und Lilatöne auf unterschiedlichen Konzentrationen an Delphinidinderivaten basieren (SEITZ, 2000). Dagegen kommen Derivate von Cyanidin meist nur in geringen Mengen, Pelargonidinderivate überhaupt nicht vor. Daneben ließen sich in Extrakten die Flavonole Km, Qu und, meist in geringerer Konzentration, My nachweisen.

Die wesentlichen an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Enzyme konnten in Proteinextrakten von Petalen nachgewiesen und charakterisiert werden (Abb. A6). Für die CHS ergab sich dabei eine hohe Substratpräferenz für 4-Cumaroyl-CoA gegenüber dem ebenfalls getesteten Kaffeooyl-CoA.

Eine starke F3'5'H-Aktivität ließ sich in der mikrosomalen Fraktion nachweisen als Grundlage für die Akkumulation von Delphinidinderivaten. Dagegen konnte in Proteinextrakt keine DFR-Aktivität mit DHK als Substrat detektiert werden. Aufgrund dieser Substratspezifität der DFR scheint die Bildung von Pelargonidinderivaten *per se* nicht möglich zu sein.



**Abb. A6: Postulierte Flavonoidbiosynthese in *Osteospermum*.**

Im oberen Teil der Abbildung sind schematisch die an der Entstehung des Anthocyanmusters beteiligten und näher charakterisierten Enzyme (SEITZ, 2000) sowie der postulierte Flavonoidbiosyntheseweg in *Osteospermum* dargestellt. Die Bilder im unteren Teil zeigen den Effekt einer Behandlung der Petalen der Sorte „Kalanga“ mit Tetcyclacis.

Diese Befunde wurden gestützt und veranschaulicht durch eine Behandlung der Petalen mit dem Cytochrom P450-Hemmstoff Tetcyclacis. Die chemische Hemmung der F3'5'H führte in den Petalen zu einem drastischen Rückgang der Delphinidinsynthese, aber zu keiner Induktion der Pelargonidinsynthese.

### **A.3 Zielsetzung der Arbeit**

Die gentechnische Modifikation der Flavonoidbiosynthese bietet die Möglichkeit für eine zielgerichtete Veränderung und Erweiterung des Blütenfarbspektrums. Sie setzt detaillierte biochemische und molekularbiologische Kenntnisse über die Entstehung des zu verändernden Flavonoidmusters voraus.

*Osteospermum* wurde in den letzten Jahren zu einer bedeutenden Zierpflanze. Das Farbspektrum ihrer Petalen ist relativ begrenzt und setzt sich aus weißen, gelben und rosa bis lila Farben zusammen. Dementsprechend besteht ein großes Interesse an der Züchtung neuer Blütenfarben bei *Osteospermum*.

Die Intention vorliegender Arbeit liegt in der Bestätigung und Erweiterung der vorangegangenen enzymologischen Ergebnisse durch molekularbiologische Methoden. Erstes Ziel ist dabei die Klonierung von cDNA-Fragmenten aller wichtigen Strukturgene der Flavonoidbiosynthese. Von den entscheidend an der Ausprägung des Flavonoidmusters beteiligten Enzyme (CHS, F3'5'H, FLS und DFR) sollen vollständige cDNA-Klone erstellt und heterolog in Hefe exprimiert werden. Die rekombinanten Proteine sollen auf Aktivität und Substratspezifität hin getestet werden. Von besonderem Interesse ist hierbei, ob sich die Ergebnisse daraus mit denjenigen, die mit Proteinextrakt erhalten wurden, korrelieren lassen. Daneben ist die Erstellung von funktionell verifizierten cDNA-Klonen die Voraussetzung für eine zukünftige gentechnische Modifikation der Blütenfarben bei *Osteospermum*.

Besonders im Blickpunkt sollen die DFR und F3'5'H stehen. Diese Enzyme spielen eine entscheidende Rolle bei der Ausprägung des Anthocyanmusters und sind damit beim „genetic engineering“ zur Erzeugung neuer Blütenfarben besonders gefragt.

EDER (2001) isolierte aus *Callistephus chinensis* einen cDNA-Klon, der sich anhand seiner Sequenz als F3'H klassifizieren ließ. Das rekombinante Protein zeigte aber überraschenderweise F3'5'H-Aktivität. Durch die Erstellung und Charakterisierung eines F3'5'H cDNA-Klons aus *Osteospermum* als einem weiteren Vertreter der Asteraceae-Familie soll geklärt werden, ob es sich bei *C. chinensis* um eine

Ausnahme handelt oder eine möglicherweise generelle Erscheinung bei Asteraceae. In diesem Zusammenhang sind die Implikationen bezüglich der Phylogenie von F3'H und F3'5'H und der molekularen Basis des Funktionsunterschieds von Interesse.

Die DFR entscheidet mit ihrer Substratspezifität maßgeblich über die Ausprägung des Anthocyanmusters. Die These von JOHNSON *et al.* (2001), dass die Substratspezifität von nur wenigen Aminosäuren in einer bestimmten Region der Sequenz determiniert wird, soll hier überprüft werden. Eine detaillierte Kenntnis der molekularen Grundlagen der Substratspezifität würde eine Voraussage der Substratspezifität einer DFR anhand ihrer Sequenz erlauben. Zudem könnten gezielt DFR-Enzyme mit für die jeweilige Anwendungen passender Substratspezifität designed werden.

## B.1. Material

### B.1.1 Pflanzenmaterial

Für *Osteospermum* stand das „African Summer“-Sortiment von Cape Daisy (Aarhus, DK) zur Verfügung. Die Flavonoidbiosynthese in Petalen *Osteospermum* wurde chemisch und biochemisch in einer früheren Arbeit untersucht (SEITZ, 2000). Die Kultur erfolgte im Gewächshaus unter den in der Praxis üblichen Bedingungen (GRÜBER, 1997; HASS-TSCHIRSCHKE, 1996). Die Erhaltung und Vermehrung erfolgte über Stecklinge.

Zur Klonierung von Flavonoidgenen wurde, sofern nicht anders angegeben, die Sorte „Bamba“ verwendet. Petalen von „Bamba“ akkumulieren hohe Mengen an Derivaten der Flavonole Kaempferol und Quercetin sowie des Anthocyanidins Delphinidin.



Derivate von Cyanidin dagegen kommen nur in niedrigen Mengen vor.

Zur Präparation von Gesamt-RNA wurden schwach ausgefärbte Petalen eines jungen Blütenstadiums verwendet. Das Pflanzenmaterial wurde frisch verarbeitet oder schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Abb. B1:** *Osteospermum*-Hybrida „Bamba“.

(aus: <http://class.bishopb-college.ac.uk/hortic/pldisp.php?pid=564>; 04.2004)

### B.1.2 Geräte

Bio-Imaging-Analyzer BAS 1000  
 Biophotometer  
 Brutschrank 3033  
 Brutschrank BE500  
 Brutschrank Incushake INCUCELL 111  
 Elektrophorese-Spannungsquelle EPS3500  
 Elektrophorese-System Mini-Sub<sup>®</sup> Cell GT  
 PCR-Express  
 Reinstwassersystem TKA-LAB HP 6UV/UF  
 Thermomixer comfort  
 UV Transilluminator 254nm  
 VARIOKLAV<sup>®</sup> Dampfsterilisator  
 Werkbank Laminair<sup>®</sup> Typ LB48C

Fuji Photo (Tokyo, J)  
 Eppendorf (Hamburg)  
 GFL mBH (Burgwedel)  
 Memmert (Schwabach)  
 MMM Medcenter GmbH (Hanau)  
 Pharmacia Biotech (Uppsala, S)  
 BIORAD (Hercules, CA)  
 Hybaid (Ashford, UK)  
 TKA-GmbH (Niederelbert)  
 Eppendorf (Hamburg)  
 LTF Labortechnik (Wasserburg)  
 H+P Labortechnik (Oberschleißheim)  
 Kendro Laboratory Products (Hanau)

Zentrifuge Biofuge pico mit Kühlung	Kendro Laboratory Products (Hanau)
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Kendro Laboratory Products (Hanau)
Zentrifuge Sigma 3K30C mit Kühlung	B. Braun Biotech International (Melsungen)
Zentrifuge Speedvac Vacuum Concentrator	Bachofer (Reutlingen)

### B.1.3 Firmen

Die für die Arbeit notwendigen Chemikalien, Materialien, Enzyme, Kits u.a. wurden von folgenden Firmen bezogen:

Biorad (USA)	<a href="http://www.bio-rad.com/">http://www.bio-rad.com/</a>
Duchefa (NL)	<a href="http://www.duchefa.com/">http://www.duchefa.com/</a>
Eppendorf (Köln)	<a href="http://www.eppendorf.com/">http://www.eppendorf.com/</a>
Fluka (Neu-Ulm)	<a href="http://www.fluka.de/">http://www.fluka.de/</a>
FMC Bioproducts (USA)	<a href="http://www.bioproducts.com/">http://www.bioproducts.com/</a>
Invitrogen (UK)	<a href="http://www.invitrogen.com/">http://www.invitrogen.com/</a>
Roth (Karlsruhe)	<a href="http://www.carl.roth.de/">http://www.carl.roth.de/</a>
MBI Fermentas (St. Leon-Rot)	<a href="http://www.fermentas.com/">http://www.fermentas.com/</a>
Merck (Darmstadt)	<a href="http://www.merck.de/">http://www.merck.de/</a>
Moravek Biochemicals (USA)	<a href="http://www.moravek.com/">http://www.moravek.com/</a>
Peqlab (Erlangen)	<a href="http://www.peqlab.de/">http://www.peqlab.de/</a>
Roche (CH)	<a href="http://www.roche.com/">http://www.roche.com/</a>
Qiagen (Hilden)	<a href="http://www.qiagen.com/">http://www.qiagen.com/</a>
Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	<a href="http://www.sial.com/">http://www.sial.com/</a>
Zefa Laborservice (München)	<a href="http://www.zefa-laborservice.de/">http://www.zefa-laborservice.de/</a>

### B.1.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle nicht aufgelisteten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Merck, Sigma-Aldrich oder Fluka bzw. über Zefa Laborservice bezogen.

Agarose	FMC Bioproducts
Ampicillin	Duchefa
Bromphenolblau	Merck
D-Galaktose	Roth
D-Glukose	Duchefa
DNA-Längenstandards	MBI
Chloroform	Fluka
DNA-Längenstandards	MBI
dNTPs	MBI
Dowex. 1x2	Fluka
EDTA	Sigma
Eisessig	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Ethylacetat	Merck
Glas Beads 425-600 µM	Sigma

HCl	Merck
Hefeextrakt	Fluka
Hepes	Fluka
Isopropanol	Merck
IPTG	Sigma
Kanamycin	Duchefa
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma
Natriumacetat	Merck
Pepton	Fluka
Phenol, gesättigt mit 0,1 M Citrat-Puffer	Sigma
PVPP	Fluka
Rinderserum Albumin Fraktion V	Fluka
Seesand, geblüht	Merck
Triton X-100	Fluka
Tris	Pharmacia Biotech (S)
Tryptophan	Fluka
Yeast-Extrakt	Fluka
X-Gal	Sigma

### B.1.5 Substrate, Cosubstrate und Radiochemikalien

4-Cumaroyl-CoA	W. Heller, GSF (Neuherberg)
Kaffeoyl-CoA	W. Heller, GSF (Neuherberg)
[ <sup>14</sup> C] 2-Malonyl-CoA (spez. Aktivität ≈ 55 mCi/mmol)	Moravek Biochemicals
β-NADPH-Na <sub>4</sub>	Sigma
2-Oxoglutarat	Fluka

### B.1.6 Chromatographiesysteme

Bei der Dünnschichtchromatographie wurden mit Cellulose beschichtete Glasplatten (Merck, Darmstadt) in folgenden Laufmittelsystemen aufgetrennt:

CAW	(Chloroform-Essigsäure-Wasser: 10 : 9 : 1)
Forestal	(Essigsäure-Salzsäure-Wasser: 30 : 3 : 10)
BAW	(n-Butanol-Eisessig-Wasser: 6 : 1 : 2)
30% Essigsäure	

### B.1.7 Puffer und sonstige Lösungen

TAE-Puffer	40 mM Tris-acetat, pH 8,3, 1 mM EDTA
TE-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8, 1% EDTA
TEK	50 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 100 mM KCl

TES-B*	50 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,6 M Sorbitol, 2 mM DTT
TEG*	50 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 20% Glycerin

### B.1.8 Enzyme und Proteine

<i>Pfu</i> DNA Polymerase	MBI Fermentas
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas Reverse
Reverse Transkriptase M-MLV	Promega
RNase A	Sigma
Superscript Reverse Transkriptase II	Invitrogen
<i>Taq</i> DNA Polymerase	MBI Fermentas
Terminale Transferase	Promega
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas

### B.1.9 Reaktionssysteme und Kits

„DNeasy Plant Mini“-Kit	Qiagen
„Expand™ High Fidelity PCR System“	Roche
„E.Z.N.A. Plasmid Miniprep“-Kit	Peqlab
„High Pure PCR Purification“-Kit	Qiagen
„QUIAEX II DNA Gel Extraction“-Kit	Qiagen
„RNeasy Plant Mini“-Kit	Qiagen
„TOPO TA Cloning“-Kit	Invitrogen
„pYes2.1 TOPO TA Cloning“-Kit	Invitrogen
„S.c. EasyComp™ Transformation“-Kit	Invitrogen

### B.1.10 Bakterien- und Hefestämme

#### *Escherichia coli*

Es fanden die *E. coli* Stämme TOP10 und TOP10F' (Invitrogen) Anwendung. Beide Stämme besitzen keine Resistenz gegen Kanamycin oder Ampicillin. Eine Deletion im  $\beta$ -Galaktosidase-Gen (*lacZ*) ermöglicht Selektion durch  $\alpha$ -Komplementation („blau/weiß-Screening“). Bei TOP10F' ist überdies der Lac Repressor (*lacI<sup>q</sup>*) überexprimiert, so dass die Zugabe von IPTG zum Selektionsmedium nötig ist.

#### *Saccharomyces cerevisiae*

Zur heterologen Expression von Genen wurde der diploide Hefestamm INVSc 1 (Invitrogen) verwendet. Er besitzt eine endogene Cytochrom P450-Reduktase-

Aktivität. Zur Selektion kann seine Auxotrophie für die Aminosäuren Histidin, Leucin und Tryptophan sowie für die Base Uracil ausgenutzt werden.

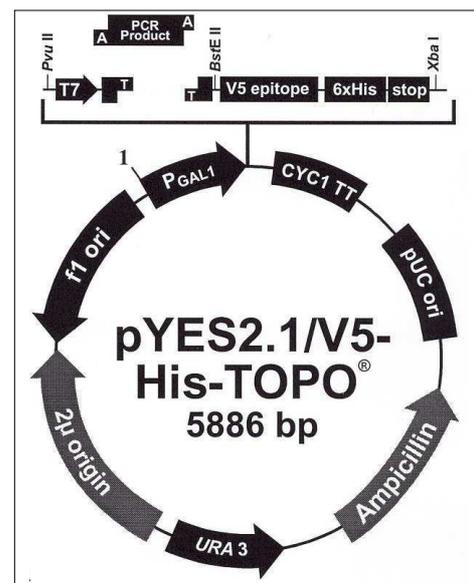
### B.1.11 Vektoren

#### PCR-Klonierungsvektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>

pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) ist ein 3908 bp großes, linearisiertes *high-copy*-Plasmid und enthält einen Replikationsstart für *E. coli*, ein Ampicillin- und ein Kanamycin-Resistenzgen zur Selektion und 3'-T-Überhänge an der Insertionsstelle, die innerhalb eines Proteinfragments zur  $\alpha$ -Komplementation der  $\beta$ -Galaktosidase (ermöglicht „blau/weiß-Screening“) lokalisiert ist.

#### Hefeexpressionsvektor pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup>

pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) ist ein 5886 bp großes, linearisiertes *high-copy*-Plasmid und besitzt einen Replikationsstart für *E. coli* und einen für *S. cerevisiae*, ein Ampicillin-Resistenzgen und *URA3* als Komplementationsmarker zur Selektion sowie einen galaktose-induzierbaren Promotor (*GAL1*) und eine Insertionsstelle mit 3'-T-Überhängen.



**Abb. B2: Hefeexpressionsvektor pYES2.1.** Abbildung aus: <http://www.invitrogen.com/>, dort ist auch die komplette Sequenz erhältlich.

### B.1.12 Bakterien- und Hefemedien

Zur Herstellung der Medien wurde deionisiertes Wasser verwendet. Für Festmedien erfolgte Zugabe von 15 g Agar pro Liter. Die Medien wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Nach Bedarf erfolgte nach dem Abkühlen Zugabe von Antibiotika aus sterilfiltrierten Stammlösungen. Die Lagerung erfolgte im Dunkeln bei 4°C.

### Medien für *E. coli*

LB-Medium	10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,58 g/l NaCl, pH 7,0
SOC	20 mg/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,6 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1 g/l MgCl <sub>2</sub> , 3,5 g/l Glukose

Je nach verwendetem Vektor wurden folgende Konzentrationen an Antibiotika zur Selektion transformierter Bakterienzellen zugegeben:

50 mg/l Kanamycin:	pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup>
100 mg/l Ampicillin:	pYES2.1/V5-His-TOPO <sup>®</sup>

### Medien für *S. cerevisiae*

SGI	1 g/l Pepton, 6,7 g/l Yeast Nitrogen Base, 0,02 g/l Tryptophan, 20 g/l Glukose
YPD	10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 20 g/l Glukose, 0,1 g/l Adenin
YPGE	10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Pepton, 5 g/l Glukose, 3 Vol% Ethanol

## **B.2. Molekularbiologische Methoden**

### **B.2.1 Transformation von Mikroorganismen**

#### *E. coli*

Die verwendeten TOP10F- oder TOP10F'-Zellen (Invitrogen) wurden nach Herstellerangaben über Hitzeschock transformiert.

#### *S. cerevisiae*

Die Herstellung kompetenter Zellen und die Transformation von *S. cerevisiae* wurden mit dem „S.c. EasyComp<sup>™</sup> Transformation“-Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### **B.2.2 Präparation von Plasmid-DNA und Gesamt-RNA**

#### Plasmid-DNA

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mit dem „Plasmid Miniprep“-Kit von Peqlab nach Herstellerangaben präpariert.

## Gesamt-RNA

Für Klonierungszwecke verwendete Gesamt-RNA aus Pflanzen konnte mit dem „RNeasy“-Kit (Qiagen) in ausreichender Menge und in guter Qualität gewonnen werden.

### **B.2.3 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäure**

PCR-Produkte und Plasmide wurden mit dem „PCR Purification Kit“ von Qiagen gereinigt und bei Bedarf konzentriert. Plasmide, Gesamt-RNA und cDNA wurden mit EtOH oder Isopropanol nach Standardprotokollen (SAMBROOK *et al.*, 1989) gefällt.

### **B.2.4 Reverse Transkription**

Zum Umschreiben von mRNA in den komplementären DNA-Strang wurde das Enzym Reverse Transkriptase (Promega oder Invitrogen) verwendet. Als Primer diente Oligo(dT) oder der „adapter primer“ (AP). AP besitzt neben einem dT<sub>17</sub>-Anteil noch einen überhängenden Adapterbereich, der für nachfolgende PCRs ausgenutzt werden kann. Für das 3'-RACE wurde grundsätzlich AP verwendet, für das 5'-RACE ein genspezifischer Primer (GSP). Die Synthese erfolgte nach den jeweiligen Angaben des Herstellers. Standardmäßig wurden 1 bis 5 µg Gesamt-RNA bei einem 25 µl Gesamtansatz verwendet. Vor der Synthese erfolgte eine Inkubation der RNA bei 70°C für 10 min. Die cDNA-Synthese für das 5'-RACE mit *A-tailing* fand bei 50°C statt, ansonsten bei 42°C.

### **B.2.5 PCR-Methoden**

#### **B.2.5.1 Synthetische Oligonukleotide**

Alle in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried, <http://www.metabion.com>) bezogen. Sie sind im Anhang angeführt.

### **B.2.5.2 Standard-PCR**

Für Standard-PCRs wurde *Taq* DNA Polymerase (Promega) verwendet. Im Gesamtvolumen befanden sich standardmäßig 1 x Polymerase Puffer (ohne MgCl<sub>2</sub>), 1 u Polymerase, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, jeweils 0,2 µM Primer und 1 bis 100 ng Template.

Die PCRs wurden mit dem Gradiententhermozykler Hybaid Express (Hybaid) durchgeführt.

Die Amplifikation bestand aus 30 bis 35 Zyklen (1 min Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 45 bis 60°C, 1 min Extension bei 72°C) mit einer anfänglichen 1-minütigen Denaturierung bei 94°C und einer abschließenden 10-minütigen Extension bei 72°C.

Optimierungen wurden hauptsächlich in Bezug auf die Annealing-Temperatur vorgenommen, bei Bedarf für die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration oder der Menge an Template. Für „Proofreading“-PCR wurde „High Fidelity“ Polymerase (Roche) oder *Pfu* Polymerase (MBI Fermentas) verwendet. Das Standardprotokoll wurde entsprechend den Herstellerangaben modifiziert. Die Zyklenzahl betrug maximal 30.

### **B.2.5.3 Konstruktion chimärer Gene**

Die zu fusionierenden cDNA-Fragmente wurden in separaten PCR-Ansätzen amplifiziert. Neben den externen Primern für das entsprechende 5'- bzw. 3'-Ende wurden interne Primer verwendet, die direkt an der Fusionsstelle mit ihrem jeweiligen 5'-Ende aneinander grenzen. Dabei besaß ein interner Primer am 5'-Ende einen Phosphatrest, so dass die Fragmente nach der Amplifikation ligiert werden konnten. Dafür wurden jeweils etwa 50 ng der Fragmente verwendet. Die Ligation fand in einem Gesamtvolumen von 20 µl statt, unter Verwendung von 1,0 u (Weiss) T4 DNA Polymerase (MBI) bei RT für 10 min. Der stark (mindestens 1 : 2000) verdünnte Ligationsansatz diente als Template für die Amplifikation des gewünschten Ligationsprodukts durch die entsprechenden externen Primer.

#### B.2.5.4 Colony-PCR

Mit der *Colony-PCR* erfolgte das Screening von Bakterienklonen auf Anwesenheit eines Plasmids mit gewünschtem Insert. Die Bakterienzellen wurden mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers in den PCR-Ansatz überführt. Der initiale Denaturierungsschritt war 3 min lang, um eine ausreichende Lyse der Bakterienzellen sicherzustellen. Für die *Colony-PCR* waren 25 Zyklen ausreichend.

#### B.2.5.5 RACE-PCR

Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) fand zur Generierung fehlender 3'- bzw. 5'-Enden (3'-RACE bzw. 5'-RACE) aus cDNA-Fragmenten Anwendung. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Angaben des jeweiligen Manuals von Gibco BRL („3'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends“ bzw. „5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends“, Version 2.0).

Anhand bekannter Fragmente folgte die Ableitung genspezifischer Primer (GSP) in Richtung des fehlenden Endes. Für die cDNA-Synthese beim 3'-RACE wurde der „adapter primer“ (AP) verwendet (vgl. A.2.4). AP besitzt neben einem oligo(dT)-Anteil einen Adapter, der aus 20 Nukleotiden besteht. Dadurch kann in der nachfolgenden PCR der „abridged universal anchor primer“ (AUAP), dessen Sequenz dem Adapter entspricht, verwendet werden. Dies erlaubt höhere Annealing-Temperaturen im Vergleich zu einem oligo(dT)-Primer.

1 µl der cDNA diene als Template für einen 50 µl PCR-Ansatz. Als *forward*-Primer wurde der am weitesten *upstream* liegende GSP verwendet. 1 bis 3 µl des gereinigten und ca. 1 : 200 verdünnten PCR-Produkts dienen als Template für eine weitere PCR (*nested-PCR*) mit einem weiter *downstream* liegenden GSP.

Die reverse Transkription von Gesamt-RNA für das 5'-RACE erfolgte mittels eines GSP. Anschließend wurde mit dem Enzym Terminale Transferase (Promega) synthetisch ein *tail* am 5'-Ende geschaffen. Die *tailing*-Reaktion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Meist wurde sowohl mit dATPs (*A-tailing*) als auch dCTPs (*C-tailing*) getailt und beide Ansätze weiter verfolgt. Bei A-getailter cDNA wurde für die erste PCR-Runde als Primer AP verwendet, bei C-getailter cDNA der „abridged anchor primer“ (AAP). AAP besitzt 10 Deoxyguanidine und 6 Deoxyinosine sowie den gleichen Adapter wie AP, so dass für anschließende PCRs ebenfalls AUAP

verwendet werden kann. Als *reverse* Primer wurde jeweils ein GSP verwendet. 2 bis 4 µl der getailten cDNA dienten als Template für einen 50 µl PCR-Ansatz. 1 bis 3 µl des gereinigten und ca. 1 : 200 verdünnten PCR-Produkts dienten als Template für eine *nested*-PCR mit AUAP und einem GSP. Die über 5'-RACE neu zu gewinnende Sequenz war meist auf ca. 600 bp beschränkt. Für längere fehlende 5'-Enden war deswegen ein schrittweises Vorgehen nötig. Die gesamte RACE-Prozedur wurde dann mit zusätzlichen, weiter *upstream* liegenden GSPs noch- oder mehrmals durchgeführt. *A-tailing* führte im Vergleich zum *C-tailing* zwar zu zuverlässigerer, aber meist auch unspezifischerer Produktbildung bei den PCRs.

Die PCR entspricht der Standard-PCR, abgesehen von einer höheren Primer-Konzentration (0,4 µM) und Zyklenzahl (35 bis 40) für die jeweilige PCR.

#### **B.2.5.6 Klonierungen in Vektoren**

Die Ligationen mit dem Klonierungsvektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> und dem Hefe-expressionsvektor pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> (vgl. B.1.11) wurden nach Herstellerangaben (Invitrogen) durchgeführt.

#### **B.2.5.7 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierungen wurden von MWG-Biotech (Ebersberg, <http://www.mwg-biotech.com/>) durchgeführt.

### **B.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **B.3.1 Heterologe Genexpression in Hefe**

Für Anzucht, Induktion und Zellaufschluss von *S. cerevisiae* wurde ein optimiertes Protokoll nach POMPON *et al.* (1996) verwendet. Zur Gewinnung löslicher Proteine wurden nach dem mechanischen Zellaufschluss durch zweimaliges Abzentrifugieren die festen Bestandteile entfernt. Der Überstand diente dann als Proteinquelle. Die

Präparation der mikrosomalen Fraktion erfolgte über PEG-Fällung. Eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise befindet sich in EDER (2001).

### **B.3.2 Bestimmung des Gesamtproteingehalts**

Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts erfolgte nach der Methode von BRADFORD (1976) mit Rinderserum Albumin Fraktion V (BSA) als Standard.

### **B.3.3 Synthese von radioaktiv markierten Flavonoiden**

Die für die Enzymtests als Substrate verwendeten [<sup>14</sup>C]-markierten Flavonoide wurden ausgehend von 4-Cumaroyl-CoA und [<sup>14</sup>C]-Malonyl-CoA nach BRITSCH *et al.* (1981) und BRITSCH und GRIESBACH (1985) hergestellt. Dazu wurden rekombinante Proteine von Chalkonsynthase, Chalkonisomerase, Flavanon 3-Hydroxylase, Flavonoid 3'-Hydroxylase, Flavonoid 3'5'-Hydroxylase aus entsprechenden Expressionsklonen verwendet. Die Vorgehensweise ist in KNOTT (2004) beschrieben.

### **B.3.4 Standardenzymtest**

Ein Standardenzymtest enthielt, sofern nicht anders angegeben, in einem 100 µl Gesamtansatz 20 µl Rohextrakt oder mikrosomale Fraktion aus der heterologen Hefeexpression. Für die Enzymtests wurden [<sup>14</sup>C]-markierte Substrate verwendet. Tab. B1 enthält die für das jeweilige nachzuweisende Enzym verwendeten Substrate und Kofaktoren sowie den pH-Wert des verwendeten Puffers KPi.

Der Testansatz wurde bei 28°C für 30 min inkubiert und mit 500 µl EtOAc extrahiert. Die Oberphase wurde auf Dünnschichtplatten aufgetragen und in geeigneten Laufmitteln aufgetrennt (vgl. B.1.6).

Für eine nähere Charakterisierung des rekombinanten Enzyms, vor allem in Bezug auf die Substratspezifität, wurden 1 bis 2 Wiederholungen der Enzymtests durchgeführt.

**Tab. B1: Für Enzymtests verwendete Substrate, Kofaktoren und pH-Werte des Reaktionspuffers.**

Nachzuweisendes Enzym	Substrat(e)	Kofaktor(en)	pH-Wert
CHS	5 µl Malonyl-Co (110000 dpm), 5 µl 1 nmol 4-Cumaroyl-Co und/oder Kaffeooyl-CoA	-	7,5
F3'(5')H	[ <sup>14</sup> C]-NAR (4000 dpm) oder andere Flavonoide	10 µl NADPH (0,1 mmol)	7,5
FLS	[ <sup>14</sup> C]-DHK oder -DHQ (4000 dpm)	10 µl 2-Oxoglutarat (50 nmol), 10 µl FeSO <sub>4</sub> (10 nmol), 10 µl Na-Ascorbat (1 nmol)	7,5
DFR	[ <sup>14</sup> C]-DHK oder -DHQ (4000 dpm)	10 µl NADPH (0,1 mmol)	6,8

### B.3.5 Radioaktivitätsmessung

Zur Visualisierung und Quantifizierung der radioaktiven Signale wurden die Dünnschichtplatten auf Expositionsplatten (Phospho-Imager-Screen, Fujix) gelegt. Die Expositionsplatten wurden mit dem Phosphoimager (Fujix Bas 1000) eingelesen und ausgewertet (Software BASReader 2.21 und TINA 2.10i, raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt).

### B.4. Computergestützte Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen

Die Analyse und Bearbeitung von Sequenziererergebnissen wurden mit dem Programm Chromas 2.23 (<http://www.technelysium.com/>) durchgeführt. Recherchen in der GenBank erfolgten mit den Programmen Blastn, Blastx und Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Die Erstellung von Restriktionskarten, die Suche nach ORFs u.ä. wurde mit den entsprechenden Funktionen von „A Pack of molecular Analysis Tools“ (<http://www.microbiology.adelaide.edu.au/learn/tools.htm>) oder vergleichbaren Programmen durchgeführt. DNA- und AS-Alignments wurden mit MultAlin (Version 5.4.1, <http://www.prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) oder mit ClustalW (Version 1.82, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) durchgeführt.

Für weitergehende Analysen (Phylogenie, Substitutionsraten) wurden die von ClustalW erstellten Alignments verwendet. Da die in dieser Arbeit analysierten Sequenzen meist mehr als 60% Übereinstimmung aufweisen, spielt die Art der

Substitutionsmatrix für die Erstellung des Alignments i.d.R. keine Rolle. Standardmäßig wurden die „GONNET Matrix“ und die „DNA Identity Matrix“ verwendet (NEI und KUMAR, 2000) und die erhaltenen Alignments bei Bedarf manuell nacheditiert.

Für die Rekonstruktion phylogenetischer Stammbäume wurden die in das Programmpaket Mega2.1 (<http://www.megasoftware.net/>; KUMAR *et al.*, 2001) implementierten Methoden „Neighbor-Joining“, „Minimum Evolution“ und „Maximum Parsimony“ verwendet. Als Grundlage dienten AS-Alignments. Es wurden jeweils verschiedene Distanzmaße (Anzahl der Unterschiede,  $p$ -Distance, Poisson-Korrektur, Gamm-Modell) verwendet und die jeweils erhaltenen Stammbäume miteinander verglichen.

Die Schätzung der synonymen ( $K_s$ ) und nichtsynonymen ( $K_a$ ) Substitutionsrate erfolgte nach der Methode von NEI und GOJOBORI (1986), die ebenfalls in Mega2.1 implementiert ist. Synonyme („stille“) Substitutionen sind Austausche in der DNA-Sequenz, die zu keiner AS-Änderung führen, während nichtsynonyme Substitutionen einen Aminosäureaustausch bewirken (LI, 1997). Die jeweilige Substitutionsrate wird anhand der Anzahl von synonymen bzw. nichtsynonymen Austauschen im Verhältnis zu der Anzahl potenzieller synonyme bzw. nichtsynonyme Positionen berechnet ( $p$ -Distance). Zusätzlich kann in Mega2 eine JUKES-CANTOR-Korrektur durchgeführt werden, wo die Werte hinsichtlich multipler Substitutionen korrigiert werden.

Die Methode nach NEI und GOJOBORI ist ein konservatives Verfahren, da Transitionen gleich bewertet werden wie Transversionen. Da Transitionen i.d.R. häufiger auftreten wie Transversionen, werden mit dieser Methode tendenziell synonyme Austausche über- und nichtsynonyme Austausche unterschätzt (NEI und KUMAR, 2000).

Bei den phylogenetischen Analysen und den Schätzungen der Substitutionsraten wurden, sofern nicht anders angegeben, 1000-Bootstrap-Wiederholungen zur statistischen Bewertung der jeweiligen Berechnung durchgeführt.

## C. Ergebnisse

### C.1 Klonierung und Expression von Flavonoidgenen aus *Osteospermum*

In vorangegangenen enzymologischen Untersuchungen konnten die Substratspezifitäten von CHS und DFR sowie eine ausgeprägte Aktivität von F3'5'H als entscheidend für die Entstehung des Anthocyanmusters in Petalen von *Osteospermum* identifiziert werden (SEITZ, 2000). Ein erstes Ziel vorliegender Arbeit war die Gewinnung von Sequenzinformationen zu allen wichtigen Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese als Grundlage für weiterführende molekularbiologische Untersuchungen. Von den entscheidend an der Ausprägung des Flavonoidmusters beteiligten Enzymen CHS, F3'5'H, FLS und DFR sollten *full-length* cDNA-Klone isoliert und heterolog in Hefe exprimiert werden. Von besonderem Interesse war in diesem Rahmen die Substratspezifität der rekombinanten Proteine.

#### C.1.1 Allgemeines Vorgehen

Zu Beginn der Arbeit lagen keine Sequenzinformationen zu Flavonoidgenen aus *Osteospermum* vor. Deswegen wurden partiell degenerierte Primer für die PCR-gestützte Isolierung von cDNA-Fragmenten von CHS, FHT, FLS, F3'5'H, DFR, ANS und FGT verwendet.

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte aus schwach ausgefärbten Petalen der Sorte „Bamba“. cDNA wurde mit dem unspezifischen, an das Poly(A)-*tail* der mRNA bindenden AP-Primer synthetisiert. Die erhaltenen Fragmente wurden in den PCR-Klonierungsvektor pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) inseriert und sequenziert. Die anschließende Analyse, ob die erhaltene Sequenz Homologie zu bereits bekannten Genen besitzt, erfolgte durch den Vergleich mit den in der GenBank enthaltenen Sequenzen über Blast.

Ausgehend von den klonierten Fragmenten wurde für die CHS, F3'5'H, FLS und DFR versucht, durch RACE-Methoden die jeweils noch fehlenden cDNA-Enden zu gewinnen.

Anhand den von der gewonnenen Sequenzinformation abgeleiteten *end-to-end*-Primern wurden die vollständigen offenen Leserahmen der putativen cDNA-Klone von CHS, F3'5'H, FLS und DFR amplifiziert und direkt in den Hefeexpressionsvektor

pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) kloniert. Die Überprüfung des jeweiligen cDNA-Klons erfolgte anschließend über vollständiges Sequenzieren und über Blast. Die Übereinstimmungen auf DNA- bzw. AS-Ebene mit der am nächsten verwandten Sequenz wurden mit ClustalW berechnet. Nach heterologer Expression in Hefe erfolgte über Enzymtests die Untersuchung auf Funktion und Substratspezifität des jeweiligen rekombinanten Proteins.

Die Isolierung und heterologe Expression des *full-length* CHS cDNA-Klons sowie die Isolierung von putativen ANS und FGT cDNA-Fragmenten erfolgte im Rahmen einer Diplomarbeit (HAUSER, 2004) ebenso wie die Klonierung mit *end-to-end*-Primern und heterologe Expression des *full-length* DFR cDNA-Klons (VITTEN, 2004).

## C.1.2 Klonierung von Flavonoidgenen aus *Osteospermum*

### C.1.2.1 Klonierung eines putativen *full-length* CHS cDNA-Klons

Mit den partiell degenerierten Primern CHS1 und CHS2 konnte ein 656 bp langes Fragment mit einem durchgehenden ORF von 218 AS isoliert werden (Abb. C1). Die höchste Übereinstimmung bestand zur Sequenz der CHS aus *Callistephus chinensis* (Acc.: Z67988) mit 82% Identität auf DNA- und 96% auf AS-Ebene. Durch den Vergleich mit der CHS-Sequenz aus *C. chinensis* konnte auch auf ein Fehlen von ca. 450 bp bis zum 5'-Ende und von ca. 250 bp bis zum 3'-Ende geschlossen werden.

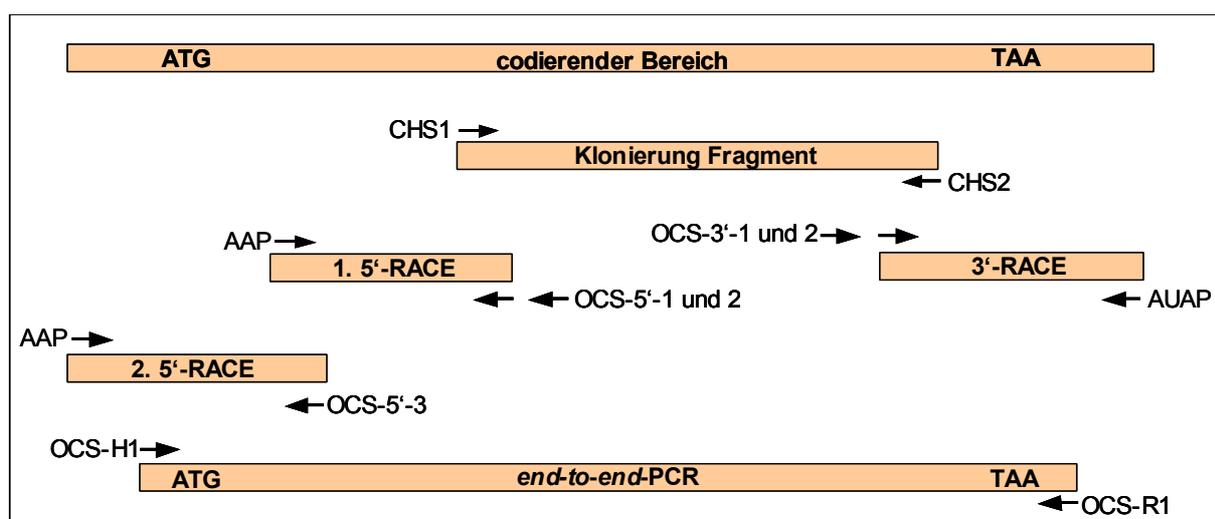


Abb. C1: Schematische Darstellung der Strategie bei der Klonierung des CHS cDNA-Klons.

Auf der Grundlage des Fragments erfolgte das Design von je 2 Primern für das 3'-RACE (OCS-3'-1 und -2) und das 5'-RACE (OCS-5'-1 und -2). Das 3'-RACE ergab

ein Fragment mit Poly(A)<sup>+</sup>-Ende, einem durchgehenden ORF bis zum Stopp-Codon und einem *trailer*-Bereich von 183 bp.

Das erste über 5'-RACE mit C-getailter cDNA gewonnene Fragment enthielt nicht das Start-ATG. Vergleiche mit bereits bekannten CHS-Genen ließen auf ein Fehlen von ca. 210 bp bis zum 5'-Ende schließen. Anhand der neuen Sequenzinformation wurde ein zusätzlicher, weiter *upstream* liegender 5'-RACE-Primer (OCS-5'-3) konstruiert. Dieser wurde in dem zweiten 5'-RACE verwendet, das erfolgreich war. Zusätzlich zum fehlenden codierenden Bereich konnten vor dem Start-ATG 73 bp vom *leader*-Bereich isoliert werden. Die gesamte nun zur Verfügung stehende Sequenz wies 1452 bp Länge auf.

Die auf dieser Grundlage konstruierten *end-to-end*-Primer OCS-H1 und -R1 dienten zur Amplifikation des *full-length* Klons *OCHS1* aus cDNA. Das Sequenzieren ergab eine Klonlänge von 1252 bp, der ORF betrug 398 AS. Es bestand eine Übereinstimmung von 83 bzw. 95 % auf DNA- bzw. AS-Ebene zur Sequenz der CHS aus *C. chinensis*.

### C.1.2.2 Klonierung eines putativen *full-length* F3'5'H cDNA-Klons

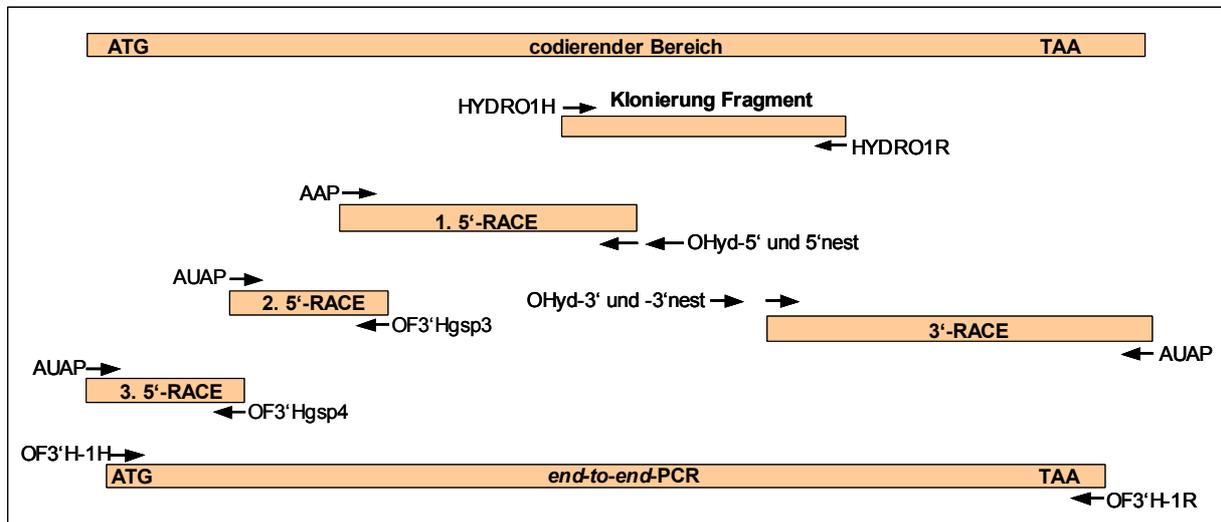
Mit den Cytochrom P450-spezifischen, partiell degenerierten Primern HYDRO1H und HYDRO2H konnte ein ca. 470 bp langes PCR-Produkt erzielt werden (Abb. C2). Die ersten 5 sequenzierten Fragmente zeigten jeweils eine Übereinstimmung von 66% auf DNA- und von 83% auf AS-Ebene mit der Geraniol 10-Hydroxylase aus *Catharanthus roseus* (Acc.: CAC80883).

Das sechste sequenzierte Fragment zeigte jeweils 85% Übereinstimmung auf DNA- bzw. AS-Ebene zur F3'5'H aus *C. chinensis* (Acc.: AAG49299) und eine ähnlich hohe Übereinstimmung zur putativen F3'H ebenfalls aus *C. chinensis* (Acc.: AAG49298). Das Fragment war 467 bp lang, mit einem durchgehenden ORF von 155 AS. Es wurde davon ausgegangen, dass ca. 400 bp bis zum 3'-Ende und ca. 900 bp bis zum 5'-Ende fehlen.

Ausgehend von diesem Fragment wurde über 3'-RACE das fehlende 3'-Ende mit den Primern OHyd-3' und OHyd-3'nest generiert. Das Fragment enthielt das Poly(A)<sup>+</sup>-Ende und einen *trailer*-Bereich von 174 bp nach dem Stopp-Codon.

Schwierig gestaltete sich die Klonierung des 5'-Endes. Das 5'-RACE über *C-tailing* lieferte jeweils deutlich kürzere Fragmente als über *A-tailing*. Das ist erklärbar durch

den hohen G/C-Gehalt am 5'-Ende von Cytochrom P450-Genen. Der G-reiche RACE-Primer bindet dann nicht an das C-Tail, sondern in der G/C-reichen Region des Gens. Beim 5'-RACE über *A-tailing* dagegen war es schwierig, deutlich sichtbare und distinkte PCR-Produkte zu erhalten.



**Abb. C2:** Schematische Darstellung der Strategie bei der Klonierung des F3'5'H cDNA-Klons.

Beim ersten 5'-RACE-Ansatz über *A-tailing* und den RACE-Primern OHyd-5' und OHyd-5'nest wurde ca. 650 bp neue Sequenzinformation gewonnen. Diese enthielt aber kein Start-Codon und der Vergleich mit den Sequenzen der F3'H und der F3'5'H aus *C. chinensis* ließ auf ein Fehlen von über 200 bp bis zum Start-ATG schließen.

Eine Wiederholung des 5'-RACE über *A-tailing* mit einem zusätzlichen RACE-Primer (OF3'Hgsp3) erbrachte ein Fragment, das bis auf ca. 45 bp an das Start-ATG heranreichte. Der fehlende Bereich inklusive Start-Codon und zusätzlich 32 bp *leader*-Sequenz konnten schließlich durch nochmalige Durchführung der 5'-RACE-Prozedur unter Verwendung eines weiteren Primers (OF3'Hgsp4) gewonnen werden. Die gesamte zur Verfügung stehende Sequenz betrug nun 1733 bp inklusive *leader*-Sequenz und *trailer*-Bereich.

Der mit den *end-to-end*-Primern OF3'H-1H und -1R erstellte und anschließend sequenzierte *full-length* cDNA-Klon OF3'H1 zeigte eine Länge von 1624 bp und einen ORF von 508 AS. Der Vergleich mit den in der GenBank vorhandenen Sequenzen erbrachte 79 und 75% Übereinstimmung auf DNA- bzw. AS-Ebene mit der F3'5'H bzw. 78 und 76% mit der F3'H aus *C. chinensis*. Die nächsthöheren Übereinstimmungen bestanden ausschließlich zu F3'Hs. OF3'H1 ist damit wie die F3'5'H aus *C. chinensis* (EDER, 2001) der Sequenz nach eine F3'H.

### C.1.2.3 Klonierung eines putativen FHT cDNA-Fragments und *full-length* FLS cDNA-Klons

Mit den Dioxygenase-spezifischen Primern DIOX1H und DIOX1R konnte auch nach verschiedenen Modifikationen der PCR-Bedingungen keine Amplifikation erzielt werden. Deswegen wurde die Strategie geändert und DIOX1H mit dem unspezifischen AUAP-Primer kombiniert, der dem Adapterteil des AP-Primers, mit dem die cDNA synthetisiert wurde, entspricht. Damit gelang die Amplifikation eines PCR-Produkts der erwarteten Länge von ca. 900 bp (Abb. C3).

Durch die Sequenzierung mehrerer Klone konnten zwei verschiedene Fragmente identifiziert werden. Sie waren homolog zu bereits bekannten FHT- und FLS-Sequenzen. Die höchsten Übereinstimmungen betrug 77 und 84% auf DNA- bzw. AS-Ebene zur FHT aus *C. chinensis* (Acc.: CAA51191) bzw. 72 und 81% zur FLS aus *Petunia-Hybrida* (Acc.: CAA80264). Die beiden Fragmente besaßen jeweils ein vollständiges 3'-Ende. Das putative FHT-Fragment wies einen durchgehenden ORF von 135 AS bis zum Stopp-Codon auf. Der *trailer*-Bereich vor dem Poly(A)<sup>+</sup>-Ende war 273 bp lang.

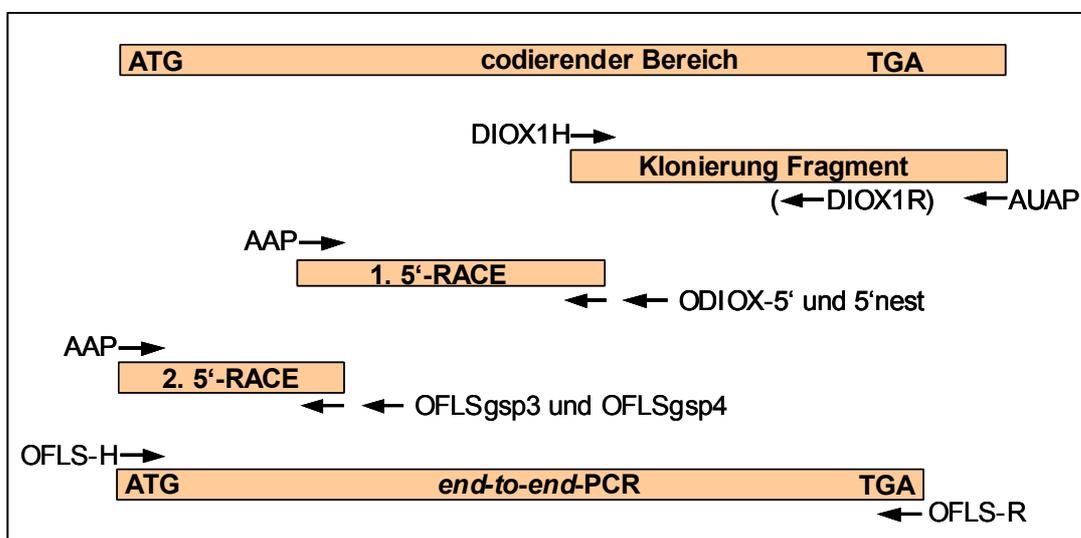


Abb. C3: Schematische Darstellung der Strategie bei der Klonierung des FLS cDNA-Klons.

Das putative FLS-Fragment besaß einen durchgehenden ORF von 119 AS bis zum Stopp-Codon und einen *trailer*-Bereich von 164 bp vor dem Poly(A)<sup>+</sup>-Ende. Es diente als Ausgangspunkt für die Generierung des 5'-Endes (Abb. C3).

5'-RACE über *C-tailing* und den Primern ODIOX-5' und ODIOX-5'nest erbrachte ein Fragment, dem im Vergleich schon bekannter FLS-Sequenzen noch ca. 330 bp bis

zum Startcodon fehlten. Durch Wiederholung der Prozedur mit den 2 zusätzlichen RACE-Primern OFLSgsp3 und OFLSgsp4 konnte ein Fragment gewünschter Länge gewonnen werden. Von dem Fragment wurden nur 21 Basen sequenziert. Da dieses Sequenzstück aber die für Pflanzen typische Startsequenz **AXXATGG** enthielt, wurde davon ausgegangen, dass es sich um das gesuchte Start-Codon handelt. Vor dem ATG standen 3 sequenzierte Nukleotide und danach 18 zur Verfügung. Zusammen mit dem Fragment für das 3'-Ende war damit ausreichend Sequenzinformation für die Konstruktion von *end-to-end*-Primern vorhanden.

Mit den *end-to-end*-Primern OFLS-H und -R erfolgte die Amplifikation des *full-length* Klon *OFLS1* aus cDNA. Sequenzanalyse ergab eine Länge von 1014 bp. Der ORF betrug 335 AS. Die höchsten Übereinstimmungen bestanden auf DNA-Ebene zur FLS aus *Eustoma grandiflorum* (Acc.: AAF64168) mit 73% und auf AS-Ebene zur FLS aus *Petroselinum crispum* (Acc.: AY230249) mit 74%.

#### C.1.2.4 Klonierung eines putativen *full-length* DFR cDNA-Klons

Durch die Verwendung der partiell degenerierten Primer DFR1 und DFR2 gelang die Isolierung eines 206 bp langen Fragments mit einem durchgehenden ORF von 69 AS (Abb. C4). Es wies mit 89% auf DNA-Ebene und 94 % auf AS-Ebene eine hohe Übereinstimmung zu der Sequenz der DFR aus *C. chinensis* (Acc.: CAA91922) auf. Der Vergleich mit dieser bereits bekannten Sequenz ließ auf das Fehlen von ca. 250 bp bis zum 5'-Ende und ca. 630 bp bis zum 3'-Ende schließen.

Ausgehend von dem Fragment wurden 2 Primer für das 3'-RACE (OPR1 und OPR2) sowie 3 für das 5'-RACE (OPR1, OPR2 und OPR3) konstruiert. Mit 3'-RACE gelang die Gewinnung eines Fragments mit Stopp-Codon und Poly(A)<sup>+</sup>-Ende. Der *trailer*-Bereich betrug 47 bp. Das über 5'-RACE gewonnene Fragment hatte vor dem möglichen Start-Codon nur 1 bp, es ließ sich aber durch den Vergleich mit bereits bekannten Genen eindeutig als komplettes 5'-Ende mit Startcodon identifizieren. Die komplette nun zur Verfügung stehende Sequenz besaß 1213 bp.

Mit den *end-to-end*-Primern ODFR1H und ODFR1R konnte der *full-length* cDNA-Klon *ODFR5* isoliert werden. Er war 1160 bp lang und wies einen ORF von 365 AS auf. Die höchste Übereinstimmung bestand zur DFR aus *C. chinensis* mit jeweils 82% auf DNA- und auf AS-Ebene.

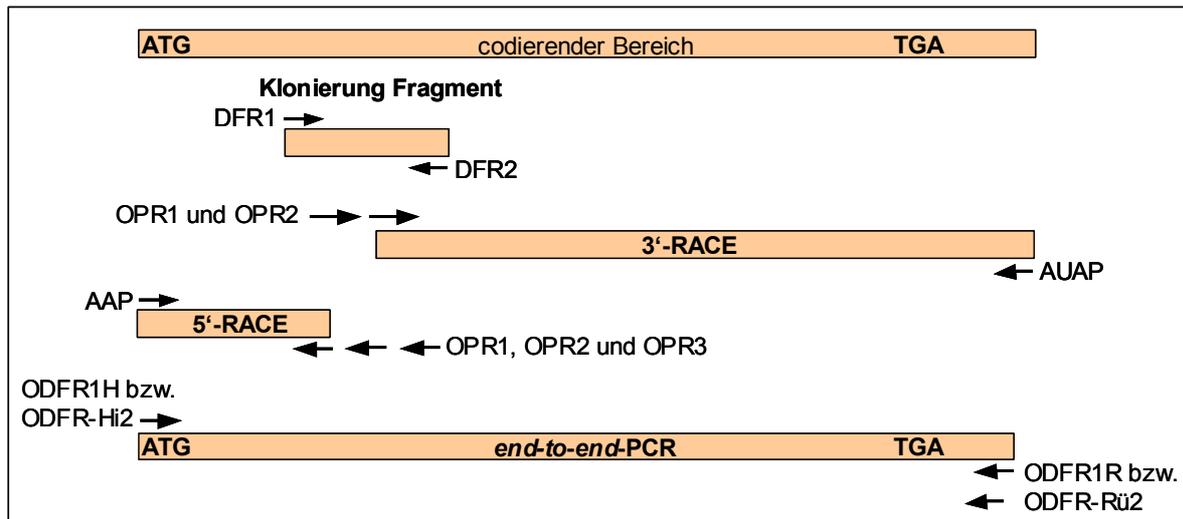


Abb. C4: Schematische Darstellung der Strategie bei der Klonierung des DFR cDNA-Klons.

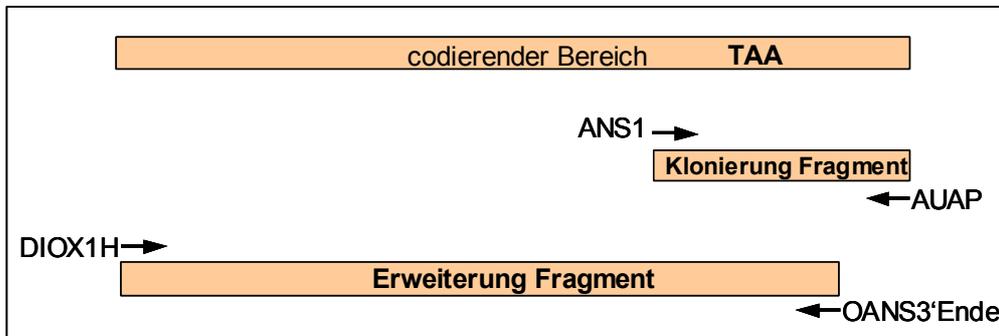
Da sich bei der heterologen Hefeexpression von *ODFR5* (C.1.3.4) weder mit DHK noch mit DHQ oder DHM als Substrat Enzymaktivität nachweisen ließ, erfolgte die Wiederholung der Klonierung mit neuen Primern. Beim *forward*-Primer ODFR-Hi2 wurde an die 3. Stelle vor dem A des Start-Codons ein A eingefügt, da dies die Expression begünstigen soll (KOZAK, 1991), ebenso wie ein G nach dem G des Start-Codons. Um die originäre codierende Sequenz zu erhalten, wurde Letzteres beim Primerdesign aber nicht berücksichtigt, obwohl mit AXXATGA damit immer noch ein für die Expression suboptimaler Startbereich vorhanden war. Das 3'-Ende des neuen *reverse*-Primers ODFR-Rü2 lag nun nur noch 13 bp vom Stopp-Codon entfernt, anstelle von 29 bp bei ODFR-1R. Die *end-to-end*-PCR mit den neuen Primern lieferte den entsprechend kürzeren Klon *ODFR11* dessen Sequenz aber ansonsten mit der bereits vorhandenen von *ODFR5* genau übereinstimmte.

### C.1.2.5 Klonierung eines putativen ANS cDNA-Fragments

Mit dem Dioxygenase-spezifischen, partiell degenerierten Primer DIOX1H in Verbindung mit DIOX1R oder dem AUAP-Primer konnte kein Fragment einer putativen ANS isoliert werden. Dagegen gelang mit dem ANS-spezifischen, partiell degenerierten Primer ANS1 und dem AUAP-Primer die Gewinnung eines putativen ANS-Fragments mit vollständigem 3'-Ende (Abb. C5). Es besaß eine Übereinstimmung von 83% auf DNA- und 86% auf AS-Ebene zur ANS aus C.

*chinensis* (Acc.: AF015885). Es hatte einen durchgehenden ORF von 45 AS. Nach dem Stopp-Codon folgten 158 bp *trailer*-Bereich vor dem Poly(A)<sup>+</sup>-Ende.

Um ausgehend von dem nun vorliegenden, recht kurzen Fragment weitere Sequenzinformation zu gewinnen, wurde der genspezifische, im *trailer*-Bereich liegende *reverse* Primer OANS3'Ende konstruiert.



**Abb. C5:** Schematische Darstellung der Strategie bei der Klonierung des ANS cDNA-Fragments.

Er wurde zur cDNA-Synthese anstelle des unspezifischen AP-Primers verwendet. Die anschließende, mit dem OANS3'Ende-Primer sowie dem Dioxygenase-spezifischen Primer DIOX1H durchgeführte PCR ergab ein Produkt, das sich ebenfalls als putatives ANS-Fragment identifizieren ließ. Die höchste Übereinstimmung bestand wieder zur ANS aus *C. chinensis* mit ähnlichen Werten wie beim Ausgangsfragment. Der zur Verfügung stehende Bereich mit durchgehendem ORF konnte auf insgesamt 275 AS erweitert werden.

#### C.1.2.6 Klonierung eines putativen FGT cDNA-Fragments

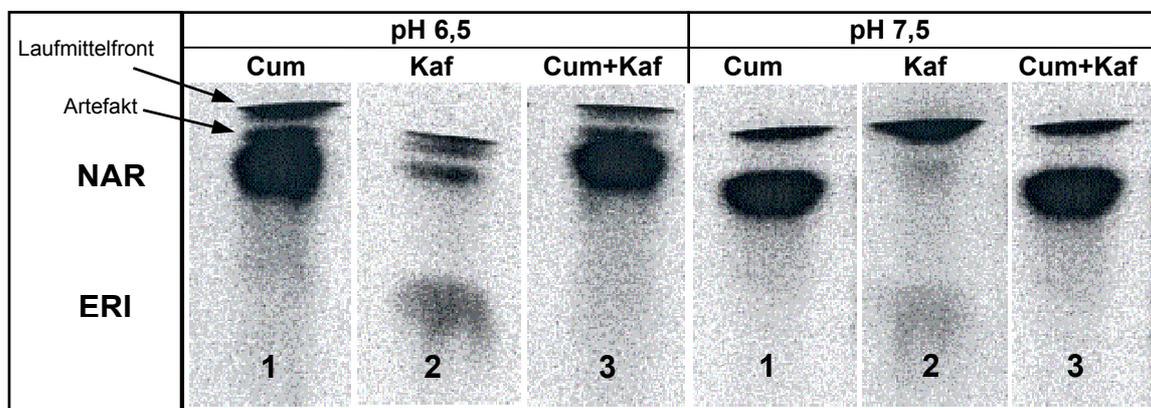
4 verschiedene Fragmente konnten durch die Verwendung des partiell degenerierten FGT-Primers GTMotif1 und des unspezifischen AUAP gewonnen werden. Ein Fragment wies eine sehr hohe Identität zu bekannten ADP-Ribosylierungsfaktoren auf, zwei weitere zeigten Homologie zu putativen Glykosyltransferasen aus *Stevia rebaudiana*.

Bei dem vierten Fragment bestand die höchste Übereinstimmung mit 71% auf DNA- und 85% auf AS-Ebene zu der Anthocyanin 5-O-Glukosyltransferase aus *Petunia-Hybrida* (Acc.: BAA89009). Der 119 AS lange ORF war durchgehend bis zum Stopp-Codon. Diesem folgte ein 74 bp *trailer*-Bereich mit anschließendem Poly(A)<sup>+</sup>-Ende.

### C.1.3 Heterologe Expression der vollständigen cDNA-Klone in Hefe

#### C.1.3.1 Heterologe Expression des putativen CHS cDNA-Klons

Protein aus der heterologen Expression des cDNA-Klons *OCHS1* (C.1.2.1) zeigte eindeutig CHS-Aktivität. Bei den Enzymtests wurde 4-Cumaroyl-CoA und/oder Kaffeoyl-CoA bei pH 6,5 bzw. 7,5 zusammen mit [<sup>14</sup>C]-Malonyl-CoA inkubiert (Abb. C6). Bei beiden pH-Werten erfolgte bei Cumaroyl-CoA als Substrat eine deutliche Bildung von NAR, bei Kaffeoyl-CoA als Substrat bildete sich im Vergleich dazu nur 9 und 3% an ERI bei pH 6,5 bzw. 7,5. Bei beiden Substraten im gleichen Ansatz erfolgte die ausschließliche Synthese von NAR bei beiden pH-Werten. Bei pH 6,5 war ein Artefakt direkt über der Höhe des NAR-Spots zu beobachten.



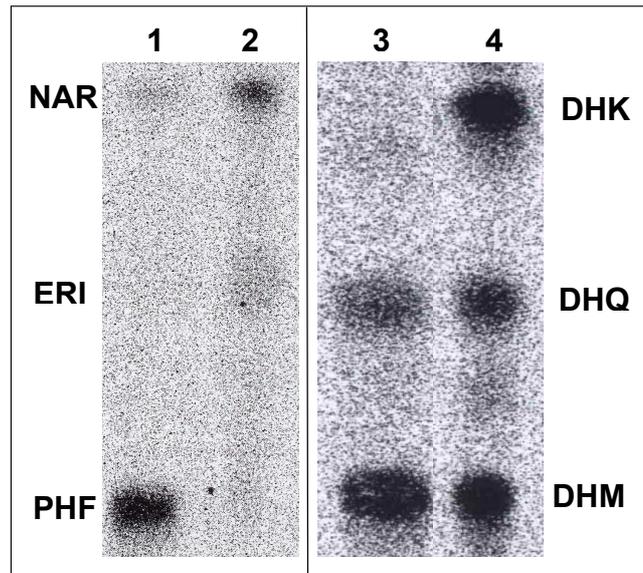
**Abb. C6: Aktivität des heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klons *OCHS1*.**

Die Tests wurden bei pH 6,5 und 7,5 durchgeführt mit 20 µl Protein und [<sup>14</sup>C]-Malonyl-CoA sowie 4-Cumaroyl-CoA bei 1, Kaffeoyl-CoA bei 2 und 4-Cumaroyl-CoA und Kaffeoyl-CoA bei 3 als Substrate. Die Inkubation betrug 30 min. Auftrennung erfolgte in CAW.

Cum = Cumaroyl-CoA, Kaf = Kaffeoyl-CoA

#### C.1.3.2 Heterologe Expression des putativen F3'5'H cDNA-Klons

Mikrosomen aus der heterologen Hefeexpression des Klons *OF3'H1* (C.1.2.2) zeigten eine deutliche 3'- und 5'-Hydroxylierungsaktivität, wobei NAR als Substrat bei den gegebenen Reaktionsbedingungen zu 100% zum 3'4'5'-hydroxylierten PHF und DHK als Substrat zu 30% zum 3'4'-hydroxylierten DHQ und zu 70% zum 3'4'5'-hydroxylierten DHM umgesetzt wurde (Abb. C7). Damit handelt es sich bei dem Klon eindeutig um eine F3'5'H.



**Abb. C7: Aktivität des heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klons *OF3'H1*.**

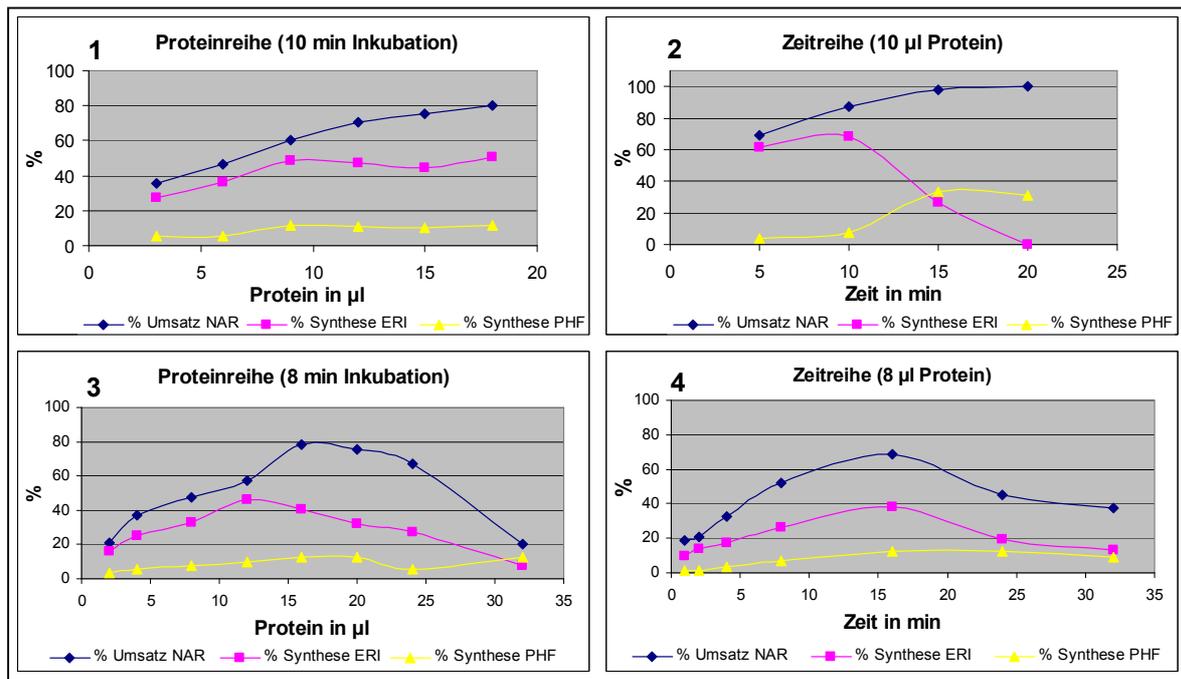
Ansätze jeweils mit 20  $\mu$ l Mikrosomen und 4000 dpm [ $^{14}$ C]-NAR (1) bzw. -DHK (3) als Substrat. Die Inkubation betrug 30 min. 2 und 4 = Vergleichssubstanzen. Auftrennung erfolgte in CAW.

#### C.1.3.2.1 Protein- und Zeitabhängigkeit der 3'5'-Hydroxylierung *in-vitro*

Um eine Vorstellung des Ablaufs und Abhängigkeit der 3'5'-Hydroxylierungsaktivität *in-vitro* zu bekommen, wurde Protein des *OF3'H1*-Klons in Zeit- und Proteinreihen getestet. Als Substrat diente NAR, da es sich im Vergleich zu DHK wesentlich leichter synthetisieren lässt. Bradford-Proteinbestimmung ergab für das verwendete rekombinante Protein eine Konzentration von 0,76  $\mu$ g/ $\mu$ l.

In einem ersten Ansatz wurden verschiedene Proteinmengen bei jeweils 10 min Inkubation und verschiedener Inkubationsdauer mit jeweils 10  $\mu$ l Protein im Ansatz getestet. Dabei zeigte sich, dass bei 10 min Inkubation unabhängig von der Proteinmenge jeweils deutlich mehr 3'4'-hydroxyliertes ERI als 3'4'5'-hydroxyliertes PHF gebildet wird (Abb. C8, 1). Dies gilt in diesem Fall auch dann noch, wenn die schwere Extrahierbarkeit des PHF berücksichtigt wird. Durch Auftragen der wässrigen Unterphase konnte gefolgert werden, dass ca. 60% des synthetisierten PHF im Reaktionsansatz verbleiben. NAR und ERI dagegen ließen sich jeweils quasi vollständig extrahieren.

Der Umsatz von NAR geht mit mehr als 12  $\mu$ l Protein (bei 10 min Inkubation) bzw. nach mehr als 10 min (bei 10  $\mu$ l Protein) in eine Sättigung über. Nach 20 min (bei 10  $\mu$ l Protein) konnte totaler Umsatz von NAR zu PHF erreicht werden (Abb. C8, 2).



**Abb. C8: Protein- und Zeitreihen mit rekombinantem Protein des cDNA-Klons OF3'H1.**

Die Ansätze enthielten jeweils 4000 dpm [ $^{14}\text{C}$ ]-NAR als Substrat. In 1 und 3 wurde die Proteinmenge bei jeweils konstanter Inkubationsdauer variiert, bei 2 und 4 war die Proteinmenge bei variierender Inkubationsdauer konstant.

Im Gegensatz zu NAR und ERI ist PHF nur schwer extrahierbar. Etwa 60 % verbleiben im Reaktionsansatz. Dies wurde bei den in der Abbildung angegebenen Werten nicht berücksichtigt.

Um einen genaueren Verlauf der Abhängigkeiten zu erhalten, wurden in einem zweiten Ansatz 8  $\mu\text{l}$  Protein und 8 min Inkubationsdauer als Fixwerte gewählt (Abb. C8, 3 und 4), da diese Bedingungen einen zirka halbmaximalen Umsatz des eingesetzten NAR erwarten ließen. Hierbei kam nun die Abhängigkeit der 3'5'-Hydroxylierungsaktivität von der eingesetzten Proteinmenge bzw. der Inkubationsdauer deutlich zum Vorschein. Höhere Proteinmengen als 9,1  $\mu\text{g}$  (12  $\mu\text{l}$ ) reduzieren die Synthese von ERI, höhere als 15,2  $\mu\text{g}$  (20  $\mu\text{l}$ ) auch diejenige von PHF. Mit 24,3  $\mu\text{g}$  (32  $\mu\text{l}$ ) Protein im Ansatz wurde nur noch ca. 20% des eingesetzten NAR umgesetzt. Mit 6,1  $\mu\text{g}$  (8  $\mu\text{l}$ ) Protein als konstantem Wert wurde der maximale Umsatz von NAR (69%) bei 16 min Inkubationsdauer erreicht, bei einer längeren Inkubationsdauer nahm die Synthese von ERI deutlich ab, bei einer längeren als 24 min auch diejenige von PHF.

Um eine maximale 3'5'-Hydroxylierungsaktivität bei totalem Umsatz des eingesetzten NAR zu erzielen, musste damit eine Mindestmenge an Protein (ca. 8  $\mu\text{g}$ ) im Reaktionsansatz vorhanden sein und die Inkubationsdauer ca. 20 min betragen (Abb. C8, 2). Höhere Proteinmengen haben ebenso wie längere Inkubationszeiten einen hemmenden Einfluss auf die Hydroxylierungsaktivität *in-vitro*.

### C.1.3.2.2 Substratspezifität der F3'5'H *in-vitro*

Die oben gemachten Untersuchungen ließen bei einer Proteinmenge von 6,8 µg und einer Inkubationsdauer von 8 min auf einen zirka halbmaximalen Umsatz des eingesetzten NAR erwarten. Deshalb wurden diese Bedingungen für die Untersuchung der Substratspezifität des *OF3'H1*-Klons verwendet. Neben NAR wurden auch ERI, DHK, DHQ, Ap, Lu, Km und Qu getestet (Tab. C1).

**Tab. C1: Substratspezifität von *OF3'H1*-Protein.**

eingesetztes Substrat:	NAR	DHK	ERI	DHQ	Ap	Km	Lu	Qu
% Umsatz Substrat	48,1	52,5	0	10,2	24,9	51,6	0	0
% 3'-hydroxyliertes Produkt	40,3	43,4	-	-	19,6	41,8	-	-
% 3'5'-hydroxyliertes Produkt	7,8	6,2	0	10,2	5,3	9,8	0	0

Die Ansätze enthielten jeweils 6,8 µg Mikrosomen und 4000 dpm [<sup>14</sup>C]-Flavonoid als Substrat. Die Inkubationsdauer betrug 8 min. Auftrennung erfolgte in CAW.

Der Test ergab in etwa einen vergleichbar hohen Umsatz von DHK und Km. NAR wies eine im Vergleich dazu geringere Umsatzrate auf (48% im Vgl. zu 52,5 bzw. 51,6%). Auffallenderweise wurde im Vergleich zu den bereits genannten Substraten das Flavon Ap unter den gegebenen Bedingungen deutlich schlechter umgesetzt. Als einziges 3'4'-hydroxyliertes Substrat wurde DHQ umgesetzt (zu ca. 10%).

Ein weiterer Test sollte zeigen, ob ERI generell kein Substrat ist. Unter den für NAR-Umsatz maximalen Bedingungen (vgl. C.1.3.2.1) wurde ERI zu 31,1% umgesetzt zu PHF.

**Tab. C2: Substratpräferenz von *O3'H1*-Protein.**

eingesetztes Substrat:	NAR+DHK
<b>% Umsatz NAR</b>	<b>41,1</b>
% Synthese ERI	34,4
% Synthese PHF	7,7
<b>% Umsatz DHK</b>	<b>54,2</b>
% Synthese DHQ	43,7
% Synthese DHM	10,5

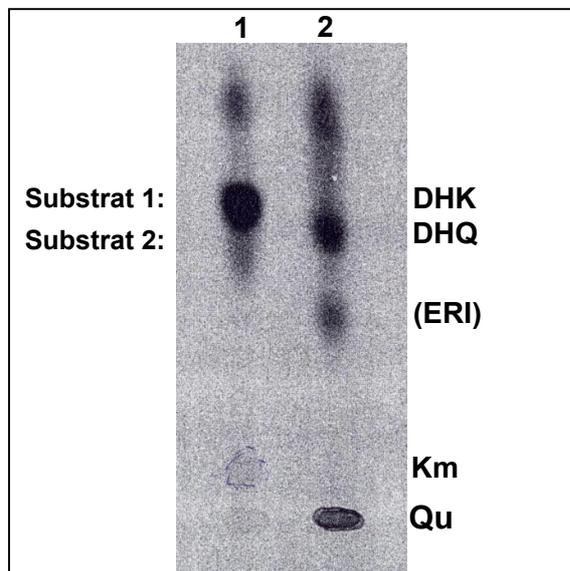
Die Ansätze enthielten jeweils 6,8 µg Mikrosomen und eine Mischung aus jeweils 2000 dpm [<sup>14</sup>C]-NAR und -DHK als Substrat. Die Inkubationsdauer betrug 8 min. Auftrennung erfolgte in CAW.

Des Weiteren wurde ein Konkurrenztest mit NAR und DHK zu gleichen Teilen im Ansatz durchgeführt (Tab. C2). Hierbei zeigte sich noch deutlicher, dass DHK das

präferierte Substrat für das getestete rekombinante Protein *in-vitro* ist. Es wurde zu ca. 54% umgesetzt, NAR dagegen zu ca. 41%.

### C.1.3.3 Heterologe Expression des putativen FLS cDNA-Klons

Bei der heterologen Expression des cDNA-Klons *OFLS1* (C.1.2.3) in Hefe zeigte das rekombinante Protein keine hohe, aber eindeutig nachweisbare FLS-Aktivität (Abb. C9). Zudem kann von einer deutlichen Substratspezifität für DHQ ausgegangen werden, da 37,5% des eingesetzten DHQ zu Qu und 11,4% des eingesetzten DHK zu Km umgesetzt wurden.



**Abb. C9: Aktivität des heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klons *OFLS1*.** Ansätze jeweils mit 20 µl Protein, **1** = Ansatz mit [<sup>14</sup>C]-DHK als Substrat, **2** = Ansatz mit [<sup>14</sup>C]-DHQ als Substrat. ( ) = Rest aus Substratsynthese. Die Inkubation betrug 30 min. Auftrennung erfolgte in 30% Essigsäure.

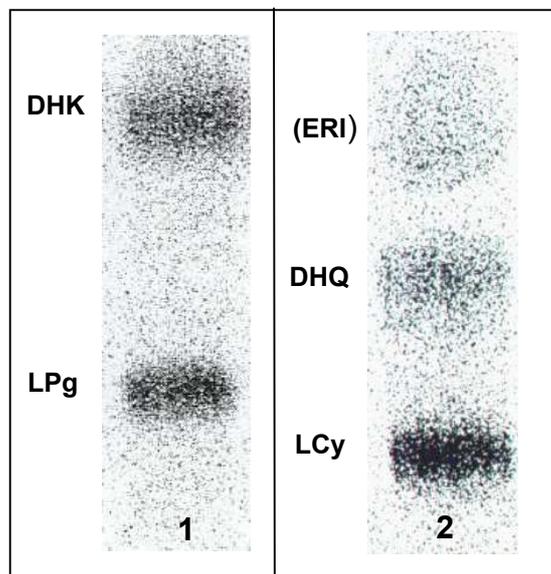
In zusätzlichen Enzymtests wurden auch NAR und ERI als Substrate getestet. Hierbei konnte keine Produktbildung beobachtet werden.

### C.1.3.4 Heterologe Expression des putativen DFR cDNA-Klons

Das Protein des heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klons *ODFR5* zeigte zunächst weder mit DHK noch mit DHQ oder DHM als Substrat Enzymaktivität. Deswegen wurde an der 3. Position vor dem Start-Codon ein A eingefügt und der untranslatierte Bereich am 3'-Ende verkürzt (vgl. C.1.2.4).

Der auf diese Weise modifizierte cDNA-Klon wurde wiederum in Hefe exprimiert. Das rekombinante Protein zeigte nun eindeutig DFR-Aktivität. Überraschenderweise fand

auch Umsatz von DHK zu LPg statt, wenn auch in geringerem Umfang als von DHQ zu LCy (Abb. C10). Da mit Proteinrohextrakt aus Blüten keine Reduktion von DHK zu LPg beobachtet werden konnte, wurde die Substratspezifität *in-vitro* in weiteren Versuchen noch näher untersucht (C.3.2).



**Abb. C10: Aktivität des heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klons ODFR11.** Die Ansätze enthielten jeweils 20 µl Protein, die Inkubation betrug 30 min. **1** = Ansatz mit [<sup>14</sup>C]-DHK als Substrat, **2** = Ansatz mit [<sup>14</sup>C]-DHQ als Substrat. ( ) = Rest aus Substratsynthese. Auftrennung erfolgte in CAW.

## C.2 Untersuchungen zur Phylogenie von F3'H und F3'5'H und zur molekularen Basis ihres Funktionsunterschieds

EDER (2001) isolierte aus *Callistephus chinensis* zwei cDNA-Klone, die sich beide der Sequenz nach als F3'H klassifizieren ließen. Das rekombinante Protein einer cDNA zeigte aber überraschenderweise F3'5'H-Aktivität. Der aus *Osteospermum* isolierte Klon *OF3'H1* ist der Sequenz nach wiederum eine F3'H. Die Übereinstimmungen zu den Sequenzen der F3'H und der F3'5'H aus *C. chinensis* sind fast gleich (C.1.2.2). Das rekombinante Protein zeigte aber eindeutig F3'5'H-Aktivität (C.1.3.2).

Diese Befunde warfen grundlegende Fragen nach der Evolution und phylogenetischen Einordnung der F3'5'Hs aus Asteraceae auf, aber auch, ob sich aufgrund der hohen Ähnlichkeit der F3'5'Hs aus Asteraceae zu den F3'Hs und allgemeine Erkenntnisse gewinnen lassen im Hinblick auf die molekulare Basis des Funktionsunterschieds zwischen F3'H und F3'5'H.

### C.2.1 Sequenzvergleich der *Osteospermum* F3'5'H mit anderen cDNAs von F3'H und F3'5'H

Zu Beginn dieser Arbeit lagen aus der Familie der Asteraceae eine F3'5'H- und eine F3'H-Sequenz, jeweils aus *C. chinensis* vor (EDER, 2001), neben einer Reihe von Sequenzen aus anderen Familien. Im Laufe des Jahres 2003 kamen von den Asteraceae noch eine weitere F3'5'H-Sequenz aus *Senecio cruentus* (Yamamura und Terakawa, 2003) dazu, sowie zwei F3'H-Sequenzen aus *Gerbera-Hybrida* (DEIML, 2003) und *Hieracium pilosella* (KELLNER, 2003). Die beiden letzteren Sequenzen wurden von B. DEIML und S. KELLNER für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

In Bezug auf die Klassifizierung trat bei der *Osteospermum* F3'5'H das von EDER (2001) für die F3'5'H aus *C. chinensis* beschriebene Phänomen auf, wonach sie gemäß den Sequenzeigenschaften als F3'H einzuordnen ist, der Funktion nach aber eindeutig eine F3'5'H ist. Das Gleiche trifft auch für die F3'5'H aus *S. cruentus* zu.

Der paarweise Vergleich der Asteraceae F3'5'H-Sequenzen untereinander ergab durchschnittlich eine Übereinstimmung von 77,7% auf DNA- und 72,7% auf AS-Ebene (Tab. C3). Ihr Vergleich mit den Asteraceae F3'Hs erbrachte mit durchschnittlich 76,3 und 72,9% fast gleiche Werte. In beiden Fällen war jeweils die Übereinstimmung auf DNA-Ebene höher als auf AS-Ebene.

Höhere Übereinstimmungen ergab der Vergleich der Asteraceae F3'Hs untereinander mit durchschnittlich 79,3% auf DNA- und 81,7% auf AS-Ebene. In diesem Fall war die Übereinstimmung auf AS-Ebene höher als auf DNA-Ebene.

Tab. C3: Homologie-Matrix der Asteraceae F3'H- und F3'5'H-Sequenzen.

	Ost-3'5'	Sen-3'5'	CC-3'5'	CC-3'	Gerb-3'	Hier-3'
Ost-3'5'	-	77	79	78	75	78
Sen-3'5'	73	-	77	75	74	78
CC-3'5'	75	70	-	77	75	77
CC-3'	76	73	74	-	78	78
Gerb-3'	72	69	71	81	-	82
Hier-3'	74	74	73	82	82	-

Im oberen Teil der Matrix sind die Übereinstimmungen der Sequenzen in % auf DNA-Ebene angegeben, im unteren Teil auf Protein-Ebene. Zur Berechnung der Werte mit ClustalW wurde jeweils nur der codierende Bereich berücksichtigt.

Die Referenzen zu den verwendeten Sequenzen sind im Anhang angegeben.

3'5' = F3'5'H, 3' = F3'H, Ost = *Osteospermum*-Hybrida, Sen = *Senecio cruentus*, CC = *Callistephus chinensis*, Gerb = *Gerbera*-Hybrida, Hier = *Hieracium pilosella*

Tab. C4: Homologie-Matrix der *Osteospermum* F3'5'H und anderer F3'H und F3'5'H-Sequenzen.

	Ost-3'5'	Gerb-3'	Pet-3'5'	Tor-3'5'	Pet-3'	Tor-3'
Ost-3'5'	-	<b>75</b>	<b>55</b>	<b>53</b>	<b>65</b>	<b>59</b>
Gerb-3'	<b>72</b>	-	<b>54</b>	<b>52</b>	<b>66</b>	<b>62</b>
Pet-3'5'	<b>47</b>	<b>48</b>	-	<b>62</b>	<b>54</b>	<b>51</b>
Tor-3'5'	<b>48</b>	<b>48</b>	<b>71</b>	-	<b>47</b>	<b>54</b>
Pet-3'	<b>67</b>	<b>71</b>	<b>50</b>	<b>48</b>	-	<b>61</b>
Tor-3'	<b>60</b>	<b>72</b>	<b>46</b>	<b>45</b>	<b>67</b>	-

Im oberen Teil der Matrix sind die Übereinstimmungen der Sequenzen in % auf DNA-Ebene angegeben, im unteren Teil auf Protein-Ebene. Zur Berechnung der Werte mit ClustalW wurde jeweils nur der codierende Bereich berücksichtigt.

Die Referenzen zu den verwendeten Sequenzen sind im Anhang angegeben.

3'5' = F3'5'H, 3' = F3'H, Ost = *Osteospermum*-Hybrida, Gerb = *Gerbera*-Hybrida, Pet = *Petunia*-Hybrida, Tor = *Torenia*-Hybrida

Für den Vergleich mit Sequenzen anderer Familien boten sich *Petunia*-Hybrida und *Torenia*-Hybrida an, da hier jeweils die Sequenz der F3'H als auch der F3'5'H bekannt ist. Erwartungsgemäß ergab der Vergleich der Sequenz der F3'H aus *Gerbera* mit diesen Sequenzen eine deutlich höhere Übereinstimmung zu den jeweiligen F3'H-Sequenzen (Tab. C4). Dagegen zeigte die *Osteospermum* F3'5'H zu den F3'H-Sequenzen erstaunlicherweise deutlich höhere Übereinstimmungen als zu den F3'5'H-Sequenzen, sowohl auf DNA-Ebene mit 65 und 59%, im Vergleich zu 55 und 53%, als auch auf AS-Ebene mit 67 und 60%, verglichen mit 47 und 48%. Beim Vergleich der F3'H aus *Petunia* bzw. *Torenia* mit der jeweiligen F3'5'H aus der gleichen Familie ergaben sich jeweils 54% Übereinstimmung auf DNA-Ebene, auf AS-Ebene betrug sie 50 bzw. 45%. Auch hier waren die Werte auf DNA-Ebene höher als auf AS-Ebene.

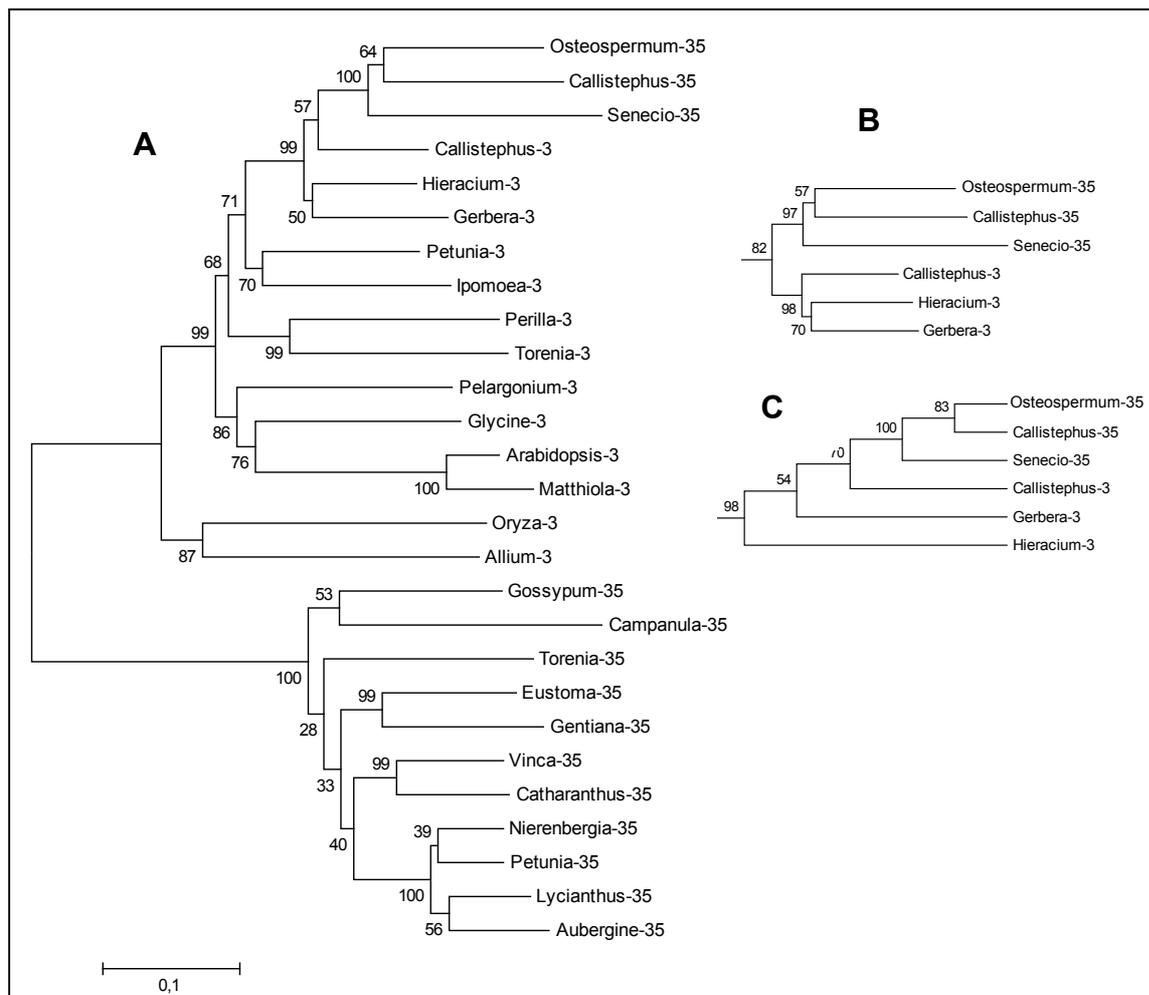
### C.2.2 Phylogenetische Verwandtschaft der F3'H und F3'5'H

Die oben dargestellten Befunde belegten den F3'H-Charakter der bislang bekannten F3'5'H-Sequenzen aus Asteraceae. Um ihre phylogenetische Einordnung zu klären, wurde mit allen bislang bekannten F3'H- und F3'5'H-AS-Sequenzen eine phylogenetische Analyse durchgeführt.

Der in Abb. C11 gezeigte, mit der „Neighbor-Joining“-Methode erstellte Stammbaum unterstreicht die Sonderstellung der Asteraceae F3'5'H-Sequenzen. Sie bilden einen eigenen, stabilen Cluster innerhalb der F3'H-Sequenzen. Das gleiche Ergebnis wurde mit der „Maximum Parsimony“-Methode und der „Minimum Evolution“-Methode erzielt (Abb. C11, B und C). Die oben zum Vergleich verwendeten

Sequenzen der F3'H und F3'5'H aus *Petunia* bzw. *Torenia* finden sich im jeweiligen Block der F3'Fs bzw. der F3'5'Fs wieder. Innerhalb der Blocks entspricht die Zuordnung jeweils dem vom Verwandtschaftsgrad her erwarteten.

Die Anordnung der F3'Fs aus Asteraceae ist instabil. Die Bootstrap-Werte sind jeweils niedrig. Nur bei dem mit der „Minimum Evolution“-Methode erstellten Stammbaum bilden sie einen eigenen Cluster.



**Abb. C11: Phylogenetischer Stammbaum der bekannten F3'Fs und F3'5'Fs.**

Die Aminosäuresequenzen wurden mit ClustalW aligned und die Stammbäume anschließend mit der (A) „Neighbor-Joining“-Methode (Bootstrap 1000 Wdh.), der (B) „Minimum Evolution“-Methode (Bootstrap 1000 Wdh.) und der (C) „Maximum Parsimony“-Methode (Bootstrap 500 Wdh.) erstellt (Methoden jeweils in Mega2 implementiert). Als Distanzmaß wurde jeweils  $p$ -Distance verwendet. Andere Distanzmaße (Poisson Correction, Gamma Model) ergaben vergleichbare Bäume. Die Referenzen zu den verwendeten Sequenzen sind im Anhang angegeben.

3 = F3'H, 35 = F3'5'H

### C.2.3 Evolutionsrate der Asteraceae F3'5'Hs

In den in Abb. C11 gezeigten, mit der „Neighbor-Joining“-Methode und der „Minimum Evolution“-Methode erstellten Stammbäumen weisen die im Vergleich zu den F3'Hs deutlich längeren Äste der F3'5'Hs aus Asteraceae auf eine beschleunigte Evolution hin. Allgemein wird eine erhöhte Austauschrate der AS (nichtsynonyme Substitutionsrate) oft nach Genduplikationen und im Zusammenhang mit der Entstehung neuer Enzymfunktionen beobachtet (LI, 1997). Das Verhältnis von der Rate der synonymen (Ks) zu der Rate der nichtsynonymen Substitutionen (Ka) ist ein Maß für das Verhältnis von funktionaler Konservierung zu funktionaler Konvergenz (OHTA, 1993; LI, 1997). Nichtsynonyme Substitutionen sind Austausche in der DNA-Sequenz, die zu keinen AS-Austauschen führen. Sie stellen nach KIMURA (1987) ein grobes Maß für die Mutationsrate dar.

Zur Schätzung der Substitutionsraten der F3'Hs und F3'5'Hs wurde die in Mega2 implementierte Methode nach NEI und GOJOBORI (1986) verwendet. Es wurden die Sequenzen der F3'Hs aus *Gerbera* und *Callistephus* und der F3'5'Hs aus *Osteospermum* und *Callistephus* verwendet und jeweils mit der Sequenz der F3'H aus *Petunia* verglichen. Die damit erzielten Ks-Werte bewegen sich jeweils in einem einheitlichen Bereich (Tab. C5). Dagegen ergab der Vergleich der F3'H aus *Petunia* mit den F3'5'Hs höhere Ka-Werte als der Vergleich mit den F3'Hs. Das schlägt sich jeweils in einem höherem Ka/Ks-Verhältnis (0,261 und 0,218 gegenüber 0,178 und 0,170) nieder. Dies weist deutlich darauf hin, dass die Asteraceae F3'5'Hs eine beschleunigte Evolutionsrate aufweisen.

**Tab. C5: Geschätzte Substitutionsraten zwischen F3'Hs und F3'5'Hs aus Asteraceae und der F3'H aus *Petunia*.**

F3'H <i>Petunia</i> zu	Ka	Ks	Ka/Ks
F3'5'H <i>Callistephus</i>	0,193 (0,015)	0,738 (0,033)	0,262
F3'5'H <i>Osteospermum</i>	0,171 (0,013)	0,781 (0,031)	0,219
F3'H <i>Callistephus</i>	0,137 (0,013)	0,771 (0,033)	0,178
F3'H <i>Gerbera</i>	0,134 (0,013)	0,785 (0,033)	0,171

Die Schätzung der synonymen (Ks) und nichtsynonymen (Ka) Substitutionsrate erfolgte nach der in Mega2 implementierten Methode von NEI und GOJOBORI ( $p$ -Distance, Bootstrap 1000 Wdh.). Die F3'H- und F3'5'H-Sequenzen aus Asteraceae wurden jeweils mit der Sequenz der F3'H aus *Petunia* verglichen. In Klammern ist die Standardabweichung angegeben.

Die Erstellung des Multialignments erfolgte mit ClustalW und die anschließende Bearbeitung manuell. Stark divergierende Bereiche, insbesondere an den 3'- und 5'-Enden, wurden entfernt. Insgesamt wurden jeweils 800 bp paarweise verglichen. Die Referenzen zu den verwendeten Sequenzen sind im Anhang angegeben.

Zusätzlich wurde der relative Ratentest nach TAJIMA (1993, ebenfalls in Mega2 implementiert) durchgeführt. In diesem auf dem Chi-Quadrat-Test basierenden Verfahren werden definierte Positionen der Codons zweier Sequenzen untereinander und jeweils mit einer Außengruppe verglichen. Er kann damit unabhängig von einem Substitutionsmodell und der möglichen Variation der Substitutionsrate zwischen verschiedenen Sequenzbereichen angewendet werden (TAJIMA, 1993). Die Nullhypothese lautet auf konstante Evolutionsgeschwindigkeit („molecular clock“).

Als Außengruppe diene wiederum die Sequenz der F3'H aus *Petunia*. Es wurden einmal die ersten beiden Nukleotide eines Codons und einmal das dritte für den relativen Ratentest verwendet. Die Analyse der Austausch an den ersten beiden sowie an der dritten Position bietet sich an, da diese jeweils die Mehrzahl der nichtsynonymen bzw. synonymen Austausch repräsentieren (NEI und KUMAR, 2000).

Der Test ergab in Bezug auf die dritte Codonposition, dass in allen Fällen von einer konstanten Evolutionsgeschwindigkeit ausgegangen werden kann (Tab. C6). Beim Vergleich der beiden verwendeten Asteraceen F3'H-Sequenzen untereinander gilt dies auch hinsichtlich der ersten beiden Positionen. Dagegen kann hier beim Vergleich einer der F3'H- mit einer der F3'5'H-Sequenzen aus Asteraceen jeweils die „molecular clock“-Hypothese bei einem niedrigen Signifikanzniveau abgelehnt werden.

**Tab. C6: Relativer Ratentest mit F3'His und F3'5'His aus Asteraceen.**

	F3'H <i>Callistephus</i>	F3'H <i>Gerbera</i>	F3'5'H <i>Osteospermum</i>	F3'5'H <i>Callistephus</i>
F3'H <i>Callistephus</i>	-	0,64 (p=0,423)	9,89 (p=0,002)	21,04 (p=0,000)
F3'H <i>Gerbera</i>	0,04 (p=0,851)	-	6,08 (p=0,014)	14,73 (p=0,000)
F3'5'H <i>Osteospermum</i>	0,04 (p=0,850)	0,15 (p=0,703)	-	3,0 (p=0,083)
F3'5'H <i>Callistephus</i>	0,09 (p=0,790)	0,01 (p=0,920)	0,27 (p=0,604)	-

Der relative Ratentest erfolgte nach der in Mega2 implementierten Methode nach TAJIMA (1993). Die Nullhypothese lautet auf konstante Evolutionsrate. In der rechten oberen Hälfte sind die  $\chi^2$ -Werte (1 Freiheitsgrad) aus dem Test, bei dem die ersten beiden Positionen eines Codons berücksichtigt wurden, angegeben, in der linken unteren Hälfte die  $\chi^2$ -Werte (1 Freiheitsgrad) aus dem Test mit der dritten Position eines Codons.

Es wurde das gleiche Multialignment wie zur Schätzung der Substitutionsraten verwendet (vgl. Tab. C5). Als Außengruppe diene jeweils die Sequenz der F3'H aus *Petunia*. In Rot sind die Fälle gekennzeichnet, in denen die „molecular clock“-Hypothese abgelehnt werden kann.

Diese statistischen Ergebnisse untermauern den anhand der Substitutionsraten festgestellten Trend der beschleunigten Evolution der Asteraceae F3'5'Hs.

#### **C.2.4 Konstruktion chimärer Gene aus cDNA-Fragmenten von F3'H und F3'5'H**

Um den Bereich zu lokalisieren, der die unterschiedliche Funktion der F3'H und der F3'5'H bedingt, wurde die Konstruktion chimärer Gene aus cDNA-Fragmenten der F3'H aus *Gerbera* und der F3'5'H aus *Osteospermum* angestrebt. Heterologe Expression in Hefe sollte Aufschluss geben über die jeweilige Funktion des chimären Gens und Rückschlüsse auf den Zusammenhang von Struktur und Funktion erlauben.

#### **C.4.1 Identifizierung unterschiedlicher Aminosäuren als Grundlage für die Konstruktion chimärer Gene**

Durch Multialignment der 3 bekannten Asteraceae und anderer F3'5'Hs mit den bis *dato* bekannten F3'Hs sollten Bereiche lokalisiert werden, die für die unterschiedliche Funktion verantwortlich sein könnten. Da, wie oben festgestellt, die bislang bekannten F3'5'H-Sequenzen aus Asteraceae eine hohe Übereinstimmung mit den F3'Hs aufweisen, ließen sich nicht nur Bereiche, sondern sogar einzelne AS näher eingrenzen.

Tab. C7 zeigt die Positionen, an denen sich jeweils die Asteraceae F3'5'Hs und teilweise die F3'5'Hs anderer Familien von den bekannten F3'Hs unterscheiden. Im Bereich zwischen Position 178 und 187 der AS-Sequenz von *Osteospermum* fallen 3 Unterschiede auf. An Position 178 weisen die drei Asteraceae F3'5'Hs ebenso wie die bekannten F3'5'Hs anderer Familien ein Ala auf, die bekannten F3'Hs dagegen überwiegend ein Thr. An Position 184 und 187 unterscheiden sich die Asteraceae F3'5'Hs sowohl von den F3'Hs als auch den F3'5'Hs anderer Familien.

Tab. C7: Unterschiede in der Aminosäuresequenz bei Asteraceen F3'5'Hs im Vergleich mit anderen F3'5'Hs und F3'Hs.

Position des Unterschieds (ausgehend von der <i>Osteospermum</i> F3'5'H AS-Sequenz)	Aminosäure(n) an der jeweiligen Position bei			entsprechende Substraterkennungsregion nach RUPASINGHE <i>et al.</i> (2003)
	Asteraceen F3'5'Hs (n = 3)	F3'Hs (n = 13) (inklusive Asteraceen F3'Hs)	andere F3'5'Hs (n = 11)	
86	S (3)	A (11), S (1), L (1)	S (11)	
133	M (1), D (2)	V (10), L (1), Q (1), I (1)	L (10), I (1)	-
178	A (3)	T (11), V (2)	A	-
184	M (3)	V (7), A (4), E (2)	V (11)	-
187	D (3)	G (13)	S (11)	-
217	T (2), F (1)	V (7), A (3), E, Q, S je (1)	T (1), R (1)	2
221	Q (2), K (1)	V (9), E (3), S (1)	Y (11)	2
434	P (1), V (2)	G (13)	G (11)	-
489	F (3)	Y (13)	F (11)	6
492	S (3)	T (13)	A (11)	6

Hinter der Aminosäure ist in Klammern die Anzahl ihres Vorkommens angegeben. Das Alignment wurde mit dem Programm MultAlin erstellt. Die Referenzen zu den verwendeten Sequenzen sind im Anhang angegeben.

Allerdings liegt dieser Bereich außerhalb von den 6 von GOTOH (1992) postulierten Substraterkennungsregionen (**SRSs**, „substrate recognition sites“) bei CytP450-Proteinen. RUPASINGHE *et al.* (2003) verfeinerten das SRS-Konzept mittels computergestützter Modellierung anhand von 4 *Arabidopsis* CytP450-Sequenzen aus dem Phenylpropanweg und der Flavonoidbiosynthese, darunter die F3'H. Diese Arbeit diente hier als Referenz.

In SRS2 und SRS6 befinden sich jeweils zwei Positionen, an denen sich die Asteraceen F3'5'Hs von den bislang bekannten F3'Hs unterscheiden. In Bezug auf SRS2 ist das Aminosäuremuster an den betreffenden Positionen allerdings sehr heterogen. Damit ist es unwahrscheinlich, dass SRS2 für den Funktionsunterschied verantwortlich ist.

#### C.4.2 Konstruktion und heterologe Hefeexpression chimärer Gene

Aufgrund des oben dargestellten Vergleichs der AS-Sequenzen kamen v.a. der N-terminale Bereich bis Position 187 sowie SRS6 als potenzielle Träger des Funktionsunterschieds zwischen F3'H und F3'5'H in Frage.

Es wurden drei chimäre Gene aus cDNA-Fragmenten der F3'H aus *Gerbera* und der F3'5'H aus *Osteospermum* konstruiert (Tab. C8). Das chimäre Gen GO-1 beinhaltet

den N-Terminus der *f3'h* aus *Gerbera* inklusive der SRS1, der C-Terminus stammt von der *f3'5'h* aus *Osteospermum*. Bei OG-1 sind die Verhältnisse umgekehrt. GO-6 beinhaltet den C-Terminus der *f3'5'h* aus *Osteospermum* inklusive der SRS6, der N-Terminus stammt von der *f3'h* aus *Gerbera*.

**Tab. C8: Chimäre Gene aus cDNA-Fragmenten der *Gerbera* F3'H und der *Osteospermum* F3'5'H.**

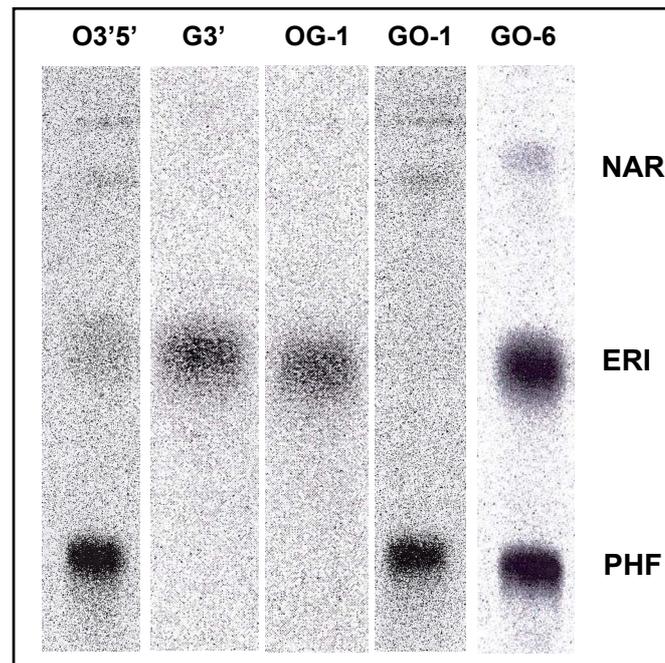
Name des chimären Gens	Bestandteile			
	N-Terminus	SRS	C-Terminus	SRS
GO-1 (1521 bp)	G3' bis N174	1 von G3'	O3'5' ab V175	2 bis 6 von O3'5'
OG-1 (1536 bp)	O3'5' bis F189	1 von O3'5'	G3' ab L190	2 bis 6 von G3'5'
GO-6 (1527 bp)	G3' bis L478	1 bis 5 von G3'	O3'5' ab N479	6 von O3'5'

In Klammern ist die Länge des codierenden Bereichs in bp angegeben.

SRS = „substrate recognition site“ nach RUPASINGHE *et al.* (2003), G3' = *Gerbera* F3'H, O3'5' = *Osteospermum* F3'5'H

Die chimären Konstrukte wurden in den Hefeexpressionsvektor pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) kloniert. Nach heterologer Expression in Hefe erfolgte über Enzymtests die Untersuchung auf Aktivität und Funktion des Proteins. Als Vergleich wurden die rekombinanten Proteine der F3'H aus *Gerbera* und der F3'5'H aus *Osteospermum* verwendet.

Das Protein von OG-1 zeigte wie das rekombinante Protein der *Gerbera* F3'H mit NAR ausschließlich 3'-Hydroxylierungsaktivität, Protein von GO-1 dagegen starke 3'5'-Hydroxylierungsaktivität (Abb. C12). Damit kann ausgeschlossen werden, dass der N-Terminus inklusive der SRS1 einen Einfluss auf die Determinierung der Funktion hat. Mit Protein von GO-6 konnte die Bildung von ERI und PHF im Verhältnis von ca. 1:1 detektiert werden. Trotz einiger Optimierungsversuche konnte mit dem Protein von GO-6 keine ausschließliche Bildung von PHF erreicht werden, wie es mit dem rekombinanten Protein der F3'5'H aus *Osteospermum* möglich ist. GO-6 besitzt aber eindeutig 3'5'-Hydroxylierungsaktivität. Der C-terminale Bereich mit der SRS6 der F3'5'H aus *Osteospermum* bewirkt damit die Funktionserweiterung von der 3'-Hydroxylierung zur 3'5'-Hydroxylierung. Da, wie oben festgestellt, SRS6 an zwei Positionen signifikante AS-Unterschiede zwischen F3'H und F3'5'H beherbergt, ist es sehr wahrscheinlich, dass in SRS6 der Funktionsunterschied determiniert wird.



**Abb. C12: Enzymtests mit Protein aus der heterologen Hefeexpression chimärer Gene aus cDNA-Fragmenten von F3'H und F3'5'H.**

Es wurden jeweils 10 µl Mikrosomen aus der Hefeexpression verwendet. Als Substrat diente jeweils 4000 dpm [<sup>14</sup>C]-NAR. Die Auftrennung erfolgte in CAW. Die Inkubation betrug 30 min. Rekombinantes Protein der *Osteospermum* F3'5'H und der *Gerbera* F3'H diente als Referenz.

O3'5' = *Osteospermum* F3'5'H, G3' = *Gerbera* F3'H

### C.3 Untersuchungen zu der Substratspezifität der DFR und ihrer molekularen Basis

Im Gegensatz zu Pflanzenextrakt akzeptierte das rekombinante Protein des heterolog in Hefe exprimierten DFR cDNA-Klons aus *Osteospermum* überraschenderweise DHK als Substrat. Um zu bestimmen, inwieweit dies ein *in-vitro*-Phänomen ist, wurden Versuche unter Verwendung weiterer rekombinanter Proteine von DFR cDNAs aus *Gerbera*-Hybrida „Regina“ und „Clivia“ sowie aus *Fragaria x ananassa* „Thetis“ durchgeführt.

*Gerbera* „Regina“ akkumuliert Pelargonidinderivate in den Petalen und dementsprechend zeigte Proteinextrakt Reduktion von DHK (MARTENS, persönliche Mitteilung). Dagegen kann bei der *Gerbera* „Clivia“ davon ausgegangen werden, dass die DFR *in-planta* nicht fähig ist, DHK zu reduzieren (MARTENS, persönliche Mitteilung). Das rekombinante Protein der DFR aus „Clivia“ zeigte aber Reduktion von DHK *in-vitro* (PFEIFFER, 2003). Die Erdbeerfrucht akkumuliert fast

ausschließlich Pelargonidinderivate und das rekombinante Protein des von GOSCH (2003) klonierten und heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klons zeigte eine hohe Substratpräferenz für DHK. Die cDNA-Klone wurden für diese Arbeit von S. MARTENS, J. PFEIFFER und C. GOSCH zur Verfügung gestellt.

Daneben wurden Proteine aus der Hefeexpression von konstruierten chimären DFR cDNAs verwendet. Damit sollte insbesondere getestet werden, ob ausschließlich eine von JOHNSON *et al.* (2001) postulierte Region für die Substratspezifität der DFR verantwortlich ist. Aufbauend darauf wurde der Fragestellung nachgegangen, ob sich Korrelationen zwischen der Substratspezifität und der Primärsequenz etablieren lassen.

### C.3.1 Konstruktion chimärer Gene aus cDNA-Fragmenten der DFRs aus *Fragaria* und *Osteospermum*

JOHNSON *et al.* (2001) konstruierten 3 chimäre Gene aus den N-Termina der *dfr* aus *Gerbera* „Regina“ und dem jeweiligen C-Terminus der *dfr* aus *Petunia*. Anhand der Ergebnisse der Expression *in-planta* dieser Chimären postulierten sie eine die Substratspezifität determinierende Region (SSDR) zwischen Position 126 und 157 der Sequenz der *Gerbera* DFR.

Zur Überprüfung dieser These wurde die Konstruktion chimärer Gene aus den cDNAs der DFR aus *Fragaria* und aus *Osteospermum* angestrebt (Tab. C9). Das chimäre Gen *OF* besitzt den N-Terminus der *dfr* aus *Osteospermum* bis zur SSDR, gefolgt von der Sequenz der *dfr* aus *Fragaria*. Dadurch kann überprüft werden, ob der N-Terminus einen Einfluss auf die Ausprägung der Substratspezifität hat. Darüber hinausgehend besitzt das chimäre Gen *OFO* von der *dfr* aus *Fragaria* nur noch die SSDR, die entsprechenden 3'- und 5'-Enden stammen jeweils von der *dfr* aus *Osteospermum*.

Tab. C9: Chimäre Gene aus cDNA-Fragmenten der DFRs aus *Fragaria* und *Osteospermum*.

Name des chimären Gens	Bestandteile	
	N-Terminus	C-Terminus
<i>OF</i> (1020 bp)	ODFR bis S129	FDFR ab A131
<i>OFO</i> (1095 bp)	OF bis V157	ODFR ab K158

In Klammern ist die Länge des codierenden Bereichs in bp angegeben.  
FDFR = DFR aus *Fragaria*, ODFR = DFR aus *Osteospermum*

### C.3.2 Untersuchungen zur Substratspezifität der DFR *in-vitro*

Rekombinantes Protein der *Osteospermum* DFR setzte DHK überraschenderweise zu einem bedeutenden Teil zu LPg um (vgl. C.1.3.4). Um die *in-vitro* auftretende Substratspezifität besser quantifizieren und vergleichen zu können, wurden 1:1-Mischungen von DHK und DHQ als Substrat für die weiterführenden Versuche verwendet. Protein des chimären Gens *OF* zeigte in Vorversuchen gute Aktivität und hohen Umsatz von DHK zu LPg. Deswegen wurde es als Referenz verwendet. Eine Proteinreihe mit 3, 6, 9 und 12 µl Proteinextrakt aus der Hefeexpression von *OF* wurde durchgeführt, um halbmaximale Umsatzbedingungen zu definieren. Die Inkubationsdauer betrug 10 min und Substrat war ausschließlich DHK (4000 dpm). Bereits mit 3 µl Protein im Testansatz, was ca. 2,9 µg Gesamtprotein entspricht, erfolgte bei 10 min Inkubation fast 50% Umsatz des eingesetzten DHK. Der maximale Umsatz betrug 68% bei 9 µl. Mit 12 µl Proteinlösung sank der Umsatz auf unter 55% ab.

Als Testbedingungen zum Vergleich der Substratspezifität verschiedener DFRs wurden 2,5 µg Protein und 10 min Inkubation gewählt. Es wurde Proteinextrakt aus der heterologen Hefeexpression der cDNAs der DFR aus *Osteospermum*, *Gerbera* und *Fragaria* sowie von den chimären cDNAs *OF* und *OFO* (vgl. Tab. C9) verwendet. In den Tests wurde eine Mischung aus jeweils 2000 dpm DHK und DHQ angeboten. Der pH des Reaktionspuffers betrug standardmäßig 6,8, für das rekombinante Protein der *Osteospermum* DFR und von *OF* wurde mit pH 6,0 und 7,5 noch zusätzlich 2 Varianten getestet.

Die getesteten Proteine zeigten eine hohe Variation hinsichtlich des Verhältnisses an gebildetem LPg zu LCy (Tab. C10). Mit rekombinantem Protein der DFR aus *Gerbera* „Regina“ lag das Verhältnis mit 0,62 jeweils deutlich höher als mit rekombinantem Protein der DFR aus *Gerbera* „Clivia“ und aus *Osteospermum*, wo die Werte 0,16 bzw. 0,27 betragen.

Mit einer 3fach höheren Synthese von LPg als von LCy zeigte das rekombinante Protein der *Fragaria* DFR eine sehr hohe Substratpräferenz für DHK. Im Vergleich dazu etwa um die Hälfte reduziert war das Verhältnis von synthetisiertem LPg zu LCy bei Verwendung von Protein von *OF*. Da dieses chimäre Gen den N-Terminus der *dfr* aus *Osteospermum* besitzt, scheint der N-terminale Bereich damit einen Einfluss auf die volle Ausprägung der hohen Substratspezifität der *Fragaria* DFR zu haben. Bei Verwendung von Protein von *OFO* ergab sich ein ähnliches Verhältnis von

synthetisiertem LPg zu LCy. Dies legt nahe, dass im Gegensatz zum N-Terminus der C-Terminus keinen Einfluss auf die Ausprägung der Substratspezifität hat.

**Tab. C10: Substratspezifität verschiedener DFRs *in-vitro* mit DHK und DHQ als Substrate.**

% Umsatz	In Hefe heterolog exprimierte DFR cDNA von:					
	<i>Gerbera</i> „Regina“	<i>Gerbera</i> „Clivia“	<i>Fragaria</i>	<i>Osteo.</i>	<i>OF</i>	<i>OFO</i>
DHK zu LPg	30,66	10,07	34,60	14,14	63,96	24,90
DHQ zu LCy	49,41	62,92	11,41	51,90	39,04	16,20
Verhältnis LPg/LCy	0,62	0,16	3,15	0,27	1,64	1,48

Als Substrat diente eine Mischung aus je 2000 dpm [<sup>14</sup>C]-DHK und [<sup>14</sup>C]-DHQ. Verwendet wurden jeweils 2,5 µg Protein, die Inkubation betrug 10 min. Die Auftrennung erfolgte in CAW.

LPg = Leucopelargonidin, LCy = Leucocyanidin, Osteo. = *Osteospermum*, OF bzw. OFO = chimäres Gen aus cDNA-Fragmenten der DFRs aus *Osteospermum* und *Fragaria* (vgl. Tab. C9)

Vergleichbare Tendenzen ergaben sich, wenn neben DHK und DHQ auch DHM als weiteres Substrat angeboten wurde (Tab. C11). Das rekombinante Protein der *Fragaria* DFR synthetisierte über 1,8-mal mehr LPg als LCy und LDp zusammen. Bei Verwendung von Protein von OF ergab sich mit ca. 1,2 wiederum ein erniedrigtes Verhältnis. Mit rekombinantem Protein der DFR aus *Gerbera* „Regina“ lag das Verhältnis mit 0,77 deutlich unter 1, wobei hier noch jeweils mehr LPg als LCy oder LDp gebildet wurde. Mit rekombinantem Protein der *Osteospermum* DFR und der DFR aus *Gerbera* „Clivia“ ergaben sich mit 0,20 und 0,29 die niedrigsten Verhältnisse.

**Tab. C11: Substratspezifität verschiedener DFRs *in-vitro* mit DHK, DHQ und DHM als Substrate.**

% Umsatz	In Hefe heterolog exprimierte DFR cDNA von				
	<i>OF</i>	<i>Osteo.</i>	<i>Fragaria</i>	<i>Gerbera</i> „Regina“	<i>Gerbera</i> „Clivia“
DHK zu LPg	40,14	11,53	26,41	33,14	30,72
DHQ zu LCy	25,57	33,35	9,04	23,21	51,63
DHM zu LDp	6,49	24,12	5,00	19,69	53,91
Verhältnis LPg/(LCy+LDp)	1,19	0,20	1,86	0,77	0,29

Als Substrat diente eine Mischung aus je 1300 dpm [<sup>14</sup>C]-DHK, [<sup>14</sup>C]-DHQ und [<sup>14</sup>C]-DHM. Verwendet wurden jeweils 2,5 µg Protein, die Inkubation betrug 10 min. Die Auftrennung erfolgte in CAW.

LPg = Leucopelargonidin, LCy = Leucocyanidin, LDp = Leucodelphinidin, Osteo. = *Osteospermum*, OF bzw. OFO = chimäres Gen aus cDNA-Fragmenten der DFRs aus *Osteospermum* und *Fragaria* (vgl. Tab. C9)

In Bezug auf den jeweiligen pH-Wert des Reaktionspuffers ließ sich ein deutlicher Einfluss auf die Ausprägung der Substratspezifität ausmachen (Tab. C12). Das

rekombinante Protein der *Osteospermum* DFR zeigte bei pH 6,0 mit 0,25 ein annähernd gleiches Verhältnis an gebildetem LPg zu LCy wie bei pH 6,8, bei pH 7,5 allerdings war es auf das Doppelte erhöht. Mit Protein des chimären Gens *OF* ergab sich bei pH 6,0 mit 0,99 ein engeres und bei pH 7,5 mit 2,32 ein weiteres Verhältnis im Vergleich zu pH 6,8.

**Tab. C12: pH-Abhängigkeit der Substratspezifität der DFR *in-vitro***

In Hefe heterolog exprimierte DFR cDNA von:	<i>Osteospermum</i>		<i>OF</i>	
	pH-Wert		Reaktionspuffer	
% Umsatz	6,0	7,5	6,0	7,5
DHK zu LPg	19,28	14,75	84,48	43,93
DHQ zu LCy	76,57	28,99	85,15	18,91
Verhältnis LPg/LCy	0,25	0,51	0,99	2,32

Als Substrat diente eine Mischung aus je 2000 dpm [<sup>14</sup>C]-DHK und [<sup>14</sup>C]-DHQ. Verwendet wurden jeweils 2,5 µg Protein, die Inkubation betrug 10 min. Die Auftrennung erfolgte in CAW. LPg = Leucopelargonidin, LCy = Leucocyanidin, *OF* = chimäres Gen aus cDNA-Fragmenten der DFRs aus *Osteospermum* und *Fragaria* (vgl. Tab. C9)

### C.3.3 Molekulare Basis der Substratspezifität der DFR

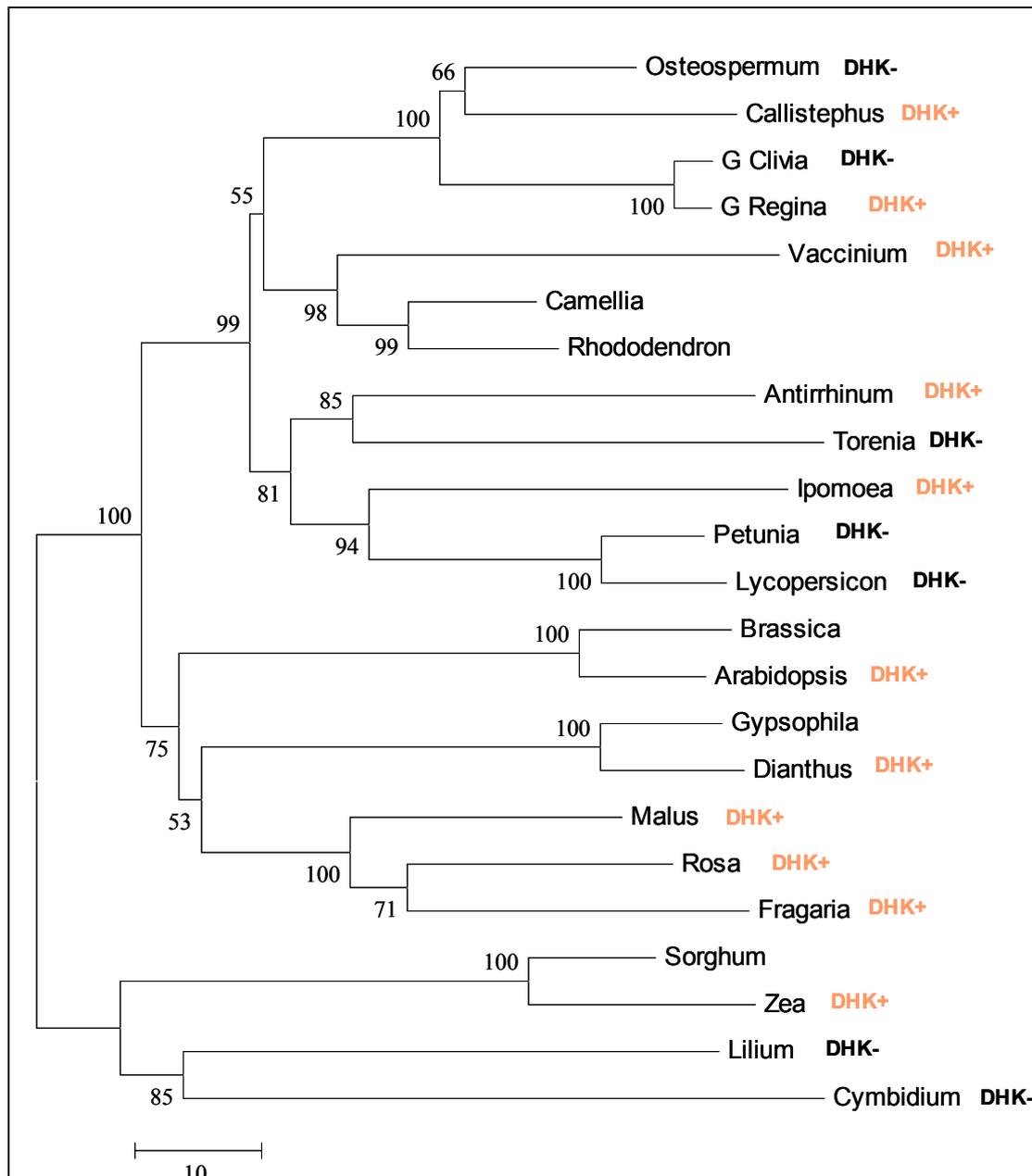
Die oben dargestellten Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die von JOHNSON *et al.* (2001) postulierte SSDR tatsächlich zu einem großen Teil, wenn auch nicht ausschließlich, für die Determinierung der Substratspezifität verantwortlich ist.

Deshalb wurde versucht, durch Vergleich der AS-Sequenzen der SSDRs verschiedener DFRs eine Korrelation bestimmter AS-Abfolgen und der *in-vivo* beobachteten Substratspezifität zu finden. In einem ersten Schritt erfolgte die phylogenetische Analyse verschiedener DFR-Sequenzen.

#### C.3.3.1 Phylogenetische Verwandtschaft der DFR

Mit 22 AS-Sequenzen bekannter DFRs wurde ein phylogenetischer Stammbaum mit der „Neighbor-Joining“-Methode rekonstruiert (Abb. C13). Die Substratspezifität *in-planta*, soweit bekannt, wurde angegeben. Wie in Abb. C13 ersichtlich, erfolgt die Clusterbildung streng nach dem Verwandtschaftsgrad der verglichenen Sequenzen. Dies bedeutet in Bezug auf die hier interessierende Substratspezifität, dass die

Fähigkeit der DFR zur Reduktion von DHK mehrmals unabhängig voneinander evolviert ist bzw. verloren ging.



**Abb. C13: Phylogenetischer Stammbaum ausgewählter DFRs.**

Die Aminosäuresequenzen wurden mit ClustalW aligned und die Stammbäume anschließend mit der „Neighbor-Joining“ Methode (implementiert in Mega2) rekonstruiert. Als Distanzmaß wurde jeweils  $p$ -Distance verwendet (Bootstrap 1000 Wdh.). Andere Methoden („Minimum Evolution“, „Maximum Parsimony“) oder Distanzmaße (Poisson Correction, Gamma Model) ergaben vergleichbare Bäume. Die Referenzen zu den verwendeten Sequenzen sind im Anhang angegeben.

DHK+ = DFR reduziert DHK *in-planta*

DHK- = DFR reduziert kein DHK *in-planta*

G = *Gerbera*

### C.3.3.2 Sequenzvergleich zur Identifizierung putativ für die Substratspezifität der DFR entscheidender Aminosäuren

Beim Vergleich der Sequenzen der SSDRs verschiedener DFRs mit bekannter Substratspezifität ließ sich keine allgemein gültige Korrelation einer bestimmten Abfolge von AS und der jeweiligen Substratspezifität ableiten.

	125	134	144	154	164		
<i>Osteospermum</i> _-	VFTSSAGT	VYVQEH	QLPYYDES	QNSDLD	INSK	KHTAMHYFV	Asteraceae
<i>Callistephus</i> _+	VYTSSAGT	VYVQET	QLPYYDESH	MSDLD	FIYSK	KHTAMHYFV	
<i>G. "Clivia"</i> _-	VFTSSAGT	VYVQEK	QLHYVDESH	MSDLD	FIYSK	KHTAMHYFV	
<i>G. "Regina"</i> _+	VFTSSAGT	VYVQEK	QLHYVDESH	MSDLD	FIYSK	KHTAMHYFV	
<i>G. "Johnson"</i> _+	VFTSSAGT	VYVQEK	QLHYVDESH	MSDLD	FIYSK	KHTAMHYFV	
<i>Iponoea</i> _-	VFTSSAGT	LVVQPP	QKPYDET	CHSDLD	FIYAK	KHTGMHYFA	Convolvulaceae
<i>Petunia</i> _-	VFTSSAGT	LDVQEQ	QLFYDQT	MSDLD	FIYAK	KHTGMHYFA	Solanaceae
<i>Lycopersicon</i> _-	VFTSSAGT	LDVQEQ	QLFYDET	MSDLD	FIYAK	KHTGMHYFV	
<i>Antirrhinum</i> _+	IFTTSGGT	VYVEEH	HQKPYDET	SDMDF	INSK	KHTGMHYFV	Scrophulariaceae
<i>Torenia</i> _-	IFTNSAGT	LVVEEH	HQKPYDESN	MSDLD	FIYST	KHTGMHYFV	
<i>Dianthus</i> _+	VFTSSGGT	VYVEE	ATQKPYDET	CHSDLD	FIRSY	KHTGMHYFV	Caryophyllaceae
<i>Fragaria</i> _+	VFTSSAGT	VYVQEK	QLHYVDESN	MSDYY	CRKY	KHTGMHYFV	Rosaceae
<i>Zea</i> _+	VFTSSAGT	VYVEER	QRPYYD	HDM	MSDYDF	CRRYKHTGMHYFV	Poaceae
<i>Lilium</i> _-	IFTSSAGT	VYVQEN	QMPYDESS	MSDYDF	CRRYKHTGMHYFV	Liliaceae	
<i>Cymbidium</i> _-	IFTSSAGT	VYVEEH	QATVYDESS	MSDLD	FVTRY	KHTGMHYFV	Orchidaceae
Consensus	!FTsSaG	lvn!#e	.qkpvYd#	..MSDldFi	...	KHTgMHYFv	

Abb. C14: Die putative die Substratspezifität der DFR determinierende Region verschiedener Arten.

Das Alignment wurde mit dem Programm MultAlin erstellt. Die Referenzen zu den verwendeten Sequenzen sind im Anhang angegeben.

+ = DFR reduziert DHK *in-planta*

- = DFR reduziert kein DHK *in-planta*

G = *Gerbera*, „Johnson“ = von JOHNSON *et al.* (2001) mutierte (N134L) DFR aus *Gerbera* „Regina“

Die Sequenz der DFR aus *Gerbera* „Clivia“ unterscheidet sich beispielsweise innerhalb der SDR nur an einer Position von derjenigen der DFR aus *Gerbera* „Regina“ (Abb. C14). Dieser Unterschied könnte die höhere Spezifität für DHK der „Regina“ DFR gegenüber der „Clivia“ DFR bedingen. Diese Hypothese stützend, weist auch die *Osteospermum* DFR an dieser Stelle wie die „Clivia“ DFR ein Val auf. Allerdings auch die DFR von *Callistephus*, in deren Blüten Pg-Derivate vorkommen. Es ließe sich argumentieren, dass sich das Pro an Position 141 für eine andere räumliche Struktur der SDR der DFRs von *Callistephus* und *Osteospermum* verantwortlich zeichnet. Genauso gut könnten aber Wechselwirkungen mit AS außerhalb der SDR entscheidend sein. Die gesamte codierende Sequenz der DFR aus „Clivia“ unterscheidet sich von derjenigen aus „Regina“ in 11 AS, davon befinden

sich 4 nahe des 3'-Endes. Beim dem Vergleich dieser Sequenzen mit denjenigen aus *Osteospermum* und *Callistephus* konnte aber wiederum kein einheitliches Unterscheidungsmerkmal für die unterschiedlichen Spezifitäten für DHK gefunden werden.

Als weiteres Beispiel mögen die *in-planta* DHK-reduzierenden DFRs von *Antirrhinum majus* und *Ipomoea purpurea* dienen. Diese unterscheiden sich von den jeweils nahe verwandten DFRs aus *Torenia* und *Petunia*, die DHK nicht reduzieren, sowie vom Konsensus an Position 137 (*Ipomoea*) bzw. 148 (*Antirrhinum*). Die DFR aus *Dianthus caryophyllus* besitzt ebenfalls an Position 137 eine wiederum andere auffallende Abweichung vom Konsensus.

Konkretere Anhaltspunkte ließen sich in Bezug auf die Substratspezifität für DHM finden. Die von JOHNSON *et al.* (2001) mutierte DFR (N134L) aus *Gerbera* „Regina“ zeigte fast ausschließliche Spezifität für DHK. Die DFR aus *Fragaria*, die, wie oben gezeigt, für DHM nur eine geringe Spezifität aufweist, besitzt an der gleichen Position ein Ala. Unter Umständen geht mit dem hydrophilen Arg (bzw. Asp bei der DFR von Petunie und Tomate) auch die Fähigkeit zur effizienten Bindung von DHM verloren. Die DFR aus Mais besitzt an dieser Stelle ein Cys. Leider wurde die für eine hohe Substratspezifität für DHK bekannte DFR aus Mais bislang nicht mit DHM als Substrat getestet.

Die DFR aus *Fragaria* unterscheidet sich an einigen weiteren Positionen auffallend von anderen DFRs, unabhängig davon, ob diese DHK reduzieren oder nicht. Auffallend ist auch das Motiv CRxV, das die *Fragaria* DFR mit den DFRs der monokotylen *Zea* und *Lilium* gemein hat.

### C.3.4 Evolutionsrate der DFR

Die Ergebnisse aus der Konstruktion chimärer DFR-Gene zeigten, dass der SSDR tatsächlich eine hohe Bedeutung bei der Determinierung der Substratspezifität zukommt. Der Versuch, bestimmte AS mit der Substratspezifität zu korrelieren, scheiterte. Dabei fiel die Variabilität dieser Region ins Auge. Insbesondere die SSDR der DFR aus *Fragaria* zeigt einige auffallende Abweichungen von dem Konsensus. Zum Test, ob sich dies in einer höheren Anzahl an AS-Substitutionen niederschlägt, wurden die Austauschraten, die zu AS-Austauschen (nichtsynonyme Substitutionen, Ka) bzw. zu keiner Änderung in den AS (synonyme Substitutionen, Ks) führen, geschätzt (Tab. C13). Das Verfahren erfolgte analog wie in Kapitel C.2.3 nach der in Mega2 implementierten Methode nach NEI und GOJOBORI (1986).

Neben den DFR-Sequenzen von *Fragaria*, *Gerbera* „Regina“ und *Osteospermum* wurden diejenigen von *Malus x domestica*, *Petunia*-Hybrida und *Dianthus caryophyllus* verwendet. Zur Schätzung der Substitutionsraten wurden die Sequenzen jeweils mit der DFR aus *Lilium*-Hybrida verglichen.

Die Schätzung der Werte für Ka und Ks erfolgte einmal jeweils für den codierenden Bereich, von dem die divergierenden 3'- und 5'-Enden entfernt wurden, einmal für diesen Bereich ohne die SSDR, sowie einmal nur für die Sequenz der SSDR.

Durch die Verwendung der DFR-Sequenz aus der monokotylen *Lilium* als Bezugspunkt konnten jeweils sehr einheitliche Werte für Ks bei der Analyse der Gesamtsequenz mit und ohne der SSDR erzielt werden. Dagegen sind die Ka-Werte für die SSDR aus dem Vergleich von *Lilium* mit *Osteospermum*, *Gerbera*, *Petunia* und *Fragaria* tendenziell erhöht im Vergleich zur gesamten analysierten Sequenz mit und ohne der SSDR. Allerdings bewegen sich die Werte für die ersten beiden Vergleiche noch im Rahmen der Standardabweichungen. Dagegen findet das oben beobachtete gehäufte Auftreten von auffallenden Abweichungen in der SSDR der DFR aus *Fragaria* ihre Entsprechung in einer erhöhten AS-Austauschrate. Die SSDR der *Fragaria* DFR weist damit im Vergleich zum Gesamtgen eine erhöhte Evolutionsgeschwindigkeit auf. Gleiches gilt auch für die DFR aus *Petunia*. Um einzuschätzen, ob es sich hierbei um einen Einzelfall handelt, wurden weitere Vergleiche durchgeführt. Die DFR aus Tomate (*Solanum lycopersicum*) zeigte im Vergleich zur DFR aus *Lilium* ebenso eine erhöhte Ks für die SSDR. Das Gleiche gilt für die DFR aus der nahe verwandten *Ipomoea purpurea* (Convolvulaceae), aber nicht für die

näher verwandten DFRs aus *Torenia* und *Antirrhinum* (beide Scrophulariaceae). Dort waren die erhaltenen Ks-Werte zwar wiederum deutlich, aber noch im Rahmen der Standardabweichung erhöht.

**Tab. C13: Geschätzte Substitutionsraten zwischen diverser DFRs und der DFR aus *Lilium*.**

Sequenz DFR <i>Lilium</i> zu	ganz (975 bp)			ohne SDR			nur SDR (78 bp)		
	Ka	Ks	Ka/Ks	Ka	Ks	Ka/Ks	Ka	Ks	Ka/Ks
<i>Osteospermum</i>	<b>0,224</b> (0,017)	0,789 (0,037)	0,284	<b>0,215</b> (0,019)	0,779 (0,039)	0,276	<b>0,284</b> (0,079)	0,879 (0,342)	0,323
<i>Gerbera</i>	<b>0,225</b> (0,018)	0,801 (0,038)	0,281	<b>0,215</b> (0,019)	0,803 (0,039)	0,268	<b>0,316</b> (0,084)	0,884 (0,361)	0,357
<i>Dianthus</i>	<b>0,235</b> (0,017)	0,813 (0,036)	0,289	<b>0,232</b> (0,018)	0,812 (0,038)	0,286	<b>0,234</b> (0,056)	0,896 (0,368)	0,261
<i>Petunia</i>	<b>0,239</b> (0,018)	0,767 (0,038)	0,312	<b>0,225</b> (0,019)	0,769 (0,035)	0,292	<b>0,380</b> (0,081)	0,730 (0,168)	0,520
<i>Malus</i>	<b>0,214</b> (0,016)	0,754 (0,039)	0,284	<b>0,212</b> (0,017)	0,770 (0,039)	0,275	<b>0,195</b> (0,058)	0,658 (0,200)	0,296
<i>Fragaria</i>	<b>0,215</b> (0,016)	0,746 (0,036)	0,288	<b>0,201</b> (0,016)	0,774 (0,039)	0,260	<b>0,334</b> (0,068)	0,774 (0,217)	0,431

Die Schätzung der synonymen (Ks) und nichtsynonymen (Ka) Substitutionsrate erfolgte nach der in Mega2 implementierten Methode von NEI und GOJOBORI (*p*-Distance, 1000 Wdh.). Die Analyse erfolgte durch den paarweisen Vergleich einer DFR-Sequenz mit derjenigen aus *Lilium*. In Klammern ist die Standardabweichung angegeben. Die Erstellung des Multialignments erfolgte mit ClustalW. Die divergierenden 3'- und 5'-Enden wurden entfernt.

Die Referenzen zu den verwendeten Sequenzen sind im Anhang angegeben.

## D. Diskussion

### D.1. Die Determinierung des Flavonoidmusters in *Osteospermum*

*Osteospermum* ist eine Zierpflanze, die in den letzten 10 Jahren enorm an Bedeutung gewonnen hat. Ein Hauptziel der züchterischen Bearbeitung ist die Erweiterung des Blütenfarbspektrums. Dies ist bislang noch auf gelbe und rosa bis lila Farben der Petalen beschränkt.

In einer vorangegangenen Arbeit konnten Carotinoide als verantwortlich für die gelbe Farbe ausgemacht werden (SEITZ, 2000). Dagegen basieren die rosa bis lila Farbtöne auf unterschiedlichen Konzentrationen von Derivaten des Anthocyanidins Delphinidins. Cyanidin kommt in der Regel in deutlich geringeren Mengen vor, Pelargonidin fehlt völlig. Quercetin und Kaempferol sind die Hauptflavonole, zuweilen kommt auch Myricetin vor.

Das Zustandekommen des Flavonoid- und insbesondere des Anthocyanmusters konnte durch Enzymnachweise nachvollzogen werden (SEITZ, 2000). Die Akkumulation von Delphinidinderivaten basiert auf einer starken F3'5'H-Aktivität. Die Bildung von Pelargonidinderivaten scheint grundsätzlich nicht möglich zu sein, da mit Proteinextrakt aus Petalen keine DFR-Aktivität mit DHK als Substrat gemessen werden konnte.

Die Intention vorliegender Arbeit lag in der Klonierung und funktionellen heterologen Expression der an der Ausprägung des Flavonoidmusters entscheidend beteiligten Flavonoidgene. Von besonderem Interesse waren dabei die Aktivität und Substratspezifität der CHS, F3'5'H und DFR *in-vitro* und die Frage, inwieweit die Ergebnisse daraus mit denjenigen, die mit Proteinextrakt aus Petalen erzielt wurden, übereinstimmen.

Die gewonnenen cDNA-Klone können für zukünftige weitergehende molekularbiologische Untersuchungen, insbesondere für Transformationsexperimente zur Schaffung neuer Blütenfarben bei *Osteospermum*, verwendet werden.

### D.1.1 Klonierung von Flavonoidgenen aus *Osteospermum*

Mittlerweile steht zu allen wichtigen Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese ausreichend Sequenzinformation zur Verfügung, so dass relativ problemlos konservierte Regionen in der Sequenz identifiziert und partiell degenerierte Primer für die Klonierung abgeleitet werden können. Dies ermöglicht die Isolierung von cDNA-Fragmenten über eine PCR-Strategie ohne das aufwändige Anlegen einer cDNA-Bibliothek.

Mit den am Lehrstuhl vorhandenen partiell degenerierten Primern konnten in dieser Arbeit ohne größere Schwierigkeiten cDNA-Fragmente aller wichtigen Strukturgene der Flavonoidbiosynthese aus *Osteospermum* isoliert werden. Für die für Dioxygenase codierenden Gene war bereits die Verwendung eines spezifischen, partiell degenerierten *forward* Primers ausreichend. Durch seine Kombination mit einem unspezifischen, an das Poly(A)<sup>+</sup>-Ende bindenden *reverse* Primer konnte für die FHT, FLS und ANS jeweils ein cDNA-Fragment mit komplettem 3'-Ende isoliert werden.

RACE-Methoden dienen zur Isolierung der fehlenden cDNA-Enden von CHS, F3'5'H, FLS und DFR. Die fehlenden 3'-Enden konnten über 3'-RACE ohne größere Probleme generiert werden. Deutlich schwieriger gestaltete sich die jeweilige Durchführung des 5'-RACE. Nur bei der DFR gelang die Isolierung des 5'-Endes auf Anhieb. Die Komplexität der Einzelschritte beim herkömmlichen 5'-RACE beschränkt das isolierbare Fragment erfahrungsgemäß auf eine Länge <1000 bp (FOX *et al.*, 2000). Generell erschweren der oft hohe G/C-Gehalt am 5'-Ende von Genen, störende Sekundärstrukturen der mRNA sowie die unspezifische und oft ineffiziente *tailing*-Reaktion die erfolgreiche Durchführung der 5'-RACE-Prozedur (CHEN, 1996; FOX *et al.*, 2000).

So musste zur Generierung vollständiger 5'-Enden bei den cDNAs von CHS, F3'5'H und FLS eine schrittweise Strategie gewählt werden. Das jeweils erhaltene unvollständige Fragment wurde dabei zur Konstruktion eines oder mehrerer zusätzlicher, weiter *upstream* liegender genspezifischer Primer für weitere RACE-Runden genutzt. Nach dreimaliger Durchführung der RACE-Prozedur konnte auch das 5'-Ende der F3'5'H-cDNA vollständig generiert werden, in Bezug auf CHS und FLS waren jeweils 2 Durchführungen notwendig.

Dieses schrittweise Verfahren ist entsprechend zeitaufwändig. Insbesondere wenn die 5'-Enden mehrerer cDNAs gewonnen werden sollen, ist unter Umständen die

Verwendung anderer 5'-RACE-Verfahren ratsam. Zum Beispiel werden von den einigen Firmen Kits vertrieben, in denen die oft ineffiziente, durch das Enzym terminale Transferase katalysierte *tailing*-Reaktion im Anschluss an die cDNA-Synthese durch andere Verfahren ersetzt ist.

Die zunehmend wachsende Sequenzinformation zu Flavonoidgenen zeigt, dass sie insbesondere bei verwandten Arten auch an den 5'- und 3'-Enden eine hohe Übereinstimmung aufweisen. Dies eröffnet die Möglichkeit zur Isolierung von vollständigen oder zumindest quasi vollständigen cDNA-Enden über einfache RT-PCR, ohne dass die Anwendung von RACE-Methoden nötig ist. Beispielsweise gelang DEIML (2003) sogar mit einem anhand der *leader*-Sequenz der *Osteospermum* F3'5'H konstruierten Primers die Isolierung des vollständigen 5'-Endes einer F3'H cDNA aus *Gerbera*.

## D.1.2 Funktion und Substratspezifität der Schlüsselenzyme

### D.1.2.1 Chalkonsynthese

Das aktive rekombinante Protein der klonierten und heterolog in Hefe exprimierten CHS cDNA aus *Osteospermum* zeigte eine deutliche Präferenz für Cumaroyl-CoA als Substrat. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen, die mit Pflanzenextrakt gewonnen wurden (SEITZ, 2000). Mit Kaffeoyle-CoA als Substrat betrug die Syntheserate von ERI nur 3% bei pH 7,5 und 9% bei pH 6,5 im Vergleich zu derjenigen von NAR mit Cumaroyl-CoA als Substrat. Wurden beide CoA-Ester gleichzeitig als Substrat angeboten, erfolgte jeweils ausschließliche Bildung von NAR. Im Gegensatz dazu entstand mit Pflanzenextrakt als Proteinquelle im Konkurrenztest bei einem pH-Wert von 6,5 ERI zu einem Prozentsatz von ca. 5% im Vergleich zum NAR (SEITZ, 2000).

Generell ist *in-vivo* Cumaroyl-CoA das bevorzugte Substrat für die CHS, *in-vitro* werden, meist in geringerem Ausmaß, auch andere Zimtsäure CoA-Ester wie z.B. Kaffeoyle-CoA oder Cinnamoyle-CoA umgesetzt (SCHRÖDER, 1999). Allerdings ergaben enzymologische Versuche mit Proteinextrakt aus Rosenblüten bei niedrigeren pH-Werten eine Substratpräferenz für Kaffeoyle-CoA (ELSHERIF, 2000). Mit Proteinextrakt aus Blättern von Kartoffel und Petunie wurde bei pH 7 jeweils die

Bildung von etwa gleichen Mengen an NAR und ERI beobachtet (KNOTT, 2004). Aus mit einem Pilz inokulierten Blättern von Gerste konnte sogar eine CHS (hvCHS2) mit Substratpräferenz für Kaffeoyl-CoA und Feruloyl-CoA isoliert werden (CHRISTENSEN *et al.*, 1998). Diese scheint aber in Zusammenhang mit der Bildung von Eriodictyolderivaten bei Pathogenbefall zu stehen. Ähnliches könnte eine Erklärung für die beschriebenen Befunde bei Rose, Petunie und Kartoffel sein.

Nur in wenigen Fällen, wie z.B. in Blüten von *Verbena-Hybrida* (STOTZ und FORKMANN, 1984) oder vor allem von *Silene dioica* (KAMSTEEG *et al.*, 1980), könnte allerdings auch Kaffeoyl-CoA *in-vivo* für die CHS als Substrat im Zusammenhang mit der Anthocyan synthese eine wichtige Rolle spielen. Es lässt sich damit die allgemeine Regel aufstellen, dass die an der Bildung von Anthocyanen beteiligten Chalkonsynthasen generell eine hohe Substratpräferenz für Cumaroyl-CoA aufweisen. Für *Osteospermum* kann ebenfalls sicher davon ausgegangen werden, dass die Festlegung des Substitutionsmusters am B-Ring auf der Flavonoidebene erfolgt.

#### D.1.2.2 Flavonoid 3'5'-Hydroxylase

Hauptsächlich konnten in Petalen von *Osteospermum* als farbgebende Pigmente Derivate von Delphinidin gefunden werden. Verantwortlich dafür ist eine starke 3'5'-Hydroxylierungsaktivität, wie sie in aus Petalen präparierten Mikrosomen nachgewiesen werden konnte (SEITZ, 2000). Das Protein des in dieser Arbeit klonierten und heterolog in Hefe exprimierten cDNA-Klons *OF3'H1* zeigte ebenfalls deutliche 3'5'-Hydroxylierungsaktivität und konnte damit eindeutig als F3'5'H charakterisiert werden.

In ersten Versuchen mit dem rekombinanten Protein wurden sowohl NAR als auch DHK jeweils fast vollständig überwiegend zu den 3'4'5'-hydroxylierten Produkten PHF bzw. DHM umgesetzt. Daneben konnte aber auch jeweils eine mehr oder weniger deutliche Bildung von nur 3'4'-hydroxylierten Flavonoiden (ERI bzw. DHQ) detektiert werden. Dies wurde auch mit Mikrosomen aus Petalen beobachtet (SEITZ, 2000).

Eine nähere Charakterisierung des Proteins mit NAR als Substrat ergab eine deutliche Abhängigkeit der 3'- bzw. 3'5'-Hydroxylierung von der eingesetzten Proteinmenge sowie der Inkubationsdauer. Für einen totalen Umsatz von NAR zu

PHF war eine bestimmte Proteinmenge nötig (etwa 7,5 µg). Bei einer niedrigeren Menge konnte trotz längerer Inkubationsdauer kein Totalumsatz erreicht werden, mit höheren trat sogar eine starke Hemmung der 3'- wie der 3'5'-Hydroxylierung auf.

Die Bildung von 3'4'-hydroxylierten Produkten im Zuge der 3'5'-Hydroxylierung könnte eine elegante Erklärung abgeben für das Auftreten von Cyanidin- neben Delphinidinderivaten bei z.B. *C. chinensis*, ohne dass eine explizite F3'H-Aktivität vorliegen müsste (EDER, 2001). Zusätzlich bzw. alternativ dazu könnte es sein, dass zuerst 3'-Hydroxylierung erfolgt und erst ab einem bestimmten Level an 3'4'-hydroxylierten Produkten die 5'-Hydroxylierung induziert wird. Dies wurde auch von EDER (2001) in Betracht gezogen. Dafür lassen sich insbesondere auch die hier festgestellten Verläufe der Syntheseraten bei den Protein- und Zeitreihen, bei denen jeweils die Bildung von ERI derjenigen von PHF vorangeht, als Indizien heranziehen. Allerdings ergaben bisherige Untersuchungen der 3'5'-Hydroxylierung mit Pflanzenextrakt (STOTZ, 1983) oder mittels heterologer Expression in Hefe (EDER, 2000) zumeist eine Diskrepanz zwischen dem *in-vitro* gebildeten und dem tatsächlich *in-planta* vorliegenden Verhältnis 3'4'- und 3'4'5'-hydroxylierter Flavonoide. Dagegen führte die *in-planta*-Expression der F3'5'H aus *Petunia* in transgenem Tabak sowie in transgenen *Petunia* zu einem jeweils deutlichen Rückgang der Cyanidinderivate in den Blüten, bei gleichzeitiger *de-novo*-Bildung von Delphinidinderivaten (SHIMINADA *et al.*, 1999). Gleiches wurde bei der Expression der F3'5'H aus *Eustoma russellianum* (SHIMADA *et al.*, 1999) und aus *Campanula medium* (OKINAKA *et al.*, 2003) jeweils in Tabak sowie der F3'5'H aus *Vinca major* in *Petunia* (MORI *et al.*, 2003) beobachtet.

Dafür, dass die Bildung von 3'4'-hydroxylierten Produkten im Zuge der 3'5'-Hydroxylierung ein reines *in-vitro*-Phänomen ist, spricht auch, dass 3'4'-hydroxylierte Flavonoide keine geeigneten Substrate für das rekombinante Protein der F3'5'H aus *Osteospermum* für die 5'-Hydroxylierung darstellten. Unter den Bedingungen, die für NAR 100%igen Umsatz zu PHF garantierten, wurde nur 31,1% des eingesetzten ERI zu PHF umgesetzt.

Damit lässt sich auch erklären, wieso eine Mindestmenge an Protein für einen maximalen Umsatz nötig ist. Durch eine möglicherweise suboptimale Ausbildung der Tertiärstruktur der F3'5'H *in-vitro* ist die 5'-Hydroxylierung unter Umständen beeinträchtigt und verläuft deswegen im Vergleich zur 3'-Hydroxylierung ineffizient. Wahrscheinlich wird auch in größerem Maße intermediär ERI frei (bzw.

entsprechende andere 3'4'-hydroxylierte Flavonoide). Bei ausreichend Protein wird das ERI wieder gebunden und, wenn auch im Vergleich zum NAR ineffizienter, umgesetzt zu PHF.

Der getestete Klon zeigte *in-vitro* eine sehr breite Substratspezifität. NAR, DHK und Km sind ähnlich gute Substrate. Ap ist ein deutlich schlechteres Substrat, unter Umständen erklärbar damit, dass Flavone in *Osteospermum* nicht vorkommen (SEITZ, 2000). Der höchste Umsatz wurde unter Standardbedingungen mit Km erzielt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Mikrosomen aus Petalen (SEITZ, 2000), war mit rekombinantem Protein der F3'5'H im direkten Vergleich DHK das deutlich bessere Substrat als NAR. Dieser Befund steht in Einklang mit der These, dass die 3'5'-Hydroxylierung *in-planta* auf der Ebene der Dihydroflavonole erfolgt, da mit Pflanzenextrakt keine FHT-Aktivität mit PHF als Substrat und mit ERI eine im Vergleich zu NAR deutlich geringere detektiert wurde (SEITZ, 2000).

Für die heterolog in *E. coli* exprimierten F3'5'Hs aus *Catharanthus* bzw. *Petunia* (KALTENBACH *et al.*, 1999) waren Ap bzw. NAR die besten Substrate. Auffallenderweise wurde im Vergleich dazu DHK jeweils deutlich schlechter umgesetzt (27 bzw. 35% zum Substrat mit dem maximalen Umsatz).

Die deutliche Substratpräferenz *in-vitro* der rekombinanten F3'5'H aus *Petunia* für NAR erstaunt, da auch für die FHT von *Petunia* bekannt ist, dass PHF kein Substrat für sie darstellt (FORKMANN und HELLER, 1999). Unter Umständen waren die von KALTENBACH *et al.* (1999) verwendeten Testbedingungen, insbesondere mit den hohen Proteinmengen (50 µg bei *Catharanthus*, 200 µg bei *Petunia*) suboptimal für den Umsatz von DHK. Auf der anderen Seite ergab auch die Verwendung von Pflanzenextrakt für die *Petunia* F3'5'H eine Präferenz für NAR gegenüber DHK, ebenso wie für *Lathyrus odoratus*, *Callistephus chinensis* und *Verbena-Hybrida* (STOTZ, 1983).

Dies lässt auch den alternativen Schluss zu, dass, angenommen die 3'5'-Hydroxylierung erfolgt tatsächlich auf Dihydroflavonolebene, die jeweilige Aktivität der F3'5'H in Bezug auf den Umsatz von DHK völlig ausreichend ist für die effiziente Bildung 3'4'5'-hydroxylierter Produkte. Mit anderen Worten, es bestand in der Evolution der F3'5'Hs keine Notwendigkeit der Optimierung auf ein bestimmtes Substrat hin. Dies gilt insbesondere, da *in-planta* höchstwahrscheinlich keine Konkurrenz zwischen den Substraten besteht, sondern, wie noch zu diskutieren sein

wird, die Zwischenprodukte in kanalisierter Weise an das jeweilige nächste Enzym weitergegeben werden. Umgekehrt erlaubt die breite, auf jeden Fall NAR und DHK umfassende Substratspezifität der F3'5'H die Ausprägung verschiedener metabolischer Pfade.

### D.1.2.3 Dihydroflavonol 4-Reduktase

Das rekombinante Protein der klonierten und heterolog in Hefe exprimierten DFR cDNA aus *Osteospermum* zeigte *in-vitro* überraschenderweise Umsatz von DHK zu LPg. Im Gegensatz dazu konnte mit Proteinextrakt aus Petalen kein Umsatz von DHK zu LPg beobachtet werden (SEITZ, 2000). In Übereinstimmung damit zeigten Petalen nach Behandlung mit dem CytP450-Hemmstoff Tetcyclacis zwar eine drastisch reduzierte Anreicherung von Delphinidinderivaten, aber keine Bildung von Pelargonidinderivaten.

Damit ist davon auszugehen, dass DHK *in-planta* kein Substrat für die DFR in *Osteospermum* darstellt. Gleiches scheint für die DFR aus *Gerbera* „Clivia“ zu gelten (MARTENS, persönliche Mitteilung), wobei auch hier die rekombinante DFR DHK als Substrat akzeptierte (PFEIFFER, 2003). Auch bei der Rose trat die Diskrepanz auf, dass DHK von der rekombinanten DFR aus der Hefeexpression umgesetzt wird (GOSCH, 2003), von pflanzlichem Proteinextrakt dagegen nicht (KNOTT, 2004).

Als Erklärung kommen posttranskriptionale oder andere Modifikationen des Proteins durch die Hefe in Frage. Wahrscheinlicher sind Instabilitäten des DFR Proteins *in-vitro*, so dass durch eine nicht optimale Raumstruktur die eigentliche Substratspezifität nicht aufrechterhalten werden kann. Dafür spricht auch die von der enzymologischen Praxis mit Pflanzenextrakten her oftmals gemachte Beobachtung, dass DFR-Enzyme im Vergleich zu anderen Flavonoidenzymen instabiler sind (STICH und FORKMANN, 1988). Grundsätzlich weist das *in-vitro*-Testsystem mit dem rekombinanten Protein aus der heterologen Hefeexpression *per se* eine unnatürlich hohe Konzentration des zu testenden Enzyms auf.

Aus diesen Gründen können Unterschiede in der Prozedur der Expression und Enzymtests einen hohen Einfluss auf die Enzymaktivität haben. So zeigte rekombinantes Protein von gleichen cDNAs, die von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen in Hefe exprimiert wurden, zum Teil drastische Abweichungen in der Substratspezifität (GOSCH, 2003).

Durch die Verwendung einer Mischung aus DHK und DHQ als Substrat im gleichen Ansatz konnten in dieser Arbeit deutliche und aussagekräftige Unterschiede in den Umsatzraten gewonnen werden. Mit den rekombinanten DFRs aus *Gerbera* „Clivia“ bzw. *Osteospermum*, wo jeweils die DFR *in-vivo* DHK als Substrat nicht akzeptiert, wurden mit 0,16 bzw. 0,27 die engsten Verhältnisse an gebildetem LPg zu LCy gefunden. Mit der rekombinanten DFR aus *Gerbera* „Regina“, wo DHK von der DFR auch *in-vivo* als Substrat akzeptiert wird, war das Verhältnis mit 0,62 deutlich erhöht. Die rekombinante DFR aus Erdbeere, in deren Früchten fast ausschließlich Pelargonidinderivate akkumulieren, synthetisierte aus einer Mischung von DHK und DHQ ca. 3 mal soviel LPg wie LCy. Vergleichbare Tendenzen ergaben sich auch, wenn neben DHK und DHQ auch DHM als weiteres Substrat angeboten wurde.

Ein bedeutender Einflussfaktor konnte in dem pH-Wert des Reaktionspuffers (0,1 M KPi) ausgemacht werden. Zusätzlich zum standardmäßig verwendeten pH-Wert von 6,8 wurden Tests bei 6,0 und 7,5 durchgeführt. Protein aus der Hefeexpression des chimären DFR-Gens *OF* (vgl. D.3) zeigte bei pH 6,0 ca. 70% Umsatz des gesamten eingesetzten Substrats (DHK und DHQ), gegenüber ca. 50% bei pH 6,8 und nur etwas mehr als 30% bei pH 7,5. Die höchste Aktivität wurde auch für das rekombinante Protein der *Osteospermum* DFR bei pH 6,0 gefunden.

Daneben offenbarte sich auch ein deutlicher Effekt des pH-Werts auf die Substratspezifität. Mit rekombinantem Protein der *Osteospermum* DFR zeigte sich bei pH 7,5 eine Verdopplung im Verhältnis an gebildetem LPg zu LCy auf ca. 0,5, gegenüber ca. 0,25 bei pH 6,8 und 6,0. Mit Protein des chimären DFR-Gens *OF* (vgl. D.3) betrug das Verhältnis bei pH 6,0 ca. 1,0, bei pH 6,8 ca. 1,6 und bei pH 7,5 ca. 2,3. Je höher der pH-Wert des Reaktionspuffers, desto höher war die *in-vitro* gemessene Substratspezifität für DHK und umgekehrt.

Damit dürften sich die von GOSCH (2003) berichteten Unterschiede in der Substratspezifität von rekombinantem Protein gleicher cDNA-Klone zu einem größeren Teil auf den pH-Wert in den Enzymtests zurückführen lassen, da in dem einen Fall bei pH 6,0 und in dem anderen bei pH 6,8 gemessen wurde. Für die Untersuchung der Substratspezifität scheint pH 6,8 angemessener zu sein, da er den annähernd neutralen Bedingungen im Cytosol näher kommt (DAVIES, 1997). Weitere Untersuchungen hierzu mit anderen Puffersystemen und verschiedenen Ionenstärken sind sinnvoll. Interessant wäre auch, ob heterologe Expression in *E. coli*, wie es vor kurzem PETERS und CONSTABEL (2002) mit einem geeigneten

Stamm gelang, verlässlichere Daten liefert im Vergleich zum Hefeexpressions-system.

Als Fazit lässt sich ziehen, dass die DFR eine starke Variation in der Substratspezifität aufweist. Dies gilt insbesondere für die Spezifität gegenüber DHK. Die von GOSCH (2003) festgestellte hohe Substratspezifität der *Fragaria* DFR für DHK konnte grundsätzlich bestätigt werden. Die DFR aus *Fragaria* scheint auf die Reduktion von DHK hin optimiert zu sein. Unter Konkurrenzbedingungen wird DHQ deutlich schlechter und DHM kaum reduziert. Die anderen untersuchten DFRs (aus *Gerbera* „Regina“ und „Clivia“ sowie aus *Osteospermum*) zeigten *in-vitro* unterschiedliche Spezifitäten gegenüber DHK, aber keine oder zumindest keine ausgeprägte Spezifität für DHQ oder DHM. Beide Dihydroflavonole wurden unter Konkurrenzbedingungen jeweils in etwa gleichem Ausmaß umgesetzt.

Die Expression der DFR aus *Osteospermum* und aus *Gerbera* „Regina“ in der *Petunia*-Linie „RL01“, in deren Blüten DHK akkumuliert, könnte Aufschluss geben, ob sie, wie die endogene *Petunia* DFR, absolut kein DHK reduzieren. JOHNSON *et al.* (1999) konnten z.B. bei der Expression der DFR aus *Cymbidium* in „RL01“ eine geringe Pelargonidinbildung beobachten.

Da mit der DFR aus Tomate auch bei heterologer Expression in Hefe keine Reduktion von DHK *in-vitro* beobachtet wurde (MARTENS *et al.*, 2002), könnte es sein, dass die DFRs aus *Solanum*-Arten auch *in-vitro* stabil genug sind, ihre Substratspezifität aufrechtzuerhalten.

#### D.1.2.4 Flavonolsynthese

Rekombinantes Protein der aus *Osteospermum* klonierten und heterolog in Hefe exprimierten FLS cDNA zeigte keine hohe Aktivität, dennoch konnte eine deutliche Substratpräferenz für DHQ im Vergleich zu DHK festgestellt werden. Hier steht kein Vergleich zu Umsätzen mit Proteinextrakt aus Petalen zur Verfügung, da damit die FLS-Aktivität bisher nicht gemessen werden konnte (SEITZ, 2000).

Die Bevorzugung von DHQ als Substrat steht aber in Einklang mit der Beobachtung, dass Qu das Hauptflavonol in Blüten von *Osteospermum* ist (SEITZ, 2000). Dass daneben auch oft hohe und z.T. höhere Mengen an Km akkumulieren, lässt sich damit erklären, dass die F3'H- bzw. F3'5'H-Aktivität im Vergleich zur FLS-Aktivität erst in einem späteren Blütenstadium einsetzt (SEITZ, 2000).

Die Substratpräferenz für DHQ spricht auch dafür, dass die Festlegung des Flavonolmusters auf der Ebene der Dihydroflavonole stattfindet. Auf der anderen Seite würde die oben bereits diskutierte breite Substratspezifität der F3'5'H auch eine Festlegung erst auf Flavonolebene erlauben. Da Km neben DHK das beste Substrat für das rekombinante Protein der F3'5'H aus *Osteospermum in-vitro* war, könnte man eine Optimierung auf Km hin vermuten.

Heterolog in Hefe exprimierte FLS cDNA-Klone aus Rose und Petunie zeigten ebenfalls eine Bevorzugung von DHQ gegenüber DHK als Substrat (SUZUKI *et al.*, 2000a). Dagegen setzte Rohextrakt aus Blüten von Nelke DHK und DHQ in gleichem Maß um (STICH *et al.*, 1992), ebenso wie Rohextrakt aus Blüten von Petunie (FORKMANN *et al.*, 1986). Bei Levkoje konnte eine Substratpräferenz für DHK festgestellt werden (SPRIBILLE und FORKMANN, 1984).

Eine rekombinante FLS aus *Arabidopsis* synthetisierte *in-vitro* mit NAR als Substrat erstaunlicherweise DHK, Km und in Spuren auch Ap (PRESCOTT *et al.*, 2002). Zuvor berichteten schon WELFORD *et al.* (2001) von der bemerkenswerten Fähigkeit der rekombinanten ANS aus *Arabidopsis in-vitro* aus NAR DHK zu bilden und in geringem Umfang auch Km. Eine ähnlich breite Substratspezifität zeigten rekombinante FLS-Proteine aus *Citrus* und *Petroselinum* und eine rekombinante ANS aus *Gerbera*, während sich die rekombinante FHT aus *Petunia* und die rekombinante FNS I aus *Petroselinum* sehr viel selektiver verhielten (LUKAČIN *et al.*, 2003; MARTENS *et al.*, 2003a).

Deswegen und aufgrund der hohen Übereinstimmung der Sequenzen ordnen MARTENS *et al.* (2003a) die FHT und FNS I in eine Gruppe mit enger und ANS und FLS in eine Gruppe mit weiter Substratspezifität ein. Ungeachtet der Frage, inwieweit die *in-vitro*-Beobachtungen den tatsächlichen Verhältnissen *in-vivo* entsprechen, legen diese Befunde einen gemeinsamen Vorfahren für die  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen nahe.

An einer nicht ausreichenden Aktivität des Proteins des heterolog in Hefe exprimierten FLS-Klons aus *Osteospermum* könnte der Grund liegen, wieso mit NAR oder ERI als Substrat keine Produktbildung gefunden wurde. Allerdings zeigte auch die rekombinante FLS aus *Gerbera in-vitro* keinen Umsatz dieser Substrate (DEIML, 2003).

### D.1.3 Möglichkeiten und Grenzen der heterologen Hefeexpression

Die heterologe Hefeexpression ist ein mittlerweile gut etabliertes eukaryotisches Expressionssystem. Innerhalb relativ kurzer Zeit kann damit ein vorhandener cDNA-Klon funktionell verifiziert werden. Alle wichtigen Strukturgene der Flavonoidbiosynthese konnten mittlerweile erfolgreich heterolog in Hefe exprimiert werden (MARTENS *et al.*, 2002). Für die DFR oder CytP450-Proteine ist eine heterologe Expression in *E. coli* zumindest nicht ohne weiteres möglich.

In dieser Arbeit konnten, wie oben diskutiert, die *full-length* cDNA-Klone der CHS, FLS, F3'5'H und DFR aus *Osteospermum* erfolgreich heterolog in Hefe exprimiert werden. Die Expression des DFR cDNA-Klons scheiterte allerdings zunächst. Dies konnte aber auf ein technische Problem zurückgeführt werden. Nach einer Modifikation im Bereich vor dem Start-ATG des Expressionsklons und einer Verkürzung des untranslatierten Bereichs am 3'-Ende gelang die Expression.

In Bezug auf die Substratspezifität der CHS waren die Ergebnisse aus der heterologen Hefeexpression gut vergleichbar mit denjenigen, die mit Pflanzenextrakt gewonnen wurden. Dagegen traten, wie oben diskutiert, bei der F3'5'H und der DFR Diskrepanzen auf. Für viele Fragestellungen ist es noch eher zweitrangig, ob NAR oder DHK das bevorzugte Substrat für die F3'5'H darstellt. Die Frage nach der Substratspezifität der DFR ist aber z.B. entscheidend für die Entwicklung von Strategien zur gezielten züchterischen Modifikation des Anthocyanmusters zur Schaffung neuer Blütenfarben. Stünden z.B. hinsichtlich der Substratspezifität der DFR aus *Osteospermum* nur die Ergebnisse aus der heterologen Hefeexpression zur Verfügung, würde dies zu Fehlinterpretationen führen. Die Substratspezifität der DFR spielt auch bei der Synthese kondensierter Tannine (CARRON *et al.*, 1994; BAVAGE *et al.*, 1997) und bei der durch Prohexadion-Ca induzierten Pathogenresistenz eine entscheidende Rolle (FISCHER *et al.*, 2003). Zur Bewertung von Ergebnissen aus der heterologen Hefeexpression ist somit der Vergleich mit Pflanzenextrakt sinnvoll. Die Behandlung von Pflanzengewebe mit Hemmstoffen der Flavonoidbiosynthese bzw. Supplementationsversuche sind in der Regel unaufwändig und erlauben durch ihren nicht-destruktiven Charakter direkte Rückschlüsse auf die Situation *in-planta* (MARTENS *et al.*, 2003b).

Dies ist auch deswegen von Bedeutung, da auch tatsächlich vorhandene Eigenschaften eines Enzyms wie bestimmte Substratspezifitäten *in-vivo* nicht zwangsläufig zum Tragen kommen müssen. In einer Reihe von Pflanzen ist

beispielsweise bekannt, dass die DFR zwar eine Substratspezifität für DHK besitzt, aber trotzdem keine Pelargonidinbildung stattfindet. Beispiele sind Blüten von *Dendranthema grandiflorum* (SCHWINN *et al.*, 1993) oder Samen von *Arabidopsis* (DONG *et al.*, 2001). Bei *Arabidopsis* fand auch nach Expression der für eine hohe Substratspezifität für DHK bekannten DFR aus Mais keine Pelargonidinbildung bei funktioneller F3'H statt. Nur in F3'H-Mutanten konnte Pelargonidinbildung beobachtet werden.

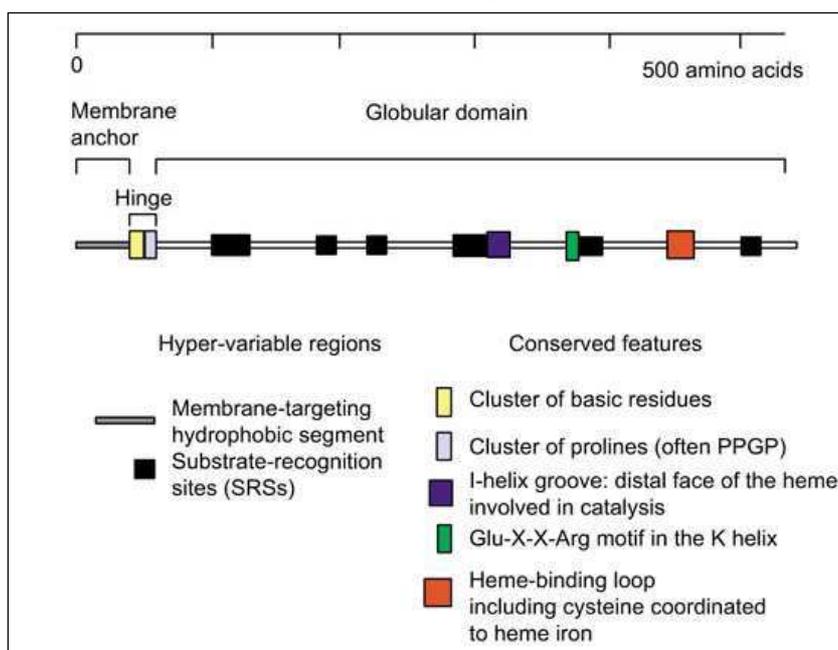
Nach DONG *et al.* (2001) sind dafür 2 Erklärungsansätze möglich: Zum einen könnte auch die im Vergleich zur *Arabidopsis* DFR höhere Substratpräferenz der Mais DFR für DHK nicht ausreichen, um mit der effizienten 3'-Hydroxylierung konkurrieren zu können. Oder die F3'H spielt eine Schlüsselrolle in der Kanalisierung des Substrats, so dass an die DFR kein DHK als Substrat weitergegeben wird.

Letzteres steht in Einklang mit der Theorie, dass die Phenylpropan- und die Flavonoidbiosynthese in cytosolischen Multienzymkomplexen, die über die Cytochrom P450-Enzyme im endoplasmatischen Reticulum verankert sind, stattfindet. Die Substrate werden in solchen Enzymkomplexen in kanalisierter Weise weitergereicht, was eine Reihe an metabolischen und regulatorischen Vorteilen mit sich bringt (OVÁDI und SRERE, 1996).

Auch für *Osteospermum* gibt es Hinweise, die auf eine effiziente Organisation der Flavonoidbiosynthese schließen lassen. So konnte bei Inkubation von Proteinextrakt aus Petalen mit Malonyl-CoA und 4-Cumaroyl-CoA die Bildung von den Dihydroflavonolen DHK, DHQ und DHM beobachtet werden, ohne dass dabei NAR als Intermediärprodukt entstand (SEITZ, 2000). Dabei hatte die Inkubation direkt nach der Präparation des Proteinextrakts zu erfolgen, nach Lagerung bei -80°C erfolgte nur noch die Synthese von NAR, was durch die Zerstörung der labilen Protein-Interaktionen erklärbar ist.

## D.2 Evolution von F3'H und F3'5'H und molekulare Basis ihres Funktionsunterschieds

Ein von EDER (2001) aus *Callistephus chinensis* isolierter cDNA-Klon ließ sich der Sequenz nach als F3'H klassifizieren. Rekombinantes Protein zeigte aber überraschenderweise eine, wenn auch schwache, F3'5'H-Aktivität. Eine in dieser Arbeit aus *Osteospermum* isolierte cDNA ist wiederum der Sequenz nach eine F3'H, das rekombinante Protein ließ sich aber, wie oben diskutiert, eindeutig als F3'5'H charakterisieren. Die F3'5'H aus *Senecio cruentus* (Yamamura und Terakawa, 2003) fügt sich ebenfalls in dieses Schema. Damit nehmen die F3'5'Hs aus Asteraceae eine Sonderstellung zwischen den bislang bekannten F3'Hs und F3'5'Hs anderer Familien ein. Das warf grundlegende Fragen nach ihrer phylogenetischen Einordnung und Evolution auf und daneben die Frage, ob sich aufgrund ihrer hohen Ähnlichkeit zu den F3'Hs allgemeine Erkenntnisse bezüglich des Funktionsunterschieds zwischen F3'H und F3'5'H gewinnen lassen.



**Abb. D1: Schematische Darstellung membrangebundener Cytochrom P450-Proteine.**  
Aus: WERCK-REICHHART und FEYEREISEN (2000).

Die F3'H und die F3'5'H gehören zur großen Familie der Cytochrom P450-Proteine (CYP), die in allen Organismen vorkommen und Oxidationsreaktionen an einer breiten Vielfalt von Substraten katalysieren (CHAPPLE, 1998; GRAHAM und PETERSON, 1999; WERCK-REICHHART und FEYEREISEN, 2000; SCHULER und WERCK-REICHHART, 2003). Die mikrosomal gebundenen CYPs weisen eine Reihe typischer Charakteristika auf wie den hydrophoben Membrananker und das sich

anschließende Membrangelenk (siehe Abb. D1). Im Bereich, in dem Sauerstoff gebunden und aktiviert wird, sowie in der Häm-Bindungstasche befinden sich einige hochkonservierte AS.

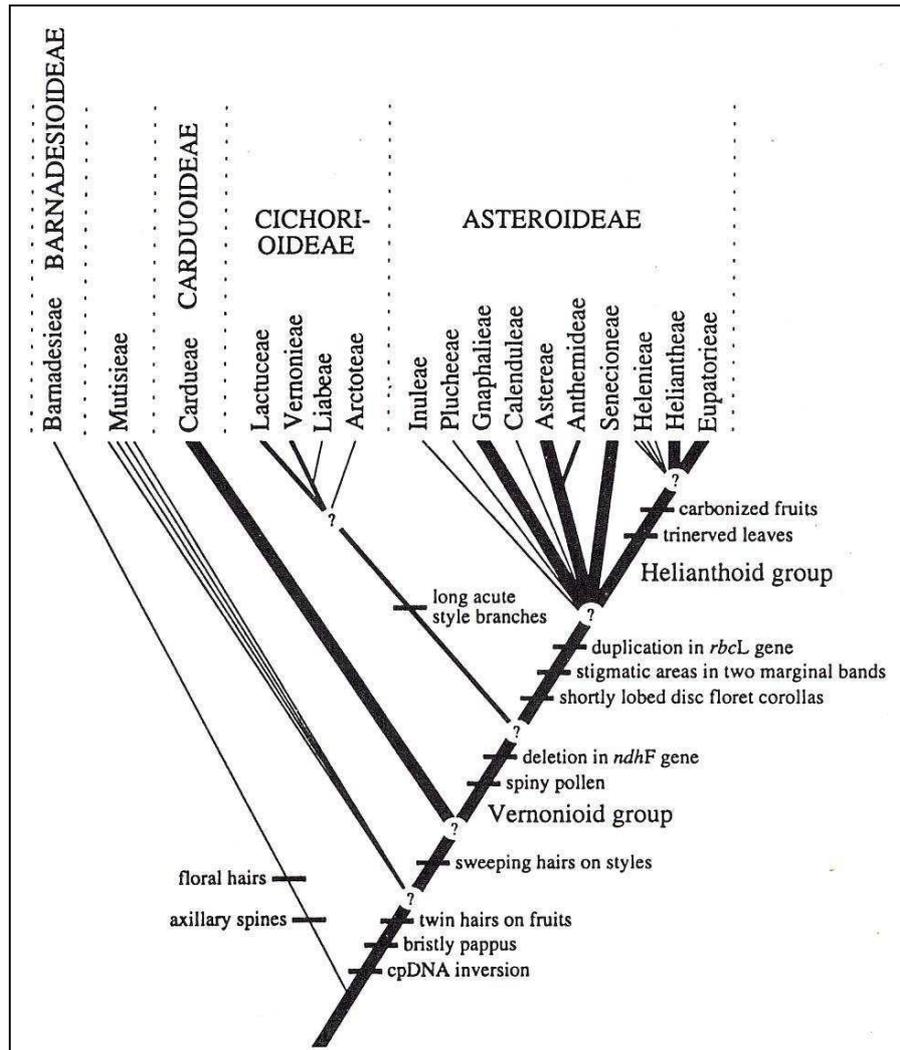
Die Übereinstimmung auch von näher verwandten CYP-Sequenzen kann kleiner als 15% sein. Trotz ausgeprägter variabler und hypervariabler Bereiche weisen die CYPs eine auffallende Konservierung in den Elementen der Sekundärstruktur sowie im tertiären Faltungsmuster auf (HASEMANN *et al.*, 1995; RUPASINGHE *et al.*, 2003). GOTOH (1992) postulierte 6 Regionen, die sog. „substrate recognition sites“ (SRSs), welche mit der Erkennung und dem Umsatz von Substraten in Zusammenhang stehen.

Die Klassifizierung der CYPs erfolgt anhand der codierenden Nukleotidsequenz (NERBERT und NELSON, 1991). Bei einer Übereinstimmung von >40% spricht man von einer Familie, bei einer Übereinstimmung von >55% von einer Unterfamilie. Die F3'Hs bilden die Unterfamilie CYP75B, die F3'5'Hs die Unterfamilie CYP75A. Eine Ausnahme stellt die F3'5'H aus *Callistephus chinensis* dar, die in die Unterfamilie CYP75B und damit zu den F3'Hs eingeordnet wurde (EDER, 2001).

### **D.2.1 Sonderstellung der Asteraceen F3'5'Hs in der Evolution von F3'H und F3'5'H**

Die F3'5'H aus *Osteospermum* ist ebenso wie die F3'5'H aus *Callistephus* der Sequenz nach eine F3'H. Auch für den F3'5'H-Klon aus *Senecio cruentus* (Yamamura und Terakawa, 2003) trifft dies zu.

Die phylogenetische Analyse unterstreicht die Sonderstellung der F3'5'Hs aus Asteraceen. Die bislang bekannten F3'5'Hs anderer Familien bilden einen von den F3'Hs streng abgegrenzten Cluster, in denen die Zuordnung jeweils der Taxonomie entspricht. Diese paraloge Anordnung der F3'Hs und F3'5'Hs entspricht ihrer unterschiedlichen Funktion. Dagegen gruppieren sich die F3'5'Hs aus Asteraceen innerhalb der F3'H-Sequenzen. Sie bilden einen stabilen eigenen Cluster, während die Zuordnung der Asteraceen F3'Hs instabil ist. Die Zuordnung entspricht jeweils den bei den Asteraceen angenommenen verwandtschaftlichen Verhältnissen, die in Abb. D2 dargestellt sind.



**Abb. D2:** Darstellung der kladistischen Verhältnisse zwischen Gruppen und Untergruppen der Familie der Asteraceae, basierend auf morphologischen Merkmalen.  
Aus: BOHM und STUESSY (2001).

Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass die Asteraceae F3'5'Hs eine von den F3'5'Hs anderer Familien unabhängige und innerhalb der Familie der Asteraceae aufgetretene Entwicklung darstellen. Die F3'Hs und F3'5'Hs aus Asteraceae besitzen offensichtlich eine F3'H als gemeinsamen Vorfahren.

Generell kann davon ausgegangen werden, dass die F3'H primitiver ist als die F3'5'H, da bislang in den niederen Pflanzen überwiegend 3'- und 3'4'-hydroxylierte Flavonoide nachgewiesen wurden (MARKHAM, 1988). Daneben ist aber jeweils auch das Vorkommen 3'4'5'-hydroxylierter Flavonoide bereits für Bryophyten gut dokumentiert. Die Entwicklung einer F3'5'H fand damit zu einem frühen Stadium der Flavonoidevolution statt. Leider gibt es bislang keine Sequenzinformation zu entsprechenden Genen, weder aus niederen Pflanzen noch aus Gymnospermen.

Bislang ist auch keine Sequenz einer F3'5'H aus einer Monokotylen bekannt. Da die F3'Hs aus *Allium cepa* und *Oryza sativa* eng mit den dikotylen F3'Hs clustern, ist davon auszugehen, dass die Abspaltung von der F3'H, die der Entwicklung der bislang bekannten F3'5'Hs (ausgenommen der Asteraceae Familie) zugrunde liegt, der Abspaltung der Monokotylen von den Dikotylen vorangeht. Die Entwicklung der Monokotylen lässt sich auf mindestens 110 Millionen Jahre zurückdatieren (WILLIS und McELWAIN, 2002). Der Beginn der Familie der Asteraceae war vor ca. 38 Millionen Jahren (BOHM und STUESSY, 2001). Die Entwicklung der F3'5'H in den Asteraceae ist damit eine vergleichsweise „junge“ Errungenschaft der Evolution.

Als Hauptmechanismus für den Erwerb evolutionärer Neuerungen wird die Duplikation von Genen und die anschließende Diversifizierung eines oder beider Duplikate angesehen (LI, 1997). Bislang kann nur spekuliert werden, wann genau innerhalb der Familie der Asteraceae die Genduplikation, die der Entwicklung der F3'5'H zugrunde lag, erfolgte. In den primitiven Untergruppen der Barnadesieae und der Mutisieae (z.B. *Gerbera*) wurden bislang keine Delphinidinderivate (bzw. andere 3'4'5'-hydroxylierte Flavonoide) gefunden (BOHM und STUESSY, 2001). Dies gilt daneben auch für die Calyceraceae und Goodeniaceae, die als Schwesterfamilien zu den Asteraceae angesehen werden (BOHM und STUESSY, 2001). Dagegen kommen in den Campanulaceae, der nächst verwandten Familie, bekanntlich Delphinidinderivate vor (HARBORNE 1967). Möglich ist damit, dass zu Beginn der Entwicklung der Asteraceae keine F3'5'H vorhanden war bzw. diese verloren ging. Unter Umständen kann dies durch die Anpassung an einen Bestäuber erklärt werden. Da wahrscheinlich Südamerika der Entstehungsort der Asteraceae ist (BOHM und STUESSY, 2001), kommen Kolibris als Bestäuber in Frage. Tatsächlich konnte offenbar die Bedeutung der Bestäubung durch Kolibris für die Entwicklung der Gattung *Chuquiraga*, die zu der Unterfamilie Barnadesioideae gehört, nachgewiesen werden (EZCURRA, 2002). Durch Vögel bestäubte Blüten enthalten fast nie Delphinidinderivate, sondern meist Pelargondin- und/oder Cyanidinderivate (HARBORNE, 1995). Allgemein werden als Stimulus der Asteraceae-Entwicklung die zunehmend wärmeren und trockeneren Bedingungen vor ca. 38 Mio. Jahren in Südamerika angesehen (BOHM und STUESSY, 2001).

Die Evolution der F3'5'H bei den Asteraceae sollte spätestens bis zu der Entstehung der Untergruppe der Cardueae erfolgt sein. FERNANDEZ *et al.* (1991) wiesen in der auf der iberischen Halbinsel endemischen *Carduus assoi* (Cardueae) ein Derivat des

3'4'5'-hydroxylierten (seltene) Flavons Tricetin nach. Die blaue Blütenfarbe der Kugeldistel (*Echinops ruthenicus*, Cardueae) basiert auf Delphinidderivaten (eigene Feststellung). Interessanterweise scheinen aber in dieser Untergruppe blaue und violette Farben, die auf Cyanidderivaten beruhen, zu dominieren. *Centaurea cyanus* (Cardueae) ist ein bekanntes Beispiel, dass auch ohne das Vorkommen von Delphinidderivaten basierend auf Cyanidin blaue Blütenfarbe möglich ist (KONDO *et al.*, 1994). In 10 weiteren *Centaurea*-Arten konnte das Vorkommen von Cyanidderivaten nachgewiesen werden (BOHM und STUESSY, 2001). Damit könnte es sein, dass in dieser Untergruppe zwar ursprünglich eine F3'5'H vorhanden war, diese aber wieder verloren ging. Das Blau der Wegwarte (*Cichorium intybus*, Lactuceae) basiert wiederum auf Delphinidderivaten (NØRBÆK *et al.*, 2002).

Bislang gibt es keine Sequenzinformation zu F3'Hs oder F3'5'Hs aus den Untergruppen der Cardueae und Lactuceae. Die bislang bekannten F3'5'H-Sequenzen stammen aus den Untergruppen Astereae (*Callistephus*), Calenduleae (*Osteospermum*) und Senecioneae (*Senecio*), die zu der Unterfamilie der Asteroideae gehören. In den Tageteae und anderen Untergruppen, die zur gleichen Unterfamilie gehören, wurden bislang keine 3'4'5'-hydroxylierten Flavonoide entdeckt (BOHM und STUESSY, 2001). Das Blau der Dahlie (Coreopsideae, ebenfalls Asteroideae) basiert auf Cyanidderivaten (HARBORNE, 1967). Die F3'5'H hat sich damit auch in dieser Unterfamilie nicht allgemein durchgesetzt.

Nach Genduplikationen wird oftmals eine erhöhte Evolutionsgeschwindigkeit als Motor der Diversifizierung beobachtet (LI, 1997; LAWTON-RAUH, 2003). Eine beschleunigte Evolution manifestiert sich in einer erhöhten Rate an nichtsynonymen Substitutionen, d.h. an denjenigen Austauschen in einem Codon, die zu einem AS-Austausch führen. Dies konnte auch für die F3'5'Hs aus Asteraceae nachgewiesen werden. Beim paarweisen Vergleich der F3'5'Hs bzw. F3'Hs aus Asteraceae mit der F3'H aus *Petunia*, die der gemeinsame nächste Verwandte unter den bekannten Sequenzen ist, weisen die F3'5'Hs aus Asteraceae eine erhöhte Rate an nichtsynonymen Austauschen auf, während die Rate an Austauschen in der DNA-Sequenz, die zu keinen AS-Austauschen (synonyme Substitutionen) führen, jeweils konstant ist. Dieser Befund steht in Einklang mit den bei den F3'5'Hs aus Asteraceae im Vergleich zu den F3'Hs aus Asteraceae deutlich längeren Ästen in der phylogenetischen Analyse.

Für eine erhöhte Rate an AS-Austauschen gibt es zwei Erklärungsansätze: die Notwendigkeit einer neuen Funktion übt eine positive, gerichtete Selektion aus (OHTA, 1993) oder ein erniedrigter Selektionsdruck erlaubt die zufällige Fixierung neutraler Austausche, die, eventuell nach einem Wechsel der Umweltbedingungen, zu der Entwicklung einer neuen Funktion führen (KIMURA, 1987).

Im Rahmen dieser Arbeit kann nicht entschieden werden, ob der Evolution der F3'5'Hs aus Asteraceae positive Selektion zugrunde liegt. Dass die Möglichkeit zur Synthese von Delphininderivaten eine unmittelbar verbesserte Anpassung im Rahmen der Bestäubung mit sich brachte, ist leicht vorstellbar. Das Wirken von positiver, gerichteter Selektion liegt damit zumindest nahe. Es existieren komplexe bioinformatische Verfahren, mit denen Wahrscheinlichkeiten für das Wirken von positiver Selektion ermittelt werden können, z.B. mit dem von YANG (1997) entwickelten Verfahren. Damit könnte auch Aufschluss über die Rolle der Selektion bei den F3'5'Hs aus Asteraceae gewonnen werden.

Die Stilbensynthese ist ein Beispiel, wo phylogenetische Analysen ebenfalls nahe legen, dass sie mehrmals unabhängig aus der CHS durch Genduplikation und anschließende funktionelle Diversifizierung evolviert ist (SCHRÖDER, 1999). Ein interessanter Fall, wo die Evolution einer Genfamilie näher studiert wurde, ist die CHS-Genfamilie aus *Dendranthema* (YANG *et al.*, 2002). Die Sequenzierung einer Reihe zufällig ausgewählter CHS-Klone aus *Dendranthema* ergab 3 Unterfamilien, die sich in der phylogenetischen Analyse entsprechend zu den 3 Unterfamilien der CHS-Genfamilie aus *Gerbera* (GCHS1, GCHS2 und GCHS3) anordnen (YANG *et al.*, 2002). GCHS1 und GCHS3 sind typische, in die Flavonoidbiosynthese involvierte CHS (HELARIUTTA *et al.*, 1996). GCHS2 dagegen ist zwar ein CHS-ähnliches Enzym, besitzt aber eine veränderte Substratspezifität und einen modifizierten Reaktionsmechanismus. Für die der GCHS2 entsprechenden Sequenzen aus *Dendranthema* konnte eine erhöhte AS-Austauschrate und damit eine erhöhte Evolutionsgeschwindigkeit nachgewiesen werden (YANG *et al.*, 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass hierbei positive Selektion wahrscheinlich ist.

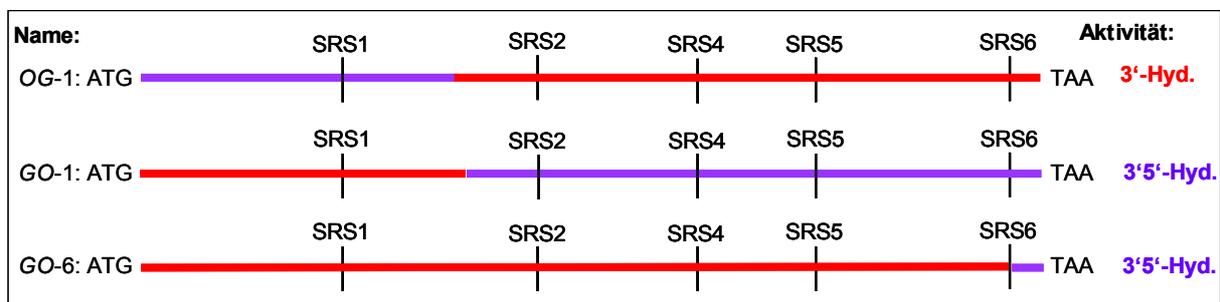
## D.2.2 Molekulare Basis des Funktionsunterschieds von F3'H und F3'5'H

TROPF *et al.* (1994) zeigten, dass wahrscheinlich nur wenige AS-Austausche für die Evolution einer Stilbensynthase aus einer CHS nötig sind. Die hohe Übereinstimmung der F3'5'Hs aus Asteraceae zu den F3'Hs legt ebenfalls nahe, dass nur wenige AS-Austausche für die Erweiterung der Funktion von der 3'- zur 3'5'-Hydroxylierung nötig sind.

Die in dieser Arbeit konstruierten chimären Gene aus cDNA-Fragmenten der F3'H aus *Gerbera* und der F3'5'H aus *Osteospermum* (Abb. D3) hatten zum Ziel, erste Erkenntnisse über die Lokalisation von Bereichen in der AS-Sequenz, die den funktionellen Unterschied zwischen F3'H und F3'5'H bedingen, zu gewinnen.

Durch das Alignment der 3 bislang bekannten AS-Sequenzen der F3'5'Hs aus Asteraceae mit allen bislang bekannten Sequenzen von F3'Hs und F3'5'Hs anderer Familien konnten einige auffallende Unterschiede zwischen dem Konsensus der F3'Hs einerseits und dem der F3'5'Hs aus Asteraceae bzw. anderer Familien andererseits identifiziert werden. Diese liegen insbesondere im N-terminalen Bereich inklusive SRS1. Darauf aufbauend wurden chimäre Gene mit dem entsprechenden N-Terminus der *f3'h* aus *Gerbera* (GO-1) bzw. der *f3'5'h* aus *Osteospermum* (OG-1) und dem jeweiligen C-terminalen Bereich der anderen cDNA konstruiert.

Allerdings zeigte das Protein aus der Hefeexpression des chimären Gens GO-1 3'5'-Hydroxylierungsaktivität, das Protein von OG-1 dagegen ausschließlich 3'-Hydroxylierungsaktivität. Diese Befunde demonstrierten, dass der für die 3'5'-Hydroxylierung verantwortliche Bereich nicht im N-Terminus einschließlich von SRS1 lokalisiert ist, sondern im C-terminalen Bereich ab Position 189 der *Osteospermum*



**Abb. D3: Schematische Darstellung der konstruierten chimären Gene aus cDNA-Fragmenten der F3'H und F3'5'H**

3'-Hyd. = 3'-Hydroxylierungsaktivität

3'5'-Hyd. = 3'5'-Hydroxylierungsaktivität

SRS = „substrate recognition site“

F3'5'H-Sequenz. Damit konnte in einem ersten Schritt generell auch gezeigt werden, dass die Konstruktion funktioneller chimärer Gene aus cDNA-Fragmenten von F3'H und F3'5'H möglich ist.

Nach dem Erscheinen der Arbeit von RUPASINGHE *et al.* (2003) wurde die Aufmerksamkeit generell hin zum C-Terminus verlagert. Die Autoren griffen das von GOTOH (1992) für CYPs entwickelte SRS-Konzept auf und wandten es auf 4 *Arabidopsis* CYP-Sequenzen aus der Phenylpropan- und der Flavonoidbiosynthese, darunter die F3'H, an. Durch computergestützte Modellierung identifizierten sie 5 SRSs als entscheidend für die Substraterkennung: demnach kontaktieren SRS1, SRS2 und das N-terminale Ende von SRS4 den aliphatischen Teil des Substrats, das C-terminale Ende von SRS4 sowie SRS5 und SRS6 dagegen den aromatischen Teil. SRS3 spielt bei diesen CYPs hinsichtlich der Substraterkennung keine Rolle.

Da am aromatischen Teil die Reaktion geschieht, müsste demnach in den letzteren SRSs die Funktion determiniert werden. Im Alignment aller F3'H- und F3'5'H-Sequenzen sind keine auffallenden Unterschiede in SRS4 und SRS5 lokalisiert. Deswegen wurde die Chimäre GO-6 konstruiert, die aus dem N-terminalen Ende der *f3'h* aus *Gerbera* bis SRS6 und dem C-terminalen der *f3'5'h* aus *Osteospermum* einschließlich der SRS6 besteht. Tatsächlich zeigte das Protein aus der Hefeexpression dieses chimären Gens eindeutig 3'5'-Hydroxylierungsaktivität. Damit konnte gezeigt werden, dass der Funktionsunterschied tatsächlich im Bereich nahe des 3'-Endes determiniert wird. Die experimentellen Befunde stimmen mit den Vorhersagen aus der homologen Modellierung von RUPASINGHE *et al.* (2003) gut überein.

Allerdings war die Aktivität des Proteins von GO-6 geringer als im Vergleich zu rekombinantem Protein der F3'5'H aus *Osteospermum*, PHF entstand max. im Verhältnis 1:1 zu ERI. Unter Umständen müssen für die optimale Ausbildung der 3'5'-Hydroxylierung Wechselwirkungen mit AS anderer Bereiche in Betracht gezogen werden.

Detaillierte Untersuchungen an einem Insekten CYP ergaben, dass hier das Zusammenwirken von in SRS1 und SRS6 lokalisierten aromatischen AS unerlässlich ist für die korrekte Ausbildung des katalytischen Zentrums (CHEN *et al.*, 2002; BAUDRY *et al.*, 2003). Eventuell spielen damit im N-terminalen Bereich lokalisierte AS auch eine wichtige Rolle in der optimalen Ausprägung der F3'5'H-Aktivität. Die Konstruktion weiterer chimärer Gene könnte diese Frage klären.

Daneben bietet sich nach dem jetzt erreichten Erkenntnisstand die gerichtete Mutagenese an. Das Alignment aller bislang bekannter F3'H- und F3'5'H-Sequenzen zeigt an 2 Stellen innerhalb von SRS6 auffallende Unterschiede. Wenn tatsächlich ausschließlich SRS6 den Funktionsunterschied determiniert, dann müsste demnach eine F3'H durch maximal zwei AS-Substitutionen in ein funktionelles Protein mit 3'5'-Hydroxylierungsaktivität konvertierbar sein.

	505	514	524
	-----+-----+-----		
Senecio_3'5'	EPEKLN	MEEYFGISL	QRVQPLL
Osteospermum_3'5'	DPERLN	MEEYFGISV	QKAEPLM
Callistephus_3'5'	KPEKLN	MDEAFGLSV	QRAEPLY
Callistephus_3'	DPEKLN	MEEAYGLTL	QRAEPLM
Hieracium_3'	EPRNL	MEEAYGLTL	QRAQPLM
Gerbera_3'	NPRKL	MEEAYGLTL	QRAAPLY
Petunia_3'	LPEML	MEEAYGLTL	QRADPLY
Iponoea_3'	SVETLN	MEEAYGLTL	QRAYPLM
Perilla_3'	LAKDL	MEEAYGITL	QRADPLY
Glycine_3'	NPEKLN	MDEAYGLTL	QRAYPLS
Pelargonium_3'	IPQELN	MDEAYGLTL	QRASPLH
Arabidopsis_3'	TPEKLN	MEEYGLTL	QRAYPLY
Matthiola_3'	TPEKLN	MEEYGLTY	QRAYPLI
Allium_3'	SAEKLN	MEEAYGLPL	QRAYPLM
Oryza_3'	TPDKLN	MEEAYGLTL	QRAYPLM
Torenia_3'	KPEKLN	MEEGYGLTL	QRASPLI
Nierenbergia_3'5'	VIE-LN	MEEYFGLAL	QKAYPLE
Petunia_3'5'	VIE-LN	MEEAFGLAL	QKAYPLE
Lycianthus_3'5'	VKE-IN	MEEYFGLAL	QKAYPLE
Solanum_n_3'5'	VVD-IN	MEEYFGLAL	QKAYPLE
Eustoma_3'5'	VIE-LN	MDEPFGLAL	QKAYPLA
Catharanthus_3'5'	INE-LN	MDEYFGLAL	QKAYPLY
Vinca_3'5'	YTK-LN	MDEYFGLAL	QKAYVPLA
Gossypum_3'5'	TGE-LN	MDEAFGLAL	QKAYPLS
Gentiana_3'5'	-DE-LN	MDEYFGLAL	QKAYPLA
Torenia_3'5'	NNI-MN	MEEAFGIAL	QKATPLK
Campanula_3'5'	VVE-VN	MEEYFGIAL	QKKYPLS
Consensus	..e.l	#M#Ea%G.l	.lQravPL.

Abb. D4: SRS6 der F3'Hs und F3'5'Hs.

Der schwarze Kasten bezeichnet die SRS6. Die Pfeile weisen auf putativ für den Funktionsunterschied verantwortliche Aminosäuren hin.

Die Referenzen zu den verwendeten Sequenzen sind im Anhang angegeben.

Alle F3'5'Hs weisen an Position 515 der Abb. D4 ein Phe auf, die F3'Hs ein Tyr. Vorstellbar wäre, dass die OH-Gruppe am aromatischen Ring des Tyr ein Umkippen des frei drehbaren B-Rings nach erfolgter 3'-Hydroxylierung verhindert und damit auch eine weitere Hydroxylierung an der 5'-Position. Dafür, dass nur diese eine AS für den Funktionsunterschied verantwortlich ist, lässt sich als weiteres Indiz heranziehen, dass die Asteraceae F3'5'Hs an der zweiten kritischen Position,

Position 518, ein Ser besitzen, welches sich chemisch anders verhält wie das apolare Ala, das die F3'5'Hs der anderen Familien an der gleichen Stelle aufweisen. Dagegen besitzen die F3'Hs (mit Ausnahme der *Allium* F3'H mit Pro) dort das zum Ser der Asteraceaeen F3'5'Hs sehr nah verwandte Thr. Jeweils ein AS-Austausch bei einer Fettsäure Hydroxylase aus *Vicia sativa* in SRS6 (KAHN *et al.*, 2001) und bei der Limon 6-Hydroxylase aus *Mentha spicata* in SRS5 (SCHALK und CROTEAU, 2000) veränderte die Regiospezifität der Oxidationsreaktion.

Auf der anderen Seite könnte es aber auch sein, dass in diesem Fall nicht die chemische Eigenschaft der AS den Ausschlag gibt, sondern die Größe und damit das gegenüber dem Thr der F3'Hs kleinere Ser der Asteraceaeen F3'5'Hs bzw. das Ala der F3'5'Hs der anderen Familien, evtl. im Verbund mit dem Phe von Position 515, die 3'5'-Hydroxylierung ermöglicht.

Generell kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass, wie bereits angesprochen, Interaktionen mit anderen AS in Bereichen außerhalb von SRS6 für die Ausprägung der 3'5'-Hydroxylierungsaktivität wesentlich sind. Da die Asteraceaeen F3'5'Hs bezüglich der Sequenz eine deutlich höhere Übereinstimmung aufweisen zu den F3'Hs auch anderer Familien als zu den entsprechenden F3'5'Hs, wäre es leicht möglich, dass solche Wechselwirkungen anders geartet sind als bei den F3'5'Hs anderer Familien. In einem solchen Kontext könnte das Ser an Position 518 in den Asteraceaeen F3'5'Hs funktionell notwendig sein. Substitution von Ser zu Ala bei den Asteraceaeen F3'5'Hs und umgekehrt bei den F3'5'Hs anderer Familien könnte die Frage klären, ob das Ser bzw. Ala jeweils notwendige oder austauschbare AS sind in Bezug auf die 3'5'-Aktivität.

Als Grundlage für die Durchführung der gerichteten Mutagenese wäre die Einbeziehung von F3'5'Hs in die computergestützte homologe Modellierung, wie sie von RUPASINGHE *et al.* (2003) betrieben wurde, hilfreich.

### D.3 Molekulare Basis und Evolution der Substratspezifität der DFR

Die DFR ist eine Oxidoreduktase, welche die NADPH-abhängige Reduktion der Ketogruppe an Position 4 der Dihydroflavonole zu den entsprechenden Leucoanthocyanidinen katalysiert (HELLER und FORKMANN, 1999). Wie bereits diskutiert, zeigen verschiedene DFRs zum Teil drastisch unterschiedliche Substratspezifitäten. Durch ihre Substratspezifität entscheidet sie maßgeblich über die Ausbildung des Anthocyan- bzw. kondensierten Tanninmusters. Sie ist damit ein Schlüsselenzym in Bezug auf die gezielte Modifikation der Flavonoidbiosynthese für unterschiedlichste Anwendungen.

Hier stellte sich die Frage, ob sich Kriterien entwickeln lassen, mit denen sich anhand der Primärsequenz Voraussagen treffen lassen über die zu erwartende Substratspezifität einer DFR. Umgekehrt würde die genaue Kenntnis der molekularen Grundlagen der Substratspezifität das Design von DFRs mit jeweils passender Substratspezifität für das „genetic engineering“ erlauben.

JOHNSON *et al.* (2001) postulierten eine die Substratspezifität determinierende Region (SSDR) zwischen Position 126 und 157 der Sequenz der *Gerbera* DFR. Die Grundlage dafür waren Ergebnisse aus der Konstruktion dreier chimärer Gene und ihrer anschließenden Expression in der *Petunia*-Linie „RL01“. Sie bestanden aus den N-Termina der *dfr* aus *Gerbera* bis Position 126, 170 und 235 der AS-Sequenz und dem jeweiligen C-Terminus der *dfr* aus *Petunia*.

Da bei dieser Vorgehensweise grundsätzlich das N-terminale Ende der DHK-reduzierenden *Gerbera* DFR verwendet wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass im Bereich N-terminal von Position 126 weitere Bereiche oder AS lokalisiert sind, die einen mehr oder weniger großen Einfluss auf die Ausprägung der Substratspezifität besitzen. Um dies zu testen, wurde in vorliegender Arbeit ein chimäres Gen (*OF*) aus dem N-Terminus der *dfr* aus *Osteospermum* bis zur SSDR und dem C-Terminus der *dfr* aus *Fragaria* konstruiert. Mit dem Protein aus der Hefeexpression des chimären Gens entstanden im Enzymtest bei gleichzeitigem Angebot von DHK und DHQ als Substrate LPg und LCy im Verhältnis von 1,64. Mit rekombinantem Protein der DFR aus *Fragaria* war, wie bereits diskutiert, das Verhältnis zirka doppelt so hoch. Damit scheint der Bereich N-terminal der SSDR tatsächlich einen bedeutenden, zumindest unterstützenden Einfluss auf die Ausprägung der Substratspezifität zu haben, wobei der SSDR aber eine



reaktive Zentrum der DFR darstellt. Dafür spricht auch, dass dieser Bereich in allen DFRs hoch konserviert ist (vgl. Abb. C14).

Keine Entsprechung lässt sich dagegen für Asn 187 und 207, die bei der menschlichen G4E eine entscheidende Rolle bei der Bindung der Glykosyl-Gruppe des Substrats spielen, finden. Dies spricht für die, in Anbetracht des unterschiedlichen Substrats auch naheliegende Annahme, dass die DFR eine andere Organisation bezüglich der Substratbindung aufweist. Aufgrund der oben diskutierten Ergebnisse mit chimären Genen scheint, dass bei der DFR, im Gegensatz zur G4E, der N-terminale Bereich wesentlich an der Substratbindung mitbeteiligt ist.

Allerdings konnte keine Korrelation zwischen bestimmten AS in der Primärsequenz und der Substratspezifität gefunden werden. Auch bei den DFRs aus Asteraceae, die eine hohe Übereinstimmung aufweisen, konnten keine Kriterien identifiziert werden, anhand derer sich unterscheiden ließe, ob eine DFR die Fähigkeit besitzt, DHK zu reduzieren oder nicht. Es fallen aber bei einigen SSDRs markante Abweichungen vom Konsensus auf. Dies legt nahe, dass die Substratbindung und Determinierung der Substratspezifität bei verschiedenen, auch nahe verwandten DFRs unterschiedlich organisiert sind. Dafür spricht auch der bereits diskutierte Befund, dass bei unterschiedlichen DFRs die relative Substratspezifität sehr stark variiert. D.h. die Ausprägung der Substratspezifität ist variabel und erfolgt auf Gattungs- oder sogar Artebene. Ein Beispiel sind die oben diskutierten DFRs aus *Gerbera-Hybrida* „Regina“ bzw. „Clivia“, die eine deutlich unterschiedliche Substratspezifität aufweisen.

Eine heterogene Organisation der Substratspezifität würde bedeuten, dass jeweils andere AS an der Substratbindung beteiligt sind. Oder dass zwar die gleichen AS in die Substratbindung involviert sind, aber jeweils ihre räumliche Anordnung zueinander variiert. Beide Möglichkeiten unterstreichen die Schwierigkeit, anhand der Primärsequenz die für die Substratspezifität verantwortlichen AS zu identifizieren. Für eine weitere Untersuchung ist damit die Verwendung räumlicher Modelle sinnvoll. Die Röntgenstrukturanalyse der CHS durch FERRER *et al.* (1999) konnte eine Reihe von seit längerem intensiv diskutierter Fragen zu Substratbindung und Reaktionsmechanismus klären. Noch steht keine Kristallstruktur für die DFR zur Verfügung. Ein Ansatzpunkt ist aber die computergestützte homologe Modellierung, wie sie von RUPASINGHE *et al.* (2003) erfolgreich an CytP450-Proteinen betrieben

wurde. Als Grundlage hierfür könnte die oben erwähnte Tertiärstruktur der G4E dienen.

Die Variabilität der SDDR warf die Frage auf, ob ihr eine besondere evolutionäre Dynamik zugrunde liegt. Generell wiesen RAUSHER *et al.* (1999) und LU und RAUSHER (2003) nach, dass die Gene von „downstream“ agierenden Enzymen (DFR, ANS, FGT) schneller evolvieren als von „upstream“ agierenden Enzymen (CHS, CHI, FHT). Erstere zeigen eine höhere Rate an nichtsynonymen Austauschen, d.h. von Austauschen, die zu AS-Substitutionen führen. Die wahrscheinliche Erklärung liegt darin, dass „upstream“ agierende Enzyme einem höheren selektiven Zwang unterliegen, da sie den Durchfluss kontrollieren und/oder die Intermediate liefern für verschiedene Synthesewege, so dass Mutationen multiple Auswirkungen haben können (RAUSHER *et al.*, 1999; LU und RAUSHER, 2003).

In dieser Arbeit wurden die Substitutionsraten verschiedener dikotyler DFRs jeweils im paarweisen Vergleich mit der monokotylen DFR aus *Lilium* geschätzt. Für die Schätzungen wurden die Gesamtsequenzen mit und ohne SDDR sowie die Sequenz der SDDR allein verwendet. Hierbei ergab sich, dass in fast allen Fällen für die SDDR eine höhere Anzahl an nichtsynonymen Austauschen im Vergleich zu den gesamten analysierten Sequenzen. Zum Teil lag der ermittelte Wert auch bei den verwendeten strengen Testbedingungen (1000 Bootstrap-Wdh.) deutlich außerhalb der Standardabweichung. Dies gilt insbesondere für die SSDRs der DFR aus *Fragaria* und *Petunia*.

Wie auch für die Evolution der F3'5'H aus Asteraceae diskutiert (D.2.2), stellt sich hier die Frage, ob der erhöhten Substitutionsrate ein erniedrigter Selektionszwang oder positive Selektion zugrunde liegt. Für die DFR aus *Fragaria* scheint positive Selektion plausibel zu sein, da leicht vorstellbar ist, dass ihre ungewöhnlich hohe Substratpräferenz für DHK als Voraussetzung für die hohe Akkumulation von Pelargonidinderivaten in Erdbeerfrüchten einen unmittelbaren Selektionsvorteil im Rahmen der Samenverbreitung brachte. Im Fall der *Petunia* ist eher eine Optimierung auf DHM als Substrat zu vermuten als Voraussetzung für die Bildung von Delphinidinderivaten in Blüten in Zusammenhang mit der Bestäubung.

LU und RAUSHER (2003) gehen allerdings davon aus, dass in „downstream“ Genen keine positive Selektion stattfindet. Allerdings stützen sie sich auf explizite Untersuchungen der ANS und FGT aus *Ipomoea*. Für die DFR könnten die Verhältnisse prinzipiell anders sein, da sie durch ihre Substratspezifität potenziell

über das Anthocyanmuster mitentscheidet und darüber hinaus auch Einfluss besitzt auf die Synthese kondensierter Tannine (CARRON *et al.*, 1994; BAVAGE *et al.*, 1997). Spezielle bioinformatische Verfahren wie das von YANG (1997) entwickelte könnten Hinweise liefern, ob bei der DFR in Bezug auf die Ausprägung der Substratspezifität tatsächlich von positiver Selektion ausgegangen werden kann.

Allgemein lässt sich in Bezug auf die Evolution postulieren, dass die effiziente Reduktion von DHK durch die DFR erst mit der Bestäubung und Samenverbreitung durch Vögel von Bedeutung war. Es gibt einen klaren Zusammenhang zwischen der Bestäubung durch Vögel (v.a. Kolibris) in tropischen und subtropischen Regionen und dem Auftreten von Pelargonidinderivaten in Blüten (HARBORNE, 1995). Cyanidin ist das dominierende Anthocyanidin in Blättern und generell in vegetativen Geweben, Delphinidin dagegen lässt sich häufig in von Insekten bestäubten Blüten nachweisen (HARBORNE, 1995; STEYN *et al.*, 2002). Die Hauptbestandteile von kondensierten Tanninen sind Procyanidin und Prodelphinidin, während Propelargonidin selten auftritt (PORTER, 1988).

#### **D.4 Ausblick**

Mit der in dieser Arbeit gewonnenen Sequenzinformation zu allen wichtigen Strukturgenen der Flavonoidbiosynthese in *Osteospermum* ist die Grundlage geschaffen worden für weitere, über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehende Untersuchungen. Southern-Blot-Analysen sind bereits in der Durchführung. Des Weiteren sind vor allem Expressionsstudien geplant. Dies ist auch für die Identifizierung und Charakterisierung von geeigneten Sorten bzw. Linien für eine zielgerichtete Züchtung von hohem Interesse. Daneben sind die cDNA-Fragmente und die *full-length* cDNA-Klone zum Teil bereits für die gentechnische Modifikation der Flavonoidbiosynthese von *Osteospermum* und anderen Pflanzen in Verwendung. Da die Substratspezifität der DFR für viele Fragestellungen entscheidend ist, werden hierzu weitere Versuche durchgeführt werden. Wichtig ist die Validierung, inwieweit *in-vitro* gemessene Substratspezifitäten einen Rückschluss auf die Verhältnisse *in-vivo* erlauben. Der Ansatzpunkt dazu ist der Vergleich von heterologer Expression in Mikroorganismen (Hefe und *E. coli.*) sowie die heterologe Expression in Pflanzen. Dazu wurden die *dfrs* aus *Gerbera*-Hybrida „Regina“ und *Fragaria x ananassa* bereits in Pflanzen transformiert.

Für eine weitere Aufklärung der molekularen Grundlagen der Substratspezifität der DFR scheint die Verwendung von räumlichen Strukturanalysen, die durch homologe Modellierung gewonnen werden könnten, notwendig zu sein. Zur experimentellen Verifizierung können Mutagenese-Experimente durchgeführt werden.

Diskrepanzen bezüglich der Substratspezifität, wenn auch weniger schwerwiegende, ergaben sich auch mit der rekombinanten F3'5'H. Hier zeigte sich aber, dass neben 3'4'5'-hydroxylierten Produkten in Abhängigkeit von den Inkubationsbedingungen meist ein mehr oder weniger großer Teil an nur 3'4'-hydroxylierten Produkten entsteht. Dies wurde auch von EDER (2001) festgestellt und tritt auch bei Verwendung von Pflanzenextrakt auf (STOTZ, 1983). Eine zuverlässig hohe 3'5'-Hydroxylierungsaktivität wäre für die Produktion von 3'4'5'-hydroxylierten Flavonoiden in einem größeren Maßstab für pharmakologische und andere Zwecke wünschenswert. In diesem Zusammenhang sollen in zukünftigen Versuchen die Bedingungen für die *in-vitro*-Konversion optimiert werden.

In Bezug auf den Funktionsunterschied von F3'H und F3'5'H sind Versuche in Planung, mit Hilfe der gerichteten Mutagenese experimentell nachzuweisen, auf welchen AS dieser beruht. Darüber hinaus wäre das Design von F3'5'Hs oder F3'5'Hs interessant, die für ein bestimmtes Substrat (z.B. NAR oder DHK) spezifisch sind. Denkbar ist zum Beispiel die Konstruktion chimärer Gene aus cDNA-Fragmenten von FNS II und F3'H bzw. F3'5'H. Dies könnte zu hybriden Enzymen führen, die nur Flavanone hydroxylieren. Durch die Verwendung von substratspezifischen F3'5'Hs bzw. F3'5'Hs für das „genetic engineering“ könnte das Substitutionsmuster am B-Ring gezielt auf einer bestimmten Flavonoidebene verändert werden. Unter Umständen erlauben weitere Einblicke in den Zusammenhang von Struktur und Funktion auch das Design von einer Hydroxylase mit hoher Akzeptanz für 3'4'-hydroxylierte Flavonoide.

Die phylogenetische Analyse der drei bislang bekannten F3'5'H-Sequenzen aus Asteraceae zeigte, dass diese offenbar eine von den F3'5'Hs anderer Familien unabhängige und eigenständige Entwicklung darstellen. Noch zu klärende Fragen sind, wann genau innerhalb der Familie die Entwicklung auftrat und wieso sich die F3'5'H nicht generell durchsetzte. Einige Asteraceae (z.B. Kornblume, Dahlie) besitzen blaue Blütenfarben basierend auf Cyanidinderivaten. Daneben ist es eine interessante Frage, ob eine unabhängige Entwicklung einer F3'5'H auch noch in anderen Familien stattfand. Generell wünschenswert wäre in diesem

Zusammenhang die Gewinnung von Sequenzinformation von F3'5'Hs aus monokotylen Pflanzen, sowie von F3'Hs und F3'5'Hs aus Gymnospermen und niederen Pflanzen. Dies würde tiefere Einblicke in die Evolution dieser interessanten und für die Ausprägung des Flavonoidmusters entscheidenden Enzyme erlauben.

In neuerer Zeit konnten durch Einbeziehung bioinformatischer Methoden in die Analyse von Sequenzen erste Aufschlüsse über die Entwicklung und Diversifizierung von Flavonoidgenen gewonnen werden. Das gilt insbesondere für die CHS-Genfamilie. Bei der Diversifizierung der CHS-Genfamilie von *Ipomoea* und *Dendranthema* erscheint das Wirken von positiver Selektion wahrscheinlich (YANG *et al.*, 2002 und 2004). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit scheint für DFR und F3'H/F3'5'H positive Selektion zumindest möglich zu sein. Die Wahrscheinlichkeiten dafür könnten mit entsprechenden Verfahren abgeschätzt werden.

RAUSHER *et al.* (1999) und LU und RAUSHER (2003) zeigten, dass Gene „upstream“ agierender Enzyme (CHS, CHI, FHT) langsamer evolvieren als Gene von „downstream“-Enzymen (DFR, ANS, FGT). Zur Ergänzung und Erweiterung dieser Studien ist die Einbeziehung von Cytochrom P450-Enzymen (FNS II, F3'H, F3'5'H) sinnvoll. Generell bietet sich die Asteraceae-Familie für solche Studien aufgrund der vergleichsweise reichlich vorhandenen biochemischen und molekularbiologischen Daten zur Flavonoidbiosynthese an.

## E. Zusammenfassung

*Osteospermum* ist eine Zierpflanze, die sich in den letzten Jahren einen bedeutenden Platz auf dem Markt erobert hat. Dementsprechend gibt es ein hohes Interesse an der Züchtung neuer Blütenfarben. Aufbauend auf chemischen und biochemischen Untersuchungen der Flavonoidbiosynthese in Petalen von *Osteospermum* wurden in der vorliegenden Arbeit von allen wichtigen Flavonoid-Strukturgenen cDNA-Fragmente isoliert. Die damit vorhandene Sequenzinformation kann für die Charakterisierung von Pflanzenmaterial zur zielgerichteten Züchtung und für die gentechnische Modifikation der Flavonoidbiosynthese in *Osteospermum* genutzt werden.

Von den entscheidend an der Ausprägung des Flavonoidmusters beteiligten Enzymen Chalkonsynthase (CHS), Flavonolsynthase (FLS), Flavonoid 3'5'-Hydroxylase (F3'5'H) und Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR) wurden *full-length* cDNA-Klone erstellt und heterolog in Hefe exprimiert. Die rekombinanten Proteine wurden jeweils in Enzymtests v.a. auf ihre Substratspezifität hin getestet. Hier war von besonderem Interesse, ob die Ergebnisse daraus mit denjenigen, die mit Enzymextrakten aus Pflanzen gewonnen wurden, übereinstimmen.

Wie die CHS aus Pflanzenextrakt akzeptierte auch die rekombinante CHS fast ausschließlich 4-Cumaroyl-CoA als Ausgangssubstrat, während Kaffeoyl-CoA deutlich weniger effizient umgesetzt wurde. Die Determinierung des Hydroxylierungsmusters am B-Ring erfolgt damit bei *Osteospermum* auf der Ebene der Flavonoide.

Die rekombinante FLS zeigte eine Präferenz für Dihydroquercetin (DHQ) gegenüber Dihydrokaempferol (DHK) als Substrat. Hier standen keine Daten aus Versuchen mit Enzymextrakt aus Pflanzen zum Vergleich zur Verfügung. Die festgestellte Substratpräferenz stimmt aber mit der hohen Anreicherung von Quercetinderivaten in Petalen überein.

Das rekombinante Protein eines vermutlichen Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H) cDNA-Klons zeigte erstaunlicherweise deutliche 3'5'-Hydroxylierungsaktivität. Unter suboptimalen Bedingungen bezüglich Proteinmenge und Inkubationsdauer entstanden aber auch deutliche Mengen an nur 3'4'-hydroxylierten Produkten. Das rekombinante Protein wies eine sehr breite Substratspezifität auf. Naringenin (NAR), DHK und Kaempferol waren vergleichbar gute Substrate, während Apigenin sowie 3'4'-hydroxylierte Flavonoide deutlich schlechter umgesetzt wurden. Im Gegensatz

zu Versuchen mit der mikrosomalen Fraktion aus Petalen war DHK im direkten Vergleich mit NAR das bevorzugte Substrat.

Die F3'5'H aus *Osteospermum* ist der Sequenz nach eine F3'H. Dies gilt auch für die F3'5'Hs aus *Callistephus chinensis* und *Senecio cruentus* (Asteraceae). Phylogenetische Analysen ergaben, dass die F3'5'Hs aus Asteraceae eine von den F3'5'Hs anderer Familien unabhängige und innerhalb der Familie aufgetretene Entwicklung darstellen.

Die hohe Ähnlichkeit der F3'5'Hs aus Asteraceae zu den F3'Hs wurde genutzt, um Aminosäuren zu identifizieren, die den Funktionsunterschied zwischen F3'H und F3'5'H determinieren könnten. Durch die Konstruktion chimärer Gene aus cDNA-Fragmenten der F3'H aus *Gerbera* und der F3'5'H aus *Osteospermum* konnte nachgewiesen werden, dass der Funktionsunterschied sehr wahrscheinlich im Bereich nahe des 3'-Endes determiniert wird. Als möglicherweise entscheidend für den Funktionsunterschied konnten zwei Aminosäurepositionen identifiziert werden. Dies ließ den Schluss zu, dass nur wenige Austausch in der Aminosäuresequenz für die Evolution einer F3'5'H aus einer F3'H nötig sind.

Mit Enzympräparationen aus Pflanzen konnte keine DFR-Aktivität mit DHK als Substrat festgestellt werden. Überraschenderweise akzeptierte die rekombinante DFR jedoch DHK als Substrat. Durch die Verwendung einer 1 : 1-Mischung von DHK und DHQ als Substrat im Testansatz zeigte sich aber, dass DHQ das deutlich präferierte Substrat ist. Weitere Versuche offenbarten, dass der pH-Wert des Reaktionspuffers einen großen Einfluss auf die Ausprägung der Substratspezifität *in vitro* besitzt.

Durch die Konstruktion chimärer Gene aus cDNA-Fragmenten der DFR aus *Osteospermum* und *Fragaria x ananassa* konnte gezeigt werden, dass für die Substratspezifität im Wesentlichen nur eine Region verantwortlich ist. Innerhalb dieser Region konnten aber durch Vergleiche von Aminosäuresequenzen von DFRs, die DHK reduzieren, und DFRs, die DHK nicht reduzieren, keine Korrelationen zwischen dem Auftreten bestimmter Aminosäuren und der Substratspezifität identifiziert werden. Die Substratspezifität verschiedener DFRs ist damit offenbar sehr unterschiedlich organisiert.

## Summary

*Osteospermum* is an ornamental plant which captured an important position on the market during the last years. Accordingly, there is a high interest in breeding new flower colours. Based on the chemical and biochemical investigation of the biosynthesis of flavonoids in petals of *Osteospermum*, in the present work cDNA-fragments of all important structural flavonoid genes were isolated. The so available sequence information can be used for the characterisation of plant material for directed breeding and for the genetic engineering of flavonoid biosynthesis in *Osteospermum*.

For the enzymes which are decisively involved in the formation of the flavonoid pattern, chalcone synthase (CHS), flavonol synthase (FLS), flavonoid 3'5'-hydroxylase (F3'5'H), and dihydroflavonol 4-reductase (DFR), full-length cDNA-clones were generated and heterologously expressed in yeast. The recombinant proteins were tested in enzyme tests esp. regarding to their substrate specificity. In this context, it was of special interest if the activities observed are consistent with those which were gained with enzyme extracts from plants.

In accordance with CHS from plant extract, recombinant CHS almost exclusively accepted 4-coumaroyl-CoA as a starter molecule, whereas caffeoyl-CoA was less efficiently converted. The determination of the hydroxylation pattern at the B-ring therefore in *Osteospermum* takes place at the flavonoid level.

The recombinant FLS showed a substrate preference for dihydroquercetin (DHQ) compared to dihydrokaempferol (DHK). Here, no data were available from experiments with enzyme extracts from plants. However, the observed substrate preference is in accordance with the high accumulation of quercetin derivatives in petals.

Astonishingly, the recombinant protein of a putative flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) cDNA-clone showed a clear 3'5'-hydroxylation activity. However, under suboptimal conditions where protein amount and incubation time were varied, conspicuous amounts of only 3'4'-hydroxylated products were synthesised. Recombinant protein exhibited a broad substrate specificity. Naringenin (NAR), DHK, and kaempferol were comparable substrates, whereas apigenin, as well as 3'4'-hydroxylated flavonoids, were clearly less converted. In contrast to experiments with the microsomal fraction from petals, DHK was the preferred substrate, when directly compared with NAR.

According to its sequence, F3'5'H of *Osteospermum* is a F3'H. This is also true for the F3'5'Hs of *Callistephus chinensis* and *Senecio cruentus* (Asteraceae). Phylogenetic analyses showed that F3'5'Hs of Asteraceae represent an evolution which is independent from F3'5'Hs of other families and which occurred within the family.

The high similarity of the F3'5'Hs of Asteraceae to the F3'Hs was used to identify amino acids potentially important for the determination of the functional difference between F3'H and F3'5'H. Through the construction of chimeric genes from cDNA-fragments of F3'H of *Gerbera* and F3'5'H of *Osteospermum*, it was demonstrated that the functional difference is probably determined in the region close to the 3' end. Two amino acid positions were identified being potentially important for the functional difference. This allowed the conclusion that only a few amino acid substitutions are necessary for the evolution of a F3'5'H from a F3'H.

With enzyme preparations from plants no DFR-activity was detected with DHK as a substrate. Surprisingly, the recombinant DFR accepted DHK as a substrate. However, tests utilising a 1 : 1-mixture of DHK and DHQ as substrate indicated that DHQ is clearly the preferred substrate. Further trials revealed that the pH of the reaction buffer has a high impact on the substrate specificity *in-vitro*.

Through the construction of chimeric genes from cDNA-fragments of the DFR of *Osteospermum* and *Fragaria x ananassa*, it was demonstrated that for the substrate specificity basically one region is responsible. However, by the comparison of amino acid sequences of DFRs which reduce DHK and DFRs which do not reduce DHK, no correlations between the presence of certain amino acids within this region and the substrate specificity could be identified. Therefore, the substrate specificity of different DFRs is apparently organised in different ways.

**F. Literatur**

- AIDA R**, YOSHIDA K, KONDO T, KISHIMOTO S und SHIBATA M (2000) Copigmentation gives bluer flowers on transgenic torenia plants with the antisense dihydroflavonol 4-reductase gene. *Plant Science* 160: 49-56
- AKASHI T**, AOKI T und AYABI S (1999) Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavone synthase involved in biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in licorice. *Plant Physiol.* 121: 821-828
- ALLAVENA A**, GIOVANNI A, BERIO T, SPENA A, ZOTTINI M, ACCOTTO G und VAIRA A (2000) Genetic engineering of *Osteospermum* ssp.: a case story. *Acta Hort.* 508: 129-134
- AMRHEIN N** und ZENK MH (1971) Untersuchungen zur Rolle der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) bei der Regulation der Flavonoidbiosynthese im Buchweizen (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Z. Pflanzenphysiol.* 64: 145-168
- ARCHETTI M** (2000) The origin of autumn colours by coevolution. *J. Theor. Biol.* 205:625-630
- BACKER M** und BLASCO R (1992) Expansion of the mammalian 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/plant dihydroflavonol reductase superfamily to include a bacterial cholesterol dehydrogenase, a bacterial UDP-galactose-4-epimerase, and open reading frames in vaccinia virus and fish lymphocystitis disease virus. *FEBS* 301(1): 89-93
- BAUDRY J**, LI W, PAN L, BERENBAUM M und SCHULER M (2003) Molecular docking of substrates and inhibitors in the catalytic site of CYP6B1, an insect cytochrome P450 Monooxygenase. *Prot. Eng.* 16: 577-587
- BAVAGE A**, DAVIES I, ROBBINS M und MORRIS P (1997) Expression of an Antirrhinum dihydroflavonol reductase gene results in changes in condensed tannin structure and accumulation in root cultures of *Lotus corniculatus* (bird's foot trefoil). *Plant Molecular Biology* 35: 443-458
- BELD M**, MARTIN C, HUIJS H, STUITJE A und GERATS A (1989) Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: partial characterization of dihydroflavonol-4-reductase genes. *Plant Mol. Biol.* 13(5): 491-502
- BIEZA K** und LOIS R (2001) An Arabidopsis mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiol.* 126: 1105-1115
- BONGUE-BARTELSMAN M**, O'NEILL S, TONG Y und YODER J (1994) Characterization of the gene encoding dihydroflavonol 4-reductase in tomato. *Gene* 138(1-2): 153-157

- BRADFORD M** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- BRADLEY J, DAVIES K, DEROLES S, BLOOR S und LEWIS D** (1998) The maize Lc regulatory gene up-regulates the flavonoid biosynthetic pathway of petunia. *The Plant Journal* 13: 381-392
- BRADLEY J, DEROLES S, BOASE M, BLOOR S, SWINNY E und DAVIES K** (1999) Variation in the ability of the maize Lc regulatory gene to up-regulate flavonoid biosynthesis in heterologous systems. *Plant Science* 140: 31-39
- BRITSCH L, HELLER W und GRISEBACH H** (1981) Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley. *Z. Naturforsch.* 36c: 742-750
- BRITSCH L und GRISEBACH H** (1985) Improved preparation and assay of chalcone synthase. *Phytochemistry* 24: 1975-1976
- BROWN D, RASHOTTE A, MURPHY A, NORMANLY J, TAGUE B, PEER W, TAIZ L und MUDAY G** (2001) Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 126: 524-535
- BROUILLARD R. und DANGLES O** (1994) Flavonoids and flower colour. In: HARBORNE J (Hrsg): The flavonoids: advances in research since 1986. Chapman and Hall, London, 559-588
- BURBULIS I, IACOBUCCI M und WINKEL B** (1996) A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in Arabidopsis. *Plant Cell* 8: 1013-1025
- BURBULIS I und WINKEL-SHIRLEY B** (1999) Interactions among enzymes of the Arabidopsis flavonoid biosynthetic pathway. *PNAS* 96(22): 12929-12934
- BOHM B und STUESSY T** (2001) Flavonoids of the sunflower family (Asteraceae). Springer-Verlag, Wien
- BRUGLIERA F, BARRI-REWELL G, HOLTON T und MASON J** (1999) Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the Ht1 locus of *Petunia hybrida*. *Plant J.* 19 (4): 441-451
- BYRNE P, McMULLEN, SNOOK M, MUSKET T, THEURI J, WIDSTROM N, WISEMAN B und COE E Jr** (1996) Quantitative trait loci and metabolic pathways: genetic control of the concentration of maysin, a corn earworm resistance factor, in maize silks. *PNAS* 93: 8820-8825
- CHALKER-SCOTT L** (1999) Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology* 70(1): 1-9
- CARRON T, ROBBINS M und MORRIS P** (1994) Genetic modification of condensed tannin biosynthesis in *Lotus corniculatus*. 1. Heterologous antisense

- dihydroflavonol reductase down-regulates tannin accumulation in "hairy root" cultures. *Theor. Appl. Genet.* 87: 1006-1015
- CHAPPLE C** (1998) Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Biol.* 49: 311-343
- CHEEK R** (1997) *Osteospermum*. *The Garden* 07/97: 506-511
- CHEN Z** (1996) Simple modifications to increase specificity of the 5' RACE procedure. *Trends Genet.* 12: 87-88
- CHEN M**, SANMIGUEL P und BENNETZEN J (1998): Sequence organization and conservation in sh2/a1-homologous regions of sorghum and rice. *Genetics* 148(1): 435-443
- CHEN J**, BERENBAUM M und SCHULER M (2002) Amino acids in SRS1 and SRS6 are critical for furanocoumarin metabolism by CYP6B1v1, a cytochrome P450 monooxygenase. *Insect Molecular Biology* 11(2): 175-186
- CHRISTENSEN A**, GREGERSEN P, SCHRÖDER J und COLLINGE D (1998) A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light and pathogen attack. *Plant Mol. Biol.* 37: 849-857
- CLEGG M**, CUMMINGS M und DURBIN M (1997) The evolution of plant nuclear genes. *PNAS* 94: 7791-7798
- COOPER-DRIVER G** und BHATTACHARYA M (1998) Role of phenolics in plant evolution. *Phytochemistry* 49(5): 1165-1174
- DAVIES J** (1997) The bioenergetics of vacuolar H<sup>+</sup> pumps. In: LEIGH R, SANDERS D und CALLOW J (Hrsg): *The plant vacuole*. Academic Press, San Diego, 340-363
- DAVIES K** und SCHWINN K (1997) Flower colour. In: GENEVE R, PREECE J und MERKLE S (Hrsg): *Biotechnology of ornamental plants*. CAB International, Wallingford, 259-294
- DEIML B** (2003) Cloning and expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and the flavonol synthase of *Gerbera hybrida*. Diplomarbeit, TU München, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau
- DEVIC M**, GUILLEMINOT J, DEBEAUJON I, BECHTOLD N, BENSAUDE E, KOORNNEEF M, PELLETIER G und DELSENY M (1999) The BANYULS gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development. *The Plant Journal* 19(4): 387-398
- DEWICK P** (1994) Isoflavonoids. In: HARBORNE J (Hrsg): *The flavonoids: advances in research since 1986*. Chapman and Hall, London, 117-238
- DILLON V**, OVERTON J, GRAYER R und HARBORNE J (1997) Differences in phytoalexin response among rice cultivars of different resistance to blast. *Phytochemistry* 44(4): 599-603

- DIXON R**, HARRISON M und PAIVA N (1995) The isoflavonoid phytoalexin pathway: from enzymes to genes to transcription factors. *Physiol. Plant.* 93: 385-392
- DJORDJEVIC M**, MATHESIUS U, ARIOLI T, WEINMANN J und GÄRTNER E (1997) Chalcone synthase gene expression in transgenic subterranean clover correlates with localized accumulation of flavonoids. *Australian Journal of plant Physiology* 24: 119-132
- DONG X**, BRAUN E und GROTEWALD E (2001) Functional conservation of plant secondary metabolic enzymes revealed by complementation of arabidopsis flavonoid mutants with maize genes. *Plant Physiol.* 127 (1): 46–57
- EDER C** (2001) Klonierung und Charakterisierung der Flavonoid 3'-Hydroxylase und der Flavonoid 3',5'-Hydroxylase. Dissertation TU München, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau
- EISELEY L** (1957) The immense journey. Vintage Books, New York
- ELSHERIF T** (2000) Genetik und Enzymologie der Bildung außergewöhnlicher Anthocyanidin-Muster in Blüten höherer Pflanzen. Dissertation TU München, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau
- ESSENBERG M** (2001) Prospects for strengthening plant defenses through phytoalexin engineering. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59: 71-78
- EZCURRA C** (2002) Phylogeny, morphology, and biogeography of Chuquiraga, an Andean-Patagonian genus of Asteraceae-Bernadesioideae. *The Botanical Review* 68(1): 153-170
- FERNANDEZ I**, GARCIA B, PEDRO J und VAREA A (1991) Lignans and flavonoids from *Carduus assoi*. *Phytochemistry* 60: 1030-1032
- FISCHER T**, HALBWIRTH H, MEISEL B, STICH K und FORKMANN G (2003) Molecular cloning, substrate specificity of the functionally expressed dihydroflavonol 4-reductases from *Malus domestica* and *Pyrus communis* cultivars and the consequences for flavonoid metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 412: 223-230
- FERRER JL**, JEZ J, BOWMAN M, DIXON R, NOEL J (1999) Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature Structural Biology* 6(8): 775-784
- FORKMANN G** (1994) Genetics of flavonoids. In: HARBORNE J (Hrsg): The flavonoids: advances in research since 1986. Chapman and Hall, London, 537-564
- FORKMANN G**, VLAMING P, SPRIBILLE R, WIERING H und SCHRAM A (1986) Genetic and biochemical studies on the conversion of dihydroflavonols in flowers of *Petunia hybrida*. *Z. Naturforsch.* 41c: 179-186

- FORKMANN G** und **HELLER W** (1999) Biosynthesis of flavonoids. In: **SANKAWA U** (Hrsg): Polyketids and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives. Elsevier, Amsterdam, 713-148
- FORKMANN G** und **MARTENS S** (2001) Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Curr. Opin. in Biotechnology* 12: 155-160
- FOX D**, **WESTFALL B**, **NATHAN M**, **HUGHES A**, **RASHTCHIAN A** und **SCHUSTER D** (2000) Striding new distances with 5'RACE: long 5'RACE of human APC and TSC-2 cDNA. *Focus* 18(2): 33-37
- FUNA N**, **OHNISHI Y**, **FUJII I**, **SHIBUYA M**, **EBIZUKA Y** und **HORINOUCHE S** (1999) A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature* 400: 897-899
- GANDIKOTA M**, **DE KOCHKO A**, **CHEN L**, **ITHAL N**, **FAUQUET C** und **REDDY A** (2001) Development of transgenic rice plants overexpressing maize anthocyanin genes and increased blast resistance. *Molecular Breeding* 7: 73-83
- GOSCH C** (2003) Dihydroflavonol 4-reductases from various crop plants: molecular cloning, heterologous expression, and consequences of the substrate specificity for induced disease resistance. Diplomarbeit, TU München, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau
- GOTOH O** (1992) Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *The Journal of Biological Chemistry* 267(1): 83-90
- GOULD K**, **McKELVIE J** und **MARKHAM K** (2002) Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in red and green leaves after mechanical injury. *Plant, Cell and Environment* 25: 1261-1269
- GRAHAM S** und **PETERSON J**, 1999: How similar are P450s and what can their differences teach us? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 369(1):24-29
- GRAYER R** und **HARBORNE J** (1994) A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry* 37(1): 19-42
- GRÜBER G** (1997) Kulturtips zu den aktuellen Beet- und Balkonneuheiten. *Zierpflanzenbau* 1: 37-41
- HAIN R**, **BIESELER B**, **KINDL H**, **SCHROEDER G** und **STOECKER R** (1990) Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol. *Plant Mol. Biol.* 15: 325-335
- HAIN R**, **REIF HJ**, **KRAUSE E**, **LANGEBARTLS R**, **KINDL H**, **VORNAM B**, **WIESE W**, **SCMELZER E**, **SCHREIER P**, **STÖCKER R** und **STENZEL K** (1993) Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361: 153-156
- HARBORNE J** (1967) Comparative biochemistry of the flavonoids. Academic Press, London

- HARBORNE J** (1995) *Ökologische Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- HARBORNE J** und **SMITH D** (1978) Correlations between anthocyanin chemistry and pollination ecology in the Polemoniaceae. *Biochem. Syst. And Ecol.* 6: 127-130
- HARBORNE J** und **GRAYER R** (1994) Flavonoids and insects. In: **HARBORNE J** (Hrsg): *The flavonoids: advances in research since 1986*. Chapman and Hall, London, 537-564
- HARBORNE J** und **BAXTER H** (1999) *The handbook of natural flavonoids*. Wiley, Chichester
- HARBORNE J** und **WILLIAMS C** (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504
- HARRISON M** und **DIXON R** (1994) Spatial patterns of expression of flavonoid/isoflavonoid pathway genes during interactions between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Plant Journal* 6: 9-20
- HASEMANN C**, **KURUMBAIL R**, **BODDUPALLI S**, **PETERSON J** und **DEISENHOFER J** (1995) Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* 2: 41-62
- HASS-TSCHIRSCHKE I** (1996) *Osteospermum* - Renaissance unter neuem Namen. *TASPO* 8: 20-21
- HAUSER A** (2004) *Isolierung und Charakterisierung von Flavonoidgenen aus Osteospermum*. Diplomarbeit, TU München, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau
- HE XZ** und **DIXON A** (2000) Genetic manipulation of isoflavone 7-O-methyltransferase enhances biosynthesis of 4'-O-methylated isoflavonoid phytoalexins and disease resistance in alfalfa. *The Plant Cell* 12: 1689-1702
- HELARIUTTA Y**, **KOTILAINEN M**, **ELOMAA P** und **TEERI T** (1993) *Gerbera hybrida* (Asteraceae) imposes regulation at several anatomical levels during inflorescence development on the gene for dihydroflavonol-4-reductase. *Plant Mol. Biol.* 28: 935-941
- HELARIUTTA Y**, **KOTILAINEN M**, **ELOMAA P**, **KALKKINEN N**, **BREMER K**, **TEERI T** und **ALBERT V** (1996) Duplication and functional divergence in the chalcone synthase gene family of Asteraceae: evolution with substrate change and catalytic simplification. *PNAS* 93: 9033-9038
- HELLER W** und **FORKMANN G** (1994) Biosynthesis of flavonoids. In: **HARBORNE J** (Hrsg): *The flavonoids: advances in research since 1986*. Chapman and Hall, London, 499-535
- HOCH W**, **ZELDIN E** und **McCOWN B** (2001) Physiological significance of anthocyanins during autumnal leaf senescence. *Tree Physiology* 21: 1-8

- HOCH W**, SINGSAAS E und McCOWN B (2003) Resorption Protection. Anthocyanins facilitate nutrient recovery in autumn by shielding leaves from potentially damaging light levels. *Plant Physiology* 133: 1296-1305
- HOFMANN R**, SWINNY E, BLOOR S, MARKHAM K, RYAN K, CAMPBELL B, JORDAN B und FOUNTAIN D (2000) Responses of nine *Trifolium repens* L. populations to ultraviolet-B radiation: differential flavonol glycoside accumulation and biomass production. *Annals of Botany* 86: 527-537
- HOLTON T**, BRUGLIERA F, LESTER D, TANAKA Y, HYLAND C, MENTING J, LU CY, FARCY E, STEVENSON T und CORNISH E (1993) Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature* 366: 276-279
- HORSCH R**, FRY J, HOFFMAN N, EICHHOLTZ D, ROGERS S und FRALEY R, (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231
- HOSHINO A**, MORITA Y, CHOI JD, SAITO N, TOKI K, TNAKA Y und LIDA S (2003) Spontaneous mutations of the flavonoid 3'-hydroxylase gene conferring reddish flowers in the three morning glory species. *Plant Cell Physiol.* 44(10): 990-1001
- HOWLES P**, SEWALT V, PAIVA N, ELKIND Y, BATE N, LAMB C und DIXON R (1996) Overexpression of L-phenylalanine ammonialyase in transgenic tobacco plants reveals control points for flux into phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiol.* 112: 1617-1624
- INAGAKI Y**, JOHZUKA-HISATOMI Y, MORI T, TAKAHASHI S, HAYAKAWA Y, PEYACHOKNAGUL S, OZEKI Y und IIDA S (1999) Genomic organization of the genes encoding dihydroflavonol 4-reductase for flower pigmentation in the Japanese and common morning glories. *Gene* 226(2): 181-188
- JEZ J**, AUSTIN M, FERRER JL, BOWMAN M, SCHRÖDER J, NOEL J (2000) Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases. *Chem. Biol.* 7: 919-930
- JOHNSON E**, YI H, SHIN B, OH B, CHEONG H und CHOI G (1999) *Cymbidium hybrida* dihydroflavonol 4-reductase does not efficiently reduce dihydrokaempferol to produce orange pelargonidin-type anthocyanins. *Plant J.* 19(1): 81-85
- JOHNSON E**, RYU S, YI H, SHIN B, CHEONG H und CHOI G (2001) Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. *The Plant Journal* 25(3): 325-333
- KAHN R** und DUST F (2000) Function and Evolution of plant Cytochrome P450. In: ROMEO J, IBRAHIM R, VARIN L, DE LUCA V (Hrsg): Recent advances in phytochemistry: evolution of metabolic pathways. Elsevier Science Ltd, Oxford, 151-190
- KAHN R**, LE BOUQUIN R, PINOT F, BENVENISTE und DUST F (2001) A conservative amino acid substitution alters the regiospecificity of CYP94A2, a fatty

acid hydroxylase from the plant *Vicia sativa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 391(2): 180-187

**KALTENBACH M**, SCHRÖDER G, SCHMELZER E, LUTZ V und SCHRÖDER J (1999) Flavonoid hydroxylase from *Catharanthus roseus*: cDNA, heterologous expression, enzyme properties and cell type specific expression in plants. *Plant J.* 19: 183-193

**KAMSTEEG J**, BREDERODE J und NIGTEVECHT G (1980) Genetical and biochemical evidence that the hydroxylation pattern of the anthocyanin B-ring in *Silene dioica* is determined at the *p*-coumaroyl-coenzyme A stage. *Phytochemistry* 19:1459-1462

**KELLNER S** (2003) Molekularbiologische Untersuchungen und Charakterisierung der Flavonoidbiosynthese bei *Hieracium pilosella*. Diplomarbeit, TU München, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau

**KIMURA M** (1987) Die Neutralitätstheorie der molekularen Evolution. Verlag Paul Parey, Berlin

**KNOTT J** (2004) Biochemische Untersuchungen zur Flavonoidbiosynthese bei Rose und Kartoffel. Dissertation, TU München, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau

**KÖHLEIN F** (2000) Eine Standortbestimmung: Kapmargeriten. *Gartenpraxis* 1: 34-38.

**KONDO T**, UEDA M, TAMURA H, YOSHIDA K, ISOBE M und GOTO T (1994) Composition of protocyanin, a self-assembled supramolecular pigment form the blue cornflower *Centaurea cyanus*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 978-979

**KOZAK M** (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *The Journal of biological chemistry* 266(30): 19867-19870

**KUMAR S**, TAMURA K, JAKOBSEN I und NEI M (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics Applications Note* 17(12): 1244-1245

**LAVOLA A**, JULKUNEN-TIITTO R, APHALO P, DE LA ROSA T und LEHTO T (1997) The effects of UV-B radiation on u.v.-absorbing secondary metabolites in birch seedlings grown under simulated forest soil conditions. *New Phytol.* 137: 617-621

**LAWTON-RAUH A** (2003) Evolutionary dynamics of duplicated genes in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 396-409

**LE ROUX A** und SCHELPE E (1981) Namaqualand and Clanwilliam. Creda Press, Cape Town

**LI WH** (1997) Molecular evolution. Sinauer, Sunderland

- LIU L** und **McCLURE J** (1995) Effects of UV-B on activities of enzymes of secondary phenolic metabolism in barley primary leaves. *Physiol. Plant.* 93: 734-739
- LLOYD A**, **WALBOT V** und **DAVIES R** (1992) *Arabidopsis* and *Nicotiana* anthocyanin production activated by maize regulators R and C1. *Science* 258: 1773-1775
- LONG S** (1989) The rhizobium-legume symbiosis: life together in the underground. *Cell* 56: 203-214
- LU Y** und **RAUSHER M** (2003) Evolutionary rate variation in anthocyanin pathway genes. *Mol. Biol. Evol.* 20(11): 1844-1853
- LUKAČIN R**, **WELLMANN F**, **BRITSCH L**, **MARTENS S** und **MATERN, U** (2003) Flavonol synthase from *Citrus unshiu* is a bifunctional dioxygenase. *Phytochemistry* 62: 287-292
- MARKHAM K** (1988) Distribution of flavonoids in the lower plants and its evolutionary significance. In: **HARBORNE J** (Hrsg): The flavonoids, advances in research since 1980. Academic Press, New York, 427-468
- MARKHAM K**, **RYAN K**, **BLOOR S** und **MITCHELL K** (1998) An increase in the luteolin : apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UV-B enhancement. *Phytochemistry* 48(5): 791-794
- MARTENS S** (2000) Genetische, biochemische und molekularbiologische Untersuchungen der Flavonbiosynthese bei *Gerbera* Hybriden. Dissertation TU München, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau
- MARTENS S**, **TEERI T**, **FORKMANN G** (2002) Heterologous expression of dihydroflavonol 4-reductase from various plants. *FEBS* 531: 453-458
- MARTENS S**, **FORKMANN G**, **BRITSCH L**, **WELLMANN F**, **MATERN U** und **LUKAČIN R** (2003a) Divergent evolution of flavonoid 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases in parsley. *FEBS* 544: 93-98
- MARTENS S**, **KNOTT J**, **SEITZ C**, **JANVARY L**, **YU SN** und **FORKMANN G** (2003b) Impact of biochemical pre-studies on specific metabolic engineering strategies of flavonoid biosynthesis in plant tissues. *Biochemical Engineering Journal* 14: 227-235
- MATHESIUS U** (2001) Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. *Journal of Experimental Botany* 52: 419-426
- MERCURI A**, **SACCHETTI A**, **DE BENEDETTI L**, **SCHIVA T** und **ALBERTI S** (2002) Green fluorescent flowers. *Plant Science* 162: 647-654
- MEYER P**, **HEIDMANN I**, **FORKMANN G** und **SAEDLER H** (1987) A new petunia flower colour generated by transformation of mutant with a maize gene. *Nature* 330: 677-678

- MO Y**, NAGEL C und TAYLER L (1992) Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *PNAS* 89: 7213-7217
- MOL J**, ROBBINS M, DIXON R, VELTKAMP E (1985) Spontaneous and enzymic rearrangement of naringenin chalcone to flavanone. *Phytochemistry* 24: 2267-2269
- MOONEY M**, DESNOS T, HARRISON K, JONES J, CARPENTER R und COEN E (1995) Altered regulation of tomato and tobacco pigmentation genes caused by *delila* genes of *Anthirrhinum*. *The Plant Journal* 7: 333-339
- MORI S**, KOBAYSHI H, HOSHI Y, KONDO M und NAKANO M (2003) Heterologous expression of the flavonoid 3',5'-hydroxylase gene of *Vinca major* alters flower color in transgenic *Petunia hybrida*. *Plant Cell Reports* 22(6): 415-421
- MURPHY A**, PEER WA, TAIZ L (2000). Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta* 211: 315-324
- NAPOLI C**, LEMIEUX C und JORGENSEN R (1990) Introduction of a chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279-289
- NEI M** und GOJOBORI T (1986) Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3: 418-426
- NEI M** und KUMAR S (2000) Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, Oxford
- NERBERT D** und NELSON D (1991) Gene nomenclature based on Evolution. *Meth. in Enzymol.* 206: 3-11
- NØRBÆK R**, NIELSEN K und KONDO T (2002) Anthocyanins from flowers of *Cichorium intybus*. *Phytochemistry* 60: 357-359
- OHTA T** (1993) Pattern of nucleotide substitution in growth hormone-prolactin gene family: a paradigm for evolution by gene duplication. *Genetics* 134: 1271-1276
- OKINAKA Y**, SHIMADA Y, NAKANO-SHIMADA R, OHBAYASHI M, KIYOKAWA S und KIKUCHI Y (2003) Selective accumulation of delphinidin derivatives in tobacco using a putative flavonoid 3'5'-hydroxylase cDNA from *Campanula medium*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67(1): 161-165
- OLSSON L**, VEIT M, WEISSENBOCK G und BORMAN J (1998) Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*. *Phytochemistry* 49(4): 1021-1028
- ORMROD D**, LANDRY L und CONKLIN P (1995) Short term UV-B radiation and ozone exposure effects on aromatic secondary metabolite accumulation of flavonoid-deficient *Arabidopsis* mutants. *Physiol. Plant.* 93: 602-610

- OSCHE G** (1993) Zur Evolution optischer Signale bei Blütenpflanzen. In: SITTE P (Hrsg): Horizonte der Biologie. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 30-39
- OVÁDI J** und **SRERE P** (1996) Metabolic consequences of enzyme interactions. *Cell Biochemistry and Function* 14: 249-258
- PEARSON S**, **PARKER A**, **HADLEY P** und **KITCHENER H** (1995) The effect of photoperiod and temperature on reproductive development of Cape Daisy (*Osteospermum jucundum* cv. "Pink Whirls"). *Scientia Horticulturae* 62: 225-235
- PETERS D** und **CONSTABEL P** (2002) Molecular analysis of herbivore-induced condensed tannin synthesis: cloning and expression of dihydroflavonol reductase from trembling aspen (*Populus tremuloides*). *The Plant Journal* 32: 707-712
- PFEIFFER J** (2003) Klonierung von Flavonoid-Genen aus Gerbera-Wildarten. Diplomarbeit, TU München, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau
- POLLAK P**, **VOGT T**, **MO Y** und **TAYLOR LP** (1993) Chalcone synthase and flavonol accumulation in stigmas and anthers of *Petunia hybrida*. *Plant Physiol.* 102: 925-932
- PORTER L** (1988) Flavans and proanthocyanidins. In: **HARBORNE J** (Hrsg): The flavonoids, advances in research since 1980. Academic Press, New York, 23-56
- POLASHOCK J**, **GRIESBACHR**, **SULLIVAN R** und **VORSA N** (2002) Cloning of a cDNA encoding the cranberry dihydroflavonol-4-reductase (DFR) and expression in transgenic tobacco. *Plant Sci.* 163(2): 241-251
- 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
- POOLEY E** (1998) A field guide to wild flowers Kwazulu-Natal and the eastern region. Natal Flora Publications Trust, Durban
- PRESCOTT A**, **STAMFORD N**, **WHEELER G** und **FIRMIN J** (2002) In vitro properties of a recombinant flavonol synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 60: 589-593
- RAUSHER M**, **MILLER R** und **TIFFIN P** (1999) Patterns of evolutionary rate variation among genes of the anthocyanin biosynthetic pathway. *Mol. Biol. Evol.* 16(2): 266-274
- REICHHOLF J**, 1994: Der schöpferische Impuls. DTV, Stuttgart
- ROBBINS M**, **PAOLOCCI F**, **HUGHES, JW**, **TURCHETTI V**, **ALLISON G**, **ARCIONI S**, **MORRIS P** und **DAMIANI F** (2003) *Sn*, a maize bHLH gene, modulates anthocyanin and condensed tannin pathways in *Lotus corniculatus*. *J. Exp. Bot.* 54(381): 239-248

- RUPASINGHE S**, BAUDRY J und SCHULER M (2003) Common active site architecture and binding strategy of four phenylpropanoid P450s from *Arabidopsis thaliana* as revealed by molecular modelling. *Protein Engineering* 16(10): 721-731
- RYAN K**, MARKHAM K, BLOOR S, BRADLEY J, MITCHELL K und JORDAN B (1998) UVB radiation induced increase in quercetin : kaempferol ratio in wild-type and transgenic lines of *Petunia*. *Photochemistry and Photobiology* 68(3): 323-330
- SAITO N** und HARBORNE J (1992) Correlations between anthocyanin type, pollinator and flower colour in the Labiatae. *Phytochemistry* 31(9): 3009-3015
- SAMBROOK J**, FRITSCH E und MANIATIS T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- SCHALK M** und CROTEAU R (2000) A single amino acid substitution (F363I) converts the regiochemistry of the spearmint (-)-limonene hydroxylase from C6- to a C3-hydroxylase. *PNAS* 97(22): 11948-11953
- SCHMIDT V**, SCHAEFER H und WINKLER H (2004) Conspicuousness, not colour as foraging cue in plant-animal signalling. *OIKOS* 1006: 551-557
- SCHOENBOHM C**, MARTENS S, EDER C, FORKMANN G und WEISSHAAR B (2000) Identification of the *Arabidopsis thaliana* flavonoid 3'-hydroxylase gene and functional expression of the encoded P450 enzyme. *Biol. Chem.* 381 (8): 749-753
- SCHRÖDER J** (1999) The chalcone/stilbene synthase family of condensing enzymes. In: SANKAWA U (Hrsg): Polyketids and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives. Elsevier, Amsterdam, 749-771
- SCHULER M** und WERCK-REICHHART D (2003) Functional genomics of P450s. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 54: 629-667
- SCHWALM K**, ALONI R, LANGHANS M, HELLER W, STICH S und ULLRICH, C (2003) Flavonoid-related regulation of auxin accumulation in *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumors. *Planta* 218: 163-178
- SCHWARZ-SOMMER Z**, SHEPHERD N, TACKE E, GIERL A, ROHDE W, LECLERCQ L, MATTES M, BERNDTGEN R, PETERSON P und SAEDLER H (1987) Influence of transposable elements on the structure and function of the A1 gene of *Zea mays*. *EMBO J.* 6: 287-294
- SCHWINN K**, MARKHAM K und GIVENO N (1993) Floral flavonoids and the potential for pelargonidin biosynthesis in commercial chrysanthemum cultivars. *Phytochemistry* 35(1): 145-150
- SEITZ C**, 2000: Blütenfarben bei *Osteospermum* und Möglichkeiten der züchterischen Beeinflussung. Diplomarbeit, TU München, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau
- SHIMADA Y**, NAKANO-SHIMADA R, OHBAYASHI M, OKINAKA Y, KIYOKAWA S und KIKUCHI Y (1999) Expression of chimeric P450 genes encoding flavonoid-

- 3',5'-hydroxylase in transgenic tobacco and petunia plants. *FEBS Letters* 461: 241-245
- SHIRLEY B** (1996) Flavonoid biosynthesis: "new" functions for an "old" pathway. *Trends in Plant Science* 1: 377-382
- SPRIBILLE R** und **FORKMANN G** (1984) Conversion of dihydroflavonols to flavonols with enzyme extracts from flowerbuds of *Matthiola incana* R. Br. *Z. Naturforsch.* 39c: 714-719
- STAFFORD H** (1974) Possible multi-enzyme complexes regulating the formation of C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> phenolic compounds and lignins in higher plants. *Rec. Adv. Phytochem.* 8: 53-79
- STAFFORD H** (1991) Flavonoid evolution: an enzymic approach. *Plant Physiol.* 96: 680-685
- STEYN W**, **WAND S**, **HOLCROFT D** und **JACOBS G** (2002) Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* 155: 349-361
- STICH K** und **FORKMANN G** (1988) Biosynthesis of 3-deoxyanthocyanins with flower extracts from *Sinningia cardinalis*. *Phytochemistry* 27(3): 785-789
- STICH K**, **EIDENBERGER T**, **WURST F** und **FORKMANN G** (1992) Flavonol synthase activity and the regulation of flavonol and anthocyanin biosynthesis during flower development in *Dianthus caryophyllus* L. (Carnation). *Z. Naturforsch.* 47c: 553-560
- STOTZ G** (1983) Enzymologie und Genetik der Oxidationsreaktionen in der Flavonoidbiosynthese höherer Pflanzen. Dissertation, Universität Tübingen, Lehrstuhl für Genetik
- STOTZ G** und **FORKMANN G** (1984) Flavonoid biosynthesis in flowers of *Verbena hybrida*. *J. Plant Physiol.* 116: 173-183
- SUZUKI K**, **TSUDA S**, **FUKUI Y**, **FUKUCHI-MIZUTANI M**, **YONEKURA-SAKAKIBARA K**, **TANAKA Y** und **KUSUMI T** (2000a) Molecular characterisation of Rose flavonoid biosynthesis genes and their application in Petunia. *Biotechnol. and Biotechnol. Eq.* 14(2): 56-62
- SUZUKI K**, **XUE H**, **TANAKA Y**, **FUKUI Y**, **FUKUCHI-MIZUTANI M**, **MURAKAMI Y**, **KATSUMOTO Y**, **TSUDA S** und **KUSUMI T** (2000b) Flower color modifications of *Torenia hybrida* by cosuppression of anthocyanin biosynthesis genes. *Mol. Breed.* 6: 239-246
- TAJIMA F** (1993) Simple methods for testing the molecular clock hypothesis. *Genetics* 135: 599-607

- TANAKA Y**, FUKUI Y, FUKUCHI-MIZUTANI M, HOLTON T, HIGGINS E und KUSUMI T (1995) Molecular cloning and characterization of *Rosa hybrida* dihydroflavonol 4-reductase gene. *Plant Cell Physiol.* 36(6): 1023-1031
- TANAKA Y**, YONEKURA K, FUKUCHI-MIZUTANI M, FUKUI Y, FUJIWARA H, ASHIKARI T und KUSUMI T (1996) Molecular and biochemical characterization of three anthocyanin synthetic enzymes from *Gentiana triflora*. *Plant Cell Physiol.* 37 (5): 711-716
- TANAKA Y**, TSUDA S und KUSUMI T (1998) Metabolic engineering to modify flower color. *Plant Cell Physiol.* 39(11): 1119-1126
- TANNER J**, FRANCKI K, ABRAHAMS S, WATSON J, LARKIN P und ASHTON A (2003) Proanthocyanidin biosynthesis in plants. *The Journal of Biological Chemistry* 278(34): 31647-31656
- TOGURI T**, UMEMOTO N, KOBAYASHI O und OHTANI T (1993) Activation of anthocyanin synthesis genes by white light in eggplant hypocotyl tissues, and identification of an inducible P-450 cDNA. *Plant Mol. Biol.* 23 (5): 933-946
- THODEN J**, HEGEMAN A, WESENBERG G, CHAPEAU M, FREY P und HOLDEN H (1997) Structural analysis of UDP-sugar binding to UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 36: 6294-6304
- THODEN J**, WOHLERS T, FRIDOVICH-KEIL J und HOLDEN H (2000) Crystallographic evidence for Tyr 157 functioning as the active site base in human UDP-galactose 4-epimerase. *Biochemistry* 39: 5691-5701
- TROPF S**, LANZ T, RENSING S, SCHRODER J, und SCHRODER G (1994) Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution. *J. Mol. Evol.* 38: 610–618
- UEYAMA Y**, SUZUKI K, FUKUCHI-MIZUTANI M, FUKUI Y, MIYAZAKI K, OHKAWA H, KUSUMI T und TANAKA Y (2002) Molecular and biochemical characterization of torenia flavonoid 3'-hydroxylase and flavone synthase II and modification of flower color by modulating expression of these genes. *Plant Science* 163: 253-263.
- VAN DER KROL A**, MUR L, DE LANGE P, MOL J und STUITJE A (1988) Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect. *Plant Mol Biol.* 14(4): 457-66.
- VITTEN M** (2004) Metabolic engineering of the flavonoid pathway in *Osteospermum*. Diplomarbeit, TU München, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau
- WERCK-REICHHART D** und FEYEREISEN R (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology* 1(6): 3003.1-3003.9
- WELFORD R**, TURNBULL J, CLARIDGE T, PRESCOTT A und SCHOFIELD C (2001) Evidence for oxidation at C-3 of the flavonoid C-ring during anthocyanin biosynthesis. *Chem. Commun.* 18: 1828-1829

- WILLIS K** und McELWAIN J (2002) The evolution of plants. Oxford Univ. Press, Oxford
- WILLKOMMEN S** (1999) Züchtungsfortschritt bei *Osteospermum*. *DeGa* 18: 13-15
- WINKEL-SHIRLEY B** (1999) Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiologia Plantarum* 107: 142-149
- WINKEL-SHIRLEY B** (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* 126: 485-493
- WINKEL-SHIRLEY B** (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 218-223
- XIE DY**, SHARMA S, PAIVA N, FERREIRA D und DIXON R (2003) Role of anthocyanidin reductase, encoded by *banyuls* in plant flavonoid biosynthesis. *Science* 299 (5605): 396-399
- YAMAMURA T** und Terakawa T (2003) cDNA and protein sequences of *Senecio cruentus* flavonoid 3',5'-hydroxylase sequence homolog and their use. Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 11 pp., Patent-Nr: JP2003159078
- YANG Z** (1997) PAML : a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput. Appl. Biosci* 13: 555-556
- YANG J**, HUANG J, GU H, ZHONG Y und YANG Z (2002) Duplication and adaptive evolution of the chalcone synthase genes of *Dendranthema* (Asteraceae). *Mol. Biol. Evol.* 19(10): 1752-1759
- YANG J**, GU H und YANG Z (2004) Likelihood analysis of the chalcone synthase genes suggests the role of positive selection in Morning Glories (*Ipomoea*). *J. Mol. Evol.* 58: 54-63
- YLSTRA B**, BUSSCHER J, FRANKEN J, HOLLMAN P, MOL J und VAN TUNEN A (1994) Flavonols and fertilisation in *Petunia hybrida*: localisation and mode of action during pollen tube growth. *Plant J.* 6: 201-212
- ZABALA G** und VODKIN L (2003) Cloning of the pleiotropic T locus in soybean and two recessive alleles that differentially affect structure and expression of the encoded flavonoid 3' hydroxylase. *Genetics* 163(1): 295-309
- ZERBACK R**, DRESSLER K und HESS D (1989) Flavonoid compounds from pollen and stigma of *Petunia hybrida*: inducers of the vir region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Plant Science* 62: 83-91

### Persönliche Mitteilungen

**Stefan Martens**, Insitut für Pharmazeutische Biologie, Philipps-Universität Marburg

**Laslo Janvari**, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, TU München

## G. Anhang

## G.1 Genunspezifische und partiell degenerierte Primer

Name des Primers	Nukleotidsequenz	Referenz
<b>Genunspezifische Primer</b>		
AP	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T	
AAP	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG	
AUAP	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC	
<b>Partiell degenerierte Primer</b>		
CHS1	JANVARI, persönliche Mitteilung	JANVARI (vor- aussichtlich 2004)
CHS2	JANVARI, persönliche Mitteilung	
Hydro1H:	MARTENS, persönliche Mitteilung	MARTENS (unveröffentlicht)
Hydro2H	MARTENS, persönliche Mitteilung	
DIOX 1H	MARTENS, persönliche Mitteilung	MARTENS <i>et al.</i> (2003a)
DIOX 1R	MARTENS, persönliche Mitteilung	
DFR1	5'-GAG AAT GAA GT(A/G)AT(A/C/T)AA(A/G)CC	HELARIUTTA <i>et al.</i> (1993)
DFR2	5'-AAA ATA CAT CCA TCC IGT CAT	
ANS1	JANVARI, persönliche Mitteilung	JANVARI (vor- aussichtlich 2004)
GTMotif1	JANVARI, persönliche Mitteilung	

G.2 Nukleotidsequenz und offener Leserahmen der *full-length* cDNA-KloneChalkonsynthase

T TAT CAC TTA ATT GTA CTT CAC TTA CTA CTT GAA AGA TCA ACC TAC CGG CCG GAG ATC GAT	61
	OCS-H1 C CGG CCG GAG ATC GAT
CAA CCG CCA CCG <b>ATG</b> GCA TCC ACA CTT GAT ATT GCT GCC ATT AGA GAA GCC CAA CGG GCA CAA	124
<b>CAA CCG CCA CC&gt;</b>	
G P A T I L A I G T A T P S N C I Y Q A D	38
GGT CCA GCC ACC ATT CTT GCC ATT GGC ACC GCA ACT CCC TCC AAT TGT ATC TAT CAA GCT GAT	187
Y P D Y Y F R I T K S E H M V D L K E K F	59
TAT CCA GAT TAC TAT TTT CGG ATC ACT AAA AGT GAA CAC ATG GTT GAT CTC AAA GAG AAG TTC	250
K R M C D K S M I R K R Y M H L T E E Y L	80
AAA CGC ATG TGT GAT AAA TCT ATG ATA AGA AAA CGG TAC ATG CAC TTA ACC GAG GAG TAT CTA	313
	<GCC ATG TAC GTG AAT TGG CTC CTC ATA G OCS-5'-3
K D N P N I C E Y M A P S L D A R Q D V V	101
AAA GAC AAC CCC AAC ATT TGC GAA TAC ATG APT CCG TCA CTC GAC GCC CGT CAA GAC GTG GTT	376
V V E V P K L G K E G A T K A I K E W G Q	122
GTC GTC GAA GTC CCA AAA CTC GGC AAA GAA GGC GCC ACA AAA GCG ATC AAA GAA TGG GGC CAA	439
P K S K I T H L I F C T T S G V D M P G A	143
CCG AAG TCC AAA ATC ACC CAT CTC ATA TTC TGC ACG ACT TCT GGT GTC GAC ATG CCT GGT GCC	502
D Y Q L T K A L L G L R P S V K R F M M Y Q	164
GAC TAC CAA CTC ACC AAA CTC CTC <u>CTC CGT CCA TCC GTC AAA CGT TTC ATG ATG TAC CAA</u>	565
	<G GCA GGT AGG CAG TTT GCA AAG TAC OCS-5'-2
Q G C F A G G T V L R L A K D L A E N N K	185
<u>CAA GGT TGT TTC GCG GGC GGT ACG GTG CTC CGT CTC GCG AAA GAT CTC GCG GAA AAC AAC AAG</u>	628
G A R V L V V C S E I T A V T F R G P N D	206
<u>GGC GCT CGA GTT CTT GTT GTT TGC TCC GAG ATA ACC GCG GTC ACG TTT CGT GGT CCT AAC GAC</u>	691
T H L D S L V G Q A L F G D G A A A V I V	227
<u>ACG CAC CTC GAT TCT CTC GTC GGC CAG GCG TTG TTT GGC GAC GGA GCG GCG GTG ATC GTT</u>	754
	OCS-3'-1 TG ATC GTT
	<G CAC TAG CAA
G S D P D P T I E R P L F E M I S A A Q T	248
<u>GGT TCG GAT CCT GAT CCG ACC ATC GAA CGG CCG TTG TTC GAG ATG ATT TCC GCT GCT CAG ACG</u>	817
<b>GGT TCG GAT CCT GAT CC&gt;</b>	
<b>CCA AGC CTA GGA CTA</b> OCS-5'-1	
I L P D S E G A I D G H L R E V G L T F H	269
<u>ATC TTA CCG GAC TCC GAG GGC GCA ATC GAT GGA CAT TTA CGA GAA GTA GGG TTA ACT TTT CAT</u>	880
L L K D V P G L I S K N I E K A L I Q A F	290
<u>CTT CTT AAA GAT GTT CCC GGG TTA ATC TCG AAG AAC ATC GAG AAA GCG TTA ATT CAA GCG TTT</u>	943
S P L G I S D W N S I F W I A H P G G P A	311
<u>TCT CCG TTG GGT ATA AGT GAT TGG AAC TCG ATC TTT TGG ATC GCG CAT CCG GGA GGT CCG GCG</u>	1006
I L D Q V E K K L G F K E G K M R A T W H	332
<u>ATA CTT GAC CAG GTG GAG AAG AAA CTC GGT TTT AAA GAG GGG AAA ATG AGA GCA ACT TGG CAT</u>	1069
<b>A CTC GAC CAG GTC GAG ATG AAA CTC G&gt;</b> OCS-3'-2	
V L R E F G N M S R A W G L F I I D E M R	353
<u>GTA CTC AGG GAG TTC GGT AAC ATG TCG AGG GCT TGG GGG TTG TTC ATT ATC GAT GAG ATG AGG</u>	1132
K K S V E D G V S P P G E G L D W G V L F	374
<u>AAG AAA TCG GTG GAG GAC GGT GTT TCC CCC CCC GGA GAA GGG TTA GAT TGG GGG GTT TTG TTT</u>	1195
G F G P G L T G E T V V F Y S L P T P M Q	395
<u>GGG TTT GGT CCT GGT TTG ACG GGG GAG ACG GTG GTT TTT TAC AGC CTT CCA ACC CCC ATG CAG</u>	1258
I A P *	398
<u>ATT GCC CCC TAA AAG TTT GAC CAT ATG GTG GTA AGG GGG TTT TGT GGA AGT TTA TCA TTT CAG</u>	1321
	<TTC AAA CTG GTA TAC CTC CAT TCC CCC OCS-R1
ATT ATC AAT TTT TTA AGG TTT GGT TAA ATA AAT AAA GCA TTT TTA GTT TTG TTT TTG AAA GTA	1384
TTT ATT ATT ATG GGG GGG TTT ATG GGT TAT TTT ATG TTT TTG GAA GTA AAA TAT AAA TCC CCG	1447
TCG GGG AAA AA	1494

unterstrichen: das anhand partiell degenerierter Primer isolierte Ausgangsfragment

**fett** = Primer; > = forward Primer; < = reverse Primer

**ATG** = Startcodon; **TAA** = Stoppcodon

**Flavonoid 3',5'-Hydroxylase**

AC CAC AAT ACC CCA ATA GCC CCT	TTA AGT AAA	M A I I M T L L M D	10
	OF3'H-1H:	<b>ATG GCC ATT ATT ATG ACT TTA CTC ATG GA&gt;</b>	62
T C I T V L V F Y V L	L N L R T R H P N R		31
ACA TGC ATC ACT GTG TTA GTA TTC	TAT GTA TTG CTT AAC CTG CGT ACC	CGT CAC CCA AAC CGT	125
L P P G P T P W P I V G	G N L P H L G P L P		52
CTT CCC CCC GGC CCA ACC CCA TGG	CCA ATT GTC GAA AAC CTA CCA CAC	CTC GGT CCA CTT CCG	188
H H T L A A F A K K Y G P L I H L R F G F			73
CAT CAC ACA CTA GCG GCA TTC GCG AAA AAG TAC	GGT CCA TTG ATA CAC CTC CGG TTC GGA TTT		251
V D V V V A S S P T V A S Q F L R D N D L			94
GTT GAC GTG GTG GTC GCC TCA TCT CCG ACA GTA	GAT TCA CAG TTT TTA AGG GAT AAT GAC TTG		314
N F A S R P P N S G A K H M A Y N Y Q D L			115
AAT TTT GCT AGC AGG CCG CCA AAT TCG GGA GCG AAG	CAT ATG GCG TAT AAT TAT CAG GAT CTT		377
V F A P Y G P R W T M L R K I C K D H L F			136
GTT TTT GCA CCC TAT GGT CCA CGG TGG ACT ATG	CTT CGA AAG ATT TGC AAG GAT CAC TTG TTT		440
S S K A L D N F R H V R E E E V A I L T R			157
TCT AGC AAA GCA CTC GAT AAT TTC CGT CAC GTT	CGG GAG GAA GAG GTA GCG ATA CTC ACA CGC		503
I L A S A G E S T V K L S Q L L N V C T A			178
ATA TTG GCC AGT GCG GGT GAA TCA ACA GTT AAA	TTA AGT CAA CTA CTT AAT GTG TGC ACC GCA		566
N T L A R M M L D M R L F G D G N G S G D			199
AAC ACT TTA GCA CGG ATG ATG TTA GAC ATG AGA	TTA TTT GGT GAT GGA AAT GGA AGT GGT GAT		629
P K A A D E F K D M V V E L M T L A G K F N			220
CCA AAA AAG GCG GAT GAG TTC AAG GAT ATG GTT	GAG CTG ATG ACG TTG GCC GGG AAA TTC AAC		692
I G D F I P M L D W M D L Q G V T T K M K			241
ATT GGT GAC TTC ATT CCG ATG CTT GAT TGG ATG	GAC TTG CAA GGC GTG ACA ACC AAG ATG AAA		755
	<A ACC TAC CTG AAC GTT CCG CAC TGT	OF3'Hgsp4	
K V H D R F D S F L D N I L D E H K I R K			262
AAA GTA CAT GAT CGA TTC GAT TCA TTC CTT GAC	AAC ATT CTT GAT GAA CAT AAA ATC CGC AAG		818
G A H D D M L S T L I S L K E D V N G E G			283
GGT GCT CAT GAT GAC ATG TTG AGC ACA TTG ATT	TCA CTA AAG GAA GAT GTT AAT GGA GAG GGA		881
G K L S D I E I K A L L L N L F S A G T D			304
GGG AAG CTT TCG GAC ATC GAA ATC AAA GCT	CTG CTT CTG AAC TTA TTT TCT GCG GGA ACG GAC		944
T S S S S I E W T M A E L I R N P Q L L K			325
ACG TCA TCT AGT AGT ATA GAA TGG ACA ATG	GCC GAA CTC ATT CGC AAT CCA CAA CTA TTG AAA		1007
	<T ACC TGT TAC CCG CTT GAG TAA GCG	OF3'Hgsp3	
Q A Q E E M D I V V G R D R L V T E S D L			346
CAA GCC CAA GAA GAA ATG GAC ATT GTA GTG	GGT CGA GAC CGC CTA GTA ACA GAA TCG GAC CTA		1070
T Q L T F L H A I V K E S F R R L H P S T P			367
ACG CAA CTA ACA TTC CTC CAC GCC ATT GTG	AAG GAG TCA TTT AGG CTC CAC CCA TCA ACA CCA		1133
	OHyd3' T AGG CTC CAC CCA TCA ACA CCA		
L S L P R I A S E S C E G V N G Y H I P K G			388
CTT TCA CTT CCA AGG ATT GCA TCG GAG AGT	TGT GAG GTC AAT GGG TAC CAC ATT CCT AAG GGA		1196
	CT> <ACA CTC CAG TTA CCC ATG GTG TAA GG	OHyd5'nest	
S T L L V N I W A I G R H P E V W A D P L			409
TCC ACA CTC CTT GTC AAC ATA TGG GCC ATT	GGC CGA CAC CCA GAG GTG TGG GCT GAC CCA CTT		1259
	OHyd3'nest		
E F R P A R F L P C G G E K P G V N V K V N			430
GAG TTC CGG CCT GCT CGG TTC TTA CCC GGG	GGC GAA AAG CCC GGT GTC AAC GTG AAG GTA AAT		1322
	AG TTC CGG CCT GCT CGG TTC TTA>	<TT TTC GGG CCA CAG TTG CAC TTC CA	OHyd5'
D F E V L P F G A G R R I C A G M S L A L			451
GAT TTT GAA GTT TTA CCA TTT GGT GCC GGG	CGG AGG ATT TGT GCG GGT ATG AGT CTA GCA TTG		1385
K M V H L L I A T L I Q A F D W E L A N G			472
AAA ATG GTC CAT TTG CTC ATT GCA ACA TTG	ATT CAA GCC TTT GAT TGG GAA CTG GCT AAT GGG		1448
L D P E R L N M E E E F G I S V Q K A E P			493
TTA GAC CCC GAG AGA CTC AAC ATG GAA GAA	GAG TTT GGG ATA AGC GTT CAA AAG GCT GAG CCC		1511
L M V H P R P R L A P H T Y I *			508
TTG ATG GTG CAC CCA AGG CCG AGG TTA GCC	CCC CAC ACA TAT ATA TAA AAG TGG TTG AAG TTA		1574
ATT TTT CTT TTA AGC ATA AAA TTT CCA TTT	TAT TTA TTT TGT TTT AAG TAT TCA TTT CAT CAC		1637
	<AAA GTA GTG		
TTA AGA CCA AAT TCC CTG TAT TAT TTA TTA	TTC TGT GAC TTA TGA GAT GAT TTA ATT GTG TTT		1700
	AAT TCT GGT TTA AGG GAC A	OF3'H-1R	
TTT ATA AAA GTC TAT AGA TAA ATG CTT	ATG TGT AAA AAA AAA AAA AAA AA		1750

unterstrichen: das anhand partiell degenerierter Primer isolierte Ausgangsfragment

**fett** = Primer; > = forward Primer; < = reverse Primer

**ATG** = Startcodon; **TAA** = Stoppcodon

**Flavonolsynthase**

M	E	F	E	K	V	Q	K	I	A	S	L	S	N	L	K	G	T	I	P	20	
AAA	<b>ATG</b>	GAG	TTT	GAG	AAA	GTT	CAA	AAA	ATA	GCT	TCA	CTG	TCA	AAC	CTA	AAA	GGC	ACA	ATA	CCA	63
<b>AA</b>	<b>ATG</b>	<b>GAG</b>	<b>TTT</b>	<b>GAG</b>	<b>AAA</b>	<b>GTT</b>	<b>CAA</b>	<b>AAA</b>	<b>ATA</b>	> OFLS-H											
S	E	F	I	R	S	E	N	E	Q	P	A	I	T	T	I	H	G	V	T	L	41
AGT	GAG	TTT	ATA	AGA	TCC	GAA	AAC	GAA	CAA	CCA	GCA	ATC	ACT	ACC	ATC	CAT	GGT	GTG	ACG	CTT	126
E	V	P	V	I	D	L	S	H	H	D	D	Q	S	L	V	D	S	I	S	K	62
GAG	GTT	CCA	GTA	ATC	GAT	CTT	AGC	CAC	CAT	GAT	GAC	CAG	TCC	TTG	GTG	GAT	TCG	ATA	TCT	AAA	189
A	S	K	D	W	G	I	F	Q	V	V	N	H	G	I	P	N	E	L	I	S	83
GCC	AGC	AAG	GAT	TGG	GGG	ATA	TTT	CAG	GTG	GTG	AAC	CAT	GGG	ATT	CCG	AAT	GAA	CTT	ATA	AGC	252
K	L	Q	K	V	G	K	E	F	F	E	L	P	Q	E	E	K	E	V	I	A	104
AAG	TTA	CAA	AAA	GTT	GGA	AAA	GAG	TTC	TTT	GAA	TTA	CCA	CAA	GAA	GAA	AAA	GAA	GTG	ATT	GCT	315
K	P	I	G	Y	Q	G	V	E	G	Y	G	T	K	L	Q	K	E	V	E	G	125
AAA	CCA	ATT	GGG	TAT	CAA	GGT	GTA	GAA	GGG	TAT	GGA	ACA	AAG	CTT	CAA	AAG	GAA	GTT	GAA	GCC	378
K	K	G	W	V	D	H	L	F	H	R	V	W	P	P	S	V	I	N	Y	H	146
AAG	AAA	GGA	TGG	GTG	GAT	CAT	TTG	TTT	CAT	AGG	GTT	TGG	CCA	CCT	TCT	GTT	ATT	AAC	TAT	CAC	441
F	W	P	K	N	P	P	S	Y	R	D	I	N	E	Q	Y	T	E	S	L	I	167
TTT	TGG	CCA	AAG	AAC	CCT	CCT	TCT	TAC	AGG	GAT	ATA	AAC	GAA	CAA	TAC	ACG	GAA	AGC	TTA	ATA	504
G	V	A	N	K	L	L	G	F	L	S	N	G	L	G	L	E	E	N	E	L	188
GGG	GTA	GCA	AAC	AAA	TTG	TTG	GGG	TTT	TTA	TCC	AAT	GGG	CTT	GGA	CTA	GAA	GAG	AAT	GAA	TTG	567
K	Q	G	L	G	G	E	E	L	I	Y	M	L	K	I	N	Y	Y	P	P	C	209
AAA	CAA	GGG	TTG	GGT	GGT	GAA	GAG	TTG	ATC	TAC	ATG	TTG	AAA	ATC	AAC	TAC	TAC	CCA	CCA	TGT	630
P	C	P	D	L	A	L	G	V	V	P	H	T	D	M	S	S	I	T	I	L	230
CCA	TGC	CCT	GAT	CTT	GCT	CTT	<u>GGG</u>	<u>GTG</u>	<u>GTA</u>	<u>CCT</u>	<u>CAT</u>	<u>ACA</u>	<u>GAT</u>	<u>ATG</u>	<u>TCT</u>	<u>TCC</u>	<u>ATT</u>	<u>ACT</u>	<u>ATA</u>	<u>CTT</u>	693
										<A CTA GAA CGA GAA CCC CAC CAT GGA OFLSgsp4											
V	P	N	E	V	Q	G	L	Q	V	F	R	D	D	H	W	Y	D	V	A	Y	251
GTC	CCA	AAT	GAA	GTT	CAA	GGT	CTA	CAA	GTC	TTC	AGA	GAT	GAT	CAT	TGG	TAT	GAT	GTT	GCT	TAC	756
I	P	N	A	L	I	I	H	I	G	D	Q	I	E	I	M	S	N	G	K	Y	272
ATC	CCT	AAT	GCT	CTC	ATC	ATC	CAC	ATT	GGT	GAC	CAA	ATT	GAG	ATA	ATG	AGT	AAC	GGG	AAA	TAT	819
										<A CGA GAG TAG TAG GTG TAA CCA CTG G OFLSgsp3											
K	S	V	Y	H	R	T	T	V	N	K	E	K	T	R	M	S	W	P	M	F	293
AAG	AGC	GTG	TAT	CAC	AGA	ACA	ACG	GTG	AAC	AAG	GAG	AAA	ACA	AGA	ATG	TCT	TGG	CCA	ATG	TTT	882
L	E	P	P	G	E	F	E	V	G	P	I	P	K	L	I	N	E	E	N	P	314
TTA	GAG	CCA	CCA	GGT	GAG	TTT	GAG	GTT	GGA	CCA	ATT	CCA	AAG	CTC	ATC	AAT	GAA	GAG	AAT	CCA	945
										<AT CTC GGT GGT CCA CTC AAA CTC CAA ODIOX-5'nest											
P	K	Y	K	T	K	K	Y	K	D	Y	V	Y	C	K	L	N	K	L	P	Q	335
CCA	AAA	TAC	AAG	ACT	AAG	AAG	TAC	AAA	GAC	TAT	GTC	TAT	TGC	AAG	CTA	AAC	AAA	CTT	CCA	CAA	1008
										<CG TTC GAT TTG TTT GAA GGT GTT											
*																					
TGA	AGA	ACT	AAT	TTC	ATG	CCA	ATT	TAT	AAT	AAG	TAA	ATA	AAA	CAT	TCA	TAC	ATA	CAT	ATT	TGC	1071
ACT TC OFLS-R																					
ATG	TAC	GTG	TAT	GTG	CGC	GTG	TGA	GTA	CAT	GTC	TTT	GTT	GAT	TTA	CTT	GAA	TGT	CGG	TTT	GTA	1134
<C ATG CAC ATA CAC GCG CAC ACT CA ODIOX-5'																					
CGA	GAT	ATT	AAA	CTC	TAA	TCA	ATT	TTA	GTT	CTA	AGT	TAT	GGA	AAA	1191						

unterstrichen: das anhand partiell degenerierter Primer isolierte Ausgangsfragment

**fett** = Primer; > = forward Primer; < = reverse Primer

**ATG** = Startcodon; **TGA** = Stoppcodon

**Dihydroflavonol 4-Reduktase**

M	K	E	D	S	P	T	T	V	C	V	T	G	A	A	G	F	I	G	S	20												
C	ATG	AAA	GAG	GAT	TCT	CCC	ACC	ACC	GTA	TGT	GTC	ACC	GGA	GCC	GCC	GGG	TTC	ATT	GGG	TCG	61											
<b>C</b>	<b>ATG</b>	<b>AAA</b>	<b>GAG</b>	<b>GAT</b>	<b>TCT</b>	<b>CCC</b>	<b>ACC</b>	<b>ACC</b>	<b>G</b>	ODFR1H																						
<b>G</b>	<b>AAC</b>	<b>ATG</b>	<b>AAA</b>	<b>GAG</b>	<b>GAT</b>	<b>TCT</b>	<b>CCC</b>	<b>A</b>	ODFR-Hi2																							
W	L	V	M	R	L	L	E	R	G	Y	I	V	R	A	T	V	R	D	P	G	41											
TGG	CTC	GTT	ATG	AGA	CTT	CTG	GAA	CGA	GGG	TAC	ATA	GTT	CGT	GCT	ACC	GTT	CGT	GAT	CCT	GGT	124											
N	M	K	K	V	K	H	L	L	E	L	P	K	A	E	T	N	L	T	L	W	62											
AAC	ATG	AAA	AAG	GTT	AAG	CAT	TTG	TTA	GAA	CTA	CCG	AAA	GCC	GAA	ACA	AAT	TTG	ACA	TTA	TGG	187											
K	A	D	L	T	Q	E	G	S	F	D	E	A	I	E	G	C	H	G	V	F	83											
AAA	GCG	GAT	TTG	ACA	CAA	GAA	GGA	AGT	TTT	GAT	GAA	GCT	ATT	GAA	GGT	TGT	CAT	GGT	GTC	TTT	250											
H	V	A	T	P	M	D	F	E	S	K	D	P	E	N	E	I	I	K	P	T	104											
CAT	GTT	GCT	ACC	CCT	ATG	GAC	TTT	GAA	TCC	AAA	GAC	CCT	<u>GAG</u>	<u>AAT</u>	<u>GAA</u>	<u>ATT</u>	<u>ATA</u>	<u>AAG</u>	<u>CCA</u>	<u>ACA</u>	313											
																			OPR1	<b>CA</b>	<b>ACA</b>											
																					<b>&lt;GGT</b>	<b>TGT</b>										
I	E	G	V	L	S	I	I	R	S	C	V	K	A	K	T	V	N	K	L	V	125											
ATA	GAA	GGG	GTA	TTA	AGT	ATC	ATA	AGA	TCA	TGT	GTT	AAA	GCC	AAA	ACA	GTC	AAT	AAA	TTA	GTG	376											
<b>ATA</b>	<b>GAA</b>	<b>GGG</b>	<b>GTG</b>	<b>TTA</b>	<b>AGC</b>																											
<b>TAT</b>	<b>CTT</b>	<b>CCC</b>	<b>CAC</b>	<b>AAT</b>	<b>TC</b>	OPR5																										
F	T	S	S	A	G	T	V	N	V	Q	E	H	Q	L	P	V	Y	D	E	S	146											
TTC	ACC	TCG	TCC	GCG	GGA	ACC	GTA	AAC	GTA	CAA	GAA	CAT	CAA	CTT	CCG	GTT	TAT	GAT	GAG	TCG	439											
																			OPR2	<b>GTA</b>	<b>CAA</b>	<b>GAA</b>	<b>CAT</b>	<b>CAA</b>	<b>CTT</b>	<b>CCG</b>					<b>&lt;G</b>	
																					<b>&lt;CCT</b>	<b>TGC</b>	<b>CAT</b>	<b>TTG</b>	<b>CAT</b>	<b>GTT</b>	<b>CTT</b>	<b>GT</b>	OPR4			
Q	W	S	D	L	D	F	I	N	S	K	K	M	T	A	W	M	Y	F	V	S	167											
CAG	TGG	AGT	GAT	TTG	GAC	TTC	ATC	AAC	TCT	AAG	AAA	ATG	ACC	GCT	TGG	ATG	TAT	TTC	GTG	TCA	502											
<b>GTT</b>	<b>ACC</b>	<b>TCG</b>	<b>CTA</b>	<b>AAC</b>	<b>CTG</b>	OPR3																										
K	T	L	A	E	K	A	A	W	K	A	A	E	E	N	N	I	E	F	I	S	188											
AAA	ACA	TTG	GCG	GAA	AAA	GCA	GCA	TGG	AAA	GCA	GCA	GAG	GAA	AAC	AAC	ATA	GAA	TTC	ATT	AGC	565											
I	I	P	T	L	V	V	G	P	F	I	T	P	S	F	P	P	S	L	I	T	209											
ATC	ATA	CCA	ACA	TTA	GTA	GTT	GGT	CCA	TTT	ATC	ACA	CCC	TCG	TTC	CCA	CCA	AGC	CTC	ATT	ACC	628											
A	L	S	L	I	N	G	A	E	S	H	Y	S	I	I	K	Q	G	Q	Y	V	230											
GCA	CTT	TCT	TTG	ATC	AAC	GGA	GCG	GAG	TCA	CAT	TAT	TCG	ATT	ATA	AAG	CAA	GGC	CAA	TAC	GTG	691											
H	L	D	D	L	C	E	S	H	I	F	L	Y	E	N	P	K	A	N	G	R	251											
CAT	CTG	GAT	GAT	CTT	TGT	GAG	TCT	CAT	ATA	TTC	CTC	TAC	GAG	AAC	CCT	AAA	GCC	AAT	GGG	AGA	754											
Y	I	C	S	S	H	D	A	T	I	H	Q	L	A	K	M	M	K	E	K	W	272											
TAC	ATT	TGT	TCT	TCA	CAT	GAT	GCC	ACT	ATT	CAT	CAA	TTG	GCA	AAA	ATG	ATG	AAA	GAG	AAA	TGG	817											
P	E	Y	N	I	P	T	R	F	A	G	I	D	E	G	L	P	I	V	S	F	293											
CCA	GAG	TAT	AAT	ATT	CCA	ACT	CGG	TTT	GCG	GGG	ATC	GAT	GAG	GGA	CTG	CCA	ATA	GTT	TCT	TTT	880											
S	S	K	K	L	T	D	M	G	F	E	F	K	Y	N	L	E	D	M	F	K	314											
TCG	TCA	AAG	AAG	TTA	ACG	GAT	ATG	GGT	TTC	GAG	TTT	AAG	TAT	AAT	TTG	GAG	GAC	ATG	TTT	AAA	943											
G	A	I	D	S	C	R	E	K	G	L	L	P	Y	S	T	N	E	V	K	N	335											
GGA	GCT	ATT	GAT	AGT	TGT	AGA	GAG	AAA	GGA	TTG	CTT	CCA	TAT	TCC	ACA	AAT	GAG	GTC	AAG	AAT	1006											
E	F	I	T	P	I	S	G	N	H	V	H	V	S	S	E	A	I	N	K	I	356											
GAA	TTC	ATC	ACA	CCA	ATT	AGT	GGT	AAT	CAT	GTT	CAT	GTA	TCT	AGT	GAA	GCC	ATA	AAT	AAA	ATC	1069											
Y	V	K	L	E	N	S	I	I	*																							
TAT	GTA	AAA	TTG	GAG	AAC	TCT	ATC	ATA	<b>TGA</b>	TAT	ATA	TGA	TTT	TAT	GTG	AGA	TTC	ATA	CAC	CTC	1132											
																					<b>&lt;TA</b>	<b>CTC</b>	<b>TCT</b>	<b>AAG</b>	<b>TAT</b>	<b>GTG</b>	<b>GAG</b>					
																					<b>&lt;G</b>	<b>GAG</b>										
TAA	GGG	TAT	GGT	TGT	TTA	ATA	ATC	CCA	CTA	CTA	TGA	TTG	TAT	CAA	TCA	AGG	TGA	TGC	TTA	ATA	1195											
<b>ATT</b>	<b>CC</b>	ODFR-Rü2																														
<b>ATT</b>	<b>CCC</b>	<b>ATA</b>	<b>CCA</b>	<b>ACA</b>	<b>AAT</b>	<b>TAT</b>	<b>TAG</b>	<b>GGT</b>	<b>G</b>	ODFR1R																						
AAA	GGG	TAT	GGT	TAG	TTG	AAA	AAC	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	1234											

unterstrichen: das anhand partiell degenerierter Primer isolierte Ausgangsfragment  
**fett** = Primer; **>** = forward Primer; **<** = reverse Primer  
**ATG** = Startcodon; **TGA** = Stoppcodon

### G.3 Nukleotidsequenz und offener Leserahmen der cDNA-Fragmente

#### putative Flavanon 3-Hydroxylase

T	L	L	L	Q	D	Q	V	G	G	L	Q	A	T	R	D	G	G	K	N	20	
TC	ACG	TTG	TTG	CTT	CAG	GAC	CAA	GTT	GGT	GGG	CTT	CAA	GCG	ACT	CGT	GAT	GGT	GGC	AAG	AAT	62
W	I	T	V	E	P	V	E	G	A	F	V	V	N	L	G	D	H	G	H	Y	41
TGG	ATC	ACG	GTT	GAG	CCC	GTT	GAA	GGT	GCT	TTT	GTG	GTT	AAT	CTT	GGT	GAT	CAT	GGG	CAT	TAT	125
L	S	N	G	R	F	K	N	A	D	H	Q	A	V	V	N	S	N	T	S	R	62
TTG	AGC	AAC	GGG	AGG	TTC	AAG	AAC	GCG	GAC	CAC	CAA	GCC	GTG	GTC	AAC	TCT	AAT	ACT	AGT	CGG	188
L	S	I	A	T	F	Q	N	P	A	P	E	A	I	V	Y	P	L	K	V	N	83
CTA	TCC	ATA	GCA	ACA	TTT	CAG	AAC	CCT	GCA	CCT	GAA	GCA	ATT	GTG	TAC	CCA	TTA	AAG	GTC	AAT	251
E	G	E	N	S	I	M	E	K	P	I	T	F	L	E	M	Y	K	K	K	M	104
GAA	GGA	GAG	AAT	TCG	ATA	ATG	GAA	AAG	CCT	ATA	ACT	TTC	TTG	GAA	ATG	TAC	AAG	AAG	AAG	ATG	314
S	T	D	L	E	L	A	Q	L	K	K	L	A	K	D	K	Q	Q	G	L	E	125
AGT	ACG	GAC	CTT	GAG	TTG	GCT	CAG	CTT	AAG	AAG	CTA	GCC	AAG	GAC	AAG	CAA	CAA	GGG	TTG	GAG	377
K	V	K	P	N	D	D	I	F	A	*											135
AAA	GTT	AAG	CCA	AAT	GAC	GAT	ATA	TTC	GCT	<b>TAA</b>	CAT	GGC	ATT	TTT	GCC	ATT	TGC	GGT	GCA	TTA	440
GCC	TTG	TTT	TCA	CGT	CAG	ATA	TCG	TTC	TAT	GAA	AGT	TGG	CAC	TTA	GAG	GGT	GAA	AAT	ATC	ATT	503
AGA	TAT	GTA	ATA	AAG	AGT	TTG	GGT	CAT	GTC	AAT	AAT	GTT	TAA	ACA	CGT	GTT	GTC	ACT	TAC	CTA	566
ATT	ATG	TTA	TTG	TCA	TCC	TTT	TAT	TTT	TTG	CTC	TTA	TTA	TTG	TCA	CTA	GAG	GTA	TAT	GTA	ATA	629
TGT	ATC	GTG	TCA	ATA	TGA	ATA	TTT	CAT	TAT	TTA	TAT	TTG	GTT	ATG	AGG	CTA	GAC	AAA	AAA	AAA	692
AAA	AAA	A																			

#### putative Anthocyanidinsynthase

G	M	D	E	L	I	L	Q	L	K	I	N	Y	Y	P	K	C	P	Q	P	E	146	
GGG	ATG	GAT	GAG	TTA	ATT	CTT	CAA	CTA	AAA	ATC	AAC	TAC	TAC	CCA	AAA	TGC	CCT	CAA	CCC	GAG	439	
L	A	L	G	V	E	A	H	T	D	V	S	A	L	T	F	I	V	H	N	M	167	
TTA	GCA	CTC	GGT	GTT	GAG	GCT	CAC	ACG	GAC	GTG	AGT	GCA	CTC	ACG	TTC	ATA	GTC	CAC	AAC	ATG	502	
V	P	G	L	Q	L	F	Y	G	G	Q	W	V	T	A	K	C	E	P	D	A	188	
GTC	CCC	GGG	TTG	CAA	CTC	TTT	TAT	GGC	GGT	CAA	TGG	GTC	ACT	GCA	AAA	TGC	GAA	CCG	GAT	GCT	565	
I	V	M	H	I	G	D	T	I	E	I	L	S	N	G	K	Y	K	S	I	L	209	
ATC	GTT	ATG	CAT	ATT	GGT	GAC	ACT	ATT	GAG	ATT	CTT	AGC	AAC	GGA	AAG	TAT	AAA	AGT	ATT	CTT	628	
H	R	G	L	V	N	K	E	K	V	R	I	S	W	A	V	F	C	E	P	P	230	
CAT	AGA	GGG	CTT	GTC	AAT	AAG	GAA	AAA	GTT	AGG	ATT	TCT	TGG	GCG	GTT	TTC	TGT	GAA	CCG	CCC	691	
K	E	K	I	I	L	K	P	L	P	E	T	V	S	E	E	E	P	P	L	F	251	
<u>AAG</u>	<u>GAG</u>	<u>AAG</u>	<u>ATT</u>	<u>ATA</u>	<u>CTG</u>	<u>AAA</u>	<u>CCG</u>	<u>CTC</u>	<u>CCG</u>	<u>GAG</u>	<u>ACG</u>	<u>GTT</u>	<u>TCT</u>	<u>GAG</u>	<u>GAG</u>	<u>GAG</u>	<u>CCA</u>	<u>CCA</u>	<u>CTC</u>	<u>TTT</u>	754	
P	P	R	T	F	Q	Q	H	M	E	H	K	V	L	K	K	N	N	D	V	V	272	
<u>CCG</u>	<u>CCA</u>	<u>CGA</u>	<u>ACG</u>	<u>TTC</u>	<u>CAA</u>	<u>CAA</u>	<u>CAT</u>	<u>ATG</u>	<u>GAA</u>	<u>CAT</u>	<u>AAG</u>	<u>GTT</u>	<u>TTG</u>	<u>AAG</u>	<u>AAG</u>	<u>AAT</u>	<u>AAT</u>	<u>GAT</u>	<u>GTG</u>	<u>GTC</u>	817	
D	P	K	*																		275	
<u>GAT</u>	<u>CCG</u>	<u>AAA</u>	<u>TGA</u>	<u>AAT</u>	<u>CGT</u>	<u>GTA</u>	<u>TAA</u>	<u>CTT</u>	<u>TGT</u>	<u>TTA</u>	<u>TGT</u>	<u>GTT</u>	<u>TGT</u>	<u>TTA</u>	<u>TGG</u>	<u>GTT</u>	<u>ACT</u>	<u>AGC</u>	<u>TAG</u>	<u>TTT</u>	880	
<u>GAG</u>	<u>GGG</u>	<u>ATG</u>	<u>TTT</u>	<u>ACC</u>	<u>TTT</u>	<u>TTT</u>	<u>CTG</u>	<u>TTT</u>	<u>GGA</u>	<u>TAA</u>	<u>AGT</u>	<u>TTC</u>	<u>TGT</u>	<u>TTG</u>	<u>GAT</u>	<u>AAA</u>	<u>TGT</u>	<u>AGA</u>	<u>CTG</u>	<u>TTT</u>	943	
																		<u>&lt;CA</u>	<u>TCT</u>	<u>GAC</u>	<u>AAA</u>	
<u>TGA</u>	<u>GGA</u>	<u>GAT</u>	<u>CCT</u>	<u>GTA</u>	<u>TAA</u>	<u>GTA</u>	<u>AAA</u>	<u>TTG</u>	<u>TGT</u>	<u>TTC</u>	<u>TTT</u>	<u>TTG</u>	<u>TGT</u>	<u>TGA</u>	<u>AAA</u>	<u>AAA</u>	<u>AAA</u>	<u>AAA</u>	<u>AAA</u>	<u>AAA</u>	1006	
<u>ACT</u>	<u>CCT</u>	<u>CTA</u>	<u>GGA</u>	C	OANS3'Ende																	
AAA	AAA	AA																			1014	

unterstrichen: das anhand partiell degenerierter Primer isolierte Ausgangsfragment  
**fett** = Primer; > = forward Primer; < = reverse Primer **TAA** = Stoppcodon

**putative UDP-Glukose : Anthocyanin 5-O-Glukosyltransferase**

```

F V T H C G W N S T L E S I V C G V P V V 21
TTC GTG ACG CAT TGT GGA TGG AAC TCG ACT TTA GAG AGT ATA GTT TGT GGG GTT CCT GTC GTA 63
A F P N W A D Q T T N A K L E D I W G T 42
GCA TTT CCT AAC TGG GCA GAT CAA ACA ACA AAT GCG AAG CTC TTA GAA GAC ATA TGG GGA ACA 126
G V R V T A N E D G V V E D E E I R R C I 63
GGA GTG AGG GTG ACT GCT AAT GAA GAC GGA GTT GTC GAA GAC GAG GAG ATA AGA AGA TGC ATA 189
E M V M G G H E N G A T M R K N A K K W K 84
GAA ATG GTG ATG GGA GGG CAT GAA AAT GGG GCA ACA ATG AGA AAG AAT GCT AAA AAG TGG AAG 252
D L S R E A I K E G G S Y T N L K A F V 105
GAT TTG TCA AGA GAG GCT AAA GAA GGT GGA TCT TCC TAT ACA AAT CTC AAG GCT TTT GTT 315
E E V D G S S T R D K V V I * 119
GAA GAA GTC GAT GGA AGT TCG ACT AGA GAC AAA GTG GTG ATT TAA AGT TTA AAA ATC GAA ACC 378
AAC TCT GAA TTT GGT GGT ATC AAT TAT AAG ATT AAG ATA AAA GCT CAT ATT GGT CGA AAA AAA 441
AAA AAA AAA A 451

```

**putative Geraniol 10-Hydroxylase**

(höchste Übereinstimmung zur putativen Geraniol 10-Hydroxylase aus *Catharanthus roseus*, Acc.: CAC80883)

```

S S D P L V T A A S V L E F A L I K A L 20
CG AGC TCG GAT CCA CTA GTA ACG GCC GCC AGT GTG CTG GAA TTC GCC CTT ATC AAA GCG TTG 62
L L E L F A A G T D T S S S N M D W V I S 41
TTA TTG GAG TTG TTC GCG GCG GGA ACT GAT ACA TCA TCC TCA AAT ATG GAT TGG GTA ATT AGT 125
E L V T H P R V M Q K L Q Q E V T K V G N 62
GAG CTA GTA ACA CAT CCA AGA GTG ATG CAA AAA CTA CAA GAA GTA ACA AAA GTA GGA AAC 188
G R S M I T E D D L D K M E Y L K A I V K 83
GGA AGA TCG ATG ATT ACA GAG GAT GAC TTG GAC AAA ATG GAG TAC CTA AAG GCC ATC GTC AAA 251
E T L R F H T P L P L L V Q R E S T Q D V 104
GAG ACC CTT CGG TTC CAT ACT CCA CTC CCA CTA CTT GTT CAA CGA GAA TCC ACT CAA GAT GTC 314
K L M G Y D I A A G T R V V I N A W A L A 125
AAA CTA ATG GGG TAT GAC ATT GCA GCA GGC ATC CGA GTG GTT ATC AAT GCA TGG GCG TTA GCA 377
R D P S I W E D P Q E F K P E R F L N S S 146
AGA GAT CCT TCT ATA TGG GAA GAT CCA CAA GAG TTT AAA CCC GAG AGG TTC TTG AAC AGT TCC 440
I D Y K G L H Y E F I P F G A G R R I C A 167
ATT GAC TAT AAA GGG TTG CAT TAC GAG TTT ATC CCC TTC GGC GCC GGC CGC CGC ATT TGT GCC 503
GG 505

```

**putative Glykosyltransferase**

(höchste Übereinstimmung zur UDP-Glykosyltransferase 71E1 aus *Stevia rebaudiana*, Acc.: AAR06914)

```

F V T H C G W N S T L E S V W C G V P I 20
T TTT GTG ACG CAT TGC GGG TGG AAC TCG ACA TTG GAG AGC GTA TGG TGC GGG GTT CCA ATA 61
A A W P L Y S E Q Q L N A F Q L V I E L G 41
GCA GCA TGG CCG TTA TAC TCT GAA CAA CAA CTT AAT GCT TTT CAA CTA GTG ATT GAG TTG GGA 124
I A S E I R M D Y W M N I R T G S S P M I 62
ATA GCG TCG GAG ATA AGG ATG GAT TAC TGG ATG AAT ATT AGA ACA GGT TCC AGC CCG ATG ATC 187
V S A Q V I E S G I R R L M S D C E M R E 83
GTG AGT GCG CAA GTG ATT GAG AGT GGG ATT AGG AGG CTG ATG AGT GAT TGT GAG ATG AGG GAG 250
K V K R M K N I S H I A L L E G G S S Y A 104
AAG GTG AAA AGG ATG AAA AAT ATT AGT CAC ATT GCA TTA TTA GAA GGC GGA TCT TCG TAT GCA 313
S T R S F I H H L M T Q S D * 118
TCC ACT CGA AGT TTC ATT CAC CAT TTA ATG ACT CAA AGT GAT TAA ATA ATG CAA GTG AAA ATA 126
TGG GCA GCT GTG AGG ATG AAT TGA TGA AAA TTA GCT TCG CTC TAT TTG TTT TCT GTA TCT GTA 189
AGT AAG GAA CGA ATA ACT AGT ATT TTT TTT TCT TGT ATA ATG GGT ACC TCG AGA ATA AAA TTG 252
ACC ATG TTA AAA TAA AAA AAA AAA AAA 282

```

**putative Glykosyltransferase**(höchste Übereinstimmung zur UDP-Glykosyltransferase 85A8 aus *Stevia rebaudiana*, Acc.: AAR06913)

V	T	H	C	G	W	N	S	T	T	E	S	I	L	E	G	K	P	L	I	C	21
GTG	ACG	CAT	TGT	GGT	TGG	AAC	TCT	ACT	ACT	GAG	AGC	ATA	CTT	GAA	GGT	AAG	CCG	TTG	ATA	TGT	63
W	P	Y	F	S	D	Q	Y	T	N	T	R	F	A	C	I	E	W	G	M	G	42
TGG	CCC	TAC	TTC	TCG	GAT	CAA	TAC	ACG	AAT	ACT	CGA	TTC	GCT	TGT	ATT	GAA	TGG	GGA	ATG	GGG	126
M	Q	V	N	H	D	L	K	R	D	E	L	E	V	L	V	K	E	M	L	Q	63
ATG	CAG	GTT	AAT	CAT	GAT	TTG	AAG	AGA	GAC	GAA	CTT	GAA	GTT	CTC	GTT	AAG	GAA	ATG	CTT	CAA	189
G	E	K	G	K	E	C	R	K	N	A	Q	E	W	K	R	K	A	I	E	A	84
GGG	GAG	AAA	GGA	AAA	GAA	TGT	AGA	AAA	AAT	GCA	CAA	GAA	TGG	AAG	AGA	AAG	GCA	ATA	GAA	GCA	252
C	E	F	G	G	S	S	Y	N	D	F	E	R	F	M	K	E	A	L	L	S	105
TGT	GAA	TTT	GGT	GGT	TCA	TCG	TAC	AAT	GAC	TTT	GAA	CGG	TTT	ATG	AAA	GAG	GCT	CTT	CTT	TCG	315
G	H	V	*																		108
GGA	CAT	GTT	<b>TAA</b>	AAA	ACA	TTT	TAC	AAG	TTG	GGT	AGG	CTC	TTG	GTT	GTC	ACA	AAT	GTG	CTC	GTG	378
GAA	GAT	GAT	CCA	TCG	ATT	TAT	GGT	ACT	TTC	TAA	TAG	TGT	GTT	TGT	TTA	ATA	AGG	ATT	GTA	GCT	441
TTT	ACA	TGG	TTG	AAT	CTA	TTG	TTG	AAT	AAG	GAT	TGT	AAC	TTT	TAC	ACT	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	504
AA																					506

**putativer ADP-Ribosylierungsfaktor**(hohe Übereinstimmung zum ADP-Ribosylierungsfaktor aus z.B. *Oryza sativa*, Acc.: AAT77289)

C	TCT	CTC	TCT	CTC	TCT	CTT	TCT	TCA	AAT	CGA	TCG	ATT	GAT	TGA	TCC	CTC	TCC	AAC	AAG	CTT	N	K	L	3	
F	S	G	I	L	T	C	K	R	M	G	L	T	F	T	K	L	F	S	R	L	24				
TTC	TCA	GGG	ATC	CTC	ACT	TGC	AAG	AGG	ATG	GGG	CTA	ACT	TTC	ACC	AAA	CTA	TTC	AGC	CGG	CTT				124	
F	A	K	K	E	M	R	I	L	M	V	G	L	D	A	A	G	K	T	T	I	45				
TTT	GCC	AAG	AAA	GAG	ATG	CGT	ATT	TTG	ATG	GTG	GCT	CTC	GAT	GCG	GCT	GGT	AAG	ACA	ACC	ATT				187	
L	Y	K	L	K	L	G	E	I	V	T	T	I	P	T	I	G	F	N	V	E	66				
TTG	TAC	AAG	CTC	AAG	CTC	GGT	GAG	ATT	GTG	ACC	ACA	ATT	CCT	ACC	ATA	GGT	TTT	AAC	GTG	GAG				250	
T	V	E	Y	K	N	I	S	F	T	V	W	D	V	G	G	Q	D	K	I	R	87				
ACT	GTT	GAG	TAC	AAA	AAC	ATT	AGC	TTC	ACA	GTG	TGG	GAT	GTT	GGG	GGT	CAA	GAC	AAG	ATT	CGT				313	
P	L	W	R	H	Y	F	Q	N	T	Q	G	L	I	F	V	V	D	S	N	D	108				
CCA	CTA	TGG	AGG	CAC	TAT	TTC	CAG	AAC	ACA	CAA	GGT	CTT	ATC	TTT	GTG	GTT	GAT	AGC	AAT	GAC				376	
R	D	R	V	V	E	A	R	D	E	L	H	R	M	L	N	E	D	E	L	R	129				
AGG	GAC	AGA	GTT	GTC	GAG	GCA	AGA	GAT	GAA	TTG	CAC	AGG	ATG	TTG	AAT	GAG	GAC	GAG	TTA	AGA				439	
D	A	V	L	L	V	F	A	N	K	Q	D	L	P	N	A	M	N	A	A	E	150				
GAT	GCA	GTT	CTC	CTT	GTA	TTT	GCT	AAC	AAA	CAA	GAT	CTC	CCA	AAT	GCC	ATG	AAT	GCT	GCT	GAA				502	
I	T	D	K	L	G	L	H	S	L	R	Q	R	H	W	Y	I	Q	S	T	C	171				
ATC	ACT	GAC	AAG	CTC	GGT	CTC	CAC	TCC	CTC	CGA	CAG	CGC	CAC	TGG	TAC	ATC	CAG	AGC	ACT	TGT				565	
A	T	S	G	E	G	L	Y	E	G	L	D	W	L	S	N	N	I	A	N	K	192				
GCA	ACC	TCT	GGA	GAG	GGA	CTT	TAT	GAA	GGA	TTG	GAT	TGG	CTT	TCC	AAC	AAC	ATA	GCA	AAC	AAG				628	
A	*																				193				
GCA	<b>TAA</b>	GGC	AGT	GGT	TGA	TGT	TTG	TTT	TTC	GAT	GAG	GGT	GGG	ATT	GTT	GGT	TCT	TTG	AAA	AGT				691	
GTT	TTG	CTT	TTG	ATA	TAG	AAG	TCA	TGG	ACT	CGA	ATA	CAT	TGT	TTG	TTT	GTT	TGG	TTT	TAT	GTT				754	
TGT	TGG	ATT	GCA	AGT	ATG	GGG	TGG	TTA	GGA	GGT	TAC	TAC	TAT	TCT	TTT	ATA	T								806









**OFO**

```

M K E D S P T T V C V T G A A G F I G 19
G AAC ATG AAA GAG GAT TCT CCC ACC ACC GTA TGT GTC ACC GGA GCC GCC GGG TTC ATT GGG 61
G AAC ATG AAA GAG GAT TCT CCC A> ODFR-Hi2
S W L V M R L L E R G Y I V R A T V R D P 40
TCG TGG CTC GTT ATG AGA CTT CTG GAA CGA GGG TAC ATA GTT CGT GCT ACC GTT CGT GAT CCT 124
G N M K K V K H L L E L P K A E T N L T L 61
GGT AAC ATG AAA AAG GTT AAG CAT TTG TTA GAA CTA CCG AAA GCC GAA ACA AAT TTG ACA TTA 187
W K A D L T Q E G S F D E A I E G C H G V 82
TGG AAA GCG GAT TTG ACA CAA GAA GGA AGT TTT GAT GAA GCT ATT GAA GGT TGT CAT GGT GTC 250
F H V A T P M D F E S K D P E N E I I K P 103
TTT CAT GTT GCT ACC CCT ATG GAC TTT GAA TCC AAA GAC CCT GAG AAT GAA ATT ATA AAG CCA 313
T I E G V L S I I R S C V K A K T V N K L 124
ACA ATA GAA GGG GTA TTA AGT ATC ATA AGA TCA TGT GTT AAA GCC AAA ACA GTC AAT AAA TTA 376
V F T S S A G A V A I E E H R K E V Y S E 145
GTG TTC ACC TCG TCC GCG GGA GCT GTC GCC ATT GAA GAG CAT CGA AAG GAG GTC TAC AGC GAA 439
N N W S D V V F C R K V K M T A W M Y F V 166
AAC AAC TGG AGC GAT GTT GTC TTT TGC CGG AAA GTA AAA ATG ACC GCT TGG ATG TAT TTC GTG 502
ODFR-Jo-for AAA ATG ACC GCT TGG ATG TAT TTC GTG>
S K T L A E K A A W K A A E E N N I E F I 187
TCA AAA ACA TTG GCG GAA AAA GCA GCA TGG AAA GCA GCA GAG GAA AAC AAC ATA GAA TTC ATT 565
S I I P T L V V G P F I T P S F P P S L I 208
AGC ATC ATA CCA ACA TTA GTA GTT GGT CCA TTT ATC ACA CCC TCG TTC CCA CCA AGC CTC ATT 628
T A L S L I N G A E S H Y S I I K Q G Q Y 229
ACC GCA CTT TCT TTG ATC AAC GGA GCG GAG TCA CAT TAT TCG ATT ATA AAG CAA GGC CAA TAC 691
V H L D D L C E S H I F L Y E N P K A N G 250
GTG CAT TTG GAT GAT CTT TGT GAG TCT CAT ATA TTC CTC TAC GAG AAC CCT AAA GCC AAC GGG 754
R Y I C S S H D A T I H Q L A K M M K E K 271
AGA TAC ATT TGT TCT TCA CAT GAT GCC ACT ATT CAT CAA TTG GCA AAA ATG ATG AAA GAG AAA 817
W P E Y N I P T R F V G I D E E L P I V S 292
TGG CCC GAG TAT AAT ATT CCA ACT CGG TTT GTG GGG ATC GAT GAG GAA TTG CCA ATA GTT TCT 880
F S S K K L T D M G F E F K Y T L E D M F 313
TTT TCG TCA AAG AAG TTA ACG GAT ATG GGT TTC GAG TTT AAG TAT ACT TTG GAG GAC ATG TTT 943
K G A I D S C R E K G L L P Y S T N E V K 334
AAA GGA GCT ATT GAT AGT TGT AGA GAG AAA GGA TTG CTT CCA TAT TCC ACA AAT GAG GTC AAG 1006
N E F I T P I N G N H V H V S S E A I N K 355
AAT GAA TTC ATC ACA CCA ATT AAT GGT AAT CAT GTT CAT GTA TCT AGT GAA GCC ATA AAT AAA 1069
I Y V K L E N S I I * 365
ATC TAT GTA AAA TTG GAG AAC TCT ATC ATA TGA TAT ATA TGA TTT TAT GTG AGA TTC ATA CAC 1132
CTC ATT CC <TA CTC TCT AAG TAT GTG> 1140
GAG TAA GG ODFR-Rü2

```

**fett** = verwendete Primer; **>** = forward Primer; **<** = reverse Primer; **pho** = Phosphatrest  
**ATG** = Startcodon; **TAA** = Stoppcodon

## G.5 Verwendete Sequenzen

DFR aus	Acc.:	Referenz
<i>Arabidopsis thaliana</i>	BAA85261	ICHIKAWA H, OKANO E und WINKEL-SHIRLEY B (1999, unveröffentlicht)
<i>Antirrhinum majus</i>	P14721	BELD <i>et al.</i> (1989)
<i>Brassica oleracea</i>	AAO73442	PARK S und MIN B (1999, unveröffentlicht)
<i>Callistephus chinensis</i>	P51103	MIN B, SOMMER H und FORKMANN G, (1995, unveröffentlicht)
<i>Camellia sinensis</i>	BAA84940	TAKEUCHI A und MATSUMOTO S, (1999, unveröffentlicht)
<i>Cymbidium-Hybrida</i>	AAC17843	JOHNSON <i>et al.</i> (1999)
<i>Dianthus caryophyllus</i>	P51104	MIN B, SOMMER H und FORKMANN G (1995, unveröffentlicht)
<i>Fragaria x ananassa</i>	-	GOSCH (2003)
<i>Gerbera-Hybrida</i> „Clivia“	-	PFEIFFER (2003)
<i>Gerbera-Hybrida</i> „Regina“	P51105	HELARIUTTA <i>et al.</i> (1993)
<i>Gypsophila elegans</i>	AAP13055	LEE K und MIN B (2003, unveröffentlicht)
<i>Ipomoea nil</i>	BAA22072	INAGAKI <i>et al.</i> (1999)
<i>Lilium-Hybrida</i>	AAQ83576	YAN Y und KOFFAS M (2003, unveröffentlicht)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	P51107	BONGUE-BARTELSMAN <i>et al.</i> (1994)
<i>Malus x domestica</i>	AAD26204	LEE J, HONG S, YOO Y und KIM S (1999, unveröffentlicht)
<i>Petunia-Hybrida</i>	P14720	BELD <i>et al.</i> (1989)
<i>Rhododendron simsii</i>	CAC88859	DE SCHEPPER S, DE KEYSER E, DENDAUF J, VAN BOCKSTAELE E, DEBERGH P und DE LOOSE M (2001, unveröffentlicht)
<i>Rosa-Hybrida</i>	BAA12723	TANAKA <i>et al.</i> (1995)
<i>Sorghum bicolor</i>	T03448	CHEN <i>et al.</i> (1998)
<i>Torenia-Hybrida</i>	BAB20075	AIDA <i>et al.</i> (2000)
<i>Vaccinium macrocarpon</i>	AAL89714	POLASHOCK <i>et al.</i> (2002)
<i>Zea mays</i>	P51108	SCHWARZ-SOMMER <i>et al.</i> (1987)
F3'H aus	Acc.:	Referenz
<i>Allium cepa</i>	AAS48419	KIM S, BINZEL M, YOO K und PIKE L (2004, unveröffentlicht)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SD85	SCHOENBOHM <i>et al.</i> (2000)
<i>Callistephus chinensis</i>	AAG49298	EDER (2001)
<i>Gerbera-Hybrida</i>	-	DEIML (2003)
<i>Glycine max</i>	AAO47846	ZABALA und VODKIN (2003)
<i>Hieracium pilosella</i>	-	KELLNER (2003)
<i>Ipomoea nil</i>	BAD00190	HOSHINO <i>et al.</i> (2003)
<i>Matthiola incana</i>	AAG49301	EDER (2001)
<i>Oryza sativa</i>	NP_920627	BUCELL C, WING R, MCCOMBIE W, MESSING J und YUANQ (2003, unveröffentlicht)

<b>F3'H aus</b>	<b>Acc.:</b>	<b>Referenz</b>
<i>Pelargonium x hortorum</i>	AAG49315	EDER (2001)
<i>Perilla frutescens</i>	BAB59005	SAITO K, KITADA C, TANAKA Y und YAMAZAKI M (2002, unveröffentlicht)
<i>Petunia-Hybrida</i>	Q9SBQ9	BRUGLIERA <i>et al.</i> (1999)
<i>Torenia-Hybrida</i>	BAB87839	UEYAMA <i>et al.</i> (2002)
<b>F3'5'H aus</b>	<b>Acc.:</b>	<b>Referenz</b>
<i>Callistephus chinensis</i>	AAG49299	EDER (2001)
<i>Campanula medium</i>	BAA03440	OKINAKA <i>et al.</i> (2003)
<i>Cathranthus roseus</i>	CAA09850	KALTENBACH <i>et al.</i> (1999)
<i>Eustoma grandiflorum</i>	AAB17562	NIELSEN K and PODIVINSKY E (1996, unveröffentlicht)
<i>Gentiana triflora</i>	BAA12735	TANAKA <i>et al.</i> (1996)
<i>Glycine max</i>	AAM51564	LIAO R, CHU T und WANG C (2002, unveröffentlicht)
<i>Gossypium hirsutum</i>	AAP31058	LUO M, XIAO Y, HOU L, LUO X, LI D, ZHANG Z und PEI Y (2002, unveröffentlicht)
<i>Lycianthes rantonnei</i>	AAG49300	EDER (2001)
<i>Nierembergia sp. NB17</i>	BAC10997	UEYAMA Y, KATSUMOTO Y, FUKUI Y, OHKAWA H, KUSUMI T und TANAKA Y (2002, unveröffentlicht)
<i>Petunia-Hybrida</i>	P48418	HOLTON <i>et al.</i> (1993)
<i>Senecio cruentus</i>	-	YAMAMURA und TERAOKAWA (2003)
<i>Solanum melongena</i>	S43342	TOGURI <i>et al.</i> (1993)
<i>Torenia-Hybrida</i>	BAB20076	SUZUKI <i>et al.</i> (2000b)
<i>Vinca major</i>	BAC97831	MORI <i>et al.</i> (2003)

## **Danksagung**

Herzlich bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei allen, die zu der Entstehung vorliegender Arbeit beigetragen haben, besonders bei

Herrn Prof. Dr. Gert Forkmann für die Überlassung des Themas, sein entgegengebrachtes Vertrauen und seine Begleitung der Arbeit

Herrn Prof. Dr. Gerhard Wenzel für die Übernahme des Prüfungsausschuss-Vorsitzes und Herrn Prof. Dr. Alfons Gierl sowie Herrn PD Dr. Ramon A. Tórrés Ruiz für die Übernahme des Coreferats

Dr. Stefan Martens für seine große Unterstützung und Diskussionsbereitschaft, sowie Dr. Thilo Fischer, Dr. Bernhard Hauser, Gunter Betz (GSF Unterschleißheim) und Prof. Dr. Bernhard Haubold (Fachhochschule Weihenstephan) für viele wertvolle Anregungen und Diskussionen

allen Kolleginnen und Kollegen für die angenehme Zusammenarbeit

dem Gärtnerteam um Gärtnermeister Richard Dinkel für die Betreuung des Pflanzenmaterials

Silvia Eckardt für die Unterstützung bei der Laborarbeit

den beiden Sekretärinnen Erna Lock und Waltraud Deragisch für ihre stete Hilfsbereitschaft

unzähligen Studenten und Diplomanden für die produktive und bereichernde Zusammenarbeit

meinen Freunden; besonders prägend in dieser Zeit waren Catalina Arévalo-Ferro, Irisade Schneider, Niall Palfreyman und meine Freundin Banu Eyüboglu

meinen Eltern Arntraud und Erich Seitz und meiner Schwester Michaela

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Christian Seitz
Geburtsdatum	31.01.1973
Geburtsort	Buchloe
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

### Berufsausbildung und Studium

1979-1983	Grundschule in Buchloe
1983-1992	Gymnasium in Türkheim/Unterallgäu (Joseph-Bernhart-Gymnasium)
1992-1994	Zivildienst im Pflegeheim für schwerstbehinderte Kinder und Jugendliche „Haus Schatzinsel“ in Lamerdingen
1994-2000	Studium der Gartenbauwissenschaften an der TU München in Freising/Weihenstephan
2000	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, Fachgebiet gartenbauliche Pflanzenzüchtung: „Analyse der Flavonoidbiosynthese bei <i>Osteospermum</i> und Ansätze zur züchterischen Bearbeitung“
seit 08/2000	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau