

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Department für Lebensmittel und Ernährung
Fachgebiet Biomolekulare Lebensmitteltechnologie

Charakterisierung von NAD(P)H-abhängigen Enonoxidoreduktasen der Erdbeer- und Tomatenfrucht

Dorothee Klein

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. Dr. h.c. (Zonguldak Univ./Türkei) H. Parlar

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. W. Schwab
2. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Engel
3. Priv.-Doz. Dr. W. Eisenreich

Die Dissertation wurde am 30.01.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 03.05.2007 angenommen.

**Charakterisierung von NAD(P)H-abhängigen
Enonoxidoreduktasen der Erdbeer- und Tomatenfrucht**

Dorothee Klein

Für meine Familie

Dissertation

Fachgebiet Biomolekulare Lebensmitteltechnologie der TU München,
Freising im Januar 2007

Probleme sind gute Gelegenheiten zu zeigen was man kann.

(Duke Ellington, 1899-1974)

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum Februar 2003 bis Januar 2006 am Fachgebiet für Biomolekulare Lebensmitteltechnologie am Wissenschaftszentrum Weihenstephan der TU München in Freising angefertigt.

Auszüge dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung eingereicht.

PUBLIKATIONEN

Thomas Raab, Juan Antonio López-Ráez, Dorothée Klein, Jose Luis Caballero, Enriqueta Moyano, Wilfried Schwab, Juan Muñoz-Blanco; *FaQR, Required for the Biosynthesis of the Strawberry Flavor Compound 4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3(2H)-Furanone, Encodes an Enone Oxidoreductase*; *The Plant Cell* (2006) Vol. 18, 1023-1037.

Dorothée Klein, Barbara Fink, Beate Aroid, Wolfgang Eisenreich, Wilfried Schwab; *Functional Characterization of Enone Oxidoreductases from Strawberry and Tomato Fruit*; *Journal of Biological Chemistry* (zur Veröffentlichung eingereicht).

VORTRÄGE

Dorothée Klein, Thomas Raab, Juan Munoz-Blanco, Wilfried Schwab; *Eine multifunktionelle Chinonreduktase katalysiert die Bildung von 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon in Erdbeerfrüchten*; Tagung der Regionalverbände Süd-West und Bayern der Lebensmittelchemischen Gesellschaft - FG in der GDCh, März 2004.

W. Schwab, T. Raab, D. Klein and J.M. Blanco; *Characterisation of FaQR, the first enzyme involved in the formation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3[2H]-furanone in strawberry fruit*; In: *State-of-the-Art in Flavour Chemistry and Biology*; Hofmann, T, Rothe, M. and Schieberle, P. (Hrg) Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching (2005) 254-261.

POSTERBEITRÄGE

Dorothée Klein, Mirco Gschwander, Thomas Raab, Reinhard Kappl, Juan Munoz-Blanco, Wilfried Schwab; *A NAD(P)H: quinone-oxidoreductase from strawberry utilizes two different reaction mechanisms*; Tagung zum Jubiläum 25 Jahre Lehrstuhl für Lebensmittelchemie an der Universität Würzburg, Oktober 2005.

DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Wilfried Schwab verdanke ich nicht nur das Thema und die Möglichkeit zu promovieren - seine wissenschaftliche Unterstützung und sein Vertrauen in mich und meine Arbeit haben mir den erfolgreichen Abschluss dieser Promotion ermöglicht. Vielen Dank!

Bei meinem Arbeitskreis, dem Fachgebiet Biomolekulare Lebensmitteltechnologie, bedanke ich mich dafür, dass es jeden Morgen Spaß gemacht hat auf die Arbeit zu gehen. Die wissenschaftliche Unterstützung im Labor, der „Gruppenzwang“ beim Mensagang und die anregenden Kaffeepausen haben hierzu ihren Teil beigetragen.

Meinen „Ex-Bürokollegen“ Stefan Lunkenbein und Christian Landmann danke ich besonders für die ausgesprochen gute Arbeitsatmosphäre. Großer Dank gilt auch Barbara Fink deren Kollegialität und ausgezeichnete Arbeit als technische Assistentin mir sehr weiter geholfen hat. Ebenso möchte ich mich bei Daniela Göttler für ihre Mitarbeit als technische Assistentin bedanken.

Mirco Gschwander danke ich für die engagierte Mitarbeit während seiner Diplomarbeit, die zur Aufklärung des Ein-Elektronen-Reaktionsmechanismus von FaEO beigetragen hat. YuFan Yang danke ich für die Mitarbeit bei der Synthese neuer Verbindungen im Rahmen ihres Praktikums.

Bei Prof. Juan Muñoz-Blanco bedanke ich mich für die Bereitstellung des Gens der NAD(P)H-abhängigen Chinonoxidoreduktase und die Möglichkeit in seinem Arbeitskreis an der Universidad de Córdoba arbeiten zu können. Seinem und dem Arbeitskreis um Prof. Jose Luis Caballero insbesondere Enriqueta Moyano danke ich für die nette Betreuung, die wissenschaftliche Unterstützung und die Einführung in die spanische Kultur während meiner Zeit am dortigen Institut.

Herrn PD Dr. Wolfgang Eisenreich (Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie, TU München) gilt mein Dank für die unerschöpfliche Hilfe bei den NMR-Messungen und die viele Zeit, die er in die gemeinsamen Auswertungen investiert hat. Außerdem danke ich seiner Mitarbeiterin Christine Schwarz für die Durchführung der Messungen.

Herrn Prof. Dr. Schieberle (Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, TU München) danke ich für die Möglichkeit der Zusammenarbeit mit seinem Lehrstuhl und der deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie und der Teilnahme an den dortigen wissenschaftlichen Seminaren.

Dr. Martin Steinhaus und Nadja Alt (Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching) danke ich für die Durchführung von NMR-Messungen und Dr. Michael Czerny (Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching) für die Möglichkeit der GC-Olfaktometrischen Messungen meiner Proben.

Herrn Dr. Reinhard Kappl und Kalina Rangelova (Theoretische Medizin, Biophysik und Physikalische Grundlagen der Medizin, Universität des Saarlandes) danke ich für die Möglichkeit der dortigen ESR-Messungen und die nette Betreuung und Hilfe während dieser Zeit.

Dr. Maher Korakli und Prof. Dr. Rudi F. Vogel (Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, TU München) danke ich für die Möglichkeit photometrische Studien am dortigen Lehrstuhl durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Engel (Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie, TU München) danke ich für die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl studentische Praktika betreuen zu können.

Ulrich Schmitt und Frau Prof. Dr. U. Holzgrabe (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg) danke ich für die Messungen an der chiralen Kapillarzonenelektrophorese.

Der Firma Degussa danke ich für die Bereitstellung finanzieller Mittel und die Möglichkeit der Mitnutzung der Räumlichkeiten und Geräte. Den Mitarbeitern danke ich für die nette Zusammenarbeit.

Bei meinen Korrekturlesern bedanke ich mich für die fachlichen und grammatikalischen Verbesserungsvorschläge.

Meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Schwester mit Familie danke ich für jedwede Unterstützung während meiner Promotion, insbesondere für die oftmals notwendige Ablenkung in so vielfältiger Weise. Ebenso gilt der Familie Elbert mein Dank für all die kleinen Annehmlichkeiten, die mir die Zeit während der Dissertation verschönt haben.

Der größte Dank gilt Frank für das Teilen der guten und der schlechten „Promotionszeiten“. Die Geduld und sein immerwährendes Interesse an meiner Arbeit haben mir den Rückhalt gegeben, den ich für die erfolgreiche Fertigstellung meiner Dissertation benötigt habe.

INHALTSVERZEICHNIS

A	ZUSAMMENFASSUNG UND SUMMARY.....	I
	ZUSAMMENFASSUNG	I
	SUMMARY.....	V
B	KENNTNISSTAND	1
1	DIE ERDBEERE	1
1.1	BOTANISCHE SICHT	1
1.2	FRUCHTREIFUNG	2
1.3	AROMASTOFFE	4
2	4-HYDROXY-3(2H)-FURANONE.....	6
2.1	4-HYDROXY-2,5-DIMETHYL-3(2H)-FURANON (HDMF) UND DERIVATE.....	6
2.2	2 (ODER 5)-ETHYL-4-HYDROXY-5 (ODER 2)-METHYL-3(2H)-FURANON (EHMF)	8
2.3	EIGENSCHAFTEN	8
2.3.1	Keto-Enol-Tautomerie und Chiralität	8
2.3.2	Sensorik.....	9
2.3.3	Wichtige physikalische Eigenschaften und Stabilität.....	10
2.3.4	Physiologische Eigenschaften.....	11
2.4	BILDUNG VON 4-HYDROXY-3(2H)-FURANONEN IN DER MAILLARD-REAKTION	12
2.5	BIOSYNTHESE VON HDMF UND SEINEN DERIVATEN IN DER ERDBEERFRUCHT	14
2.6	BIOSYNTHESE VON EHMF DURCH HEFEN.....	16
3	NAD(P)H-ABHÄNGIGE CHINONOXIDOREDUKTASEN	17
4	AUFGABENSTELLUNG	22

C	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	23
1	HETEROLOGE EXPRESSION UND CHARAKTERISIERUNG EINER <i>FRAGARIA ANANASSA</i> ENONOXIDOREDUKTASE (FAEO) UND EINER <i>LYCOPERSICUM ESCULENTUM</i> ENONOXIDOREDUKTASE (LEEO) ALS CHINONOXIDOREDUKTASEN.....	23
1.1	EXPRESSION UND AUFREINIGUNG VON FAEO	23
1.2	CHARAKTERISIERUNG VON FAEO	24
1.2.1	Substratscreening	24
1.2.2	pH-Optimum	27
1.2.3	Variation der Inkubationstemperatur.....	27
1.2.4	Cofaktoren.....	27
1.2.5	Metallionen.....	28
1.2.6	Inhibitoren	28
1.3	KLONIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON LEEO	30
1.3.1	Substratscreening	32
1.3.2	pH-Studie.....	32
1.3.3	Temperaturstudie	32
1.3.4	Cofaktoren.....	33
1.3.5	Kinetische Daten	33
1.3.6	Metallionen.....	33
1.4	SEQUENZVERGLEICHE	34
1.5	ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION.....	38
2	BETEILIGUNG VON FAEO AN DER BIOSYNTHESE VON HDMF	43
2.1	NACHWEIS UND CHARAKTERISIERUNG DER HDMF-BILDENDEN EIGENSCHAFT	43
2.1.1	Variation der Substratmenge	43
2.1.2	pH-Studie.....	43
2.1.3	Cosubstrate.....	44
2.1.4	Cofaktoren.....	44
2.1.5	Hitze-/Kälte-Inaktivierung	45
2.1.6	Nachweis der Bildung von enantiomerenangereichertem HDMF	46
2.2	SUCHE NACH ZWISCHENVERBINDUNGEN DER HDMF-BIOSYNTHESE IN DER ERDBEERFRUCHT	47
2.2.1	1-Desoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphat (D1).....	47
2.2.2	4-Hydroxy-5-methyl-2-methylen-3(2H)-furanon (HMMF).....	48
2.2.2.1	<i>Synthese von HMMF.....</i>	49

2.2.2.2	<i>Stabilisierung von HMMF mit 3-Mercaptobenzoessäure (MBS)</i>	52
2.2.2.3	<i>Umsetzung von HMMF mit MBS über eine konjugierte Addition</i>	54
2.2.2.4	<i>NMR-Analytik des Thioethers</i>	56
2.2.3	Nachweis der enzymatischen Umsetzung von HMMF zu HDMF	59
2.2.4	Nachweis von HMMF <i>in vivo</i>	63
2.2.4.1	<i>Nachweis in der Erdbeerfrucht</i>	63
2.2.4.2	<i>Inkorporationsstudien von 6-¹³C-D-Glucose in HMMF</i>	64
2.2.4.3	<i>Nachweis von HMMF in anderen HDMF-bildenden Früchten</i>	66
2.3	DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG.....	68
3	WEITERE UNGESÄTTIGTE 4-HYDROXY-3(2H)-FURANONE ALS SUBSTRATE VON FAEO	75
3.1	SYNTHESEBEDINGUNGEN.....	75
3.2	NMR-STUDIEN.....	77
3.3	NACHWEIS DER ENZYMATISCHEN UMSETZUNG.....	79
3.3.1	Charakterisierung der enzymatischen Umsetzungen mittels HPLC-MS/MS ...79	
3.3.2	Charakterisierung der enzymatischen Umsetzungen mittels HPLC-DAD	84
3.3.3	Charakterisierung der enzymatischen Umsetzungen mittels GC-MS	85
3.4	DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG.....	87
4	CHARAKTERISIERUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN ENZYMATISCHEN EIGENSCHAFTEN VON FAEO	91
4.1	KINETISCHE DATEN.....	91
4.2	REAKTIONSMECHANISMUS.....	92
4.2.1	Nachweis einer Ein-Elektronen-Übertragung	92
4.2.1.1	<i>Elektronen-Spin-Resonanz (ESR)-Messungen</i>	92
4.2.1.2	<i>Reduktion von Cytochrom c</i>	94
4.2.2	Nachweis einer Zwei-Elektronen-Übertragung	96
4.2.2.1	<i>Bildung von stabilen Produkten</i>	96
4.2.2.2	<i>Stöchiometrischer Verbrauch von NAD(P)H</i>	97
4.3	DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG.....	99

D	MATERIAL UND METHODEN	105
1	MATERIAL	105
1.1	CHEMIKALIEN	105
1.2	ENZYME	105
1.3	ZELLEN	105
1.4	PFLANZENMATERIAL	105
1.5	SONSTIGES MATERIAL	105
2	VERWENDETE PUFFER, MEDIEN UND SONSTIGE LÖSUNGEN	106
2.1	LB-MEDIUM, -AGAR	106
2.2	SOC-MEDIUM.....	106
2.3	VERWENDETE PRIMER.....	106
2.4	STAMMLÖSUNGEN	106
2.5	LÖSUNGEN ZUM BLOTTEN	107
2.6	LÖSUNGEN ZUR GELEXTRAKTION.....	108
2.7	FÄRBE- UND ENTFÄRBE LÖSUNGEN FÜR DIE SDS-PAGE	108
2.8	LADEPUFFER ZUR GELELEKTROPHORESE.....	108
2.9	LÖSUNGEN FÜR DIE MINIPREP	108
2.10	BRADFORD-REAGENZ.....	109
2.11	PUFFER.....	109
2.12	VEKTOREN	110
3	METHODEN	111
3.1	KLONIERUNG UND HETEROLOGE EXPRESSION	111
3.1.1	Isolation von RNA aus Tomaten	111
3.1.2	Herstellung von cDNA.....	111
3.1.3	Amplifizierung des gewünschten Gens aus der cDNA.....	112
3.1.4	Gelelektrophorese zur Kontrolle der PCR.....	112
3.1.5	Gelextraktion.....	113
3.1.6	Ligation in pGemT-Easy	113
3.1.7	Transformation	114
3.1.8	Blau-Weiß-Selektion und Colony PCR	114
3.1.9	Miniprep.....	114
3.1.10	Restriktionsanalyse.....	115

3.1.11	Sequenzieren	115
3.1.12	SDS-PAGE	115
3.1.13	Western-Blot	116
3.1.13.1	<i>Durchführung des Blots:</i>	116
3.1.13.2	<i>Antikörperfärbung des Blots:</i>	116
3.1.14	Proteinexpression	116
3.1.14.1	<i>Vor- und Übernachtskultur</i>	116
3.1.14.2	<i>Enzymexpression</i>	116
3.1.15	Isolierung und Reinigung des Enzyms	117
3.1.15.1	<i>Affinitätschromatographie</i>	117
3.1.15.2	<i>Ultrafiltration</i>	117
3.1.16	Bestimmung der Proteinkonzentration	118
3.2	BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNGEN	118
3.2.1	Inhibitorenstudien	118
3.2.1.1	<i>LeEO</i>	119
3.2.1.2	<i>FaEO</i>	119
3.2.2	Substratscreening	119
3.2.2.1	<i>Photometrisches Substratscreening</i>	119
3.2.2.2	<i>Substratscreening mittels HPLC-MS/MS</i>	119
3.2.2.3	<i>Substratscreening mittels GC-MS</i>	120
3.2.3	pH-Studien	120
3.2.4	Michaelis-Menten-Kinetik	120
3.2.4.1	<i>Photometrische Bestimmung</i>	121
3.2.4.2	<i>Bestimmung mittels HPLC-MS</i>	121
3.2.5	Untersuchung auf Cofaktoren	122
3.2.6	Temperaturoptimum	122
3.2.7	Test auf Metallionen	122
3.2.8	Versuche zur Charakterisierung der HDMF-bildenden Eigenschaft	122
3.2.8.1	<i>Nachweis einer Sättigungskinetik</i>	122
3.2.8.2	<i>pH-Studie</i>	123
3.2.8.3	<i>Cosubstrate</i>	123
3.2.9	Hitze-Kälteinaktivierung	123
3.2.10	Festphasenextraktion	123
3.2.11	Enzymatische Assays zur Charakterisierung des gebildeten HDMF mittels chiraler Kapillaronenelektrophorese	124

3.3	VERSUCHE ZUR IDENTIFIZIERUNG DES VORLÄUFERS VON HDMF	124
3.3.1	Synthese, Stabilisierung und Reinigung von 4-Hydroxy-5-methyl-2-methylen-3(2H)-furanon	124
3.3.2	Lagerungsversuche von HMMF	125
3.3.3	Weitere Stabilisierungsansätze.....	125
3.3.4	Einfluss von MBS auf die Aktivität von FaEO.....	125
3.3.5	Konkurrenzreaktion von MBS und FaEO um HMMF	126
3.3.6	<i>In vivo</i> Studien	126
3.3.6.1	<i>Applikationslösungen.....</i>	<i>126</i>
3.3.6.2	<i>Erdbeeren.....</i>	<i>127</i>
3.3.6.3	<i>Andere Früchte.....</i>	<i>127</i>
3.3.6.4	<i>Aufarbeitung der Früchte.....</i>	<i>127</i>
3.3.6.5	<i>Umsetzung von Q1 mit alkalischer Phosphatase</i>	<i>128</i>
3.4	VERSUCHE ZUR IDENTIFIZIERUNG WEITERER SUBSTRATE	128
3.4.1	Synthese und Reinigung von HMMF-Derivaten.....	128
3.5	VERSUCHE ZUR AUFKLÄRUNG DES REAKTIONSMCHANISMUS.....	128
3.5.1	Synthese von 9,10-Diacetoxyphenanthren	128
3.5.2	Nachweis von Diacetoxyphenanthren in enzymatischen Umsetzungen	129
3.5.3	Reduktion von Cytochrom c.....	129
3.5.4	Elektronen-Spin-Resonanz-Messung	130
4	GERÄTE.....	133
4.1	HOCHAUFLÖSENDE-GASCHROMATOGRAPHIE.....	133
4.2	HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE MIT DIODENARRAY-DETEKTION ...	133
4.3	HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE MIT UV-DETEKTION UND MASSENSPEKTROMETRIE.....	134
4.3.1	Hochleistungs-Flüssigchromatographie.....	134
4.3.2	UV-Detektor.....	134
4.3.3	Massenspektrometer.....	134
4.3.3.1	<i>Methode 1.....</i>	<i>135</i>
4.3.3.2	<i>Methode 2.....</i>	<i>135</i>
4.3.3.3	<i>Methode 3.....</i>	<i>135</i>
4.3.3.4	<i>Methode 4.....</i>	<i>136</i>
4.3.3.5	<i>Methode 5.....</i>	<i>137</i>
4.3.3.6	<i>Methode 6.....</i>	<i>137</i>
4.3.3.7	<i>Methode Infusion.....</i>	<i>138</i>

4.4	PRÄPARATIVE HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE MIT UV-DETEKTION	138
4.5	NUCLEAR-MAGNETISCHE-RESONANZ-SPEKTROSKOPIE	139
4.6	GASCHROMATOGRAPHIE-OLFAKTOMETRIE.....	139
4.7	CHIRALE KAPILLARZONENELEKTROPHORESE.....	139
4.8	ELEKTRONEN-SPIN-RESONANZ.....	139
4.9	SONSTIGE GERÄTE	140
5	ZUSÄTZLICHE DATEN.....	141
E	LITERATUR.....	147

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ADH	Alkoholdehydrogenase
AER	Alkenal-Reduktase
AKR	Aldo-Keto-Reduktase
Amp	Ampicillin
AOR	Alkenal/on Oxidoreduktase
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat p-Toluidin-salz
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA (<i>copy DNA</i>)
cKZE	Chirale Kapillarzonenelektrophorese
D1	1-Desoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphat
DAD	Dioden Array Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DMBC	2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon
DMMF	2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2 <i>H</i>)-furanon
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPD	4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion
DtBB	3,5-Di- <i>tert</i> -butyl-1,2-benzochinon
EHMF	2 (oder 5)-Ethyl-4-hydroxy-5 (oder 2)-methyl-3(2 <i>H</i>)-furanon
EIC	Einzelionenchromatogramm (<i>extracted ion chromatogram</i>)
ESI	Elektrospray-Ionisation
ESR	Elektronen Spin Resonanz
EST	exprimierte Sequenzabschnitte (<i>expressed sequence tags</i>)
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FaEO	<i>Fragaria ananassa</i> Enonoxidoreduktase (<i>Enone oxidoreductase</i>)
FaQR	Gen der <i>Fragaria ananassa</i> Chinonoxidoreduktase (<i>Quinone oxidoreductase</i>)
FD	Aroma Verdünnung (<i>flavor dilution</i>)
FID	Flammenionisationsdetektor
FMN	Flavin-Mononucleotid
GC	Gaschromatographie
GC-O	Gaschromatographie-Olfaktometrie
GDH	Glucose Dehydrogenase
Glc	Glucose

GT	Glycosyltransferase
h	Stunden
HDMF	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanon
HDHMF	(2 <i>E</i>)-2-[(2 <i>E</i>)-Hex-2-enyliden]-4-hydroxy-5-methyl-3(2 <i>H</i>)-furanon
HHMMF	4-Hydroxy-2-hydroxymethyl-5-methyl-3(2 <i>H</i>)-furanon
HMF	4-Hydroxy-methyl-3(2 <i>H</i>)-furanon
HMPFF	(2 <i>E</i>)-4-Hydroxy-5-methyl-2-[(2 <i>E</i>)-3-phenylprop-2-enyliden]-3(2 <i>H</i>)-furanon
HPLC	Hochdruck Flüssigchromatographie (<i>high pressure liquid chromatography</i>)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
k_{cat}	Wechselzahl, molare Aktivität
K_{m}	Michaelis-Menten-Konstante
LeEO	<i>Lycopersicum esculentum</i> Enonoxidoreduktase (<i>Enone oxidoreductase</i>)
LB	Luria-Bertani
M	Molarität, mol/l
<i>m/z</i>	Verhältnis von Masse durch Ladung
MBS	3-Mercaptobenzoessäure
MDR	Mittelkettige Dehydrogenasen/Reduktasen
MeOH	Methanol
Min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Zweidimensionale Massenspektrometrie
NADH	Nicotinamidadenin-dinucleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenin-dinucleotid-phosphat (reduzierte Form)
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
OD	Optische Dichte
OMT	O-Methyltransferase
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD	<i>o</i> -Phenylendiamin
pET	leerer Vektor pET 29a (+)
PQ	Phenanthrenchinon
Q1	Phosphorsäure-mono-[2,3-dihydroxy-3-(3-methyl-chinoxalin-2-yl)-propyl]- ester
Q ₂	2-Methyl-3-(1,2-dihydroxyethyl)-chinoxalin

RP-18	Umkehrphase mit C18-Alkylketten (<i>reversed phase</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TIC	Totalionenchromatogramm (<i>total ion chromatogram</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit [$\mu\text{mol}/\text{Min}$]
UV	Ultraviolett
v_{max}	Maximale Umsatzgeschwindigkeit
XAD	Spezialadsorberharz aus Amberlite
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid
ZCr	ζ -Crystallin

A ZUSAMMENFASSUNG UND SUMMARY

ZUSAMMENFASSUNG

4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (HDMF, Furaneol®) ist der wichtigste, qualitätsbestimmende Aromastoff der Erdbeerfrucht. Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass die Biosynthese dieses Geruchsstoffes auf der Stufe des D-Fructose-1,6-diphosphats vom Primärstoffwechsel abzweigt. Teilsequenzen eines aus Erdbeerfrüchten isolierten Proteins, welches in der Lage ist HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat und NAD(P)H zu bilden, waren vollständig identisch mit der Proteinsequenz einer mutmaßlichen NAD(P)H-abhängigen Chinonoxidoreduktasen-cDNA aus Erdbeeren. Des Weiteren gab es Übereinstimmungen im Expressionsmuster, dem Methioningehalt und der Proteingröße. Die Oxidoreduktase (FaEO), sowie ein ähnliches Enzym der Tomatenfrucht, wurden im Rahmen dieser Arbeit in *Escherichia coli* heterolog exprimiert, aufgereinigt und anschließend biochemisch charakterisiert.

Der Nachweis der HDMF-Bildung durch FaEO ist durch die Analyse von Reaktionsansätzen aus D-Fructose-1,6-diphosphat, NADH und FaEO erbracht worden. Hierbei wurden das pH-Optimum, die Kosubstratabhängigkeit, die Hitzeinhibierung und die Enantioselektivität bestimmt. Allerdings zeigte sich insbesondere wegen der langen Umsetzungszeiten, dass D-Fructose-1,6-diphosphat nicht das eigentliche Substrat von FaEO sein konnte. Aus diesem Grund wurden weiterführende Untersuchungen zur Identifizierung des Vorläufers von HDMF durchgeführt. 1-Desoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphat, welches bei der Biosynthese von HDMF in Hefen als Zwischenverbindung beschrieben wurde, konnte in Erdbeeren als Vorläufer ausgeschlossen werden. Die Synthese des α , β -ungesättigten 4-Hydroxy-5-methyl-2-methylen-3(2*H*)-furanon (HMMF) führte schließlich zum Erfolg. FaEO war in der Lage im Reaktionsansatz unter Verbrauch von NADH die Doppelbindung von HMMF selektiv zu reduzieren und so HDMF darzustellen. Die NMR-Analytik zur Strukturabsicherung der neuen und reaktiven, aus 4-Hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanon (HMF) und Formaldehyd, synthetisierten Verbindung HMMF gelang erst nach Herabsetzung der Reaktivität durch eine Derivatisierung als Thioether.

Der Nachweis des postulierten Prekursors HMMF *in vivo* erfolgte gleichfalls über die Derivatisierung als Thioether. Die Applikation von 3-Mercaptobenzoessäure (MBS) an Erdbeeren in verschiedenen Reifestadien unterbrach die Biosynthese von HDMF auf der Stufe von HMMF, da dieses mit dem Thiol zum Thioether reagierte. Der Thioether konnte in den anschließenden Messungen mittels HPLC-MS/MS-Untersuchungen nachgewiesen werden. In grünen Früchten wurden keine, in Erdbeeren des pinkfarbenen Stadiums größere und in roten Früchten die größten Mengen an Thioether detektiert. Diese Ergebnisse gehen konform mit der reifekorrelierten Expression von FaEO und der reifekorrelierten Bildung von

HDMF in Erdbeeren. Auch in anderen HDMF-enthaltenden Früchten, in Ananas und Tomate, gelang es auf diesem Weg HMMF nachzuweisen.

Durch Applikation an Erdbeerfrüchte wurde stabil markierte Glucose in den Biosyntheseweg von HDMF eingeschleust. Dieser wurde wieder durch ebenso applizierte MBS auf der Stufe von HMMF unterbrochen. Die stabile Markierung konnte durch HPLC-MS/MS-Experimente im Furanon-Teil des Thioethers wieder gefunden werden.

Das Gen von FaEO, *FaQR* (*Fragaria ananassa* Quinone Oxidoreductase), wurde, basierend auf dem Vergleich der cDNA-Sequenz mit Datenbankeinträgen, zunächst der Klasse der NAD(P)H-abhängigen Chinonoxidoreduktasen zugeordnet. Ein Substratscreening von FaEO mit Chinonen ergab, dass ausschließlich 9,10-Phenanthrenchinon (PQ), eine synthetische Verbindung, unter Verbrauch von NADH umgesetzt wurde. *P*-Chinone wurden, wie auch weitere Vertreter aus den Klassen der *o*-Chinone und *o*-Diketoverbindungen, nicht als Substrate akzeptiert. Auch bekannte α , β -ungesättigte Aldehyde, Ketone, Carbonsäuren und Amide stellten, ebenso wie Flavone, keine Substrate für FaEO dar.

Aus diesem Grund wurden weitere α , β -ungesättigte HMMF-strukturanaloge 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanone mit unterschiedlichen Substituenten an der Doppelbindung [u. a. 2-Ethyliden-4-hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanon (EDHMF); 4-Hydroxy-5-methyl-2-propyliden-3(2*H*)-furanon (HMPDF); 2-Butyliden-4-hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanon (BDHMF)] synthetisiert. Die Charakterisierung der teilweise bislang unbekannt, synthetisierten Verbindungen sowie der zum Teil neu beschriebenen enzymatischen Produkten erfolgte durch HPLC-MS/MS-, GC-MS-, GC-O- und HPLC-DAD-Messungen. HDMF, das enzymatische Produkt aus HMMF, und EHMf [2 (oder 5)-Ethyl-4-hydroxy-5 (oder 2)-methyl-3(2*H*)-furanon], das Produkt aus EDHMF, sind als wichtige Aromakomponenten in verschiedenen Lebensmitteln beschrieben. Die längerkettigen Substrate und Produkte BDHMF, HMPDF, BHMf und HMPf zeigten in GC-Olfaktometrie-Analysen ebenfalls ausgeprägte Geruchsaktivitäten. Es gelang kinetische Daten zu FaEO mit den umgesetzten längerkettigen, synthetisierten Verbindungen und PQ zu gewinnen. Für HMMF hingegen konnten aufgrund der hohen Reaktivität keine reproduzierbaren kinetischen Daten erhalten werden.

Die Substratstudien zeigten, dass FaEO eine Substratspezifität besitzt, die sich auf α , β -ungesättigte Doppelbindung, die mindestens ein Wasserstoffatom am β -C-Atom besitzen und gleichzeitig nicht mit einer weiteren Doppelbindung in *trans*-Stellung konjugiert sind beschränkt. Weiter entfernte Doppelbindungen, ob C=O oder C=C, oder ein weiterer Sauerstoff in der Nähe der Ketogruppe schienen die Reaktivität auch zu beeinflussen. Des Weiteren wiesen die Ergebnisse mit Benzil, welches nicht als Substrat akzeptiert wurde, darauf hin, dass das aktive Zentrum von FaEO nur planare Moleküle umsetzen kann.

Überraschenderweise ließ sich FaEO anhand der biochemischen Ergebnisse nicht klar in eines der in der Literatur beschriebenen Schemata von NAD(P)H-abhängigen Chinonoxidoreduktasen einordnen.

Des Weiteren stellt das Chinon PQ nicht das in der Erdbeere vorkommende Substrat der mutmaßlichen NAD(P)H-abhängigen Chinonoxidoreduktase dar. Da das Enzym *in vivo* die Doppelbindung des Enons HMMF reduziert, wurde der Name FaEO (*Fragaria ananassa* Enon Oxidoreduktase) dem der Chinonoxidoreduktase vorgezogen.

Die Charakteristika der Umsetzungen von PQ und der ungesättigten Hydroxyfuranone unterschieden sich nicht nur in den katalytischen Effizienzen, sondern auch im pH-Optimum und vor allem im Reaktionsmechanismus. Durch die Aufklärung der Stöchiometrie der Reaktionen, die Identifizierung eventuell entstandener Produkte und die Probe auf Radikale stellte sich heraus, dass FaEO abhängig vom zur Verfügung stehenden Substrat (Chinon oder ungesättigtes Hydroxyfuranon) unterschiedliche Reaktionsmechanismen katalysieren kann. So wird PQ über eine Ein-Elektronen-Übertragung zum instabilen Semichinonradikal umgesetzt, während aus den ungesättigten 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanonen die gesättigten Analoga über eine Zwei-Elektronen-Übertragung gebildet werden.

Da auch in der Tomate HMMF, das Substrat der Enonoxidoreduktase, nachgewiesen werden konnte, wurde in dieser Frucht nach einem ähnlichen Enzym wie FaEO gesucht. Schließlich konnte dieses mit Hilfe einer Tomatenexpressionsdatenbank identifiziert werden (71 % Übereinstimmung auf Proteinebene). Die Klonierung, heterologe Expression und biochemische Charakterisierung der LeEO (*Lycopersicum esculentum* Enonoxidoreduktase) erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei FaEO und ergab, dass die Eigenschaften von LeEO nur geringfügig von denen von FaEO abwichen, z. B. durch ein etwas höheres pH-Optimum, eine höhere katalytische Effizienz gegenüber PQ und dem Chloroplastentransitpeptid am N-terminalen Ende der Sequenz.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in der vorliegenden Studie mit der Entdeckung von HMMF als Intermediat und FaEO als umsetzendes Enzym ein weiterer wichtiger Schritt in der Aufklärung der Biosynthese von HDMF gelungen ist (Abb. A-1). Lediglich die Transformation von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HMMF, welche eine Dephosphorylierung und Dehydratisierung beinhaltet, ist noch ungeklärt. Gleichzeitig gelang mit der Charakterisierung einer vermeintlichen NAD(P)H-abhängigen Chinonoxidoreduktase als Enon Oxidoreduktase, die Beschreibung eines Enzyms, das in der Lage ist, substratabhängig zwei verschiedene Reaktionsmechanismen zu katalysieren. Ein homologes Enzym LeEO konnte auch in Tomaten nachgewiesen und charakterisiert werden.

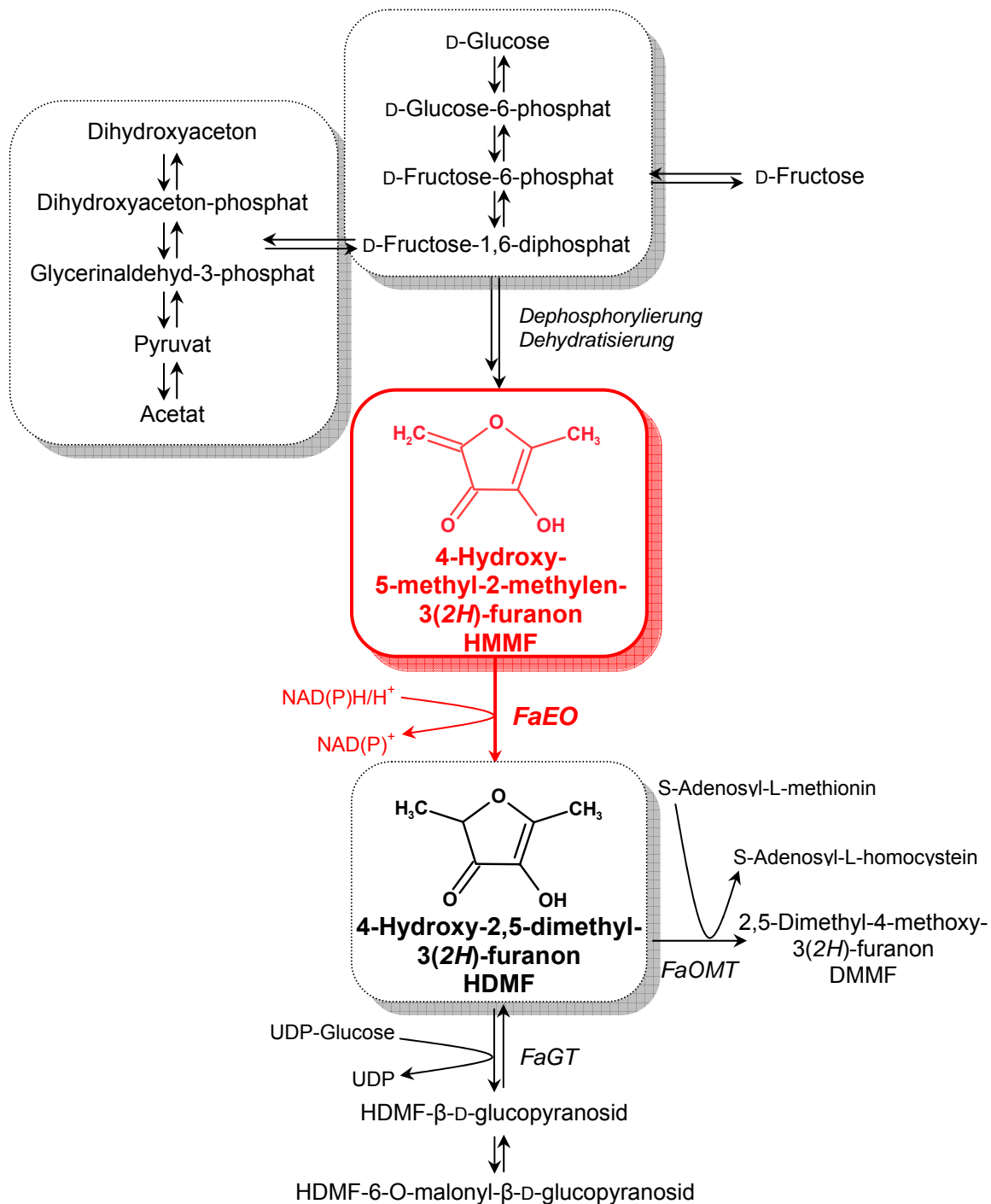


Abb. A-1: Postulierter Biosyntheseweg von HDMF in der Erdbeerfrucht (Roscher und Mitarbeiter, 1998), erweitert durch die neu gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit (rot). HMMF entsteht aus D-Fructose-1,6-diphosphat über noch unbekannte Mechanismen und wird durch FaEO unter Verbrauch von NAD(P)H zu HDMF umgesetzt. FaOMT: *F. ananassa* O-Methyltransferase; FaGT: *F. ananassa* Glycosyltransferase.

SUMMARY

Previous studies have revealed that D-fructose-1,6-biphosphate plays a central role in the biosynthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone (HDMF), one of the most important flavor compounds in the strawberry. Furthermore, partially purified protein extracts from the strawberry have been shown to build HDMF from D-fructose-1,6-biphosphate in the presence of NADH. The enzymatic activity could be correlated with the presence of a single polypeptide, which contained two peptide fragments that showed total identity with the protein sequence of a putative quinone oxidoreductase (*Fragaria ananassa* quinone oxidoreductase) that is ripening induced. Additionally, there were similarities in the expression pattern, the amount of methionine, and the size.

In this study, the enzyme from strawberry and a similar enzyme from tomato were heterologously expressed in *E. coli*, purified and biochemically characterized. We confirmed, *in vitro*, that the heterologously expressed enzyme catalyzes the formation of HDMF from D-fructose-1,6-biphosphate and NADH. In addition we determined the pH-optimum, co-substrate dependencies, inactivation by heat, and the enantiomer selectivity of this enzyme. During the characterization process, it became clear from the results of longer reactions, that D-fructose-1,6-biphosphate was probably not the native substrate. Thus, additional studies on the identification of the precursor of HDMF were initiated.

One option for this precursor was the compound 1-desoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphat, which is known to be the precursor of HDMF in yeasts. In this study, we were able to show that it is not the precursor of HDMF in strawberries. To identify the true substrate of the enzyme we synthesized the α , β -unsaturated 4-hydroxy-5-methyl-2-methylene-3(2*H*)-furanone (HMMF). In the presence of NADH, the enzyme reduced the double bond of this compound to form HDMF. The previously unknown compound, HMMF, was synthesized by adding formaldehyde to 4-hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanone (HMF). To proof the structure of HMMF by NMR, its reactivity required its derivatisation as a thioether. This derivatisation was also necessary to show that HMMF was indeed the precursor *in vivo*. The application of 3-mercapto-benzoic-acid (MBA) to strawberries at different ripening stages interrupted the biosynthesis of HDMF because the precursor, HMMF, reacted with the thiol to form a thioether. This thioether was detected in subsequent HPLC-MS-measurements. Additionally the formation of thioether correlated with the ripening stage of the fruit, as do the formation of HDMF, and the expression of the enzyme.

The proof of HMMF by this method was also successful in several other HDMF containing fruits, like the pineapple and tomato. Additionally, we were able to show that, as expected, D-glucose is transformed into HMMF during the biosynthesis of HDMF. The application of 6-¹³C-D-glucose to strawberries that were later treated with MBA enabled us to confirm the incorporation of the labelled sugar into the furanone part of the thioether.

At first the gene *FaQR* (*Fragaria ananassa* quinone oxidoreductase) was classified as a NAD(P)H-quinone oxidoreductase based on sequence-similarities with known QRs. However, a substrate screening with several quinones revealed that the enzyme accepted only 9,10-phenanthrenequinone (PQ), an artificial quinone, as a substrate. Other *o*-quinones, *p*-quinones, α , β -unsaturated aldehydes, ketones, acids, amides, and flavones were not accepted. Thus it was necessary to synthesize more substrates [such as 2-ethylidene-4-hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanone (EDHMF), 4-hydroxy-5-methyl-2-propylidene-3(2*H*)-furanone (HMPDF); 2-butyldiene-4-hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanone (BDHMF)] with the same unsaturated double bond as HMMF, but with different substitutions. These compounds were synthesized and characterized by HPLC-MS/MS-, GC-MS-, GC-O- and HPLC-DAD-data for the first time in this study. Additionally, the enzymatically formed products were only partially known, e.g. HDMF formed from HMMF and EHMF (2 (or 5)-Ethyl-4-hydroxy-5 (or 2)-methyl-3(2*H*)-furanone) formed from EDHMF. These two compounds are important flavor compounds in several foods. Consistent with this, the related structures BDHMF, BHMF, HMPDF, and HMPF revealed similar odor activities. Kinetic data was obtained for EDHMF, HMPDF, BDHMF, and PQ. Due to its high reactivity we were not able to gain kinetic data for HMMF.

This study shows that the enzyme reduces the α , β -unsaturated double bond in those compounds that also have at least one hydrogen atom in the β -position and no second double bond in the trans position. Other double bonds or oxygen nearby doesn't interfere with the activity. The lack of enzymatic activity with benzil as the substrate shows that FaEO accepts only planar molecules.

Surprisingly, it was not possible to clearly classify the enzyme based solely on biochemical studies. Since we have shown *in vivo* that HMMF and not PQ is the substrate, we prefer the name FaEO (*Fragaria ananassa* enone oxidoreductase) to quinone oxidoreductase. This we appropriate, because the two reactions differ not only in their catalytic efficiencies, but also in their optimal pH and reaction mechanism. Using measurements of the stoichiometry of radicals and products, we were able to confirm that the reaction mechanism of FaEO depends on whether the available substrate is an unsaturated hydroxyfuranone or a quinone. PQ is transformed into its unstable semiquinone-radical by a one-electron-reduction, whereas, when the unsaturated hydroxyfuranones are available, FaEO catalyzes a two-electron-reduction and forms the saturated compounds.

Since we could detect HMMF in tomato fruit, it wasn't surprising that we also found a sequence similar to FaEO in a tomato expression database. The protein was heterologously expressed and the enzyme, LeEO (*Lycopersicum esculentum* enone oxidoreductase), showed similar characteristics as FaEO. The optimal pH and the catalytic performance were slightly higher, and there was a transit peptide at the N-terminus of the sequence.

In this study, by discovering HMMF, the precursor, and FaEO, the responsible enzyme we have uncovered another important step in the biosynthesis of HDMF (Fig. A-2). Now only the transformation of D-Fructose-1,6-biphosphate to HMMF, which includes a dephosphorylation and a dehydration, remains unknown. Finally, we were able to characterize FaEO as an enzyme able to carry out two different reaction mechanisms depending on the available substrate. The characterization of LeEO, a homologous enzyme from the tomato, confirms these results.

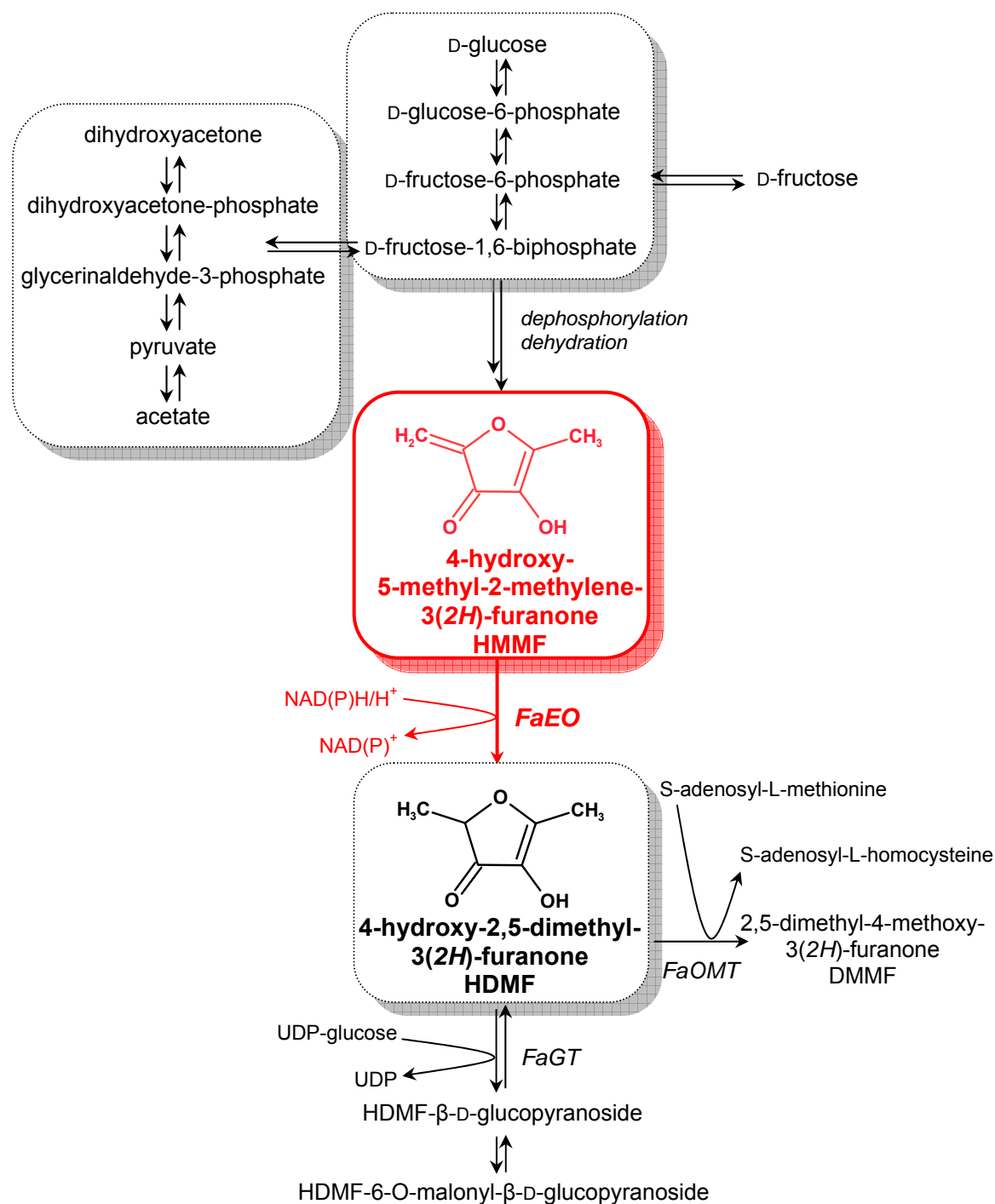


Fig. A-2: Postulated biosynthetic pathway of HDMF in strawberry (Roscher et al. 1998) combined with the results of the present study (red); HMMF is built from D-fructose-1,6-biphosphate through unknown mechanisms, and is transformed into HDMF by FaEO in the presence of NADH. FaOMT: *F. ananassa* O-methyltransferase; FaGT: *F. ananassa* glycosyltransferase.

B KENNTNISSTAND

1 DIE ERDBEERE

Die Erdbeere gehört zur Familie der Rosengewächse (Rosaceae) und ist botanisch gesehen eine Sammelnussfrucht und keine Beere, wie es der Name vermuten lässt. Mit der Kultivierung von Walderdbeeren, *Fragaria vesca*, wurde vor ca. 2000 Jahren begonnen. Betrachtet man im Vergleich dazu die Anfänge der Getreidedomestizierung liegen gut 8000 Jahre dazwischen. Vermutlich ist die einfache Zugänglichkeit neben der leichten Verderblichkeit der Walderdbeeren ein Grund für den späten Beginn des kultivierten Anbaus. Erst im Mittelalter wurde damit begonnen Wald- und Zimterdbeeren (*Fragaria moschata*) in europäischen Gärten anzubauen (Hancock, 1999).

Zu einer weltweit vermarkteten Frucht entwickelte sich die Erdbeere in den letzten 250 Jahren. Ein wichtiger Einschnitt war die Entdeckung der „neuen Welt“, die eine ganze Reihe an neuartigen Pflanzen nach Europa brachte. Unter ihnen befand sich auch die amerikanische Erdbeere *F. virginiana*. Diese wurde besonders aufgrund ihrer größeren Früchte, deren scharlachroten Färbung und Robustheit den Walderdbeeren, die bis heute nur fingernagelgroß wachsen, vorgezogen. Der eigentliche Durchbruch im kommerziellen Anbau gelang durch die Kreuzung der amerikanischen mit der sehr großfruchtigen chilenischen Erdbeere (*F. chiloensis*). So entstand in der Mitte des 18. Jahrhunderts aus den Blüten der Chile-Erdbeere, die mit Pollen der amerikanischen Scharlacherdbeere bestäubt worden war, die oktaploide Hybridform der *F. ananassa* (Hancock, 1999). Diese Art vereinigt mit ihren großen, roten und robusten Früchten die positiven Eigenschaften der Eltern und bestimmt bis heute den Markt. Heutzutage ist sie nach dem Apfel das beliebteste Obst in Deutschland mit einem pro Kopf Verbrauch von 2,8 kg pro Jahr, Tendenz steigend (Stuttgarter Zeitung, 02.05.2006).

1.1 BOTANISCHE SICHT

Botanisch gesehen versteht man unter dem allgemein als „Erdbeerfrucht“ beschriebenem Pflanzenteil der Erdbeere den aufgedunsenen, fleischigen Blütenboden. Die dem Blütenboden aufsitzenden Achänen, auch Nüsschen genannt, stellen die eigentlichen Früchte dar und bilden zusammen eine Sammelnussfrucht. Der reife Blütenboden gliedert sich in den weißlichen Kortex, die durch Anthocyane rot gefärbte Rinde und die der Rinde aufliegende Epidermis. Die außen aufsitzenden Achänen werden über Leitbündel, die auch Kortex von Rinde trennen, mit Nährstoffen versorgt (Abb. B-1, Hancock 1999).

Neben der in Europa heimischen diploiden Walderdbeere, *F. vesca*, spielt heutzutage besonders die octaploide *F. ananassa* eine wichtige Rolle. Diese unterscheidet sich von der wilden Form nicht nur durch die Polyploidie sondern auch durch die daraus resultierenden größeren Früchte und das Aroma- und Geschmacksprofil.

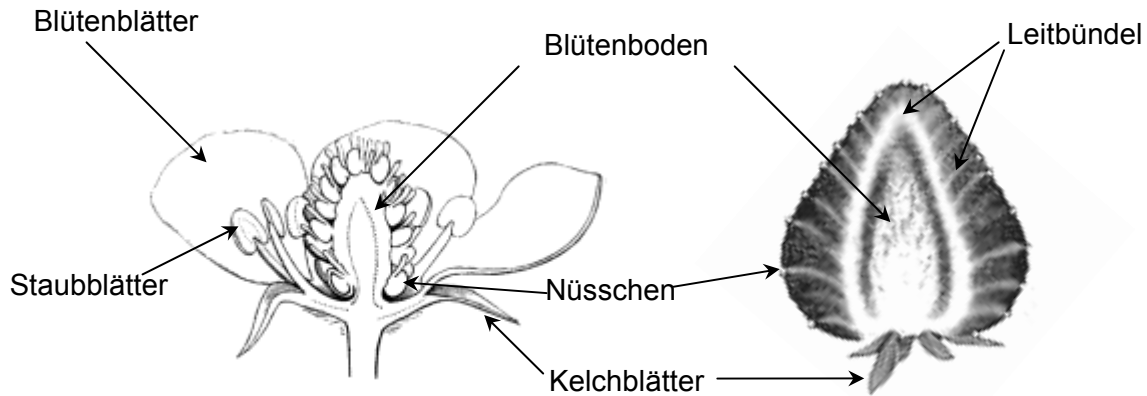


Abb. B-1: Aufbau der Erdbeerblüte und der Erdbeerfrucht (nach Hancock, 1999; Bild der Blüte aus Watson und Dallwitz, 1992).

1.2 FRUCHTREIFUNG

Nicht nur visuell ist die Fruchtreifung der Erdbeere ein spektakulärer Prozess, auch die molekularbiologisch und biochemisch ablaufenden Prozesse sind beeindruckend, wenn auch bei Weitem nicht so gut untersucht.

Besonders für die Ernte und den Handel ist die Einteilung von Früchten in klimakterisch oder nicht-klimakterisch wichtig, da hiervon der Erntezeitpunkt und die Transportdauer abhängig sind. Klimakterische Früchte, wie z. B. die Banane, besitzen die Fähigkeit nach der Ernte nachzureifen und können demzufolge im grünen Zustand geerntet werden. Nicht-klimakterische Früchte weisen diese Eigenschaft nicht auf. Da keine Produktion von Ethylen und auch keine erhöhte Respiration während der Reifung, die typischen Merkmale klimakterischer Früchte, nachweisbar sind, wird die Erdbeere zu den nicht-klimakterischen Früchten gezählt (Manning, 1994).

Durch die Studie von Given und Mitarbeiter (1988) wurde gezeigt, dass primär das Pflanzenhormon Auxin (Indolessigsäure) die Reifung reguliert. Gibberelline, Cytokinine und Abscisinsäure scheinen einen geringen Einfluss auf das Fruchtwachstum zu haben (Manning, 1994; Perkins-Veazie, 1995). Auxin wird in den Nüsschen gebildet und entgegen dem Nährstoffstrom durch die Leitbündel zu den Blütenstängeln transportiert (Perkins-Veazie, 1995). Erst wenn die Menge an Auxin im Blütenboden unter einen Schwellenwert fällt, beginnt dessen Reifung (Given und Mitarbeiter, 1988). Generell lässt sich die Reifung der Erdbeere in zwei nacheinander ablaufende Prozesse einteilen, die Reifung der Achänen und das anschließende Anschwellen des Blütenbodens.

Die Achänen beginnen direkt nach der Bestäubung zu reifen. In dieser Zeit fließt der Hauptstrom der Metabolite in die Embryos. Gleichzeitig startet der Blütenboden nach der Blüte sich durch Zellteilung zu vergrößern. Es entsteht ein festes Gewebe, mit dicken

Zellwänden und eng stehenden Zellen. Während der Reifung der Achänen ist die ganze Aktivität der Pflanze auf die Zellteilung und Zellwandverstärkung eingestellt. Etwa sieben Tage nach dem Fall der Blütenblätter haben die Achänen ihre Reife erreicht, die Zellteilung wird gestoppt und das Wachstum des Blütenbodens durch die Vergrößerung der Zellen beginnt (Perkins-Veazie, 1995). Durch die Einlagerung von großen Mengen an Anthocyanen in die Vakuole und den gleichzeitigen Abbau der Chloroplasten entsteht der schön zu beobachtende Farbumschlag der Frucht. Der Abbau von Mittellamellen verursacht die Bildung von Interzellularen im Kortex und in der Rinde - die Frucht wird weich (Hancock, 1999; Perkins-Veazie, 1995).

Biochemisch steht die Reifung der Erdbeerfrucht, wie auch bei anderen Früchten, ganz im Zeichen der Bildung und Akkumulation von Sekundärmetaboliten. Der Metabolismus wird zum Katabolismus, es entstehen Farb-, Geruchs- und Geschmackstoffe und die Textur verliert an Härte. Sekundärstoffe können aus den Hauptinhaltsstoffen der verschiedenen Biosynthesewege durch enzymatische oder nicht-enzymatische Reaktionen hervorgehen (Schreier und Mosandl, 1985). Die Textur der Frucht verändert sich dahingehend, dass durch die Aktivität von Cellulasen und Pektinmethylesterasen Hemicellulosen und Pektine freigesetzt werden. Auch durch Expansine, welche für die Zellausdehnung verantwortlich sind, wird das Gewebe weicher (Hancock, 1999). Die rote Farbe entsteht durch die Akkumulation von Anthocyanen, hauptsächlich Pelargonidin- und Cyanidin-3-glucosid. Aus den Metaboliten des Lipid-, Terpen-, Aminosäure- oder Phenylpropanstoffwechsels resultiert die Bildung von Aromastoffen. Diese ist deshalb so interessant, da das Aroma neben der Textur den wichtigsten Faktor der Fruchtqualität darstellt. Das Aroma ist eine Komposition aus flüchtigen Stoffen, wohingegen die Süße und Säure der Früchte aus Zuckern und Fruchtsäuren resultieren. Oft bestimmen schon wenige Spuren eines Aromastoffes oder das Fehlen eines anderen die aromatischen Eigenschaften der Erdbeere stark mit. Die verschiedenen Verhältnisse der Aromastoffe in den einzelnen Sorten fungieren wie ein Fingerabdruck, obwohl nur wenige der Aromastoffe tatsächlich dazu beitragen. Dass Aromastoffe erst während der Reifung gebildet werden, wurde durch diverse Studien bestätigt (Azodanlou und Mitarbeiter, 2004; Ménager, 2004; Pérez und Mitarbeiter, 1992, 1996; Aharoni und Mitarbeiter, 2004).

1.3 AROMASTOFFE

Hunderte verschiedene flüchtige Verbindungen wurden bereits in der Erdbeerfrucht identifiziert, wobei die Methyl- und Ethylester der Butan- und Hexansäure, sowie 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (HDMF), sein Methoxyderivat (2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2*H*)-furanon, DMMF) und (*Z*)-3-Hexenal für die wichtigsten gehalten werden (Larsen und Poll, 1992; Larsen und Mitarbeiter, 1992; Pérez und Mitarbeiter, 1992). Einen Überblick über einige das Aroma der Erdbeere bestimmenden Verbindungen gibt Tabelle B-1.

Tabelle B-1: Für das Aroma von Erdbeeren (Senga Sengana) repräsentative Verbindungen und die zugehörigen Aromawerte (Larsen und Poll, 1992).

Aromawert	Verbindung	Geruchseigenschaften	Chemische Struktur
453000	Ethylbutanoat	Fruchtig, süß	Ester
4700	Ethylhexanoat	Fruchtig	Ester
1170	HDMF	Karamell, süß	Furanon
614	Methylbutanoat	Fruchtig, Käse	Ester
410	Linalool	Blumig, Zitrus	Terpen
166	2-Heptanon	Käse	Keton
122	Methylbutansäure	Fruchtig	Carbonsäure
31	2-Pentanon	Lösungsmittel	Keton
25	2 <i>E</i> -Hexenal	Grün, Mandel	Aldehyd
19	γ -Dekalacton	Pfirsich	Lacton
11	DMMF	Brotkruste	Furanon
3	Hexanal	Grün, sauer	Aldehyd

Obwohl die Anzahl der aromawirksamen Verbindungen in der Erdbeerfrucht so hoch ist, tragen doch bei weitem nicht alle gleich zum Aroma bei. Das liegt vor allem an den verschiedenen Aromaschwellenwerten und Konzentrationen, in denen die Substanzen in der Frucht vorliegen. Um herauszufinden welche Verbindung das Aroma mitgestaltet, wurden Aromawerte bestimmt. Diese Werte sind definiert als Quotient der Konzentration einer Substanz in einem Lebensmittel und seinem Geruchsschwellenwert (Belitz und Grosch, 1992). Somit ist es möglich die Geruchswirksamkeit verschiedener flüchtiger Komponenten in einem Lebensmittel zu vergleichen. Per Definition trägt eine Substanz dann zum Aroma bei, wenn ihr Aromawert größer als 1 ist.

Eine weitere Möglichkeit die Beteiligung einer Verbindung am Aroma eines Lebensmittels festzustellen ist die Aroma-Extrakt-Verdünnungsanalyse. Diese beruht auf der

gaschromatographischen Auftrennung eines Aromaextraktes mit angeschlossener Olfaktometrie. Der Aromaextrakt wird sukzessive mit Lösungsmittel verdünnt, mittels GC in die Bestandteile aufgetrennt und überprüft bis zu welchen Verdünnungen diese noch olfaktometrisch nachweisbar sind. Auf diesem Weg wird ein so genannter Flavour-Dilution-(FD)-Faktor bestimmt, definiert als die Verdünnung bei der eine Verbindung noch erkennbar ist. Mit dessen Hilfe können Aussagen über die Aromawirksamkeit einer Verbindung getroffen werden. Je höher der FD-Faktor, umso größer ist auch die Aromawirksamkeit.

Hirvi und Honkanen (1982) bestimmten die höchsten Aromawerte für Ethylhexanoat, Ethylbutanoat, 3Z-Hexenal und DMMF in drei verschiedenen Erdbeersorten (Annelie, Alaska Pioneer, Senga Sengana). In der Walderdbeere hingegen verhielt es sich anders, denn dort hatten die Verbindungen Ethylbutanoat, DMMF, Methylantranilat und Myrtenol den größten Einfluss auf das Aroma. Larsen und Poll (1992) untersuchten Früchte der Sorte Senga Sengana und erhielten den höchsten Aromawert für Ethylbutanoat, gefolgt von Ethylhexanoat und HDMF (Tabelle B-1). In der nachfolgenden Studie von Larsen und Mitarbeiter (1992), die an weiteren fünf verschiedenen Erdbeerkultivaren (Elsanta, Elvira, Dania, Bogota und Pandora) durchgeführt wurde, stellte sich heraus, dass es sortenspezifische und allgemein wichtige Aromakomponenten gibt. Zu ersteren gehören Ethylbutanoat, Methylbutanoat, γ -Dekalacton und 2-Heptanon, letztere werden vertreten durch HDMF, Linalool und Ethylhexanoat.

Schieberle und Hofmann bestimmten 1997 in einer unbekannt spanischen Erdbeersorte die höchsten FD-Faktoren für HDMF, (Z)-3-Hexenal, Methylbutanoat, Ethylbutanoat, und Ethyl-2-methylpropanoat. Eine Studie mit Modellerdbeersaft aus den zwölf wichtigsten Aromastoffen ergab, dass das Fehlen von HDMF, (Z)-3-Hexenal oder Methylbutanoat in der Mischung den größten negativen Einfluss auf die Aromaqualität hat (Schieberle und Hofmann, 1997).

Eine so genannte „*character impact compound*“ (Jennings und Mitarbeiter, 1964) konnte nicht identifiziert werden. Verschiedene Arbeitsgruppen kommen selbst bei der Untersuchung der selben Erdbeersorte zu unterschiedlichen Einstufungen der Bedeutung der Aromastoffe. Gerade im Fall von HDMF und DMMF könnte das jedoch auch an ungünstig gewählten Extraktions- und Nachweismethoden liegen (Kap. B-2.3.3).

Dennoch kann in Übereinstimmung mit fast allen Studien festgestellt werden, dass HDMF, für kultivierte Erdbeeren, und DMMF, für Walderdbeeren, besondere Rollen bei der Qualität des Aromas spielen.

2 4-HYDROXY-3(2H)-FURANONE

2.1 4-HYDROXY-2,5-DIMETHYL-3(2H)-FURANON (HDMF) UND DERIVATE

4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (HDMF, Furaneol®) gehört aufgrund seines niedrigen Geruchsschwellenwertes und dem angenehmen Geruchseindruck zu den wichtigsten Vertretern der 4-Hydroxy-3(2H)-furanone. Hodge und Mitarbeitern gelang es 1963 zum ersten Mal HDMF durch die Umsetzung von Rhamnose mit Piperidinacetat darzustellen. Aufgrund fehlender spektroskopischer Daten lieferten erst die kurz aufeinander folgenden Studien von Rodin und Mitarbeitern (1965) sowie Willhalm und Mitarbeitern (1965) den eindeutigen Strukturbeweis. Die Arbeitsgruppe um Rodin isolierte das Ananasketon, wie HDMF damals genannt wurde, aus frischem Ananassaft und identifizierte die Verbindung durch NMR-, UV-, Infrarot- und Massenspektren.

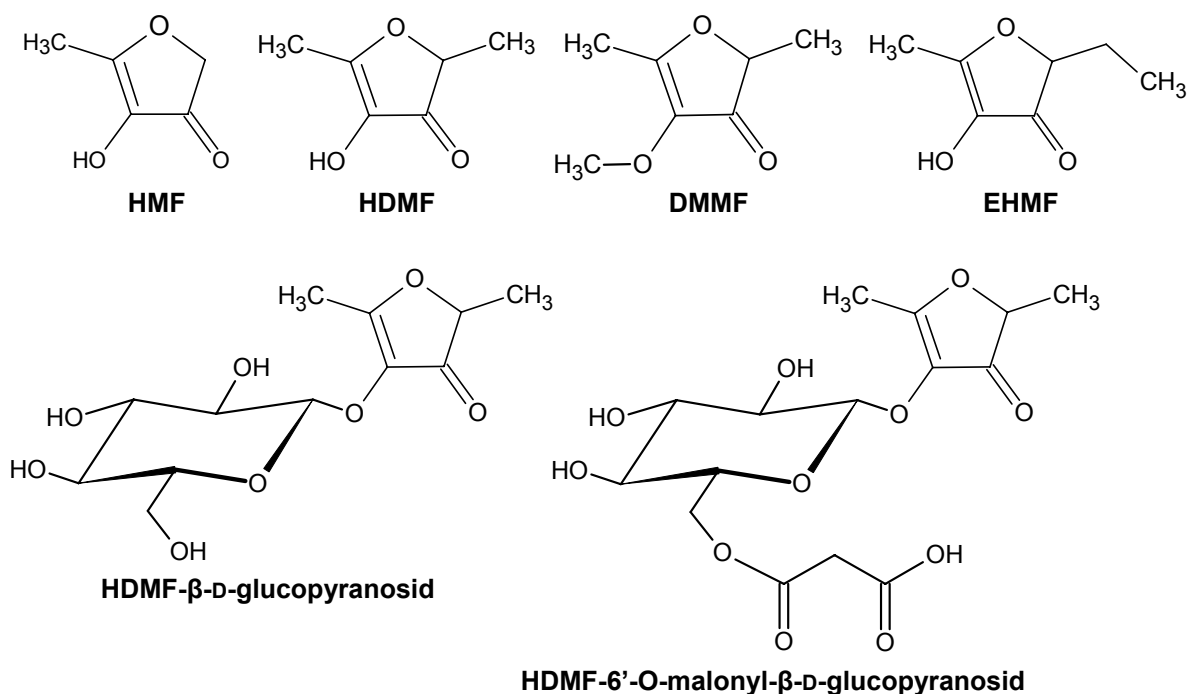


Abb. B-2: Strukturformeln der 4-Hydroxy-3(2H)-furanone; 4-Hydroxy-methyl-3(2H)-furanon (HMF); 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (HDMF); 2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanon (DMMF); 2 (oder 5)-Ethyl-4-hydroxy-5 (oder 2)-methyl-3(2H)-furanon (EHMF); HDMF-β-D-glucopyranosid; HDMF-6'-O-malonyl-β-D-glucopyranosid.

Willhalm und Mitarbeiter (1965) bestätigten die von Rodin und Mitarbeitern (1965) erhaltenen Daten nachdem sie die Synthese von Hodge und Mitarbeitern (1963) wiederholt hatten. Der erste Nachweis von HDMF in der Erdbeere erfolgte 1969 (Sundt und Mitarbeiter, 1970) und 1976 wurde die Verbindung auch in der arktischen Moosbeere durch Kallio nachgewiesen. Einige Jahre später stellten sich auch Himbeeren (Honkanen und Mitarbeiter, 1980) und Mangos (Pickenhagen und Mitarbeiter, 1981) als HDMF-haltige Früchte heraus. Schließlich folgte die Bestätigung der Struktur in Tomaten (Buttery und

Mitarbeiter, 1994) und in der Schlangenfrucht (*Salacca zaiacca* (Gaert.) Voss) (Wijaya und Mitarbeiter, 2005). Nicht nur HDMF, auch der Methylether (2,5-Dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanon, Mesifuran, DMMF) trägt in pflanzlichen Lebensmitteln wie z. B. der Walderdbeere zum Aroma bei (Pyysalo und Mitarbeiter, 1979). HDMF- β -D-glucopyranosid und HDMF-6'-O-malonyl- β -D-glucopyranosid stellen die gebundenen und somit stabilisierten Formen von HDMF in verschiedenen Früchten dar (Mayerl und Mitarbeiter, 1989; Honkanen und Mitarbeiter, 1994; Roscher und Mitarbeiter, 1997 b). Eine Beteiligung dieser Verbindungen am Aroma ist bisher umstritten. HDMF und seine Derivate wurden in Pflanzen bisher nur in Blüten und Früchten nachgewiesen (Schwab und Roscher, 1997).

Neben pflanzlichen Lebensmitteln sind auch prozessierte, z. B. thermisch behandelte, Lebensmittel eine Quelle für HDMF. Durch die schon von Hodge und Mitarbeitern 1963 zur Darstellung von HDMF eingesetzte Maillard-Reaktion, die so genannte nicht-enzymatische Bräunung, entstehen aus reduzierenden Zuckern und Aminoverbindungen über einige komplexe Reaktionsabfolgen viele verschiedene Aromastoffe, so genannte Röstaromen (Kap. B-2.4). Zu diesen gehört auch HDMF weshalb es u. a. in Brot (Schieberle und Grosch, 1994), Popcorn (Schieberle, 1991) und Kaffee (Blank und Mitarbeiter, 1992) nachgewiesen werden konnte. Eine weitere Quelle für HDMF sind fermentative Prozesse wie sie bei der Käse-, Sojasoßen- und Miso-Herstellung eingesetzt werden. Auch in diesen Lebensmitteln trägt HDMF zum Aroma bei (Preininger und Grosch, 1994; Milo und Reineccius, 1997; Nunomura und Mitarbeiter, 1976). Sogar in Insekten konnten HDMF und HMF nachgewiesen werden, nämlich im männlichen Sexualhormon der Schabe *Euricotis floridana* (Farine und Mitarbeiter, 1994).

Der Nachweis von Hydroxyfuranonen in Lebensmitteln ist keine triviale Aufgabe. Zum Einen kann HDMF z. B. während der Wasserdampfdestillation (Pickenhagen und Mitarbeiter, 1981; Larsen und Mitarbeiter, 1992) oder bei der Analytik mittels GC-MS leicht oxidieren, und verschwindet somit während der Aufarbeitung aus der Liste der Aromakomponenten. Zum Anderen kann man durch falsche Aufarbeitungsmethoden, besonders durch Hitzeeinwirkung, Hydroxyfuranone durch die Maillard-Reaktion erzeugen. Dies kann auch ein Grund dafür sein, warum HDMF von verschiedenen Arbeitsgruppen in den gleichen Lebensmitteln in unterschiedlichen Mengen detektiert wurde.

Heutzutage wird der Hauptteil des verwendeten HDMF über die von Re und Mitarbeitern (1973) beschriebenen Reaktionsschritte aus einem Hex-3-in-2,5-diol synthetisch gewonnen. Die Arbeitsgruppe um Newman (2004) hatte sich die Erarbeitung einer einfacheren und billigeren Methode zur Darstellung der Feinchemikalie zum Ziel gesetzt und konnte schließlich eine chemisch-enzymatische Methode beschreiben. Diese beinhaltet im ersten Schritt die enzymatische Umsetzung von p-Xylen zum Z-Cyclohexadiendiol durch eine Dioxygenase. Anschließend wird über eine Ringöffnung durch Ozonolyse HDMF dargestellt.

2.2 2 (ODER 5)-ETHYL-4-HYDROXY-5 (ODER 2)-METHYL-3(2H)-FURANON (EHMF)

2 (oder 5)-Ethyl-4-hydroxy-5 (oder 2)-methyl-3(2H)-furanon (EHMF, Homofuraneol) wurde 1973 zum ersten Mal von der Arbeitsgruppe um Re durch Ozonolyse, Reduktion und säurekatalysierte Cyclisierung von Hept-3-in-2,5-diol dargestellt. 1976 konnte die Verbindung aus Sojasoße isoliert und in Folgestudien als „*character impact compound*“ des fermentierten Lebensmittels charakterisiert werden (Nunomura und Mitarbeiter, 1976; Sasaki und Mitarbeiter, 1991; Sasaki, 1996). Es wird angenommen, dass die zur Fermentation eingesetzten Hefen für die Biosynthese von EHMF verantwortlich sind. Als Aromakomponente in Kaffee wurde EHMF im Jahr 1978, in Melone 1991 und in Liebstöckel-Extrakt 1993 identifiziert (Huber, 1992; Blank und Schieberle, 1993). Eine weitere mikrobielle Beteiligung an der Biosynthese von EHMF zeichnete sich durch die Identifizierung der Verbindung im Aroma von Käse ab (Preininger und Grosch, 1994; Milo und Reineccius, 1997). 2004 folgte der Nachweis von EHMF in Himbeeren (Klesk und Mitarbeiter, 2004). Die kürzeste Synthesemethode von EHMF wird von Givaudan eingesetzt und basiert auf der Reaktion zwischen Pentennitril und Ethyllaktat, gefolgt von einem Oxidationsschritt mit Monoperoxisulfat (Huber, 1992). Erst seit 1998 wird EHMF industriell vermarktet und in erster Linie zur Intensivierung von Fruchtaromen eingesetzt.

2.3 EIGENSCHAFTEN

2.3.1 Keto-Enol-Tautomerie und Chiralität

Die Keto-Enol-Struktur der 4-Hydroxy-3(2H)-furanone führt zu vier Isomeren (Rodin und Mitarbeiter, 1965), wobei allerdings bislang weder die Diketo- noch die Dienolstruktur isoliert oder nachgewiesen wurden (Abb. B-3). Die Konstitutionsisomere von EHMF liegen in einem Verhältnis von 2:1 bzw. 3:1 (A:B) vor (Re und Mitarbeiter, 1973; Bruche und Mitarbeiter, 1995). Das reine Tautomer A von EHMF erhält man durch Kristallisation der Substanz aus Wasser. Sobald die Kristalle schmelzen, liegen wieder beide Tautomere vor (Huber, 1992). Sowohl HDMF, als auch DMMF und EHMF besitzen ein asymmetrisches C-Atom an der Position C-2 und gehören somit zur Gruppe der chiralen Verbindungen. Der Arbeitsgruppe um Mosandl (1990) gelang es zum ersten Mal, die beiden Enantiomere von HDMF durch HPLC-Analytik mit einer Säule, die mit einer chiralen Phase belegt war, zu separieren. Die Keto-Enol-Tautomerie, die besonders gut im stark sauren, neutralen und basischen Milieu abläuft, ist der Grund dafür, dass weder HDMF noch DMMF oder EHMF mit einem für enzymatische Reaktionen typischen Enantiomeren-Überschuss aus pflanzlichen Quellen isoliert wurden (Raab und Mitarbeiter, 2003; Bruche und Mitarbeiter, 1991). Lediglich das natürliche Vorkommen von diastereomeren HDMF- β -D-glucopyranosid im Verhältnis 3:1 konnte von Mayerl und Mitarbeiter (1989) beobachtet werden.

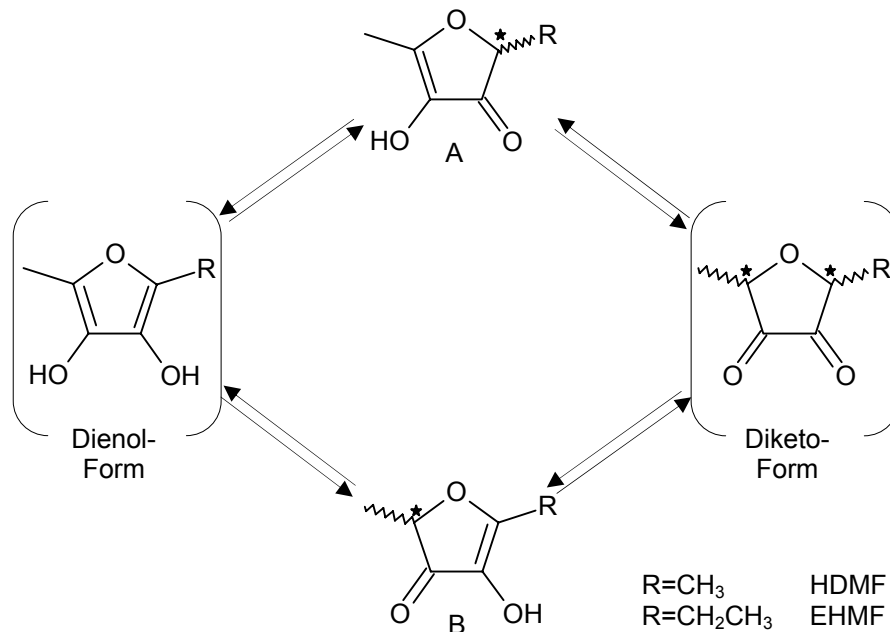


Abb. B-3: Tautomere Grenzstrukturen von 4-Hydroxy-3(2H)-furanonen; *Chiralitätszentren.

Zum ersten Mal gelang der Nachweis einer enantioselektiven Biosynthese von HDMF in Inkubationsexperimenten mit Erdbeerproteinextrakt und in Umsetzungsexperimenten mit der Hefe *Zygosaccharomyces rouxii* durch die Anwendung der Chiralphasen-Kapillarzonenelektrophorese (Raab und Mitarbeiter, 2003). Diese Methode wird üblicherweise für die Enantiomeren-Analytik von Pharmazeutika verwendet. Die erhaltenen Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass die an der Biosynthese von HDMF beteiligten Enzyme in der Erdbeere und in Hefen zunächst ein Enantiomer bevorzugt bilden. Der Überschuss geht dann allerdings durch die Keto-Enol-Tautomerie sehr schnell verloren und kann so nicht mehr nachgewiesen werden. Eine Herkunftsbestimmung über das Enantiomerenverhältnis ist bei diesen Verbindungen somit nicht möglich (Bruche und Mitarbeiter, 1995).

2.3.2 Sensorik

Bruche und Mitarbeiter (1995) bestimmten durch GC-Olfaktometrie-Analysen die Aromaeindrücke von HDMF als Karamell-ähnlich, malzig und süß, wohingegen in verdünnter Form eine Erdbeer- und Ananasnote die Oberhand gewinnt. DMMF wurde als süß, würzig und Sherry-ähnlich beschrieben. EHMF besitzt einen weniger süßen Aromaeindruck, nach Pfeifentabak und gerösteter Mandel. Diese angenehmen Aromaeindrücke der 4-Hydroxy-3(2H)-furanone resultieren aus ihrer planaren Oxo-Carbonyl-Struktur und der Fähigkeit Wasserstoffbrücken zu bilden (Ohloff, 1990). Die Substitution oder Entfernung der Enolgruppe führt zum Verlust der Aromaeigenschaften.

Die Geruchseigenschaften der verschiedenen Isomere unterscheiden sich stark. So zeigt das eine der beiden Enantiomere des HDMF intensiv die oben beschriebenen Aromaqualitäten, wohingegen das andere fast geruchlos ist. Gleiches gilt bei DMMF. EHMF liegt in vier Konstitutionsisomeren vor und nur eines davon, welches 12,5 % der gesamten EHMF-Menge ausmacht, besitzt die beschriebene Aromaaktivität (Bruche und Mitarbeiter, 1995).

Die veröffentlichten Geruchsschwellenwerte für HDMF liegen in einem Bereich von 0,5 bis 1,5 ng/L in Luft (Blank und Mitarbeiter, 1992, 1993) und von 0,03 bis 60 µg/kg in Wasser (Buttery und Mitarbeiter, 1994; Honkanen und Mitarbeiter, 1980). EHMF wurde mit Werten von 0,1-0,2 ng/L in Luft (Blank und Mitarbeiter, 1993) und 40 µg/kg in Wasser (Ohloff, 1978) beschrieben. Im selben Bereich liegen die Werte für DMMF (10 µg/kg, Hirvi und Honkanen 1982) wohingegen HMF mit 23 mg/kg (Ohloff, 1978) in Wasser einen weitaus höheren Geruchsschwellenwert besitzt.

2.3.3 Wichtige physikalische Eigenschaften und Stabilität

HDMF ist ebenso wie die anderen 4-Hydroxy-3(2H)-furanone sehr gut wasserlöslich und reagiert aufgrund seiner phenol-ähnlichen Struktur schwach sauer. Eine 2 %ige wässrige Lösung von HDMF weist einen pH-Wert von 2,8 auf (Buttery und Mitarbeiter, 1995). Somit ist HDMF schwächer als Essigsäure jedoch stärker als Phenol einzustufen. HDMF ist gegenüber Luftsauerstoff sehr empfindlich. Schon innerhalb weniger Tage schmilzt die vorher kristalline Substanz und der sensorische Eindruck verändert sich aufgrund von Oxidationsreaktionen (Hodge und Mitarbeiter, 1963; Henry und Silverstein, 1966). Allerdings lässt sich die Lagerzeit durch eine Stickstoffatmosphäre und niedrige Temperaturen verlängern (Henry und Silverstein, 1966). In wässrigen Lösungen ist die Halbwertszeit im sauren pH-Bereich um einige Faktoren höher als in neutralen Lösungen (Hirvi und Mitarbeiter, 1980). Die geringe Stabilität von HDMF hat zur Folge, dass bei den ersten beschriebenen gaschromatographischen Untersuchungen HDMF nur in niedrigen Mengen nachgewiesen wurde. Hohe Temperaturen und aktive Seitengruppen der GC-Trennphasen hatten noch vor der Detektion eine Zersetzung zur Folge. Der Einsatz von „fused-silica“ Kapillarsäulen brachte schließlich zuverlässigere Ergebnisse (Blank und Mitarbeiter, 1970; Schwab und Roscher, 1997).

EHMF ist eine klare, gelbliche Flüssigkeit und wird üblicherweise als Reinsubstanz (99 %) oder 20 %ige Lösung in Propylenglycol eingesetzt. Wie HDMF wird EHMF am Besten dunkel, unter 0 °C und in Stickstoffatmosphäre gelagert. Ältere Proben bekommen einen essigsäuren sensorischen Eindruck. Auch die Stabilität in Wasser geht mit der von HDMF einher (Huber, 1992). Aufgrund der enolischen Struktur sind EHMF und HDMF Ziel von elektrophilen Angriffen, weshalb sie z. B. mit Aldehyden reagieren (Huber, 1992).

2.3.4 Physiologische Eigenschaften

Erdbeerextrakte haben ein höheres antioxidatives Potential als andere Früchte. Zwar wird diese Eigenschaft hauptsächlich durch die vorhandenen phenolischen Strukturen begründet (Meyers und Mitarbeiter, 2003), allerdings besitzen 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanone aufgrund der Keto-Enol-Tautomerie auch phenolische Eigenschaften. Dies könnte der Grund sein, warum HDMF und EHMF als gute Antioxidantien, die Peroxylradikale abfangen können, beschrieben werden (Koga und Mitarbeiter, 1998). Sasaki und Mitarbeiter (1998) zeigten, dass HMF, HDMF und EHMF in der Linse von Rattenaugen antioxidativ wirksam sind und so gegen die Bildung von Katarakt helfen können. Deshalb beschäftigt sich die Kataraktforschung intensiv mit den Hydroxyfuranonen (Koga und Mitarbeiter, 1998).

Allerdings werden den Hydroxyfuranonen nicht nur positive Eigenschaften zugesprochen, denn Li und Mitarbeiter (1998) zeigten, dass von HMF, HDMF und EHMF DNA-Brüche induziert werden. Besonders in den asiatischen Teilen der Welt werden durch den Verzehr von prozessierten und fermentierten Lebensmitteln wie Sojasoße und Shoyu große Mengen an 4-Hydroxy-3(2*H*)-furanonen aufgenommen. Aus diesem Grund darf das genotoxische Risiko dieser Verbindungen nicht vernachlässigt werden. Bisher sind jedoch zum Metabolismus in Menschen nur wenige Daten vorhanden. Roscher und Mitarbeiter (1997 a) zeigten, dass die orale Aufnahme von HDMF, DMMF und HDMF- β -D-glucopyranosid in Form von Erdbeerfrüchten zur Ausscheidung von HDMF-Glucuronid über den Urin führt.

2.4 BILDUNG VON 4-HYDROXY-3(2H)-FURANONEN IN DER MAILLARD-REAKTION

Das grundlegende Prinzip der komplexen Reaktionsabfolgen der nicht-enzymatischen Bräunung, die auch als Maillard-Reaktion bekannt ist, ist die Reaktion von Carbonyl- mit Aminoverbindungen. In Lebensmitteln stehen hierzu vor allem Aminosäuren, Amine, Peptide und Proteine als Aminokomponenten zur Verfügung. Die Carbonylseite wird durch reduzierende Zucker, Aldehyd- und Ketoverbindungen abgedeckt. Die Reaktionen führen zu braunen Pigmenten, so genannten Melanoidinen, flüchtigen Verbindungen, die vielfach aromawirksam sind, Geschmacksstoffen, insbesondere Bitterstoffen, und Reduktonen, Verbindungen mit stark reduzierenden Eigenschaften die zur Stabilisierung des Lebensmittels beitragen können (Belitz und Grosch, 1992). Demzufolge spielt während der Zubereitung von Lebensmitteln die Maillard-Reaktion eine große Rolle bei der Entwicklung von Farb-, Aroma- und Geschmacksstoffen. Die Maillard-Reaktion hat aber auch negative Folgen, wie z. B. den Verlust von essentiellen Aminosäuren und die Bildung mutagener und karzinogener Substanzen (Belitz und Grosch, 1992). Zum besseren Verständnis der ablaufenden Reaktionsmechanismen wird die Maillard-Reaktion in Modellreaktionen vereinfacht nachgestellt. So entsteht HDMF als Produkt der Reaktion von 6-Desoxyzuckern, wie Rhamnose oder Fucose, mit Aminen oder Aminosäuren (Hodge und Mitarbeiter, 1963). Ausgehend von den stickstoffhaltigen Zwischenverbindungen, die mit der Stickstofffunktion einen Katalysator im Molekül enthalten (Abb. B-4), verlaufen diese Reaktionen unter viel mildereren Bedingungen, wie sie auch bei vielen Lebensmitteln gegeben sind, als die von Schieberle (1992) beschriebene direkte Bildung aus Hexosen oder Hexosephosphaten über Acetylformoin beim Backprozess in Brot (Abb. B-5). Zunächst findet die Bildung von Glykosylaminen statt, aus denen durch Wasserabspaltung die entsprechenden Amadoriprodukte entstehen. Diese werden zum 1-Desoxyoson abgebaut, welches als reaktive α -Dicarbonylverbindung viele verschiedene Folgeprodukte liefern kann (Abb. B-4) (Scarpellino und Soukup, 1993; Belitz und Grosch, 1992; Schwab und Roscher, 1997). Blank und Fay (1996) beschrieben auch die Bildung von HDMF aus einer Pentose durch die Addition eines C1-Körpers in Form eines Streckeraldehyds. Die thermische Bildung von EHMF ist bisher wenig erforscht (Blank und Fay, 1996). Schieberle (1992) fand heraus, dass auch Zuckerphosphate potente Vorläufer von HDMF in Maillard-Reaktionen darstellen. Hier spielt D-Fructose-1,6-diphosphat eine besondere Rolle. Die Phosphatgruppen sind gute Abgangsgruppen, was höhere Umsatzraten als bei nicht phosphorylierten Zuckern verursacht. Schieberle (1992) postulierte als ersten Schritt nach einer 2,3-Enolisierung die Abspaltung der Phosphatgruppe an C-1 und die Entstehung eines 1-Desoxyoson-6-phosphates. Acetylformoin wird schließlich durch weitere Enolisierungsschritte und die Abspaltung der zweiten Phosphatgruppe gebildet (Abb. B-5). Aus Acetylformoin kann HDMF nur durch eine Reduktion entstehen, welche durch eine Disproportionierung oder durch Reaktion mit reduzierenden Verbindungen, wie Ascorbinsäure, erfolgen kann.

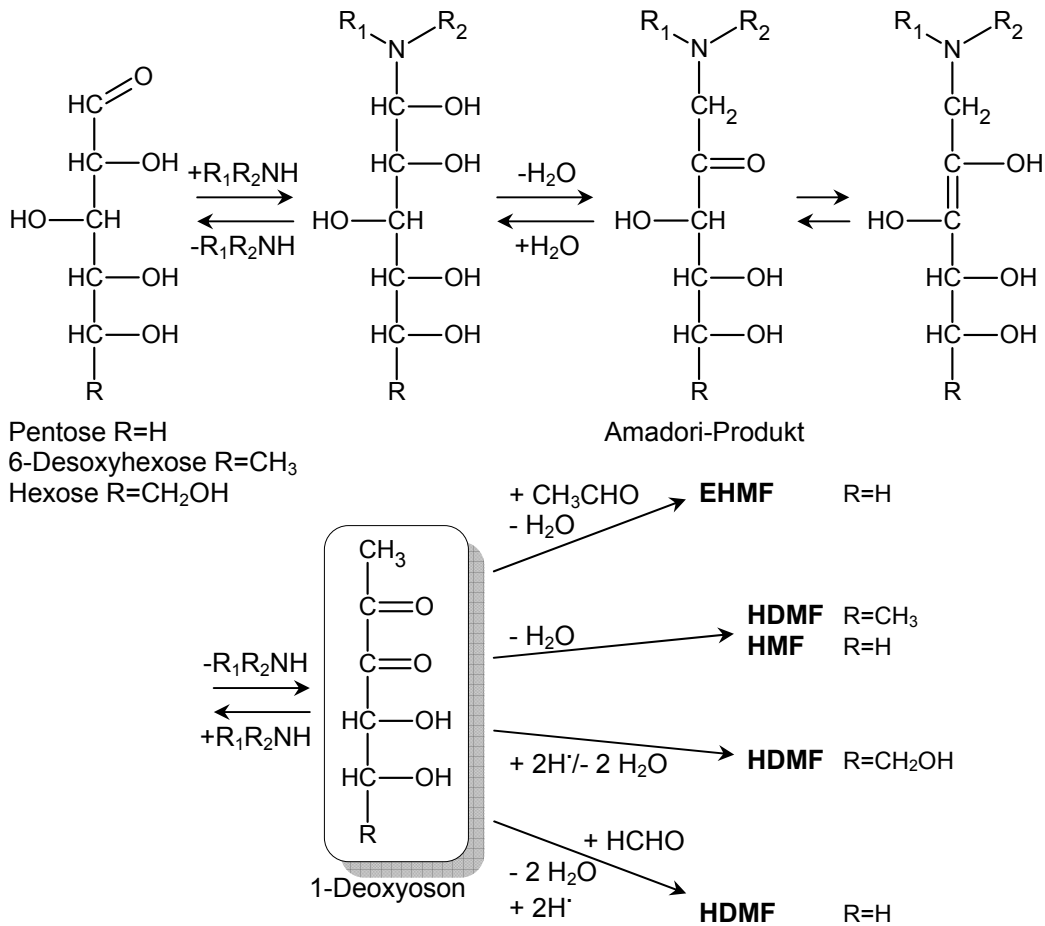


Abb. B-4: Postulierter Reaktionsweg für die Maillard-Reaktion ausgehend von 6-Desoxyhexosen, Pentosen bzw. Hexosen zur Bildung von HDMF, EHMF und HMF; R₁, R₂ = Aryl, Alkyl (Schwab und Roscher, 1997; Blank und Fay, 1996).

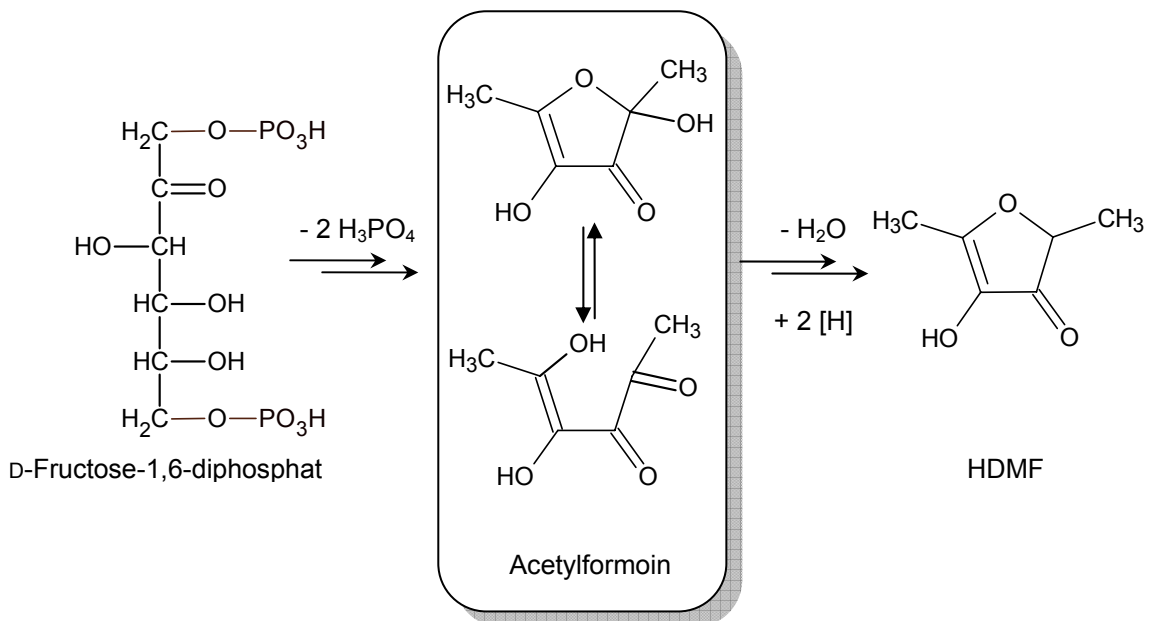


Abb. B-5: Hypothetischer Reaktionsweg (stark verkürzt) ausgehend von D-Fructose-1,6-diphosphat über Acetylformoin (offenkettige und Ring-Form) zu HDMF; (Schieberle, 1992).

2.5 BIOSYNTHESE VON HDMF UND SEINEN DERIVATEN IN DER ERDBEERFRUCHT

Die Biosynthese von HDMF in Erdbeerfrüchten ist seit 1992 Thema der Fachliteratur. Die direkte Proportionalität des Gehaltes an HDMF zum Gehalt an Methylpentosen, wie L-Rhamnose und L-Fucose, in Erdbeeren veranlasste Pisarnitskii und Mitarbeiter (1992) anzunehmen, dass diese Verbindungen die Vorläufer von HDMF in einer in der Erdbeere ablaufenden Maillardreaktion darstellten.

Zabetakis und Mitarbeiter (1995, 1996a, 1996b) führten Metabolisierungsstudien mit 6-Desoxy-D-fructose in Erdbeerkalluskulturen durch und konnten anschließend eine vermehrte Bildung an HDMF- β -D-glucopyranosid feststellen. Aus diesem Ergebnis wurden zwei Biosynthesewege für HDMF und sein Glucosid vorgeschlagen. Schlüsselkomponente in beiden Reaktionsfolgen ist, im Zusammenspiel mit Methylobakterien gebildetes, D-Lactaldehyd welches mit Dihydroxyacetonphosphat eine aldolasekatalysierte Reaktion eingeht und so 6-Desoxy-D-fructose-1-phosphat bildet. Der postulierte Weg zum D-Glucosid läuft über die Verknüpfung der dephosphorylierten Verbindung mit D-Glucose zu einem D-Desoxyanalogon der Saccharose. Dieses wird anschließend durch nicht näher beschriebene Reaktionen in das HDMF- β -D-glucopyranosid umgewandelt. HDMF soll hingegen über einen anderen Mechanismus, nämlich die Metabolisierung von 6-Desoxy-D-fructose-1-phosphat durch eine Phosphatdehydrogenase und eine Alkoholdehydrogenase entstehen. Zabetakis und Mitarbeiter (1999) postulieren folglich zwei unterschiedliche Biosynthesewege für HDMF und sein Glucosid in Erdbeerkalluskulturen. Aus der gleichen Arbeitsgruppe (Orruño und Mitarbeiter, 2001) stammen Untersuchungen zu einer β -Glucosidase aus Erdbeerfrüchten, die von den Autoren mit der Bildung von HDMF aus seinem Glucopyranosid in Verbindung gebracht wird.

Die Studien von Hequet und Mitarbeitern (1996) in Hefekulturmedien zeigten, dass für die Biosynthese von HDMF in Hefen D-Fructose-1,6-diphosphat den besten Prekursor darstellt. Diese wurde durch Studien von Roscher und Mitarbeiter (1997 b), die Untersuchungen zur Aufklärung des Biosyntheseweges von HDMF in der Erdbeere durchführten, bestätigt. Nach Applikation radioaktiv markierter Verbindungen an Erdbeerfrüchte konnte basierend auf den unterschiedlichen Einbauraten von D-Glucose, D-Glucose-6-phosphat, D-Fructose und D-Fructose-1,6-diphosphat (in ansteigender Reihenfolge) der in Abb. B-6 gezeigte Biosyntheseweg von HDMF in der Erdbeerfrucht postuliert werden (Roscher und Mitarbeiter, 1998). Die von Schwab 1998 nachgewiesene vollständige Inkorporation der C₆-Kette von ¹³C₆-D-Fructose in HDMF untermauerte dieses Ergebnis. Zusätzlich konnte in keiner Studie beobachtet werden, dass einer der von Zabetakis und Mitarbeitern (1997) oder Pisarnitskii und Mitarbeitern (1992) postulierten Vorläufer D-Lactaldehyd oder L-Rhamnose bzw. L-Fucose in HDMF oder seine Derivate transformiert wurde. Durch die Quantifizierung von HDMF, DMMF und HDMF- β -D-glucopyranosid während verschiedener Reifestadien der Erdbeerfrucht beschrieb die Arbeitsgruppe um Pérez (1996) zum ersten Mal HDMF als

Vorläufer seiner Derivate. Roscher und Mitarbeitern (1997 b) gelang es durch die Applikation von radioaktiv markiertem S-Adenosyl-L-methionin (SAM) und HDMF an Erdbeerfrüchte und die anschließende Wiederfindung der Markierung in DMMF und HDMF- β -D-glucopyranosid dieses Ergebnis zu bestätigen.

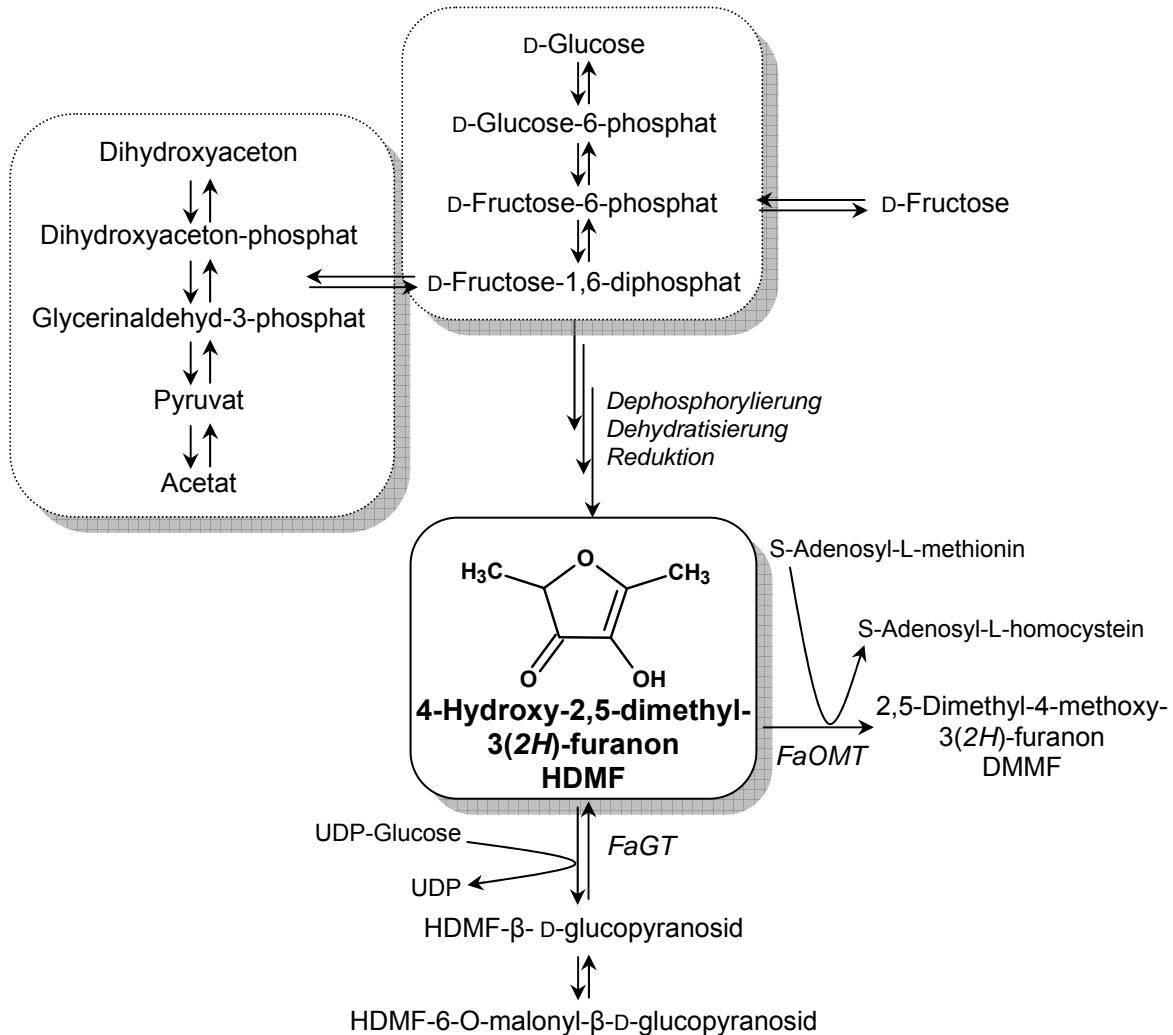


Abb. B-6: Postulierter Biosyntheseweg von HDMF und seinen Derivaten in der Erdbeerfrucht (Roscher und Mitarbeiter, 1998); *Fragaria ananassa* O-Methyltransferase (FaOMT); *Fragaria ananassa* Glycosyltransferase (FaGT).

Auch Wein und Mitarbeiter (2001) konnten keinen Einbau von stabil markierter 1-Desoxy-D-fructose und 6-Desoxyhexosen nachweisen, was die Biosynthese von HDMF in Erdbeerfrüchten von der Bildung in Erdbeerkalluskulturen, wie sie von Zabetakis und Mitarbeitern (1996) beschrieben wird, unterscheidet. Im Jahre 2002 gelang es eine O-Methyltransferase aus Erdbeeren (FaOMT), welche zuvor von Lavid und Mitarbeitern (2002) in Erdbeerfrüchten identifiziert werden konnte, heterolog zu exprimieren und so die Entstehung von DMMF aus HDMF endgültig zu beweisen (Wein und Mitarbeiter, 2002).

Abbildung B-6 fasst die Ergebnisse der Studien von Pérez und Mitarbeitern (1996, 1999), Roscher und Mitarbeitern (1997 b, 1998), Schwab (1998) und Wein und Mitarbeitern (2001) zusammen.

2.6 BIOSYNTHESE VON EHMF DURCH HEFEN

Bisher wurde EHMF vor allem als Aromastoff in Sojasoße und Miso beschrieben (Sasaki, 1996; Nunomura und Mitarbeiter 1976; Hayashida und Mitarbeiter, 1998). Von Sasaki und Mitarbeitern (1991) ist gezeigt worden, dass EHMF von der zur Fermentation der Lebensmittel eingesetzten Hefe *Zygosaccharomyces rouxii* synthetisiert wird. Durch die Zugabe von potentiellen Vorläufern von EHMF zu reinem Hefemedium konnten mit dem Bariumsalz von D-Sedoheptulose-7-phosphat (15,26 ppm EHMF), D-Ribulose-5-phosphat (28,90 ppm EHMF) und D-Xylulose-5-phosphat (44,34 ppm EHMF) die höchsten Mengen an EHMF gebildet werden. Die Hefe bevorzugt somit phosphorylierte Kohlenhydrate als Vorläuferverbindungen. Aus diesem Grund wird postuliert, dass die Biosynthese von EHMF in Hefen eng mit dem Pentose-Phosphat-Zyklus verknüpft ist und über das aus den Sojabohnen freigesetzte D-Xylulose-5-phosphat abläuft (Sasaki, 1996).

3 NAD(P)H-ABHÄNGIGE CHINONOXIDOREDUKTASEN

Enzyme können anhand der von ihnen katalysierten Reaktion in verschiedene, numerisch geordnete Klassen eingeteilt werden. Die erste dieser sechs Enzymhauptklassen ist die der Oxidoreduktasen. Diese Enzyme haben die Fähigkeit Redoxreaktionen meist mit Hilfe eines Cosubstrates, wie NAD(P)H, zu katalysieren. Zu dieser Klasse gehören auch die NAD(P)H-abhängigen Chinonoxidoreduktasen. In Säugetieren wurde ein solches Enzym erstmals unter dem Namen DT-Diaphorase (EC 1.6.99.2) von Ernster (1958) entdeckt. Cadenas (1995) beschrieb die DT-Diaphorase als einzigartiges Enzym, weil sie unspezifisch gegenüber NADH und NADPH reagiert und ein breites Substratspektrum, von Chinonen über Chinonimine bis hin zu aromatischen Nitroverbindungen, akzeptiert. Eine weitere für die Zelle wichtige Eigenschaft ist die von der DT-Diaphorase obligatorisch durchgeführte Zwei-Elektronen-Übertragung. Hierbei werden zwei einzelne Elektronen nacheinander auf das Chinon und das intermediär entstehende Semichinonradikal übertragen (Abb. B-7). Semichinonradikale sind jedoch auch in der Lage Elektronen an molekularen Sauerstoff abzugeben, so dass Sauerstoffradikalanionen und wiederum Chinone entstehen. Diese Sauerstoffspezies können fatale Schäden in der Zelle verursachen, was allgemein auch unter oxidativem Stress bekannt ist. Im Fall der DT-Diaphorase kommt das reaktive und selbst auch toxische Semichinonradikal nicht aus dem Enzym-Substrat-Komplex frei, und es entstehen durch zwei nacheinander ablaufende Ein-Elektronen-Übertragungen (Iyanagi, 1987; Cadenas, 1995) direkt stabile Hydrochinone. Diese können konjugiert und ausgeschieden werden, weshalb die Aktivität der DT-Diaphorase seit langem als Entgiftungsvorgang gewertet wird. Cadenas (1995) steht dieser Aussage kritisch gegenüber, da durch die Zwei-Elektronen-Übertragung auf Nitroverbindungen Nitrosamine hervorgehen und somit auch toxische Produkte durch die DT-Diaphorase entstehen. Obwohl in Pflanzen bisher keine Enzyme mit Ähnlichkeiten zur Sequenz der DT-Diaphorase nachgewiesen wurden, werden pflanzliche Chinonoxidoreduktasen dennoch gerne in die Klassen der DT-Diaphorase-ähnlichen und die der ζ -Crystallin-ähnlichen Enzyme eingeteilt.

Crystalline sind Strukturproteine der Augenlinse und wurden auch in Leber- und Nierengewebe nachgewiesen (Rao und Mitarbeiter, 1992). Sie werden unterteilt in ubiquitär in Wirbeltieren vorkommende (α -, β - und γ -Crystallin) und in taxon-spezifische Crystalline. Generell sind Crystalline für die Struktur der Linse verantwortlich. Da in der Linse nur begrenzt Möglichkeiten der Reproduktion zur Verfügung stehen, werden besonders stabile Konformationen benötigt (Bórras und Mitarbeiter, 1989). Interessant sind hierbei die taxon-spezifischen Crystalline. Es wird angenommen, dass sie von anderen, am Metabolismus beteiligten, Enzymklassen rekrutiert wurden und so die verschiedenen Eigenschaften dieser Enzymklassen aufweisen. So besitzt z. B. λ -Crystallin aus Hasen die Eigenschaften einer Hydroxyacyl Coenzym A Dehydrogenase (Bórras und Mitarbeiter, 1989). Für Chinonoxidoreduktasen interessanter ist das aus Meerschweinchen isolierte ζ -Crystallin mit

den Eigenschaften einer Alkoholdehydrogenase (ADH) (Rao und Mitarbeiter, 1997). Bórras und Mitarbeiter (1989) vertiefen an diesem Enzym die „Rekrutierungstheorie“, indem sie behaupten, dass ζ -Crystallin alle für die Linse wichtigen Eigenschaften der ADH übernommen und gleichzeitig die nachteiligen Eigenschaften ausgeschaltet hat. Das Protein weist u. a. die gleiche stabile Tertiärstruktur und Coenzymbindungsstelle auf. Dahingegen besitzt ζ -Crystallin weniger Thiolgruppen als die ADH und auch die Bindungsstelle des reaktiven Zn-Atoms wurde entfernt. Die Tatsache, dass Glycin die am häufigsten konservierte Aminosäure in den beiden Sequenzen der Alkoholdehydrogenase und des ζ -Crystallin ist, weist laut den Studien der Arbeitsgruppe um Bórras darauf hin, dass es sich hierbei um entfernt verwandte Enzyme handelt, die eine ähnliche Tertiärstruktur besitzen. Das aus Meerschweinchen isolierte ζ -Crystallin (Rao und Mitarbeiter, 1992) enthält keinen Flavin-Cofaktor und ist ein Homotetramer. Es katalysiert bei chinoiden Substraten eine Ein-Elektronen-Übertragung und produziert somit im Gegensatz zur DT-Diaphorase die sehr reaktiven Semichinonradikale, welche die Entstehung von Sauerstoffradikalanionen verursachen können. Dies hat zur Folge, dass die Aktivität der ζ -Crystalline den oxidativen Stress der Zelle erhöhen kann. Die Proteine aus Augenlinsen sollen aus diesem Grund sogar eine Ursache für die Bildung von grauem Star sein (Rao und Mitarbeiter, 1992).

Obwohl die in der Literatur beschriebenen Oxidoreduktasen teilweise vergleichbare Reaktionen katalysieren, fällt die Zuordnung anhand von Sequenzähnlichkeiten recht schwer. Oft stimmen lediglich die Sequenzen der Cofaktor-, Cosubstrat- oder Metallbindungsstellen überein. Edwards und Mitarbeiter (1996) schlagen deshalb vor, Verwandtschaften mit Hilfe der dreidimensionalen Strukturen durch so genanntes „*homology modeling*“ zu überprüfen. Auf diese Weise gelingt es, die drei Enzymklassen Alkoholdehydrogenase (ADH) aus Leber, Glucose Dehydrogenase (GDH) aus *Thermoplasma acidophilum* und Chinonoxidoreduktase (QR) aus *E. coli* in der Familie der „*medium chain dehydrogenases/reductases*“ (mittelkettige Dehydrogenasen/Reduktasen, MDR) zusammenzufassen. Diese Enzyme weisen wie ζ -Crystallin eine sehr ähnliche dreidimensionale Struktur auf, unterscheiden sich allerdings stark in ihren Funktionen.

Die Familie der MDR kann anhand des Vorliegens einer Zink-Bindungsstelle in Dehydrogenasen, welche per Definition Zink gebunden haben, und Reduktasen, welche ohne Metallionen aktiv sind, unterteilt werden (Edwards und Mitarbeiter, 1996).

Neben der Klassifizierung von Chinonoxidoreduktasen über die Gensequenzen werden diese oft in ζ -Crystallin-ähnliche und DT-Diaphorase-ähnliche Enzyme eingeteilt. Dieser Klassifizierung liegt hauptsächlich der unterschiedliche Reaktionsmechanismus, eine Ein-Elektronen- oder eine Zwei-Elektronen-Übertragung, zu Grunde.

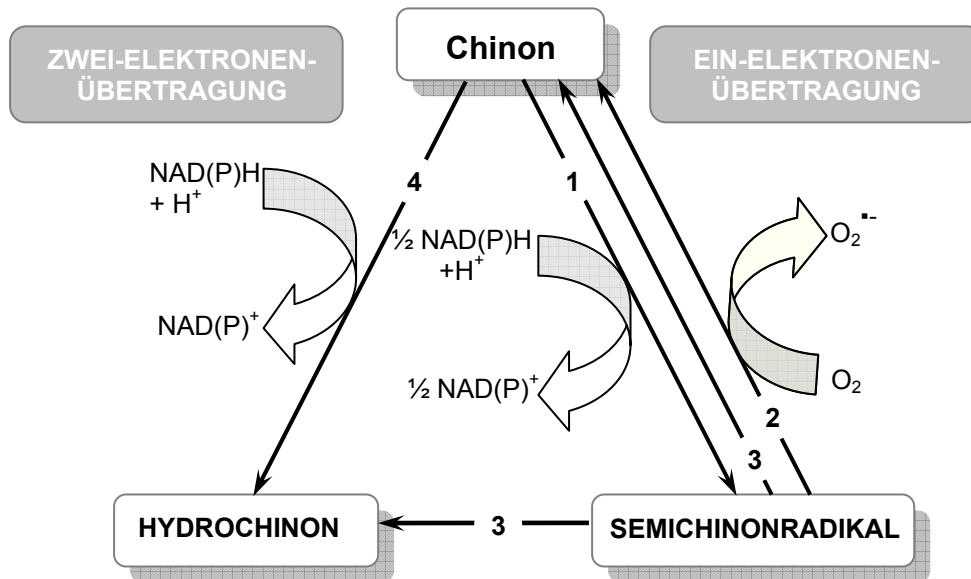


Abb. B-7: Reaktionsmechanismen von NAD(P)H-abhängigen Chinonoxido-reduktasen nach Maruyama und Mitarbeiter (2003) und Mano und Mitarbeiter (2000). Ein-Elektronen-Reduktion des Chinons (1), Oxidation des Semichinonradikals und Bildung von Superoxidradikalanionen (2), Disproportionierung von Semichinonradikalen zum Hydrochinon und Chinon (3), Zwei-Elektronen-Reduktion des Chinons (4).

Deshalb wird die von Sparla und Mitarbeitern (1999) sequenzierte und heterolog exprimierte erste pflanzliche Chinonoxido-reduktase aus *Arabidopsis thaliana* den DT-Diaphorase-ähnlichen Enzymen zugeordnet. Dieses Enzym ist ein Homotetramer, benötigt den Cofaktor Flavin-Mononucleotid (FMN), und katalysiert eine Zwei-Elektronen-Übertragung über einen „ping-pong“-Mechanismus. Eine in einer Basidiomyceten-Art beschriebene Chinonoxido-reduktase zeigt ebenfalls das genannte Reaktionsmuster und weist einen dimerischen Aufbau auf. Das native Protein enthält FMN und akzeptiert wie die DT-Diaphorase NADH und NADPH (Brock und Mitarbeiter, 1995). Sequenzähnlichkeiten zur DT-Diaphorase in der Flavinbindungsstelle wurden für eine Chinonoxido-reduktase aus der parasitischen Pflanze *Triphysaria versicolor* von Wrobel und Mitarbeitern (2002) beschrieben. Auch dieses Enzym bevorzugt kein Cosubstrat. Oftmals wird auch die Hemmung durch den Inhibitor Dicumarol als Kriterium beschrieben, da dieser als spezifischer Inhibitor der DT-Diaphorase gehandelt wird. Allerdings beschreiben Winski und Mitarbeiter (2001), dass Dicumarol kompetitiv gegen das Cosubstrat wirkt, in dem es sich reversibel an dessen Bindungsstelle anlagert. Ein Nachteil sei aber, dass der Hemmgrad stark abhängig vom umgesetzten Substrat sei. Dennoch wurde für viele Chinonoxido-reduktasen ihr Verhalten in Gegenwart von Dicumarol getestet. So auch für eine aus *Escherichia coli* beschriebene lösliche Chinonoxido-reduktase (Thorn und Mitarbeiter, 1995). Dieses Enzym zeigt keinerlei Einfluss von Dicumarol auf seine Aktivität. Auch die Cofaktorverwendung, die Bevorzugung von NADPH gegenüber NADH, passt nicht

ins Schema der DT-Diaphorase. Lediglich der dimerische Aufbau und die Zwei-Elektronen-Übertragung bieten Übereinstimmungen.

Eine Ein-Elektronen-Übertragung wie vom ζ -Crystallin wird von der in *Staphylococcus aureus* beschriebenen multimeren Chinonoxidoreduktase, welche durch oxidativen Stress induziert wird, katalysiert (Maruyama und Mitarbeiter, 2003). Außerdem wird von diesem Enzym NADPH bevorzugt verwendet und kein Flavin benötigt. Ebenso als ζ -Crystallin-ähnliches Enzym wird eine Chinonoxidoreduktase aus *A. thaliana* (Mano und Mitarbeiter, 2000 a, b) gehandelt. Der Reaktionsmechanismus und das Substratspektrum dieses dimeren Enzyms ähneln dem des ζ -Crystallins aus Meerschweinchen (Rao und Mitarbeiter, 1992). Es stellt aber gleichzeitig das erste Enzym dieser Familie dar, das eine Umsetzung von Azodicarbonylen katalysiert. Die Besonderheit ist, dass das hierfür verwendete Substrat, Diamid, anders als die eingesetzten Chinone über eine Zwei-Elektronen-Übertragung reduziert wird. Ebenso beschrieben Dick und Mitarbeiter (2001; 2004a) ein Enzym aus Rattenleber, welches abhängig vom zur Verfügung stehenden Substrat zwei verschiedene Reaktionen katalysieren kann. In diesem Fall ist das Enzym in der Lage die Hydroxyfunktion in Leukotrien B4 zu oxidieren und α , β -ungesättigte Aldehyde oder Ketone zu reduzieren. Hierbei erfolgt nicht etwa die Reduktion der Carbonylgruppe sondern der Doppelbindung. Auch Mano und Mitarbeiter (2002) konnten die Reduktion der Doppelbindung von α , β -ungesättigten Aldehyden und Ketonen durch das Enzym aus *A. thaliana* nachweisen. Diese Fähigkeit, in Abhängigkeit des zur Verfügung stehenden Substrates, verschiedene Reaktionsmechanismen zu katalysieren, besitzt auch ein Enzym aus der Familie der Aldo-Keto-Reduktasen (AKR). AKRs katalysieren die Reduktion einer Carbonylgruppe zum entsprechenden Alkohol. Schlegel und Mitarbeiter (1998) verglichen biochemisch eine native und eine im aktiven Zentrum veränderte AKR. Um den Reaktionsmechanismus genauer studieren zu können, wurde eine Aminosäure aus der katalytischen Tetrade, der mutmaßliche Säure-Base-Katalysator Tyr 55, mutiert. Das veränderte Protein verlor die Eigenschaft die Reduktion des physiologischen Substrates (wie z. B. Steroidhormone, Prostaglandine, Aldehyde aus biogenen Aminen, Monosaccharide) zu katalysieren. Es war aber immer noch in der Lage, das nicht-physiologische Substrat PQ umzusetzen. Schlegel und Mitarbeiter (1998) folgerten aus ihren Ergebnissen, dass die Umsetzung von PQ und die Reduktion des physiologischen Substrates über zwei verschiedene Reaktionsmechanismen ablaufen. Viele Mitglieder der Familie der AKR können neben den eigentlichen Substraten auch nicht-physiologische Substrate umsetzen und es ist zu vermuten, dass auch hier zwei verschiedene Reaktionsmechanismen in Abhängigkeit vom zur Verfügung stehenden Substrat katalysiert werden (Schlegel und Mitarbeiter, 1998).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die auf dreidimensionalen Strukturähnlichkeiten basierende Familie der „*medium chain dehydrogenases/reductases*“

Chinonoxidoreduktasen und ζ -Crystallin beinhaltet. Gleichzeitig werden Chinonoxidoreduktasen anhand ihres Reaktionsmechanismus in DT-Diaphorase-ähnliche, also Zwei-Elektronen-übertragende, und ζ -Crystallin-ähnliche, Ein-Elektronen-übertragende Enzyme eingeteilt. Allerdings wurden in letzter Zeit auch Oxidoreduktasen beschrieben, die abhängig von dem ihnen zur Verfügung stehenden Substrat beide Mechanismen katalysieren. Die Einteilung angesichts von Sequenzähnlichkeiten ist in dieser Familie schwierig und nur aufgrund von Übereinstimmungen in bestimmten Domänen möglich.

4 AUFGABENSTELLUNG

Aus den Ergebnissen vorangegangener Studien zum Biosyntheseweg und Metabolismus von HDMF (Pérez und Mitarbeiter, 1992, 1996; Roscher und Mitarbeiter, 1997 b, 1998; Schwab, 1998) postulierten Roscher und Mitarbeiter 1998 den in Abbildung B-6 gezeigten Biosyntheseweg von HDMF. Lavid und Mitarbeiter (2002) und Wein und Mitarbeiter (2001, 2002) konnten diesen durch ihre Ergebnisse bestätigen.

In Vorarbeiten gelang es, die Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat mit dem Vorliegen eines bestimmten Proteins aus reifen Erdbeeren zu korrelieren (Raab, 2004). Aufgrund der notwendigen chemischen Reaktionen, Dephosphorylierung, Dehydratisierung und Reduktion, und der zur Umsetzung benötigten Zeitspannen von bis zu 24 h wurde angenommen, dass nicht nur ein enzymatischer Schritt abläuft. Vielmehr wurde postuliert, dass in den *in vitro* Studien aus D-Fructose-1,6-diphosphat chemisch eine Zwischenstufe entsteht, welche schließlich das enzymatische Substrat darstellt. Die Sequenzierung des isolierten Proteins scheiterte zunächst aufgrund einer N-terminalen Blockierung. Auch die Bromcyan-Spaltung brachte zu Beginn keine Ergebnisse, was darauf hindeutete, dass neben dem Start-Methionin kein weiteres Methionin in der Proteinsequenz enthalten war. Durch eine unspezifische säurekatalysierte Spaltung und die anschließende Sequenzierung konnten schließlich Peptide dieses ca. 34 kDa großen Enzyms erhalten werden (Raab, 2004).

Parallel zu diesen Experimenten sind Studien zu reifekorreliert exprimierten Genen in der Erdbeerfrucht durchgeführt worden. Hierbei wurde eine cDNA, kodierend für eine putative Chinonoxidoreduktase (*FaQR*, AY158836), erhalten. Das korrespondierende Protein hatte eine Größe von ca. 34 kDa, wies die sequenzierten Peptid-Bruchstücke des isolierten Enzyms auf und enthielt nur das Start-Methionin in der Proteinsequenz. Aufgrund dieser Hinweise wurde angenommen, dass die klonierte cDNA das entsprechende Gen des isolierten Enzyms darstellt (Raab und Mitarbeiter, 2006).

Ziel dieser Arbeit war es, nach heterologer Expression, durch die biochemische Charakterisierung des rekombinanten Proteins zu zeigen, dass es sich hierbei um das HDMF-bildende Enzym aus der Erdbeerfrucht handelt.

Parallel dazu sollte ein Gen bzw. Protein aus der Tomatenfrucht, welches aufgrund einer Datenbankabfrage große Ähnlichkeit mit dem vermuteten HDMF-bildenden Gen bzw. Enzym der Erdbeerfrucht aufwies, kloniert, heterolog exprimiert und funktionell charakterisiert werden.

Im Laufe der Studien stellte sich heraus, dass es sich bei den putativen Chinonoxidoreduktasen aus der Erdbeerfrucht (*FaQR*) und der Tomatenfrucht (*LeQR*) korrekterweise um Enonoxidoreduktasen handelt, weshalb eine Umbenennung in *FaEO* (identische Sequenz wie *FaQR*) und *LeEO* (identische Sequenz wie *LeQR*) erfolgte.

C ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1 HETEROLOGE EXPRESSION UND CHARAKTERISIERUNG EINER *FRAGARIA ANANASSA* ENONOXIDOREDUKTASE (FAEO) UND EINER *LYCOPERSICUM ESCULENTUM* ENONOXIDOREDUKTASE (LEEO) ALS CHINONOXIDOREDUKTASEN

1.1 EXPRESSION UND AUFREINIGUNG VON FAEO

Zur heterologen Expression von FaEO wurde der Vektor pET 29a(+) (Novagen, San Diego, USA) verwendet. Neben einer für einen S•TagTM kodierenden Sequenz am N-terminalen Ende enthält dieser Vektor auch die kodierende Sequenz für einen His•TagTM am C-terminalen Ende. Nach erfolgreicher Expression entsteht somit ein Fusionsprotein mit der Zielsequenz, sowie His- und S-Tag. Diese bieten Möglichkeiten das Enzym mittels Affinitätschromatographie zu isolieren. Als Wirt diente der proteasedefiziente *E. coli*-Stamm BL 21 (DE3) *pLysS* (Novagen, San Diego, USA). Im Gegensatz zu höheren Temperaturen (30 °C, 37 °C) konnten bei einer Expressionstemperatur von 16 °C durch die verlangsamte Proteinsynthese größere Mengen natives und funktionstüchtiges Proteins erhalten werden (Lilie und Mitarbeiter, 1998). Als Kontrolle wurde eine *E. coli*-Kultur verwendet, die ebenso den Vektor pET 29a (+) jedoch ohne die kodierende Sequenz für das Zielprotein enthielt.

Das Fusionsprotein ist mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt worden. Die Reinheit des Proteins wurde durch die Auftrennung mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung und die Identität durch einen Western Blot überprüft.

Wie in Abb. C-1-1 zu sehen, handelt es sich um ein Zielprotein mit dem Molekulargewicht von ca. 35 kDa, wobei die sechs Histidinreste des His-Tags nur knapp 1 kDa davon ausmachen. Trotz der Affinitätschromatographie enthielt die Lösung noch verschiedene andere, bakterielle Proteine, auch wenn das Zielprotein die mit Abstand höchste Konzentration aufwies. Wie sich bei Substratstudien herausstellte, zeigen diese Verunreinigungen, welche auch in der Kontrolle auftraten, Chinonoxidoreduktase-Aktivität. Es wird vermutet, dass es sich in diesem Fall um eine bakterielle Chinonoxidoreduktase handelt, wie sie bereits mehrmals in *E. coli* beschrieben wurde (Lilley und Mitarbeiter, 1993; Edwards und Mitarbeiter, 1994; Thorn und Mitarbeiter, 1995 und Hayashi und Mitarbeiter, 1996). Das von Edwards und Mitarbeiter (1994) beschriebene bakterielle Enzym weist eine monomere Größe von 35 kDa auf, liegt aber als Dimer vor. Auch die anderen Enzyme haben ein Molekulargewicht welches größer als 50 kDa ist. Deshalb wurde zum weiteren Reinigen von FaEO, das nativ als Monomer mit ca. 35 kDa vorliegt, die von Raab und Mitarbeiter (2006) beschriebene Methode der Ultrafiltration gewählt. Zur Kontrolle der Reinigungsschritte wurde eine Proteinfraction aus einer *E. coli*-Kultur, welche mit dem „leeren“ Vektor transformiert worden war (pET), mit der gleichen Methode gereinigt.

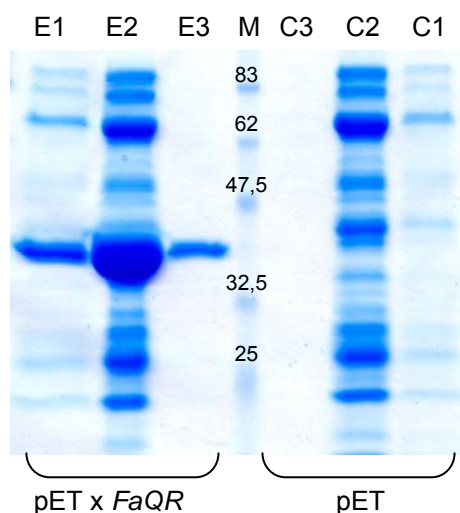


Abb. C-1-1 SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung des Zielproteins (pET x *FaQR*, E1-E3) bzw. der Kontrolle (pET, C1-C3); Reinigung mittels Affinitätschromatographie (E1/C1), konzentrierte Lösung (E2/C2) sowie zusätzliche Reinigung durch Ultrafiltration (E3/C3) und Molekulargewichtsmarker (M).

Mit Hilfe der Ultrafiltration konnten alle störenden Proteine vollständig entfernt und eine homogene Lösung des Zielproteins erhalten werden (Abb. C-1-1). Wenn nicht anders beschrieben, wurden die folgenden Ergebnisse mit Proteinfractionen erhalten, die durch Affinitätschromatographie und Ultrafiltration aufgereinigt worden waren.

1.2 CHARAKTERISIERUNG VON FAEO

1.2.1 Substratscreening

Basierend auf dem Vergleich der cDNA-Sequenz mit Datenbankeinträgen wurde FaEO zunächst der Klasse der NAD(P)H-abhängigen Chinonoxidoreduktasen zugeordnet. Aus diesem Grund wurden zu Beginn die in der Literatur gängigen chinoiden Substanzen Juglon, Ubichinon, Menadion, 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon, Durochinon und PQ als mögliche Substrate getestet (Abb. C-1-2). Der Nachweis einer enzymatischen Umsetzung erfolgte hauptsächlich photometrisch über die Absorptionsabnahme bei 340 nm durch die Oxidation des benötigten Cosubstrates NADH. Auch HPLC-MS/MS-Analysen der Reaktionsansätze wurden durchgeführt um eventuell neu entstandene Produkte zu detektieren. Mit Proteinextrakten, gewonnen ohne den Ultrafiltrationsschritt, konnte wahrscheinlich aufgrund der beschriebenen Kontamination mit bakteriellen Chinonoxidoreduktasen (Kap. C.1.1) am Photometer mit fast allen chinoiden Substraten enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu setzte das reine FaEO keines der getesteten *p*-Chinone um. Ausschließlich das *o*-Chinon Phenanthrenchinon (PQ), eine künstliche Verbindung aus der

Farbstoffsynthese, wurde als Substrat akzeptiert. Allerdings zeigte sich in den HPLC-MS/MS-Analysen keine neue Verbindung, nur photometrisch konnte die Umsetzung verfolgt werden.

Da mit PQ ein *o*-Chinon als Substrat akzeptiert wurde, wurde die weitere Substratsuche auf Verbindungen mit *o*-Ketogruppen gelenkt. Getestet wurden neben PQ, *o*-Cyclohexandion, 3,5-Di-*tert*-butyl-1,2-benzochinon, Biacetyl und Benzil (Abb. C-1-2). Doch schien eine *o*-Diketogruppe alleine als Strukturmerkmal für FaEO nicht ausreichend zu sein, denn keine der Verbindungen mit Ausnahme von PQ wurde als Substrat akzeptiert.

Daneben wurden *E2*-Hexenal, *E3*-Hexen-2-on und Diamid (Abb. C-1-2) als Substrate getestet. Mano und Mitarbeiter (2000 a, b, 2002) sowie Dick und Mitarbeiter (2004) beschrieben Oxidoreduktasen, welche neben der eigentlichen Reaktion eine zweite, nämlich die Reduktion der Doppelbindung in α , β -ungesättigten Aldehyden oder Ketonen katalysierten. Bei der Verwendung dieser Substrate wurden nicht nur mit Photometer und HPLC-MS Untersuchungen durchgeführt, die Reaktionsansätze wurden auch mittels GC-MS auf eventuell gebildete Reaktionsprodukte hin untersucht. Es konnten jedoch weder eine Oxidation von NADH noch enzymatische Produkte nachgewiesen werden. Die zum Teil aus der Ligninbiosynthese bekannten Verbindungen *p*-Coumarsäure, Zimtaldehyd, Dimethoxzimtsäure und Ferulasäure (Abb. C-1-2) wurden zum Einen wegen ihrer α , β -ungesättigten Keto- bzw. Aldehydfunktionen, zum Anderen weil kurzfristig postuliert wurde, dass FaEO eine Rolle in der Ligninbiosynthese spielen könnte, eingesetzt. Keine dieser letztgenannten Verbindungen sowie 5-Hydroxyflavon und 7-Hydroxyflavon wurde durch FaEO umgesetzt.

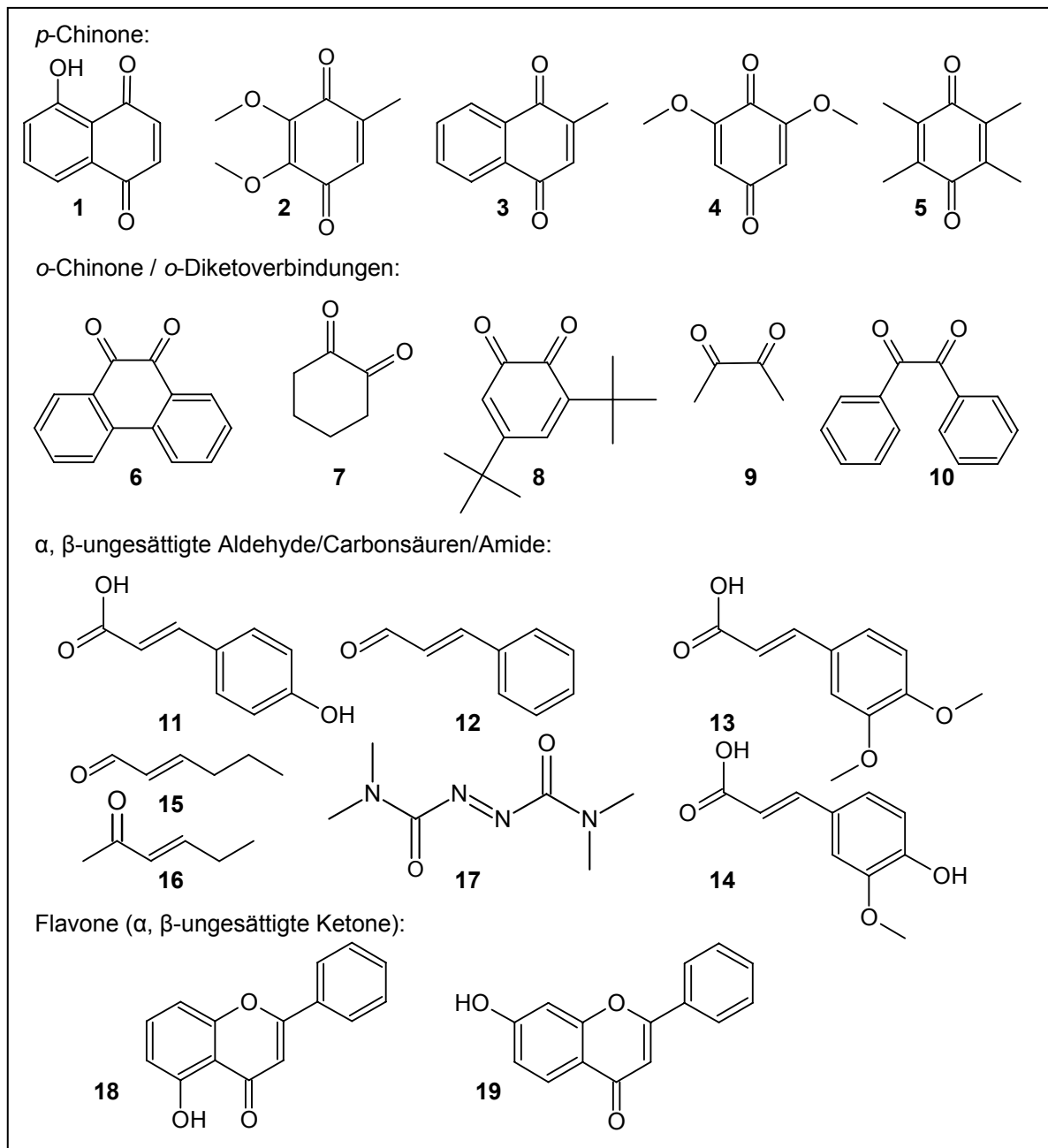


Abb. C-1-2: Zum Substratnachweis eingesetzte Verbindungen; Juglon (5-Hydroxynaphthochinon) (1); Ubichinon (2,3-Dimethoxy-5-methyl-1,4-benzochinon) (2); Menadion (2-Methylnaphthochinon) (3); 2,6-Dimethoxy-1,4-benzochinon (4); Durochinon (2,3,5,6-Tetramethyl-1,4-benzochinon) (5); 9,10-Phenanthrenchinon (6); *o*-Cyclohexandion (7); 3,5-Di-tert-butyl-1,2-benzochinon (8); Biacetyl (2,3-Butandion) (9); Benzil (10); *p*-Coumarsäure ((*2E*)-3-(4-Hydroxyphenyl)acrylsäure) (11); Zimtaldehyd ((*2E*)-3-Phenylacrylaldehyd) (12); Dimethoxyzimtsäure ((*2E*)-3-(3,4-Dimethoxyphenyl)acrylsäure) (13); Ferulasäure ((*2E*)-4-Hydroxy-3-methoxyphenylacrylsäure) (14); *E2*-Hexenal (15); *E3*-Hexen-2-on (16); Diamid (Azodicarboxylsäure-bis-dimethylamid) (17); 5-Hydroxyflavon (18); 7-Hydroxyflavon (19).

Außer PQ wurde kein weiteres Substrat gefunden. So wurden zunächst alle folgenden enzymatischen Charakterisierungen mit dieser Verbindung durchgeführt. Erst viel später stellte sich heraus, dass die α , β -ungesättigte Ketostruktur zumindest ein Teil der von FaEO vorausgesetzten Struktur war, da bei synthetisierten α , β -ungesättigten Hydroxyfuranonen eine Umsetzung beobachtet werden konnte. Diese Substrate werden in den Kapiteln C.2.2.2 und C.2.2.3 besprochen.

1.2.2 pH-Optimum

Um einen möglichst großen pH-Bereich abzudecken wurde in verschiedenen Puffersystemen gearbeitet (Abb. C-1-3 A). Außerdem wurden die Bereiche der einzelnen Puffer so breit gewählt, dass es Überschneidungen zwischen den verschiedenen Systemen gab, so dass eventuelle hemmende bzw. aktivierende Einflüsse der Pufferzusammensetzung auf das Enzym beobachtet werden konnten. FaEO zeigt mit PQ als Substrat ein breites pH-Optimum von 5,5 bis 8,5. Bei pH-Werten unter 4 und über 10 war keine Aktivität mehr feststellbar. Des Weiteren zeigte sich in diesen Ansätzen, dass in den verschiedenen Puffersystemen unterschiedliche Umsetzungsgeschwindigkeiten erreicht wurden. So erfolgte die Umsetzung bei einem pH-Wert von 7 in Tris/HCl-Puffer schneller als in McIlvaine-Puffer.

1.2.3 Variation der Inkubationstemperatur

Die Reaktionstemperatur ist durch ein temperierbares Photometer kontrolliert worden. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wurde zwischen 30 und 37 °C erreicht (Abb. C-1-3 B).

1.2.4 Cofaktoren

Luster und Buckhout (1989) beschrieben eine Aktivitätssteigerung eines aus der Plasmamembran von Maiswurzeln isolierten Flavoenzyms nach einer Inkubation mit dem Cofaktor Flavin-Mononucleotid (FMN). Als Erklärung dafür wird der Verlust von nicht-kovalent gebundenen Cofaktoren während der Proteinaufreinigung angegeben. Der Zusatz von Flavinadenindinucleotid (FAD) bzw. FMN zur Enzymlösung vor der enzymatischen Umsetzung hatte im Fall von FaEO keinen Effekt auf die Reaktionsgeschwindigkeit mit PQ und NADH (Abb. C-1-3 C). Des Weiteren zeigte das Absorptionsspektrum von FaEO ausschließlich das generell für Proteine zu erwartende Maximum bei 280 nm (Abb. D-1). Die von Sparla und Mitarbeiter (1996) beschriebenen Maxima für Flavin-Cofaktoren (375 nm, 448 nm) konnten nicht nachgewiesen werden.

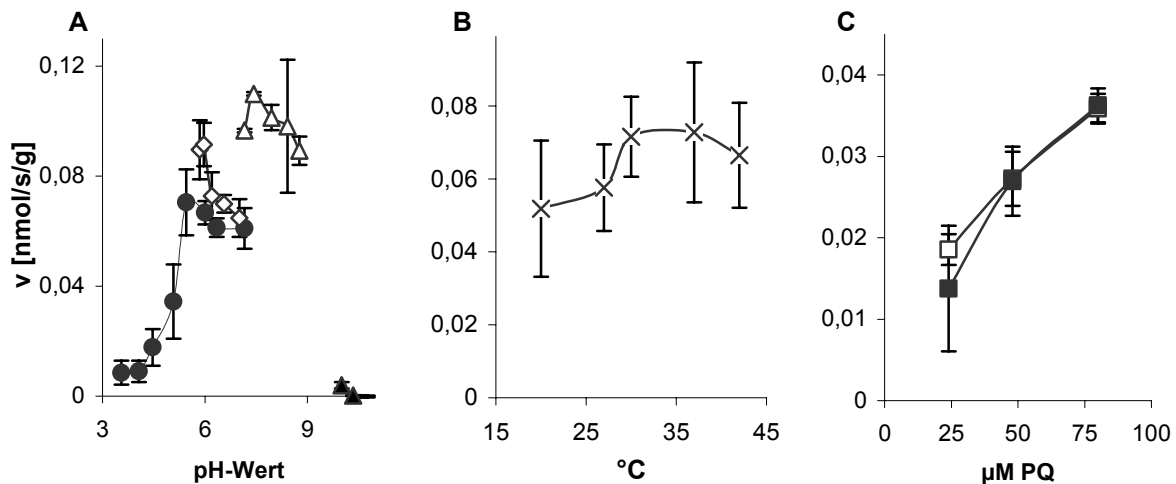


Abb. C-1-3: Einfluss des pH-Wertes (A), der Temperatur (B) und von FAD (C) auf die Reaktionsgeschwindigkeit bei Umsetzungen von PQ mit FaEO unter Verbrauch von NADH; Mcllvaine-Puffer ●; Phosphatpuffer ◇; Tris/HCl-Puffer △; CAPS-Puffer ▲; C: FaEO wurde vorher mit FAD □ inkubiert oder nativ ■ eingesetzt.

1.2.5 Metallionen

Für die Einordnung in die Familie der „*medium chain dehydrogenases/reductases*“ (MDR) ist die Kenntnis der Beteiligung von Metallionen, insbesondere Zink, an der Katalyse von entscheidender Bedeutung. In der Sequenz von FaEO sind keine potentiellen Bindungsstellen für zweiwertige Metallionen zu erkennen. Um dies biochemisch zu bestätigen wurden enzymatische Umsetzungen unter der Zugabe des Komplexbildners EDTA durchgeführt. Dieser entzieht Metallionen aus dem Enzym-Metall-Komplex, was eine Aktivitätsverringern oder sogar einen vollständigen Verlust der Aktivität zur Folge haben kann. Bei einer Umsetzung von PQ mit NADH durch FaEO konnte keine Aktivitätsminderung in Gegenwart von EDTA beobachtet werden.

1.2.6 Inhibitoren

Als mögliche Inhibitoren wurden die Substanzen Dicumarol, Nitrofurantoin und Cibacron Blue getestet. Dicumarol blockiert bei DT-Diaphorase-ähnlichen Enzymen reversibel die Pyridinnucleotidbindungsstelle und verursacht so eine kompetitive Hemmung (Winski und Mitarbeiter, 2001). FaEO wurde zwar bezüglich PQ durch Dicumarol beeinflusst, es konnte aber kein bestimmter Hemmtyp zugeordnet werden. In Gegenwart von 0,03 mM bzw. 0,06 mM Dicumarol stieg der K_m -Wert um 44 % von 12 µM auf 17,3 µM bzw. um 292 % auf 47,1 µM an. Hingegen erhöhte sich die maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 177 nmol/s/mg auf 610 nmol/s/mg bzw. 815 nmol/s/mg was eher einer Aktivierung

entsprechen würde. Lasch (1987) beschreibt für Inhibitoren, die nicht am aktiven Zentrum des Enzyms sondern an einer beliebigen anderen Stelle binden den Fall der partiell-kompetitiven Hemmung, bei dem der ternäre Enzym-Inhibitor-Substrat-Komplex den katalytischen Schritt nicht beeinflusst. Hier kann im speziellen Fall, in dem die Dissoziationskonstante der Reaktion $K_i = E \cdot I / EI$ (E = Konzentration des Enzyms; I = Konzentration des Inhibitor, EI = Konzentration des Enzym-Inhibitor-Komplexes) größer ist als $K_i' = ES \cdot I / EIS$ (ES = Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes, EIS = Konzentration des Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplexes), eine Aktivierung beobachtet werden (Lasch, 1987).

Nitrofurantoin (1-[(5-Nitro-2-furyl)methylidenamino]imidazolidin-2,4-dion) ist beschrieben als Inhibitor des aus Meerschweinchen-Augenlinsen isolierten ζ -Crystallins (Rao und Mitarbeiter, 1992), einer Chinonoxidoreduktase aus *Arabidopsis thaliana* (Mano und Mitarbeiter, 2000 a, b) und der Sauerstoff-unempfindlichen NADPH Nitroreduktase aus *E. coli* (Wishart und Mitarbeiter, 2006). Bei FaEO bewirkt die Zugabe von Nitrofurantoin in den Endkonzentrationen 0,03 mM und 0,06 mM keine Veränderung des K_m -Wertes für PQ. Auch hier wurde die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht (300 bzw. 710 nmol/s/mg).

Cibacron Blue wurde als Inhibitor eingesetzt, da es auf verschiedene Chinonoxidoreduktasen, aus der Ratte (Wishart und Mitarbeiter, 2006), aus Meerschweinchen-Augenlinsen (Rao und Mitarbeiter, 1992), aus *A. thaliana* (Mano und Mitarbeiter, 2002) und aus einer Basidiomyceten-Art (Brock und Mitarbeiter, 1995), hemmend wirkt. Bei FaEO wird durch die Zugabe von Cibacron Blue der K_m -Wert für PQ erst bei einer Konzentration von 0,6 mM erhöht (41,6 μ M). Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde kaum beeinflusst, was auf eine nicht-kompetitive Hemmung hindeutet.

1.3 KLONIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON LEEO

Auch in Tomaten sind HDMF und HDMF- β -D-glucopyranosid enthalten (Buttery und Mitarbeiter, 1994; Krammer und Mitarbeiter, 1994). Nachdem deren Vorläufer 4-Hydroxy-5-methyl-2-methylen-3(2*H*)-furanon (HMMF) in den Früchten gefunden wurde (Kap. 2.2.4.3), sollte untersucht werden, ob ein zu FaEO ähnliches Enzym nachweisbar ist. Die Suche nach mutmaßlichen Chinonoxidoreduktasen in einer Tomatenexpressionsdatenbank lieferte eine cDNA (*TC 124720*) deren Proteinsequenz eine Übereinstimmung von 71 % mit der Sequenz der FaEO (Fei und Mitarbeiter, 2004) und zudem eine reifekorrelierte Expression aufwies. Dies deutete auf ein zu FaEO homologes Enzym hin (Raab und Mitarbeiter, 2006). Die Sequenzähnlichkeiten beginnen erst nach 60 Aminosäuren, da LeEO mit hoher Wahrscheinlichkeit am N-terminalen Ende ein Signalpeptid besitzt, welches das Protein nach dessen Expression in die Chloroplasten dirigiert (Emanuelsson und Mitarbeiter, 2000). Aus Tomatenfrüchten und -knospen wurde mRNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und durch Polymerase Kettenreaktion (PCR) des offenen Leserasters das Ziel-Gen *TC 124720* vervielfältigt. Anschließend folgte eine erste Sequenzanalyse zur Kontrolle. Hierbei stellte sich heraus, dass aus Knospen, die in der Datenbank als Pflanzenteil mit der höchsten Expression angegeben wurden, keine der Datenbank entsprechende Sequenz isoliert werden konnte. Die Isolierung gelang jedoch aus der Fruchtschale der Tomate (Abb. C-1-4). Nach der Ligation in pGemTeasy und der Transformation in *E. coli*-Zellen des Stammes JM109 wurde ein Farbscreening auf rekombinante Kolonien durchgeführt. Diese wurden durch eine Colony-PCR, einer PCR mit einer Kolonie als Träger der Zielsequenz, und anschließende Überprüfung der Ziel-Gen-Größe im Agarosegel verifiziert. Aus positiv getesteten Kolonien wurde eine Mini-Übernachtskultur angezogen und aus dieser nach 16 h Wachstum das Plasmid durch alkalische Lyse wieder isoliert. Eine Restriktion an den durch die Primer in die Sequenz eingeführten Schnittstellen der Restriktionsenzyme Xho1 und Nco1 legte das Insert frei. Dieses konnte anschließend in den Expressionsvektor pET 29a (+) ligiert werden. Zellen des *E. coli*-Stammes BL21 (DE3) *pLysS* dienten als Wirt. Nach erfolgreicher Hitze-Schock-Transformation wurde zur Kontrolle wiederum eine Colony-PCR durchgeführt und zusätzlich das isolierte Plasmid sequenziert. Die Expression des Proteins sowie die Zwei-Stufen-Aufreinigung erfolgte nach der gleichen Methode wie für FaEO beschrieben (Kap. C.1.1). Bei der SDS-PAGE-Analyse (Abb. C-1-5) erschien in der gereinigten Proteinfraction LeEO als eine Bande mit einem kleineren Molekulargewicht als das von FaEO (34 kDa). Erwartet wurde aufgrund der Sequenz allerdings ein Protein der Größe 41,7 kDa. Eine Verschiebung der Proteinbande bei der ladungsabhängigen Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE kann dadurch erklärt werden, dass einerseits

<i>F. ananassa</i>	-----	0
<i>L. esculentum</i>	MEALLSSTTLQLKPLHPPSSSFSSLHSPFSSISVLRVKGSKKAETFIQRSNFSTVLP LRV S	61
Übereinstimmung	meallssttlqlkplhppsssfsslhspfssisvlrvkgskkaetfiqrsnfstvlp lrv s	61
<i>F. ananassa</i>	---MAAAPSE---SIPSVNKAWVYSEYGKTS DVLKFDPS VAVPEVKEDQVLIK VVAASL	54
<i>L. esculentum</i>	ASSQAAAAETSTSI SIPS EMKAWSYTDYG-SVDVLKLESNVAVPE DIKEDQVLIK I VAAAL	121
Übereinstimmung	assq-AAA-s-tsiSIPS--KAW-YseYgkt-DVLK-d--VAVPEVKEDQVLIKvVAA-L	111
<i>F. ananassa</i>	NPVDFKRALGYFKD TDSPLPTVPGYDVAGVVVKVGSQVTKFKV GDEVYGD LNEAALVNP T	115
<i>L. esculentum</i>	NPVDFKRRLGKFKATDSPLPTVPGYDVAGVVVKVGSQV KGLKE GDEVYGDIHEKALDGP K	182
Übereinstimmung	NPVDFKR-LG-FK-TDSPLPTVPGYDVAGVVVKVGSQV---K-GDEVYGDl-E-AL--P-	160
<i>F. ananassa</i>	RFGSLAEYTAADERVLAHKPKDLSFIEAAS LPLAIETAYEGLERAE LSAGK SILV LGGAG	171
<i>L. esculentum</i>	QFGSLAEYTAVEKLVALKPKNLSFAEAAALPLAIETAYEGLERKGFSSGK SILV LGGAG	243
Übereinstimmung	-FGSLAEYTA-dErVlA-KPK-LSF-EAA-LPLAIETAYEGLERa--S-GKSILVlGGAG	212
<i>F. ananassa</i>	GVTHTIIQLAKHVF GASKVAATASTKKLDFLRTLGVDLAIDYTKENIEDLPEKFDVVYDA	232
<i>L. esculentum</i>	GVGS LVIQLAKHVF GASKVAAT SSTGKLEL LKSLGADLAIDYTKENFEDLPDKFDVVYDS	304
Übereinstimmung	GVGt-iIQLAKHVF GASKVAAT-ST-KLd-LrtLG-DLAIDYTKEN-EDLPeKFDVVYD-	266
<i>F. ananassa</i>	VGETDKAVKAVKEGGKVVIVG PATPPAIHFVLT SKG SVLEKLPYLESGKVKPVLDP TS	293
<i>L. esculentum</i>	VGQGEKAVKAVKEGGSVVVLTGAVTPPGFRFVVTN GEM LK LNPYLESGKVKPV I DPKG	365
Übereinstimmung	VG--dKAVK-VKEGG-VV-i-G--TPPa--FVlTS-G-vL-KL-PYLESGKVKPVlDP--	306
<i>F. ananassa</i>	FYPFTKLVEAFGYLES SRATGKVVVPI P	322
<i>L. esculentum</i>	FFSFDKVVDAFSYLETGRATGKVV IHP I P	394
Übereinstimmung	Py-F-KlVeAF-YLES-RATGKVVv-PIP	

Abb. C-1-4: Abgleich der Proteinsequenzen von FaEO (*F. ananassa* Enonoxidoreduktase) und LeEO (*L. esculentum* Enonoxidoreduktase); 71 % Übereinstimmung; NAD(P)H-Bindungsstelle (Kasten) (Mano und Mitarbeiter, 2000 b), Chloroplastentransitpeptid in LeEO (gelb) (Emanuelsson und Mitarbeiter, 2000); PROSITE Signatur für Chinonoxidoreduktasen und ζ-Crystalline (PS01162) wurde in der Sequenz von FaEO ab Aminosäure 160 identifiziert (Hulo und Mitarbeiter, 2006) (GKsilVlgGAGGvGthiiQlaK).

glycosylierte aber auch unvollständig aufgefaltete Proteine schneller im elektrischen Feld wandern und so ein kleineres Molekulargewicht vorspiegeln (Lottspeich und Zorbas, 1998). Allerdings wird eine Glycosylierung von *E. coli* Wirtszellen nicht durchgeführt. Die Abspaltung des Signalpeptids am N-terminalen Ende durch den Wirt (*E. coli*) könnte eine weitere Erklärung sein. Dieses Bruchstück entspräche einer ungefähren Größe von 7 kDa und würde aufgrund des nicht mehr vorhandenen His-Tags durch die Reinigungsprozedur entfernt werden. Allerdings handelt es sich beim Stamm BL21 DE3 *pLysS* um einen Stamm mit Proteasedefizienz, so dass die Abspaltung eher unwahrscheinlich ist. Dass es sich bei der detektierten Proteinbande dennoch um das gesuchte Protein handelte zeigte sich im Western Blot (ohne Abbildung) und durch die anschließend nachgewiesene Chinonoxidoreduktase Aktivität (Kap. 1.2.7.1).

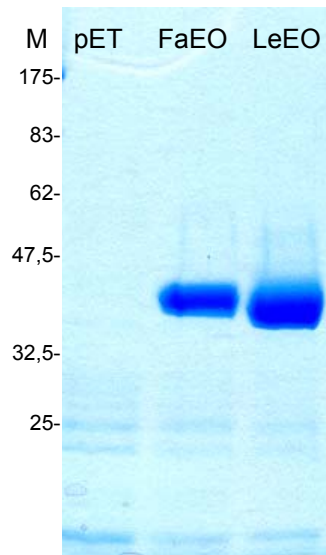


Abb. C-1-5: SDS-PAGE der vollständig gereinigten Proteinfraktionen von pET, FaEO, LeEO.
Molekulargewichtsmarker (M).

1.3.1 Substratscreening

Im Substratscreening zeigte sich, dass auch LeEO ausschließlich PQ als Substrat akzeptiert. Keine der anderen getesteten Verbindungen wurde umgesetzt.

1.3.2 pH-Studie

Die pH-Studie ergab ein recht breites, vom Puffersystem abhängiges pH-Optimum für LeEO (Abb. C-1-6 A) vergleichbar mit dem von FaEO (Abb. C-1-3 A). Wobei hier das Tris/HCl-System ungünstiger zu sein schien als der Phosphat- und McIlvaine-Puffer. Eine leichte Verschiebung des optimalen Bereiches ins Alkalische war zu beobachten, dieser befand sich zwischen pH 6-9.

1.3.3 Temperaturstudie

LeEO (Abb. C-1-6 B) zeigte wie FaEO (Abb. C-1-3 B) keinen besonderen Einfluss der Temperatur während des Assay auf die Umsetzungsgeschwindigkeit – zumindest nicht im eingestellten Temperaturbereich von 20 – 42 °C. Auch hier liegt das Maximum bei 37 °C.

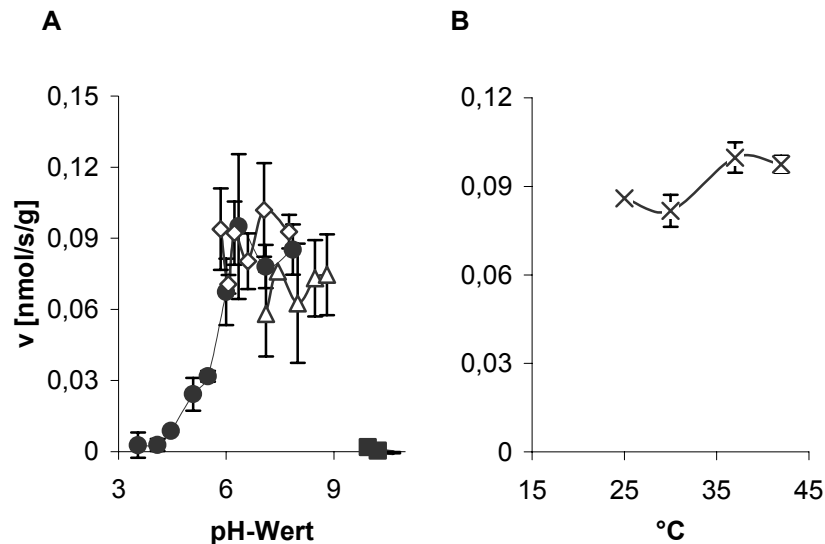


Abb. C-1-6: Einfluss des pH-Wertes (A) und der Temperatur (B) auf die Reaktionsgeschwindigkeit bei Umsetzungen von PQ mit LeEO unter Zugabe von NADH; Mcllvaine-Puffer ●, Phosphatpuffer ◇; Tris/HCl-Puffer △; CAPS-Puffer ■.

1.3.4 Cofaktoren

Auch bei LeEO ließ sich die Reaktionsgeschwindigkeit unter Zugabe von FMN oder FAD nicht steigern.

1.3.5 Kinetische Daten

Die kinetischen Daten für LeEO wurden mit der gleichen Methode ermittelt wie für FaEO (Kap. C-4). Für PQ unter Zugabe von NADH wurde ein k_{cat}/K_m -Wert von $8,8 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ bestimmt. Bei den Reduktionsäquivalenten stellte sich heraus, dass LeEO NADPH (k_{cat}/K_m $0,02 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$) mit einer niedrigeren katalytischen Effizienz als NADH (k_{cat}/K_m $0,03 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$) umsetzt.

1.3.6 Metallionen

Ebenso wie FaEO (Kap. C-1.2.5) wurde LeEO durch die Zugabe von EDTA zum Reaktionsansatz nicht in seiner Aktivität beeinflusst.

1.4 SEQUENZVERGLEICHE

Anhand von Sequenzähnlichkeiten wurde versucht FaEO und LeEO in die Familie der NAD(P)H-abhängigen Oxidoreduktasen einzuordnen. Dafür sind die Sequenzen von neun weiteren in der Literatur beschriebenen und wenn möglich biochemisch charakterisierten Enzymen mittels CLUSTALW auf Proteinebene mit FaEO und LeEO verglichen worden (Abb. C-1-7). Dazu zählten eine *Staphylococcus aureus* Chinonoxidoreduktase (QR, Maruyama und Mitarbeiter, 2003), eine *Arabidopsis thaliana* Alkenal-Reduktase (AER, Mano und Mitarbeiter, 2000 b), eine *Rattus norvegicus* Alkenal/on Oxidoreduktase (AOR, Dick und Mitarbeiter, 2001), eine *Homo sapiens* Aldo/Keto-Reduktase (AKR, Bohren und Mitarbeiter, 1989), eine *Mus musculus* Aldo/Keto-Reduktase (AKR, Deyashiki und Mitarbeiter 1995), eine *Rattus norvegicus* DT-Diaphorase (DT-D, Li und Mitarbeiter, 1995), eine *Homo sapiens* DT-Diaphorase (DT-D, Ernster und Navazio, 1958), eine *Cavia porcellus* ζ-Crystallin (ZCr, Rao und Mitarbeiter, 1992) und eine *Escherichia coli* Chinonoxidoreduktase (QR, Lilley und Mitarbeiter, 1993). Mit Hilfe des CLUSTALW-Algorithmus wurde ein Dendrogramm erstellt (Abb. C-1-8). Es zeigte sich, dass die Enonoxidoreduktasen aus Erdbeere und Tomate zusammen mit der Chinonoxidoreduktase aus *E. coli* und ζ-Crystallin aus Meerschweinchen-Augenlinsen eine Gruppe bilden. Eine weitere besteht aus den DT-Diaphorasen und Aldo/Keto-Reduktasen aus Säugetieren. Die dritte Gruppierung wird von der AER aus *A. thaliana*, der AOR aus *R. norvegicus* und der QR aus *S. aureus* gebildet.

<i>S. aureus</i> _QR	-----	0
<i>A. thaliana</i> _AER	-----	0
<i>R. norvegicus</i> _AOR	-----	0
<i>F. ananassa</i> _EO	-----	0
<i>L. esculentum</i> _EO	MEALLSSTTLQLKPLHPPSSFSSSLHSPFSSISVLRVKGSKKAETFIQRSNFSSTVLPLRVS	60
<i>H. sapiens</i> _AKR	-----	0
<i>M. musculus</i> _AKR	-----	0
<i>R. norvegicus</i> _DT-D	-----	0
<i>H. sapiens</i> _DT-D	-----	0
<i>C. porcellus</i> _ZCr	-----	0
<i>E. coli</i> _QR	-----	0
Übereinstimmung	-----	0
<i>S. aureus</i> _QR	-----MQNKQILFNKIPEGMPQEDTFKIEEIDTPKLES DG--VLVQTLTY	42
<i>A. thaliana</i> _AER	-----MTATNKQVILKDYVSGFPTE SDFDFTTTTVELRVPEGTNSVLVKNLY	47
<i>R. norvegicus</i> _AOR	-----MVQAKTWTLLKKHFEGFPD SNFELRTTELPLNNGE--VLLLEALF	43
<i>F. ananassa</i> _EO	----MAAAPSE--SIPSVNKAWYSEYKGTSDVLKFDPSVAPEVKEDQ--VLIKVVVA	50
<i>L. esculentum</i> _EO	ASSQAAAAETSTSSISIPSEMKAWSYTDYG--SVDVLKLESNVAPEDIKEDQ--VLIKIVA	116
<i>H. sapiens</i> _AKR	-----MAAS--CVLLHTGQKMPILGLGTWKSEPG--QVKA AVKYALSVGY	41
<i>M. musculus</i> _AKR	-----MDSKQQT VRLSDGHFIPILGFGTYAPQEVPKSKATEATKLAIDAGF	46
<i>R. norvegicus</i> _DT-D	-----MAVRRALIVLAHAERTSFN-----YAMKEAAVEALKKKG	34
<i>H. sapiens</i> _DT-D	-----MVGRRALIVLAHSERTSFN-----YAMKEAAAAALKKKG	34
<i>C. porcellus</i> _ZCr	-----MATGQKLMRAIRVFEFGGPEVLKVQSDVAVPIPKDHQ--VLIKVHA	44
<i>E. coli</i> _QR	-----MATRTIEFHKHGGPEVLQAVEFTP-----ADPAENEIQVENKA	37
Übereinstimmung	-----k-i-l-v-----e-----vp-----v-lvk-a	
<i>S. aureus</i> _QR	ISVDPY-MRGRMTKADS---YVQPFEIGKP--IVSHVVAKVLDSTLADYKKGDVVVG--	93
<i>A. thaliana</i> _AER	LSCDPY-MRIRMGKPD PSTAALAQAYTPGQP--IQGYGVSRIEESGHPDYKKGDLWG--	102
<i>R. norvegicus</i> _AOR	LSVDPY-MRVA AKKLE-----GDS--MMGEQVARVVE SKNSAFPTGTIVVA--	87
<i>F. ananassa</i> _EO	ASLNPFVDFKRALGYFKD TDS--PLPTVPGYD--VA--GVVVKVGSQVTKFKVGDDEVYG--	102
<i>L. esculentum</i> _EO	AALNPFVDFKRRLGKFKATDS--PLPTVPGYD--VA--GVVVKVGSQVKGLKGDDEVYG--	168
<i>H. sapiens</i> _AKR	RHIDCAATY GNEPEIGEALKEVDVGP GKAVPR--EELFVTSKLVNTKHHHPEDVEPALRKT-	98
<i>M. musculus</i> _AKR	RHIDSASMYQNEKEVGLAIRSKIADG-TVKR--EDIFYTSKLVWCTFHRPELVRLVCLIQS-	102
<i>R. norvegicus</i> _DT-D	WEVVESDLYAMN--FNPLISRNDITGEPKDS--ENFQYPVESSLAYKEGRLSPTIVAE--	88
<i>H. sapiens</i> _DT-D	WEVVESDLYAMN--FNPIISRNDITGKLDKP--ANFQYPAESV LAYKEGHLSPDIVAE--	88
<i>C. porcellus</i> _ZCr	CGINPVETYIRSGTYTRIP---LLPYTPGTD--VA--GVVESIGNDVSAFKKGD RVFTTS	97
<i>E. coli</i> _QR	IGINPVIDTYIRSGLYP-----PPSLPSGLGTEAA--GIVSKVGSVGVKHIKAGDRVYVAQ	60
Übereinstimmung	--v-p-dmy-----f-----g----i---v---i-s-----k-gd-v---	
<i>S. aureus</i> _QR	-----MLPWRIINH VQ--ADQITKVPTTD-VPLDLYLSV--LGMPGQTAYHGLLDIG	140
<i>A. thaliana</i> _AER	-----IVAWEEYSVITPMTAHFKIQHTD-VPLSYYTGL--LGMPGM TAYAGFYEV C	151
<i>R. norvegicus</i> _AOR	-----LLGWTSHSISDGNLRLKPAEWPDKLPLSLALGT--VGMPGLTAYFGLLDIC	137
<i>F. ananassa</i> _EO	--DLNEAALVNPTFRFGSLAEYTAADERVLAHKPKDLSFIEAA--SLPLAIETAYEG-LE RA	158
<i>L. esculentum</i> _EO	--DIHEKALDGPQFGSLAEYTAVEEKLVALKPKNLSFAEAA--ALPLAIETAYEG-LEKA	224
<i>H. sapiens</i> _AKR	-----LADLQLEYLDLYLMHWPYAFERGDNPFKPNADG--TICYDSTHYRETWKAL	147
<i>M. musculus</i> _AKR	-----LKQLQLDYVDLYLIHFPMAMKPGENYLPKDENG--KLTYDAVDICDTWEAM	151
<i>R. norvegicus</i> _DT-D	-----QKKLEAADLVIFQFPLYWFGVPAILKGFER--VLVAGFAYTYATMYDK	135
<i>H. sapiens</i> _DT-D	-----QKKLEAADLVIFQ-----	101
<i>C. porcellus</i> _ZCr	-----TISGGYAEYALASDHTVYRLPEKLD FRQGA--AIGIPYFTACRALFHSA	144
<i>E. coli</i> _QR	S-----ALGAYSSVHNIADKAAILPAATISFEQAA--ASF LKGLTVYVLLRKY	136
Übereinstimmung	-----l---i--v-----l---ga--l-m---tay-g--d--	
<i>S. aureus</i> _QR	QPKAGD TVVVAASGAVG SVVGQIAK- IKGCRVVG IAGGDKK VNYLTETLGF DAGIDYKK	199
<i>A. thaliana</i> _AER	SPKECETVYVSAASGAVGQLVGLAK- MMGCYVVG SAGSKEKVDLLKTKFGFDDAFNYKE	210
<i>R. norvegicus</i> _AOR	GLKGCETVLVAAAGAVG SVVGQIAK- LKGCKVVG TAGSDEK VAYLK-KLGFVAFNYKT	195
<i>F. ananassa</i> _EO	ELSA GKSILVIGGAGGVGTHIQ LAKHVF GASKVAATAS TKKLD FLR-TLGVDLAIDYT-	216
<i>L. esculentum</i> _EO	GFSS GKSILVIGGAGGVGSLVIQ LAKHVF GASKVAATSS TGKLELLK-SLGADLAIDYT-	282
<i>H. sapiens</i> _AKR	EALVAKGLVQALGLSNFNSRQIDDIILSVASVR--PAVLQVECHPYLA-QNELIAHCQARG	204
<i>M. musculus</i> _AKR	EKCKDAGLAKSIGVSNFNRRLQLEKILKPKGLKYPVCNQVECHPYLN-QGKLLDFCRSKD	210
<i>R. norvegicus</i> _DT-D	GPFQNKKTLSITTTGGSGS----MYSLQGVHG----DMNVILWPI-QSGILRFCCGFQV	184
<i>H. sapiens</i> _DT-D	---SKKAVLSITTTGGSGS----MYSLQGIHG----DMNVILWPI-QSGILRFCCGFQV	146
<i>C. porcellus</i> _ZCr	RAKA GESVLVH GASGGVGLAACQIAR-AYGLKVLGTAGTEEGQKVV L-QNGAHEVFNHR-	201
<i>E. coli</i> _QR	EIKHDEQFLFHAAAGGVGLIACQWAK-ALGAKLIGTVGT AQKQSAL-KAGAWQVINYR-	193
Übereinstimmung	---g-tv-lv-aa-ggvgs---qiak-i-g-r-vg-gs--kv-yl---g-----yk-	

<i>S. aureus</i> _QR	E-DFAEALAQAVPD-GIDVYFENVGG-TVGDEVFKHLNRFARVPVCGAISSYNHPEADIG	256
<i>A. thaliana</i> _AER	ESDLTAALKRCFPN-GIDIYFENVGG-KMLDAVLVNMNMHGRIAVCGMISQYNLENQEG-	267
<i>R. norvegicus</i> _AOR	VKSLEEALRTASPD-GYDCYFDNVGG-EFSNTVILQMKTFGRITAIICGAISSQYNRTGPCPP	255
<i>F. ananassa</i> _EO	-----KENIEDLPEK-FDVVYDAVG---ETDKAVKAVKEGKVVVTI-----VGP-----	256
<i>L. esculentum</i> _EO	-----KENFEDLPDK-FDVVYDSVG---QGEKAVKVVKEGGSVVVL-----TGA-----	322
<i>H. sapiens</i> _AKR	LEVTAYSPLGSS-DRAWRPDPEVLLLEEPVVLALAEKYGRSPAQIL-----LRWQVQRKV	258
<i>M. musculus</i> _AKR	IVLVAYSALGSHREKQWVDQSSPVLLDNPVLGSMAKKYNRTPALIA-----LRYQLQRGV	265
<i>R. norvegicus</i> _DT-D	LEPQLVYSIGHTPPDARVQVLEGWKKRLETVWEESPLYFAPSSLFD-----LNFQAG---	236
<i>H. sapiens</i> _DT-D	LEPQLTYSIGHTPADARIQILEGWKKRLENIWDETPLYFAPSSLFD-----LNFQAG---	198
<i>C. porcellus</i> _ZCr	DAHVIDEIKKSIGEKGV DVIIEMLANVN-LSNDLKL LSCGGRVIIIVGCRGSIIEINPRDTM	260
<i>E. coli</i> _QR	EEDLVERLKEITGGK KVRVVYDSVGR-DTWERSLDCLQRRGLMVSFGNSSGAVTGVNLGI	252
Übereinstimmung	-----pdkg-dvvfe-vg-----l--l---g-vvv-----v-----	
<i>S. aureus</i> _QR	PRIQGTLLIKQVMRGRFLVSEFA-NAFKEASEQLATWVQEGKIQSQVTI-----	304
<i>A. thaliana</i> _AER	VHNSLNIYKRIRIQGFVVSDFY-DKYSKFLEFVLPHTREGKITVYVEDV-----	315
<i>R. norvegicus</i> _AOR	GPSPEVIIYQQLRMGEFIVTRWQGEVRQKALTDLMNWVSEGKIRYHEYI-----	302
<i>F. ananassa</i> _EO	--ATPPATHFVLTSGSVLEKLEK-----PYLESGKVKPVLDP-----	291
<i>L. esculentum</i> _EO	--VTPPGFRFVVTSNGEMLKKNL-----PYLESGKVKPVIDP-----	357
<i>H. sapiens</i> _AKR	I-CIPKSI TPSRILQNIKVFDFI-----FSPEEMKQLNALN-----	293
<i>M. musculus</i> _AKR	V-VLAKSFSEKRIKENMQVFEFQ-----LTSSEDMKVLDDLN-----	300
<i>R. norvegicus</i> _DT-D	-----FLLKKEVQEEQKKNKFG-----LSVG-----HHLG-----	261
<i>H. sapiens</i> _DT-D	-----FLMKKEVQDEEKKNKFG-----LSVG-----HHLG-----	223
<i>C. porcellus</i> _ZCr	AKESTISGVSLFSSTKEEFQQFA-----STIQAGMELGWVKP-----VI	299
<i>E. coli</i> _QR	LNQKGSlyVTRPSLQGYITREELTEASN---ELFSLIASGVIKVDVAEQ-----	299
Übereinstimmung	-----i-----g-lv-rf-----v-g-ir---i-----	
<i>S. aureus</i> _QR	--EDGFENAPHA FKNLFTGDNFGKQVIKVTE--	333
<i>A. thaliana</i> _AER	--ADGLEK APEALVGLFHGKNV GKQVVVARE--	345
<i>R. norvegicus</i> _AOR	--TEGF EKMPAAFMGMLKGDNLGKTIVKA---	329
<i>F. ananassa</i> _EO	TSPYPTTKLVEAFGYLESSRATGKVVVYPIP--	322
<i>L. esculentum</i> _EO	KGPFSPDKVVD AFSYLETGRATGKVVVHPIP--	388
<i>H. sapiens</i> _AKR	-KNWRVIVPMLTVDGKRVPRDAGHPLYPFNDPY	325
<i>M. musculus</i> _AKR	-KNIRV I SGSSFKD-----HPDFPFWDEY	323
<i>R. norvegicus</i> _DT-D	-KSI PADN QIKARK-----	274
<i>H. sapiens</i> _DT-D	-KSIPTDNQIKARK-----	236
<i>C. porcellus</i> _ZCr	GSQYPLEKASQA HENI IHSSGTVGKTVLLM---	329
<i>E. coli</i> _QR	-QKYPLKDAQRAHEI IESRATQGSLLIP----	327
Übereinstimmung	-----fe-----a---l-----g--vi-----	

Abb. C-1-7: Vergleich der Sequenzen (CLUSTALW) verschiedener Oxidoreduktasen auf Proteinebene; *Staphylococcus aureus* Chinonoxidoreduktase (QR, ACC-Nr.: AAK69532, Maruyama und Mitarbeiter, 2003), *Arabidopsis thaliana* Alkenal-Reduktase (AER, ACC-Nr.: CAA89838, Mano und Mitarbeiter, 2000b), *Rattus norvegicus* Alkenal/on-Oxidoreduktase (AOR, ACC-Nr.: NP_620218, Dick und Mitarbeiter, 2001), *Fragaria ananassa* Enonoxidoreduktase (EO, ACC-Nr.: AA022131, Raab und Mitarbeiter, 2006), *Lycopersicon esculentum* Enonoxidoreduktase (EO; TC 124720, Fei und Mitarbeiter, 2004), *Homo sapiens* Aldo/Keto-Reduktase (AKR, ACC-Nr.: NP_006057, Bohren und Mitarbeiter, 1989), *Mus musculus* Aldo/Keto-Reduktase (AKR, ACC-Nr.: NP_085114, Deyashiki und Mitarbeiter, 1995), *Rattus norvegicus* DT-Diaphorase (DT-D, ACC-Nr.: P05982, Li und Mitarbeiter, 1995), *Homo sapiens* DT-Diaphorase (DT-D, ACC-Nr.: NP_001020605, Ernster und Navazio, 1958), *Cavia porcellus* ζ -Crystallin (ZCr, ACC-Nr.: P11415, Rao und Mitarbeiter, 1992), *Escherichia coli* Chinonoxidoreduktase (QR, ACC-Nr.: AAA23691, Lilley und Mitarbeiter, 1993); Schattierung: blau: ähnlich; gelb: identisch; Kasten, gestrichelt: Nucleotid-Bindungstelle; Kasten, gestrichelt: PROSITE Signatur für Chinonoxidoreduktasen und ζ -Crystalline (PS01162) identifiziert in der Sequenz von FaEO: [GSD]-[DEQHKM]-x(2)-L-x(3)-[SAG](2)-G-G-x-G-x(4)-Q-x(2)-[KRS] (Hulo und Mitarbeiter, 2006).

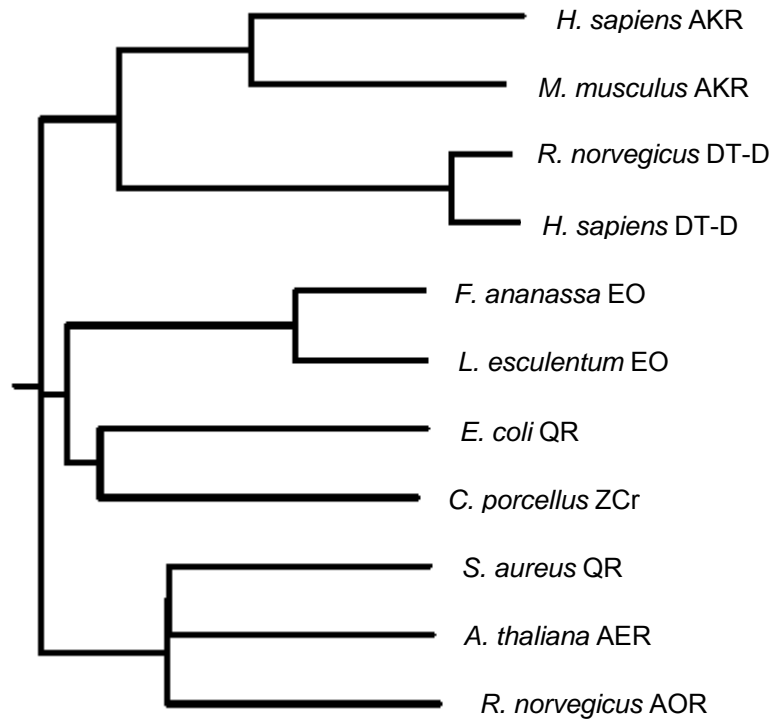


Abb. C-1-8: Mit Hilfe des CLUSTALW-Algorithmus erstelltes Dendrogramm der Aminosäuresequenzen verschiedener Oxidoreduktasen; *Staphylococcus aureus* Chinonoxidoreduktase (QR, ACC-Nr.: AAK69532, Maruyama und Mitarbeiter, 2003), *Arabidopsis thaliana* Alkenal-Reduktase (AER, ACC-Nr.: CAA89838, Mano und Mitarbeiter, 2000 b), *Rattus norvegicus* Alkenal/on-Oxidoreduktase (AOR, ACC-Nr.: NP_620218, Dick und Mitarbeiter, 2001), *Fragaria ananassa* Enonoxidoreduktase (EO, ACC-Nr.: AA022131, Raab und Mitarbeiter, 2006), *Lycopersicon esculentum* Enonoxidoreduktase (EO; TC 124720, Fei und Mitarbeiter, 2004), *Homo sapiens* Aldo/Keto-Reduktase (AKR, ACC-Nr.: NP_006057, Bohren und Mitarbeiter, 1989), *Mus musculus* Aldo/Keto-Reduktase (AKR, ACC-Nr.: NP_085114, Deyashiki und Mitarbeiter, 1995), *Rattus norvegicus* DT-Diaphorase (DT-D, ACC-Nr.: P05982, Li und Mitarbeiter, 1995), *Homo sapiens* DT-Diaphorase (DT-D, ACC-Nr.: NP_001020605, Ernster und Navazio, 1958), *Cavia porcellus* ζ-Crystallin (ZCr, ACC-Nr.: P11415, Rao und Mitarbeiter, 1992), *Escherichia coli* Chinonoxidoreduktase (QR, ACC-Nr.: AAA23691, Lilley und Mitarbeiter, 1993).

1.5 ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION

Ziel dieser Studie war es das durch Sequenzähnlichkeit der Familie der Chinonoxidoreduktasen vorläufig zugeordnete Gen aus Erdbeeren (*Fragaria ananassa* Quinone Oxidoreductase, *FaQR*) heterolog zu exprimieren und das korrespondierende Protein biochemisch zu charakterisieren.

Die heterologe Expression wurde nach Standardprotokollen durchgeführt und lieferte nach Aufreinigung über Affinitätschromatographie eine enzymatisch aktive Proteinfraction. Zu Beginn war nicht klar, dass es sich bei dieser Aktivität um die Aktivitäten mehrerer Enzyme handelte. Dies wurde erst durch Kontrollversuche mit Proteinfractionen aus Zellen, in die der leere Vektor transformiert worden war, ersichtlich. Es wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei zusätzlich um die Aktivität einer oder mehrerer aus *E. coli* stammenden Chinonoxidoreduktase handelte. Membrangebundene und lösliche Chinonoxidoreduktasen sind aus Bakterien bereits beschrieben. Allerdings ist bis auf die Kristallstruktur über die biochemischen Eigenschaften der löslichen Chinonoxidoreduktasen bisher nur wenig bekannt (Edwards und Mitarbeiter 1996, Thorn und Mitarbeiter, 1995). Deshalb musste zur Abtrennung der Störaktivität ein weiterer Reinigungsschritt, die Ultrafiltration, durchgeführt werden. Diese Methode wurde bereits von Raab und Mitarbeitern (2006) eingesetzt, um aus Erdbeerproteinextrakten die Chinonoxidoreduktase zu isolieren. So gelang es eine homogene Proteinlösung von FaEO ohne Fremdproteine zu erhalten.

Zur biochemischen Charakterisierung des Enzyms wurden zunächst Merkmale bekannter Chinonoxidoreduktasen zur Orientierung herangezogen (Kap. B-3). Chinonoxidoreduktasen gehören zur Klasse der NAD(P)H-abgängigen Oxidoreduktasen, welche aus Tieren, Bakterien, Hefen, Pilzen und Pflanzen bekannt sind. Die meisten Enzyme wurden dieser Klasse aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zugeordnet, biochemische Charakterisierungen wurden bisher nur vereinzelt durchgeführt (Rao und Mitarbeiter, 1992; Kumagai und Mitarbeiter, 2000; Dick und Mitarbeiter, 2001; Maruyama und Mitarbeiter, 2003; Kim und Mitarbeiter, 2003; Brock und Mitarbeiter, 1995; Wrobel und Mitarbeiter, 2002; Sparla und Mitarbeiter, 1999; Trost und Mitarbeiter, 1995, 1997; Mano und Mitarbeiter, 2000 b, 2002).

Die cDNA des aus der Erdbeere stammenden Gens *FaQR* ist 1187 bp lang und beinhaltet ein offenes Leseraster von 969 bp. Dieses kodiert für ein Protein FaEO mit 322 Aminosäuren, mit einem berechneten Molekulargewicht von 34,3 kDa (Raab und Mitarbeiter, 2006). Mittels SDS-PAGE wurde für das in *E. coli* heterolog exprimierte Protein ein Molekulargewicht von ca. 34 kDa bestimmt. Die Aufreinigung über Ultrafiltrationsmembranen der Ausschlussgröße 50 kDa ergab, dass es sich beim aktiven Enzym um ein Monomer handelt. Dieses Ergebnis wurde auch von Raab und Mitarbeitern (2006) für das von ihnen zuvor aus Erdbeeren isolierte Enzym erhalten.

Für die Familie der Chinonoxidoreduktasen allerdings ist diese Tatsache eher ungewöhnlich, da es sich bei den bisher beschriebenen meistens um Homodimere (Brock und Mitarbeiter,

1995; Hayashi, 1996; Li und Mitarbeiter, 1995; Kim und Mitarbeiter, 2003; Mano und Mitarbeiter, 2000 a), Homotetramere (Sparla und Mitarbeiter, 1999; Sparla und Mitarbeiter, 1996; Rao und Mitarbeiter, 1992) oder Multimere (Maruyama und Mitarbeiter, 2003) handelt. Als monomeres Enzym wurde bisher nur eine Chinonoxidoreduktase aus *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben. Dieses wurde zwar in *E. coli* heterolog exprimiert, konnte aber aufgrund der Eigenschaft sich bei der Expression in der Membran von *E. coli* unter die anderen vorhandenen Oxidoreduktasen zu mischen bisher nicht weiter charakterisiert werden (Kitajima-Ihara und Mitarbeiter, 1998).

Ein zunächst mit chinoiden Strukturen durchgeführtes Substratscreening ergab, dass ausschließlich das nicht-physiologische PQ von FaEO als Substrat akzeptiert wurde. Zwar handelt es sich hierbei um eine Verbindung die aufgrund ihres elektronischen Potentials gut für Redoxreaktionen geeignet ist, dennoch ist aus der Literatur keine Chinonoxidoreduktase bekannt, welche in der Lage ist, so spezifisch ausschließlich ein und noch dazu ein unnatürliches Chinon umzusetzen. ζ -Crystallin aus Meerschweinchen-Augenlinsen wurde als erste Chinonoxidoreduktase mit einem eingeschränkten Substratspektrum beschrieben. Im Gegensatz dazu sind DT-Diaphorase-ähnliche Enzyme relativ unspezifisch gegenüber chinoiden Verbindungen. Dass die Umsetzung von PQ nicht die *in-vivo*-katalysierte Reaktion von FaEO sein konnte war aufgrund des Substrates klar. Um sich an die vom Enzym geforderten strukturellen Eigenschaften möglicher Substrate heranzutasten, wurden weitere Verbindungen mit *o*-Diketogruppen getestet. Weder *o*-Cyclohexandion, 3,5-Di-*tert*-butyl-1,2-benzochinon (DtBB), Biacetyl noch Benzil wurden umgesetzt.

Die Charakterisierung einer mutmaßlichen Chinonoxidoreduktase aus *A. thaliana* eröffnete neue Denkansätze. Mano und Mitarbeiter (2000 a, 2000 b, 2002, 2005) beschrieben aufgrund von Sequenzähnlichkeiten dieses Protein als ζ -Crystallin-ähnlich mit einem dimeren Aufbau aus zwei 38,7 kDa großen Einheiten. Aus der Klasse der Chinone stellte PQ das beste Substrat dar. Generell wurden *o*-Chinone besser umgesetzt als *p*-Chinone. Daneben katalysierte es auch die Reduktion der Doppelbindungen in α,β -ungesättigten Aldehyd- und Amidverbindungen, wie *E2*-Hexenal und Diamid. Demzufolge handelt es sich bei diesem Enzym um eine Alkenal-Reduktase (AtAER) mit Nebenaktivität als Chinonoxidoreduktase. Auch Dick und Mitarbeiter (2001, 2004a, 2004b) charakterisierten ein Enzym aus Rattenleber, welches aufgrund von Sequenzähnlichkeiten als Alkoholdehydrogenase (ADH) eingestuft wurde, und schließlich infolge der Ergebnisse biochemischer Studien umbenannt und nun als NAD(P)H-Alkenal/on Oxidoreduktase (RnAOR) geführt wird.

Basierend auf diesen Arbeiten wurde das Substratscreening auf α , β -ungesättigte Keto-, Aldehyd- und Carbonsäureverbindungen ausgedehnt. Keine der eingesetzten Verbindungen, wie u. a. Coumarsäure, Zimtaldehyd, *E2*-Hexenal, Diamid oder Hydroxyflavon, wurde im Gegensatz zu PQ, von FaEO als Substrat akzeptiert.

Die weitere Charakterisierung des Enzyms wurde ausschließlich mit PQ durchgeführt. Bei den pH- und Temperaturstudien der Umsetzung ergaben sich für diese Enzymklasse typische Werte. Das pH-Optimum der Reaktion lag wie das der AtAER (Mano und Mitarbeiter, 2002), RnAOR (Dick und Mitarbeiter, 2004) und ζ -Crystallin (Rao und Mitarbeiter, 1992) im neutralen Bereich von pH 7. Es zeigte aber im Gegensatz zu AtAER kein klares Maximum, sondern eher wie bei RnAOR und ζ -Crystallin einen recht breiten aktiven Bereich von pH 5 bis 9.

Unter den Mitgliedern der Klasse der Oxidoreduktasen gibt es Flavo- und Nicht-Flavo-Enzyme. Zur ersten Kategorie wird u. a. eine NAD(P)H Chinonoxidoreduktase aus *A. thaliana* (Sparla und Mitarbeiter, 1999), aus *E. coli* (Thorn und Mitarbeiter, 1995; Hayashi und Mitarbeiter, 1996), aus Basidiomyceten (Brock und Mitarbeiter, 1995), aus *Tryphsaria versicolor*, aus Tabak (Sparla und Mitarbeiter, 1996) und die Säugetier DT-Diaphorase (Ernster und Navazio, 1958; Ernster und Mitarbeiter, 1963) gezählt. Alle diese Enzyme werden als „entgiftend“ wirkende DT-Diaphorase-ähnliche Proteine eingestuft. Die Enzyme unterscheiden sich jedoch in der Art des Flavin-Cofaktors, Flavin-Mononucleotid (FMN) oder Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD), und in dessen Anzahl pro Enzymuntereinheit. Zur Kategorie der Nicht-Flavoenzyme gehören u. a. das ζ -Crystallin aus Meerschweinchen (Rao und Mitarbeiter, 1992), die ζ -Crystallin-ähnliche NAD(P)H abhängige Chinonoxidoreduktase aus *Staphylococcus aureus* (Maryuama und Mitarbeiter, 2003), AtAER (Mano und Mitarbeiter, 2000 a, 2000 b, 2002, 2005) und RnAOR (Dick und Mitarbeiter, 2004).

Luster und Buckhout (1989) beschreiben die Möglichkeit durch Zugabe der Cofaktoren FMN bzw. FAD zur Enzymlösung die Aktivität von Flavoenzymen zu steigern, was aber im Fall von FaEO nicht zu beobachten war. Auch das Absorptionsspektrum des gereinigten Enzyms mit einem Maximum bei 280 nm wies nicht den für Flavoenzyme typischen Verlauf, mit Maxima bei 375 nm und 448 nm (Sparla und Mitarbeiter, 1996) auf. Zusammen mit dem Fehlen einer Flavindoxin-typischen Sequenz im Protein (Laskowski und Mitarbeiter, 2002) kann eine Beteiligung von Flavin-Cofaktoren an der enzymatischen Katalyse von FaEO ausgeschlossen werden.

Edwards und Mitarbeiter (1996) unterteilen die Familie der mittelkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (MDR) anhand der Anwesenheit einer Zn-Bindungs-Schleife. Ist diese vorhanden, handelt es sich per Definition um eine Dehydrogenase. Nordling und Mitarbeiter (2002) klassifizieren aufgrund der enzymatischen Eigenschaften acht verschiedene Unterfamilien in der Familie der MDR: vier Zn-bindende (Polyol Dehydrogenasen, dimere und tetramere Alkohol Dehydrogenasen und Zimtalkohol Dehydrogenasen), und vier nicht-Zn-bindende (Chinonoxidoreduktasen, Enzyme die an der mitochondrialen Atmung beteiligt sind, Acyl-Coenzym-A-dehydrogenasen und Leukotrien B₄ Dehydrogenasen). Die FaEO-Sequenz weist kein Metallionen-Bindungsmotiv auf. Die

Aktivität hängt zudem nicht vom Vorhandensein zweiwertiger Ionen ab, was das Enzym in den Schemata von Edwards und Mitarbeitern (1996) und Nordling und Mitarbeitern (2002) als Chinonoxidoreduktase einordnet.

Dicumarol hemmt DT-Diaphorase kompetitiv in Bezug auf das Pyridinnucleotid. Diese Hemmung ist aber aufgrund des ping-pong-Mechanismus der katalysierten Reaktion stark abhängig vom eingesetzten Substrat. Beim Einsatz eines mäßigen Substrates wie z. B. Diaziquon werden zehnfach höhere Mengen an Dicumarol benötigt um einen Hemmeffekt zu erzeugen (Preusch und Mitarbeiter, 1991). Die Aussagekraft von Inhibitorstudien muss also kritisch betrachtet werden. Unter den beschriebenen NAD(P)H-abhängigen Chinonoxidoreduktasen lässt sich kein eindeutiges Muster der Dicumarol-Hemmung erkennen. DT-Diaphorase-ähnliche Enzyme (Brock und Mitarbeiter, 1995; Wrobel und Mitarbeiter, 2001) werden bezüglich NAD(P)H kompetitiv gehemmt, bei ζ -Crystallin hingegen findet die kompetitive Hemmung gegenüber dem Chinonsubstrat statt (Rao und Mitarbeiter, 1992). Mano und Mitarbeiter (2000) beschreiben für AtAER einen gemischten Hemmtyp. FaEO wurde durch Dicumarol zwar insofern gehemmt, dass der K_m -Wert für PQ anstieg, gleichzeitig stieg allerdings auch die Reaktionsgeschwindigkeit. Dies weist laut Lasch (1987) auf eine partiell-kompetitive Hemmung hin, diese ist bisher für keine Chinonoxidoreduktasen bekannt.

Nitrofurantoin ist bekannt als Inhibitor des aus Meerschweinchen-Augenlinsen isolierten ζ -Crystallins (Rao und Mitarbeiter, 1992), der Alkenal-Reduktase aus *A. thaliana* (Mano und Mitarbeiter, 2000 a) und der Sauerstoff-unempfindlichen NADPH Nitroreduktase aus *E. coli* (Wishart und Mitarbeiter, 2006). Bei FaEO bewirkt die Zugabe von Nitrofurantoin keine Veränderung des K_m -Wertes.

Cibacron Blue wurde als Inhibitor einer Chinonoxidoreduktase der Prothrombin-Synthese aus der Ratte (Wishart und Mitarbeiter, 2006), AtAER (Mano und Mitarbeiter, 2002) und einer aus einer Basidiomyceten-Art isolierten NAD(P)H-abhängigen Oxidoreduktase (Brock und Mitarbeiter, 1995) beschrieben. Bei FaEO wird durch die Zugabe von Cibacron Blue der K_m -Wert erst bei hohen Inhibitorkonzentrationen erhöht. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde kaum beeinflusst. Es handelt sich somit um eine nicht-kompetitive Hemmung.

Anhand der Inhibitorenuntersuchungen konnte demzufolge keine eindeutige Zuordnung von FaEO zu einem bestimmten Oxidoreduktase-Typ erfolgen.

LeEO, das zu FaEO homologe Enzym der Tomate wies in allen Versuchen vergleichbare Eigenschaften auf. Geringfügige Abweichungen gab es zum Einen beim pH-Optimum, welches bei LeEO gegenüber FaEO leicht ins alkalische verschoben ist. Zum anderen zeigte sich, dass LeEO eine 10fach höhere katalytische Effizienz gegenüber PQ hat (FaEO $k_{cat}/K_m(PQ)=0,7 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$, LeEO $k_{cat}/K_m(PQ)=8,8 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$) und NADH (LeEO $k_{cat}/K_m(NADH)=0,03 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$) gegenüber NADPH (LeEO $k_{cat}/K_m(NADPH)=0,02 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$)

bevorzugt umgesetzt. Wohingegen FaEO dem Cofaktor NADPH ($k_{cat}/K_m(\text{NADPH})=0,15 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$, $k_{cat}/K_m(\text{NADH})=0,02 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$) den Vorzug gibt.

Dieses Ergebnis ist unerwartet, da eine 100%ige Sequenzübereinstimmung im Bereich der Cofaktor-Bindungsstelle (GxxGxxG) vorliegt. Mano und Mitarbeiter (2000) sowie Edwards und Mitarbeiter (1996) beschreiben, dass bei dem Motiv G/A-A-x-x-G-x-x-G NADPH bevorzugt umgesetzt wird, wohingegen das Bindungsmotiv G-x-x-G-x-x-G eine unspezifische Akzeptanz ermöglicht.

Vergleicht man die Sequenzen von FaEO und LeEO mit anderen in der Literatur beschriebenen NAD(P)H-abhängigen Oxidoreduktasen wird deutlich, dass nur wenige konservierte Regionen vorliegen. Diese befinden sich vor allem im Bereich der Nucleotid-Bindungsstelle, welche gleichzeitig einen Teil der PROSITE Signatur für Chinonoxidoreduktasen und ζ -Crystalline (PS01162) in der Sequenz von FaEO darstellt (Hulo und Mitarbeiter, 2006).

Dies entspricht der Feststellung von Edwards und Mitarbeitern (1996), die in der Familie der MDR neben den konservierten Regionen der Zink-, Cofaktor- und Cosubstrat-Bindungsstellen selten Sequenzhomologien beobachtet haben. Aus diesem Grund ist Vorsicht bei der phylogenetischen Analyse anhand von Sequenzähnlichkeiten von Enzymen dieser Familie geboten.

Die Analyse mittels CLUSTALW-Algorithmen lieferte drei Gruppen, die sich erstens aus den DT-Diaphorasen und AKRs, zweitens aus AER, AOR sowie einer QR (*S. aureus*) und drittens aus der zweiten QR (*E. coli*), ζ -Crystallin und den beiden Enonoxidoreduktasen aus der Erdbeere und Tomate zusammensetzen. In der Gruppe der Enonoxidoreduktasen, welche Monomere sind, befinden sich demnach mit der bakteriellen Chinonoxidoreduktase ein Dimer und mit ζ -Crystallin ein Homotetramer. FaEO und LeEO besitzen somit zwar einige biochemische Ähnlichkeiten zur Familie der NAD(P)H-abhängigen Chinonoxidoreduktasen, es bestehen aber keine großen Ähnlichkeiten in den Sequenzen. Eine klare Zuordnung zu einer der beschriebenen Klassen kann nur schwer getroffen werden. Im Gegensatz zu DT-Diaphorase-ähnlichen Enzymen enthält FaEO keinen Flavin-Cofaktor und liegt als Monomer vor. Aber auch die meisten ζ -Crystallin-ähnlichen Enzyme sind Di-, Tetra- oder Multimere. DT-Diaphorasen sind in der Lage NADPH und NADH umzusetzen, wohingegen ζ -Crystallin nur mit NADPH aktiv ist. Das von der DT-Diaphorase akzeptierte breite Substratspektrum unterscheidet sie von FaEO und LeEO. Die Spezifität für PQ ähnelt eher der Eigenschaft des ζ -Crystallins, welches zumindest nur eine limitierte Auswahl an chinoiden Substraten akzeptiert. Eine gemeinsame Eigenschaft der Proteine ist ihre Löslichkeit. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Heterogenität in den biochemischen Eigenschaften die wenigen konservierten Regionen in den Sequenzen widerspiegelt.

2 BETEILIGUNG VON FAEO AN DER BIOSYNTHESE VON HDMF

2.1 NACHWEIS UND CHARAKTERISIERUNG DER HDMF-BILDENDEN EIGENSCHAFT

Um zu zeigen, dass die Entstehung von HDMF in einem Assay mit heterolog exprimierten FaEO und NAD(P)H tatsächlich enzymatisch katalysiert und nicht chemisch abläuft wurden Versuche durchgeführt, die die typischen Charakteristika von enzymatischen Umsetzungen aufzeigen. Die Quantifizierung der im Ansatz gebildeten Menge an HDMF erfolgte mittels HPLC-MS/MS unter Berücksichtigung einer zuvor erstellten Kalibriergeraden.

2.1.1 Variation der Substratmenge

Die Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatisch katalysierten Umsetzung ist im Gegensatz zu einer chemischen bei hohem Substratangebot unabhängig von der Substratkonzentration. Deshalb erhält man bei Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentration eine Sättigungshyperbel.

Diese Abhängigkeit wurde in Ansätzen aus D-Fructose-1,6-diphosphat, FaEO und NADH überprüft. Im Falle einer Michaelis-Menten-Kinetik sollte es gelingen die enzymatische Bildung von HDMF von der rein chemischen Entstehung abzugrenzen (Hauck und Mitarbeiter, 2002). Die Substratsättigung von FaEO ab einer Konzentration von ca. 110 mM D-Fructose-1,6-diphosphat wies deutlich auf eine enzymatisch katalysierte Reaktion hin (Abb. C-2-1 A). Außerdem zeigte die Kontrolle mit einer Proteinfraction aus Zellen, die mit dem leeren Vektor transformiert worden waren (pET), dass die chemische Blindreaktion klar abgegrenzt werden kann. In diesen Kontrollansätzen wurde nur etwa 1/30 der HDMF-Menge gebildet im Vergleich zum Ansatz mit FaEO. Da bei der Herstellung dieser Proteinpräparationen der Reinigungsschritt der Ultrafiltration nicht angewendet worden war, zeigt dieses Ergebnis außerdem, dass die bakterielle Chinonoxido-reduktase keine HDMF-bildende Eigenschaft besitzt.

2.1.2 pH-Studie

Um einen möglichst breiten pH-Bereich abzudecken und um den Einfluss der Pufferzusammensetzung auf die enzymatische Reaktion zu sehen, wurde die pH-Studie in verschiedenen Puffersystemen durchgeführt. Abb. C-2-1 A zeigt ein klares Maximum der gebildeten Menge HDMF pro Zeit bei pH 6, wobei der McIlvaine-Puffer in diesem Bereich höhere Bildungsraten ermöglichte als der Phosphatpuffer. Im pH-Bereich von 7-9 ist der Einfluss aller eingesetzten Puffer gleich. Die leicht negativen Werte in den pH-Bereichen < 4 und > 9 ergaben sich durch die Blindwertkorrektur.

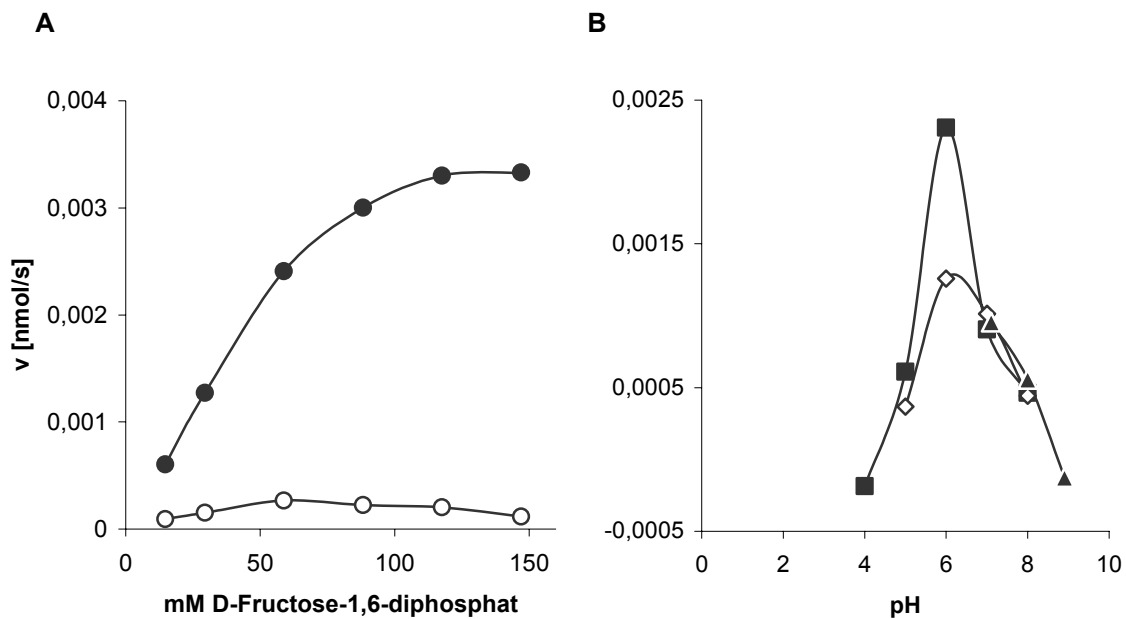


Abb. C-2-1: Substratabhängigkeit (D-Fructose-1,6-diphosphat) der HDMF-Bildung mit FaEO (●) oder pET (○) als Kontrolle unter Verbrauch von NADH (A) und pH-Studie von FaEO mit D-Fructose-1,6-diphosphat als Substrat und NADH als Cosubstrat (B); McIlvaine-Puffer(■), Phosphatpuffer(◇), Tris-Puffer(▲).

2.1.3 Cosubstrate

Der Einsatz verschiedener Reduktionsäquivalente sollte zeigen, welches von FaEO am Besten umgesetzt wird. Abb. C-2-2 A verdeutlicht, dass bei sonst gleichen Bedingungen die Menge an gebildetem HDMF in der Reihe Ascorbinsäure, NADH, NADPH zunimmt. Ascorbinsäure als Cosubstrat resultierte in einer Umsetzung die nicht viel effizienter als die der Kontrollreaktion war.

2.1.4 Cofaktoren

Wie bereits in Kap. C-1.2.4 erwähnt, gibt es einige Chinonoxidoreduktasen deren Aktivität durch die Zugabe von Flavin-Cofaktoren erhöht wird. Dies wurde auch mit D-Fructose-1,6-diphosphat als Substrat getestet. Aus der Inkubation des Enzyms mit Flavin-Mononucleotid (FMN) resultierte keine Aktivitätssteigerung (Abb. C-2-2 B). Im Gegenteil, die Menge an gebildetem HDMF war mit einer vorangegangenen Inkubation des Enzyms mit FMN sogar geringer als ohne.

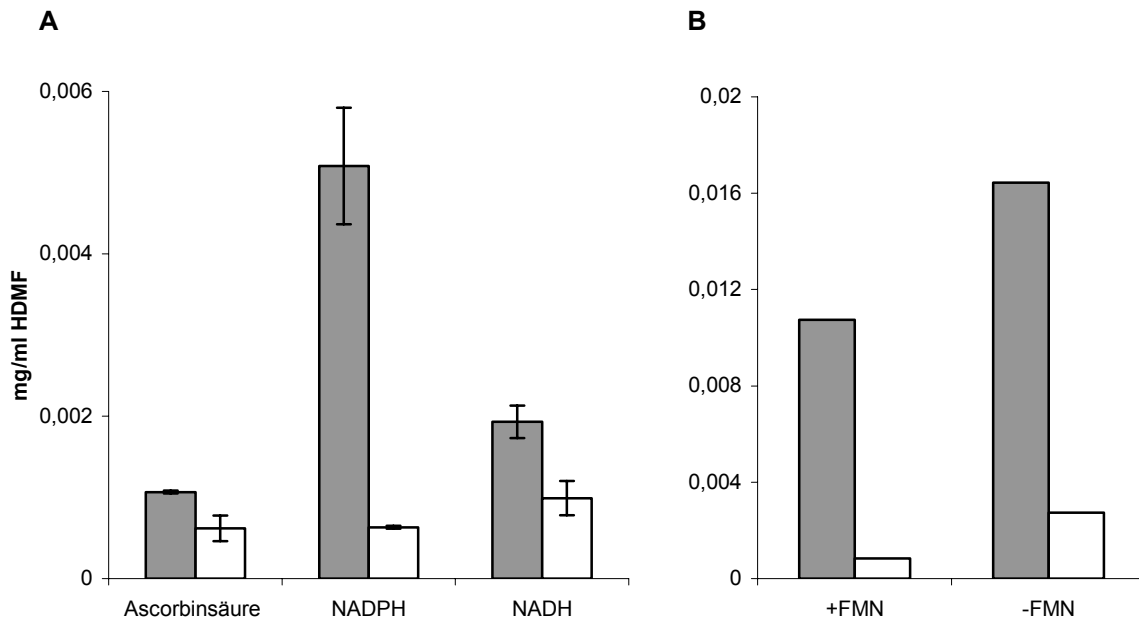


Abb. C-2-2: Abhängigkeit der Bildung von HDMF von verschiedenen Reduktionsäquivalenten (A) und von Flavin-Mononucleotid (FMN) als Cofaktor (B); Umsetzung von D-Fruktose-1,6-diphosphat mit FaEO (graue Balken) oder pET (weiße Balken); Enzymlösung wurde mit FMN vorbehandelt (+FMN), Enzymlösung wurde unbehandelt eingesetzt (-FMN).

2.1.5 Hitze-/Kälte-Inaktivierung

Nach dem Erhitzen (95 °C) einer FaEO-Lösung fiel die enzymatische Aktivität auf Kontrollniveau ab (Abb. C-2-3). Nach 24 h bei -20 °C und dem folgenden Tauschritt behielt FaEO noch 85 % seiner Aktivität.

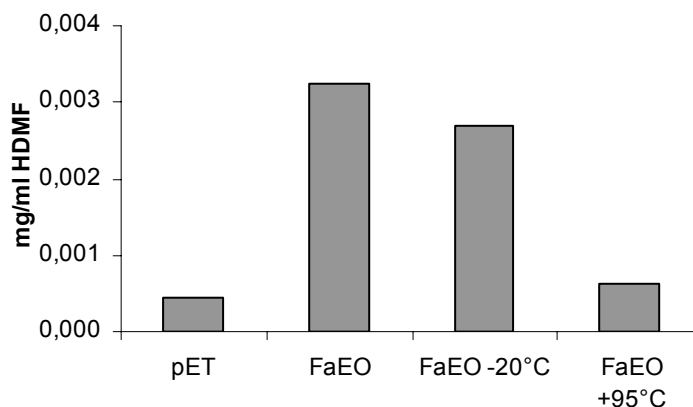


Abb. C-2-3: Hitze-Kälte-Stabilitätstest von FaEO; Umsetzung von D-Fruktose-1,6-diphosphat und NADH mit pET (Kontrolle), FaEO (unbehandelt), FaEO -20 °C (24 h bei -20 °C gelagert), FaEO +95 °C (5 Minuten auf 95 °C erhitzt).

2.1.6 Nachweis der Bildung von enantiomerenangereichertem HDMF

Der Nachweis einer enantioselektiven Biosynthese von HDMF in Inkubationsexperimenten mit Erdbeerproteinextrakt gelang Raab und Mitarbeiter (2003) durch eine für diese Fragestellung neu entwickelte Analysenmethode, der Chiralphasen-Kapillarzonen-elektrophorese (cKZE).

In dieser Studie wurde die Enantioselektivität des heterolog exprimierten Enzyms mit der des aus der Erdbeere isolierten Enzyms verglichen. Dafür ist das durch FaEO aus D-Fructose-1,6-diphosphat gebildete HDMF mittels cKZE analysiert worden. Um die pH-abhängige Racemisierung von HDMF, die im stark sauren, neutralen und basischen Milieu am schnellsten abläuft, möglichst gering zu halten, mussten die Inkubationsansätze im leicht sauren Milieu durchgeführt werden (Raab und Mitarbeiter, 2003). Als optimal stellte sich hierbei ein pH-Wert von 5 heraus, da in diesem Bereich der beste Kompromiss zwischen möglichst hoher Enzymaktivität und möglichst niedriger Racemisierung gefunden werden konnte. Die chemisch gebildete Referenz lag als Racemat vor, wohingegen FaEO das (+)-Enantiomer von HDMF (Retentionszeit, RT = 12,3 Min) im Überschuss von 4:1 gebildet hat.

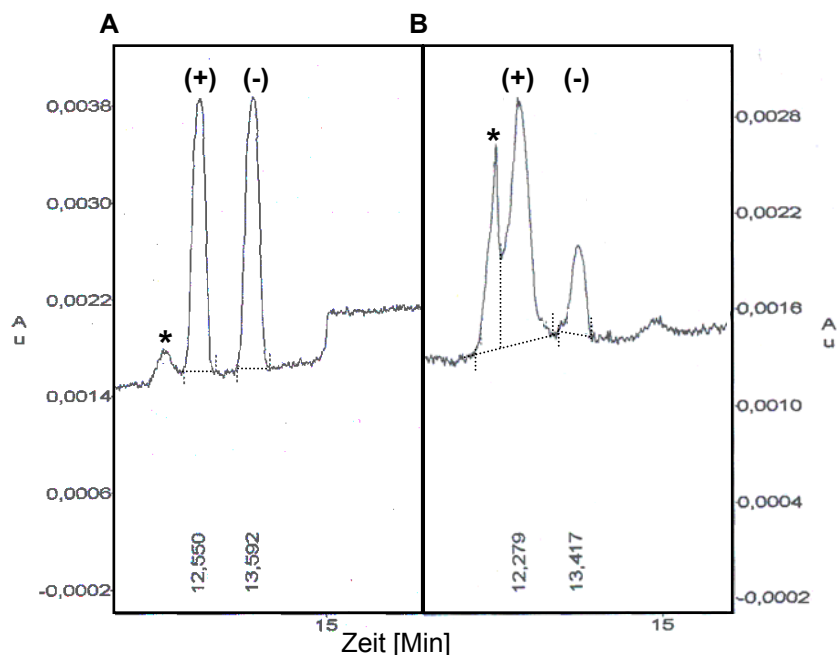


Abb. C-2-4: Chiralphasen-Kapillarzonen-elektrophorese: Analyse von racemischen HDMF (A) und durch FaEO gebildetem HDMF (B); ((+)-Enantiomer (RT = 12,3 Min.) : (-)-Enantiomer (RT = 13,4 Min.) = 80 : 20); Verunreinigung (★).

2.2 SUCHE NACH ZWISCHENVERBINDUNGEN DER HDMF-BIOSYNTHESE IN DER ERDBEERFRUCHT

2.2.1 1-Desoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphat (D1)

Hauck und Mitarbeiter (2003 a) stellten in Studien fest, dass die Diketoverbindung 1-Desoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphat (D1, Abb. C-2-5) eine Zwischenstufe während der chemischen Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat darstellt. Nachdem im Biosyntheseweg von HDMF in der Erdbeerfrucht die Intermediate der Transformation von D-Fructose-1,6-diphosphat zu HDMF noch ungeklärt waren, sollte nach einer Diketoverbindung als Zwischenstufe gesucht werden.

Für die Analyse reaktiver α -Dicarbonylverbindungen sind bereits verschiedene Methoden beschrieben worden, wobei häufig Derivatisierungsreaktionen mit so genannten Abfangreagenzien wie z. B. O-Aryl- oder O-Alkyl-Hydroxylaminen, Hydrazinen oder *o*-Diaminobenzaldehyden angewendet werden. Hierbei entstehen stabile Derivate, wie Oxime, Hydrazone und Chinoxaline, welche durch gängige Analyseverfahren nachgewiesen werden können.

Inkorporationsstudien an Erdbeeren mit *o*-Phenylendiamin (PD) zur Identifikation möglicher Vorläufer von HDMF wurden bereits in vorangegangenen Studien durchgeführt. Die Identifikation des entsprechenden Chinoxalins (Phosphorsäure-mono-[2,3-dihydroxy-3-(3-methyl-chinoxalin-2-yl)-propyl]-ester, Q1) scheiterte damals an fehlenden Referenzverbindungen. In dieser Studie konnte durch die Referenz von Q1 zunächst in Ansätzen aus D-Fructose-1,6-diphosphat und PD die Entstehung der Verbindung Q1 mit der molaren Masse von 314 durch HPLC-MS/MS-Messungen bestätigt werden (Hauck und Mitarbeiter, 2003 a).

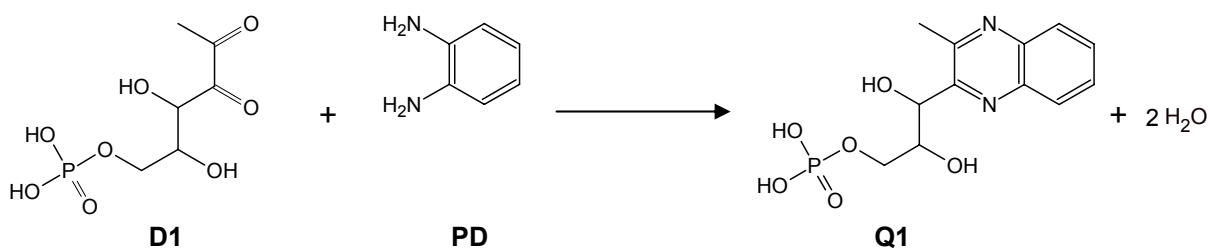


Abb. C-2-5: Reaktion von 1-Desoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphat (D1) mit *o*-Phenylendiamin (PD) unter Bildung von Phosphorsäure-mono-[2,3-dihydroxy-3-(3-methyl-chinoxalin-2-yl)-propyl]-ester (Q1); Hauck und Mitarbeiter (2003 a).

Anschließend wurde versucht auch *in vivo* Q1 als Reaktionsprodukt von D1 mit PD nachzuweisen. Dafür wurde eine PD-Lösung in reife Erdbeeren injiziert, diese anschließend über eine XAD-Festphasensäule aufgearbeitet und der semipolare Diethyletherextrakt und

B) als α , β -ungesättigte Carbonylverbindung und mögliches Substrat von FaEO sowie potentieller Vorläufer von HDMF entwickelt.

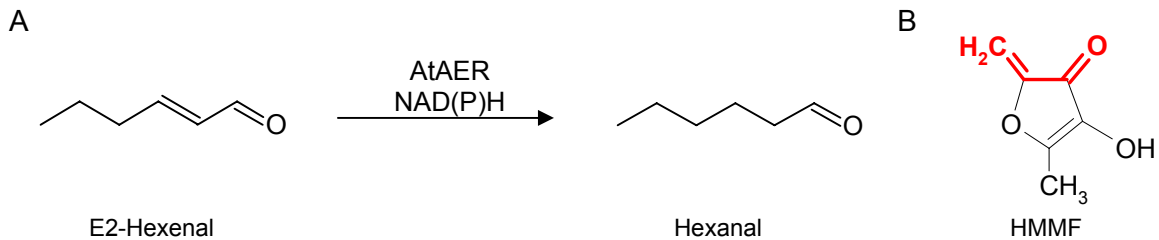


Abb. C-2-7 Reduktion der Doppelbindung von E2-Hexenal durch AtAER in Anwesenheit von NAD(P)H (A) (Mano und Mitarbeiter 2002) und Strukturformel von 4-Hydroxy-5-methyl-2-methylen-3(2H)-furanon (HMMF) (B), als postulierte Vorläuferverbindung von HDMF mit α , β -ungesättigter Carbonylstruktur.

2.2.2.1 Synthese von HMMF

Bereits 1978 wurde von Ledl und Mitarbeitern beschrieben, dass 4-Hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon (HMF) unter Bedingungen der Maillard-Reaktion mit Zuckerabbauprodukten, die eine Carbonylfunktion besitzen, zu ungesättigten Bräunungsprodukten kondensiert. In einem Modellversuch wurde damals gezeigt, dass HMF mit verschiedenen aliphatischen, aromatischen und heterocyclischen Aldehyden und Ketonen in Gegenwart von Piperidinacetat als Katalysator zu farbigen Substanzen reagiert (Abb. C-2-8). Ballesteros und Mitarbeiter (1983) beschreiben eine Möglichkeit zur Darstellung von Di-*tert*-butyl-methylenmalonat, welches als Mitglied der Gruppe der Methylenmalonatester eine wichtige Rolle als elektrophiles Alken in organischen Synthesen spielt. Die von ihnen beschriebene Methode basiert auf einer Knoevenagel-Reaktion zwischen Di-*tert*-butylmalonat und Paraformaldehyd unter Zugabe von Kaliumacetat und Kupferacetat in Essigsäure (Abb. C-2-9).

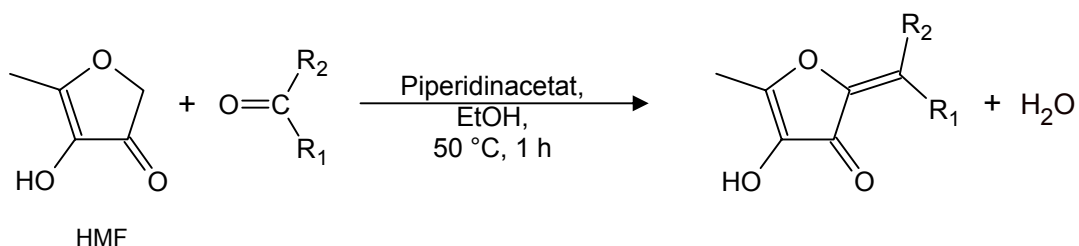


Abb. C-2-8: Umsetzung von 4-Hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanon (HMF) mit Aldehyden oder Ketonen zu Bräunungsprodukten; Ledl und Mitarbeiter (1978), z. B.: $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ und $\text{R}_2 = \text{CH}_3$, $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ und $\text{R}_2 = \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ oder $\text{R}_1 = \text{H}$ und $\text{R}_2 = \text{CH}=\text{N}-\text{NH}(\text{CH}_3)_2$.

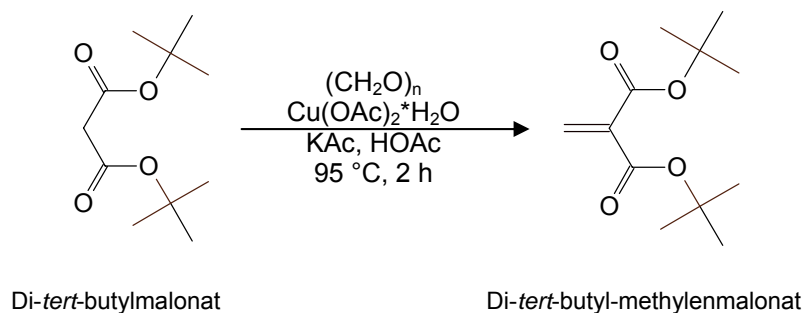


Abb. C-2-9: Umsetzung von Di-tert-butylmalonate mit Paraformaldehyd zu Di-tert-butyl-methylenmalonate; Ballesteros und Mitarbeiter (1983).

Obwohl beschrieben ist, dass die Produkte der beiden Synthesen aufgrund der hohen Reaktivität als α , β -ungesättigte Carbonylverbindungen teilweise im Reaktionsansatz weiter polymerisieren, wurde die Synthese von HMMF an die beiden Methoden angelehnt. HMF ist mit Formaldehyd zu HMMF umgesetzt worden (Abb. C-2-10).

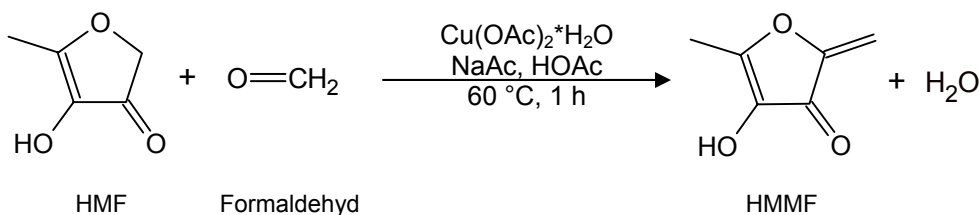


Abb. C-2-10: Reaktion von HMF mit Formaldehyd zu 4-Hydroxy-5-methyl-2-methylen-3(2H)-furanon (HMMF).

Beide Reaktionsansätze wurden getestet und auf Ausbeute und Reinheit des Produkts hin untersucht. Außerdem sind einige Parameter, wie Reagenzien, Lösungsmittel, Puffergemisch und Temperatur variiert worden, und es wurde schließlich aufgrund der höchsten Reinheit, einhergehend mit durchschnittlicher Ausbeute die in Abb. C-2-10 aufgeführten Bedingungen gewählt.

Die HPLC-MS/MS-Analysen des synthetisierten HMMF und HDMF zeigten, dass beide Substanzen ähnlich fragmentieren (Abb. C-2-11). Das Bruchstück m/z (+) 44 ($[\text{HMMF}-83+\text{H}]^+$ bzw. $[\text{HDMF}-85+\text{H}]^+$) entsteht aus beiden Substanzen. Ebenso werden aus beiden Strukturen die Fragmente $[\text{M}-\text{CO}+\text{H}]^+$ und $[\text{M}-42+\text{H}]^+$ gebildet. Lediglich Wasserabspaltungen sind im Produktionenspektrum von HMMF nicht zu erkennen.

Die durch GC-MS-Analytik erhaltenen Massenspektren der beiden Verbindungen weisen nur wenige Bruchstücke auf (Abb. C-2-12). Das Hauptfragment (m/z 55) im Massenspektrum

von HMMF ist um zwei Einheiten geringer als das Hauptfragment von HDMF (m/z 57). Die postulierten Fragmentierungen sind in Abb. C-2-12 angegeben.

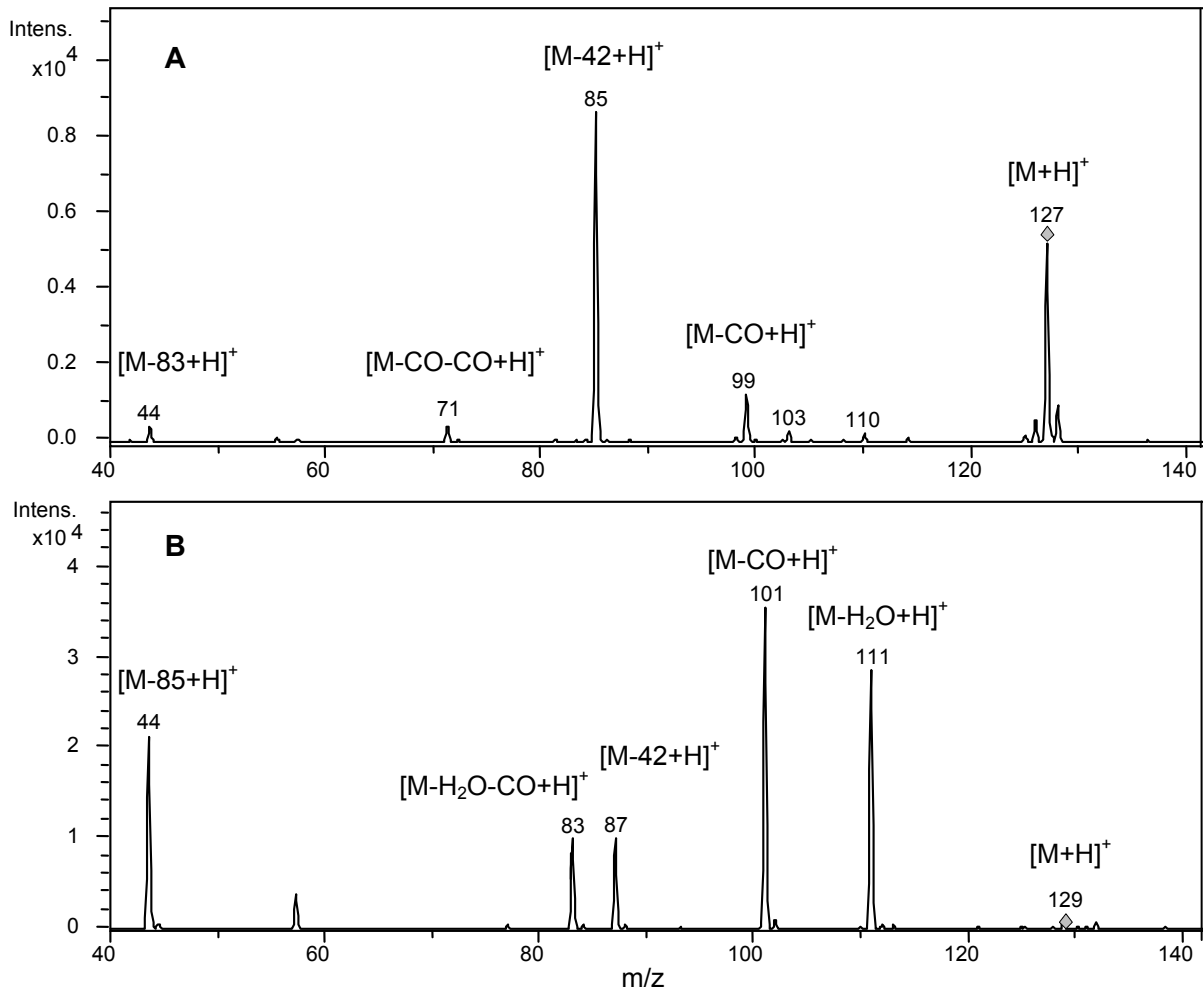


Abb. C-2-11: Produktionenspektren (HPLC-MS/MS) von HMMF (A) und HDMF (B).

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass es sich bei der synthetisierten Verbindung und HDMF um strukturell verwandte Substanzen handelte. Da für HMMF keine Referenzsubstanz zugänglich war wurden NMR-Studien zur eindeutigen Identifizierung der Verbindung durchgeführt.

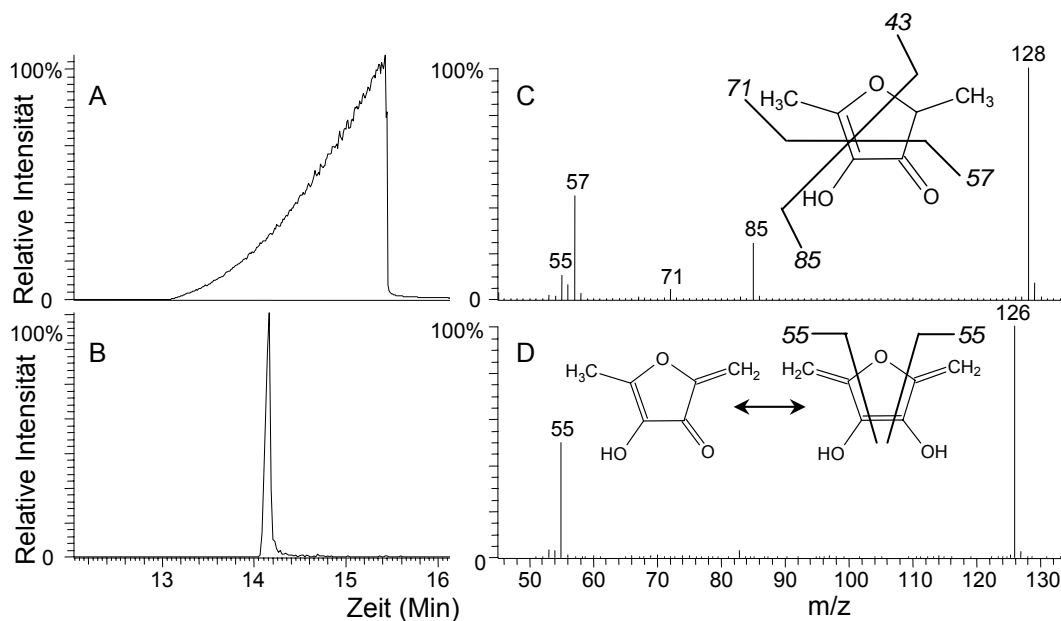


Abb. C-2-12: GC-MS-Analytik von HMMF und HDMF; Ionenchromatogramm von HDMF m/z 128 (A) und HMMF m/z 126 (B) sowie Fragmentierungsmuster von HDMF (C) und HMMF (D).

2.2.2.2 Stabilisierung von HMMF mit 3-Mercaptobenzoessäure (MBS)

Die für NMR-Studien notwendige Reinigung des Synthesengemisches stellte aufgrund der hohen Reaktivität der Zielverbindung HMMF ein Problem dar. Es gelang nicht mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Methoden (Flüssig-Flüssig-Extraktion, präparative Dünnschichtchromatographie, Säulenchromatographie an RP-18- und Kieselgelmaterial) ausreichend Substanz in der erforderlichen Reinheit zu isolieren.

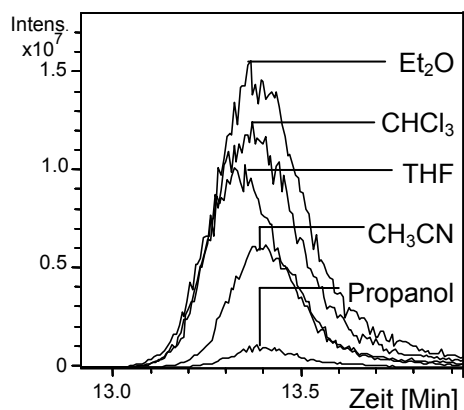


Abb. C-2-13: Lagerstudie (HPLC-MS) von HMMF (Ionenchromatogramm m/z (+) 127) in verschiedenen Lösungsmitteln; Diethylether (Et_2O); Chloroform (CHCl_3); Tetrahydrofuran (THF); Acetonitril (CH_3CN); Propanol; Lagerzeit: 30 Minuten.

Des Weiteren führte eine Lagerung der gereinigten Substanz lösungsmittelabhängig bis zum vollständigen Abbau (Abb. C-2-13). Die Reaktivität des gebildeten HMMF resultiert aus seiner Fähigkeit als α , β -ungesättigte Carbonylverbindung, nucleophile Substanzen, wie Wasser oder Ethanol, über eine konjugierte Addition an die Doppelbindung anzulagern (Abb. C-2-14, Vollhardt und Schore, 1995).

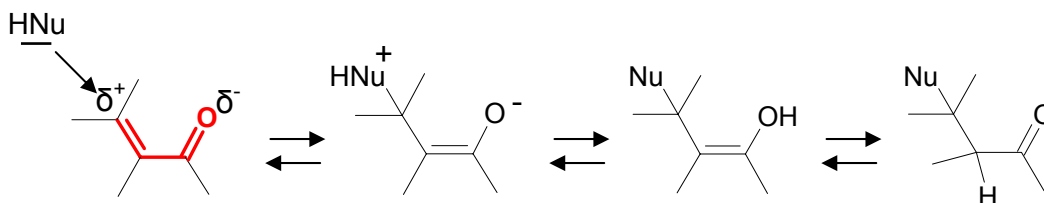


Abb. C-2-14: Schematische Darstellung einer konjugierten Addition an α , β -ungesättigte Carbonylverbindungen; Vollhardt und Schore (1995).

Ledl (1979) und Hiebl und Mitarbeiter (1987) beschrieben die Möglichkeit, dass bei der Reaktion von HMF und Formaldehyd und auch bei der Reaktion von Glucose mit Aminosäuren eine hydroxylierte Verbindung (HHMMF) entsteht, die sich durch Wasseranlagerung an die exocyclische Doppelbindung von HMMF bildet (Abb. C-2-15). Auch die Folgereaktion von HMMF mit Norfuraneol, die von Ledl und Severin (1978) für andere ungesättigte Hydroxyfuranone beschrieben wurde (Abb. C-2-16), bietet eine Erklärung für die geringe Ausbeute an HMMF. Deshalb musste das Ausgangsprodukt möglichst schnell vom Produkt abgetrennt werden. Zusätzlich, um eine ungerichtete Addition von Nucleophilen an HMMF zu vermeiden, wurde eine gezielte 1,4-Addition als Stabilisierungsreaktion durchgeführt.

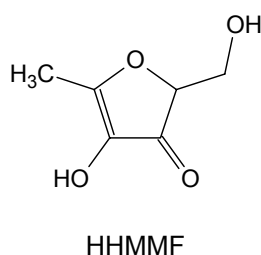


Abb. C-2-15: 4-Hydroxy-2-hydroxymethyl-5-methyl-3(2H)-furanon (HHMMF).

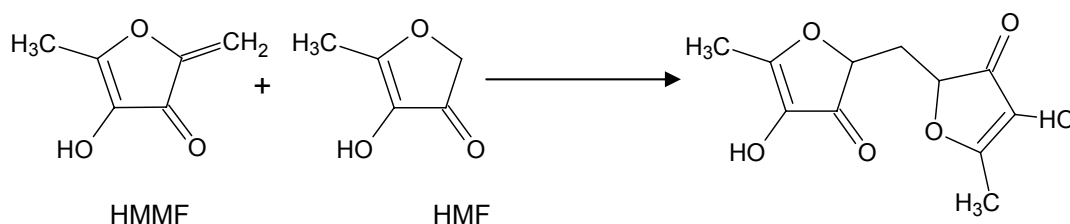


Abb. C-2-16: Polymerisationsreaktion von HMMF mit HMF; Ledl und Severin (1978).

2.2.2.3 Umsetzung von HMMF mit MBS über eine konjugierte Addition

Ballesteros und Mitarbeiter (1983) sowie Jezzusek und Schieberle (2003) beschrieben die Umsetzung von α , β -ungesättigten Carbonylverbindungen mit Thiolen zu Thioethern. Bei Jezzusek und Schieberle wurde diese Reaktion dafür verwendet, Acrylamid zu stabilisieren und somit der Stabilisotopenverdünnungsanalyse mit HPLC-MS quantitativ zugänglich zu machen. In dieser Studie sind verschiedene Thiolverbindungen als Reaktionspartner getestet worden. Daran angelehnt wurde in der vorliegenden Studie HMMF mit den in Abb. C-2-17 gezeigten Thiolen im leicht alkalischen Milieu umgesetzt und die entstandenen Verbindungen anschließend mittels GC-MS und HPLC-MS/MS analysiert.

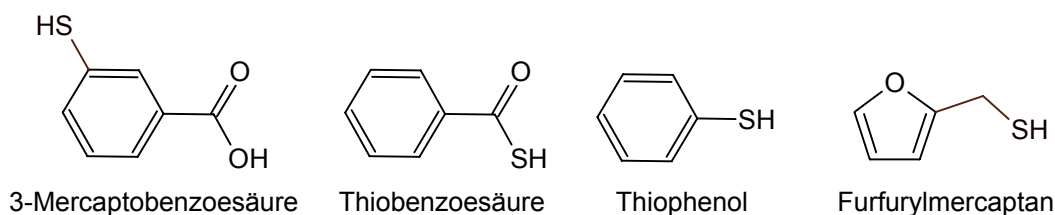


Abb. C-2-17: Zur Stabilisierung eingesetzte Thiolverbindungen.

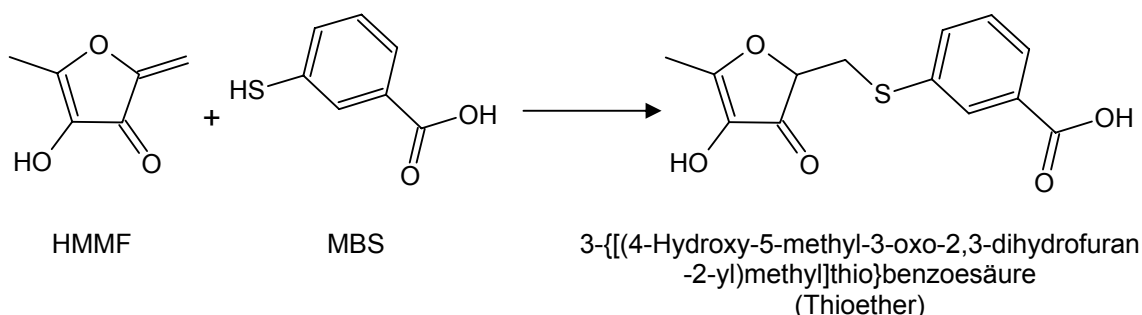


Abb. C-2-18: Umsetzung von HMMF mit 3-Mercaptobenzoessäure (MBS) zur stabilen 3-[[[4-Hydroxy-5-methyl-3-oxo-2,3-dihydrofuran-2-yl)-methyl]thio]benzoessäure (Thioether).

Es stellte sich heraus, dass die Umsetzung mit 3-Mercaptobenzoessäure (MBS) am Besten gelingt (Abb. C-2-18). Auch zeigt MBS ein nur geringes toxisches Potential.

Bei der HPLC-MS/MS-Analyse des Thioethers konnten Signale für zwei Isomere mit stark ähnelnden Fragmentierungsmustern detektiert werden (Abb. C-2-19). Das Verhältnis der Fragmentintensitäten m/z (+) 127, 155, 245 und 263 variierte. Dies deutete darauf hin, dass es sich hier um nicht vollständig getrennte Tautomere handeln könnte. Das doppelte Signal im UV-Chromatogramm bestätigte diese These (Abb. C-2-20).

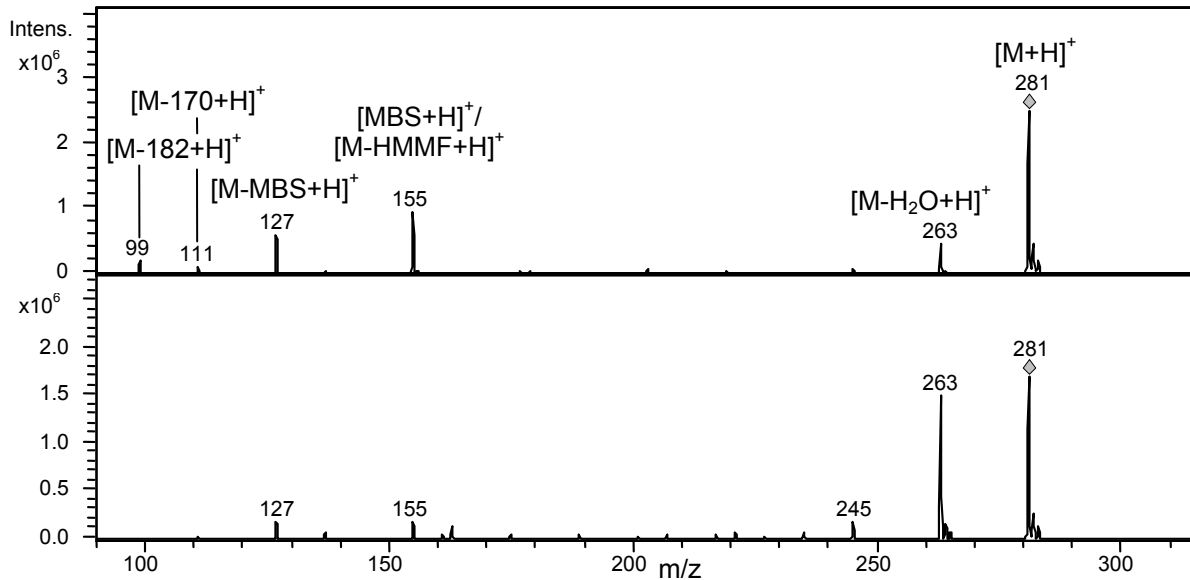


Abb. C-2-19: Fragmentierungsmuster der Thioether-Isomere im HPLC-MS/MS-Experiment; Isomer 1, RT: 19,0-19,2 Minuten (oben); Isomer 2, RT:19,2-19,4 Minuten (unten).

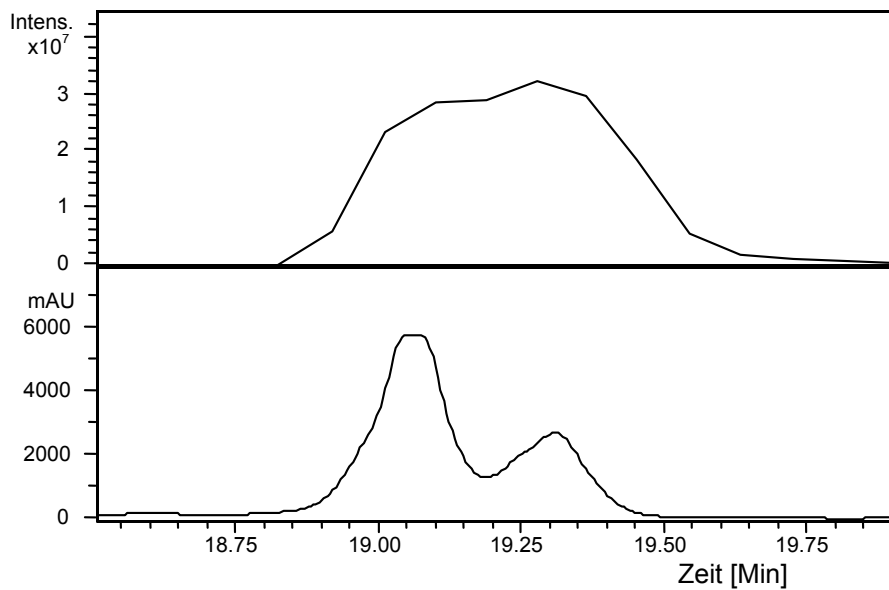


Abb. C-2-20: HPLC-MS-UV-Analytik des Thioethers; Ionenchromatogramm m/z (+) 281 (oben), UV-Chromatogramm bei 285 nm (unten).

Um den mit MBS entstandenen Thioether zu isolieren, wurde dieser säulenchromatographisch über Kieselgel und RP-18-Material gereinigt. Vom gereinigten Addukt wurden schließlich NMR-Daten aufgenommen.

2.2.2.4 NMR-Analytik des Thioethers

Durch die Addition von MBS an HMMF wurde die starre Doppelbindung an C-5 reduziert und das Molekül unterlag nun den für 3(2*H*)-Hydroxyfuranone typischen Tautomerisierungen (Abb. C-2-21).

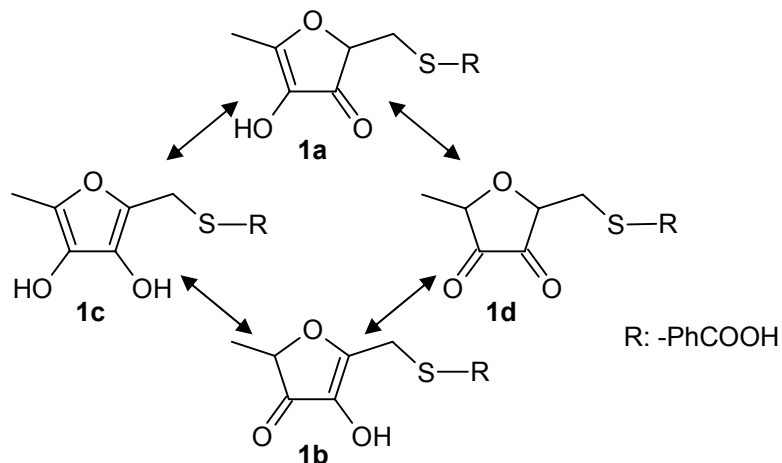


Abb. C-2-21: Tautomere Strukturen des Thioethers; 3-[[[4-Hydroxy-5-methyl-3-oxo-2,3-dihydrofuran-2-yl)methyl]thio]benzoesäure (1a), 3-[[[3-Hydroxy-5-methyl-4-oxo-4,5-dihydrofuran-2-yl)methyl]thio]benzoesäure (1b), 3-[[[3,4-Dihydroxy-5-methyl-2-furyl)methyl]thio]benzoesäure (1c), 3-[[[5-Methyl-3,4-dioxotetrahydrofuran-2-yl)methyl]thio]benzoesäure (1d).

Dies beeinflusste die NMR-Messung dahingehend, dass nun vier mögliche Tautomere existierten, die zusätzliche Signale lieferten. Zwei Tautomere lagen, wie beim EHMF (2-Ethyl-4-hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanon, 5-Ethyl-4-hydroxy-2-methyl-3(2*H*)-furanon) (Re und Mitarbeiter, 1973; Huber, 1992) im Überschuss vor. Es ergaben sich recht unübersichtliche Spektren. Ein- und zweidimensionale NMR-Experimente und vor allem der Spektrenvergleich mit den Referenzsubstanzen HDMF und EHMF brachten schließlich den Beweis, dass es sich bei der analysierten Verbindung um den Thioether von HMMF handelte (Tabellen C-2-1/C-2-2). Die Signale der aromatischen Ringe der vier Tautomere waren in ähnlichen Signalmustern angeordnet und unterschieden sich nur in den chemischen Verschiebungen. Eine Zuordnung erfolgte aufgrund ihrer Flächen und Kopplungen in COSY, HMBC und HMQC. Dies bestätigte die Aussage, dass die vielen detektierten Signale im Spektrum aus der Tautomerisierung des Thioethers resultierten und keine Artefakt- oder Verunreinigungssignale waren. Kopplungen zwischen den Furanon- und den zugehörigen Aromatenstrukturen konnten nicht beobachtet werden. Dennoch ließen sich die beiden Einheiten über die Flächen der Signale, also über die vorhandene Konzentration des Tautomers in der Probe einander zuordnen. So konnte auch das Verhältnis der vier Tautomere A : B : C : D von etwa 1 : 0,8 : 0,3 : 0,3 abgeschätzt werden.

Das $^1\text{H-NMR}$ des Tautomers A zeigte im Hochfeldbereich der chemischen Verschiebung gegen Tetramethylsilan vier Signale (Tab. C-2-1). Das Singulett bei 2,3 ppm stammt von den Protonen der Methylgruppe an C-1. Interessant waren die beiden aus der CH_2 -Gruppe an C-6 resultierenden Protonensignale, die sich um 0,3 ppm unterschieden obwohl sie von äquivalenten H-Atomen stammten. Signale von Protonen an C-6 konnten in Tautomer B dem Singulett bei 2,1 ppm zugewiesen werden. Wohingegen das Signal der Protonen an C-1 in Verbindung B aufgrund der benachbarten CH-Gruppe an C-2 als Duplett bei 1,4 ppm detektiert wurde.

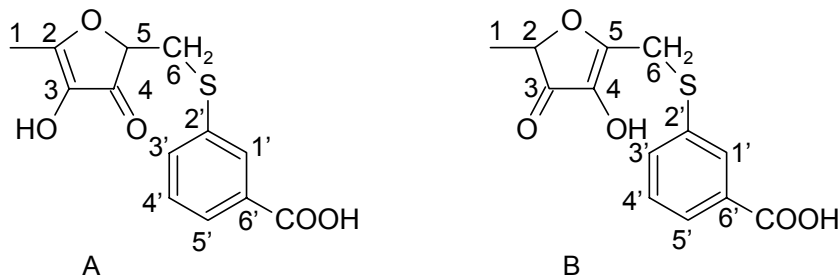


Abb. C-2-22: Strukturformeln der zwei wichtigsten tautomeren Formen des Thioethers; Die Nummerierung erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit der NMR-Messergebnisse nicht nach IUPAC-Regeln.

Tabelle C-2-1: $^1\text{H-NMR}$ -Signale des Thioethers Tautomer A (Abb. C-2-22) ermittelt durch HMBC (*heteronuclear multiple quantum multiple bond correlation spectroscopy*), COSY (*correlation spectroscopy*) und HMQC (*heteronuclear multiple quantum spectrometry*).

Pos.	^{13}C chemische Verschiebung (HMQC)	^1H chemische Verschiebung	J_{HH} [Hz]	Beobachtete NMR Kopplungen	
	δ [ppm]	δ [ppm]		COSY	HMBC
1	14,3	2,3	-	-	3
5	82,2	4,7	3,8; 6,4 (6 _{1/2})	6 _{1/2}	-
6 ₁	36,1	3,35	-	5	-
6 ₂	36,1	3,65	-	5	-
1'	128,6	8,21	1,8 (3')	3'/5'	3'
2'	137,0	-	-	-	-
3'	132,0	7,8	1,0 (5'); 1,3 (1'); 7,8 (4')	4'/1'	5'
4'	130,1	7,54	7,8 (3',5')	3'/5'	6'/2'
5'	129,1	8,05	1,3 (3'); 1,3 (1'); 7,8 (4')	4'/1'	1'
6'	132,9	-	-	-	-

Die Position der Atome wurde zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Moleküle genormt und entspricht somit nicht in allen Fällen den IUPAC-Regeln.

Tabelle C-2-2: $^1\text{H-NMR}$ -Signale des Thioethers Tautomer B (Abb. C-2-22) ermittelt durch HMBC (*heteronuclear multiple quantum multiple bond correlation spectroscopy*), COSY (*correlation spectroscopy*); HMQC (*heteronuclear multiple quantum spectrometry*).

Pos.	^{13}C chemische Verschiebung (HMQC)	^1H chemische Verschiebung	J_{HH} [Hz]	Beobachtete NMR Kopplungen	
	δ [ppm]	δ [ppm]		COSY	HMBC
1	18,3	1,4	-	-	2
2	104,7	5,0	-	-	-
6	13,6	2,1	-	-	4
1'	137,3	8,2	1,8 (3')	-	5'
2'	131,0	-	-	-	-
3'	140,4	7,7	1,6 (5'); 1,6 (1'); 7,8 (4')	4'/5'/1'	5'/1'
4'	129,3	7,5	7,8 (3'/5')	3'/5'	6'/2'
5'	131,1	8,1	1,4 (3'); 1,4 (1'); 7,8 (4')	4'/3'/1'	1'/3'
6'	130,0	-	-	-	-

Die Position der Atome wurde zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Moleküle genormt und entspricht somit nicht in allen Fällen den IUPAC-Regeln.

2.2.3 Nachweis der enzymatischen Umsetzung von HMMF zu HDMF

Um zu zeigen, dass es sich bei HMMF um den Vorläufer von HDMF handelt, wurde HMMF in Gegenwart von NADH mit heterolog exprimiertem FaEO umgesetzt (Abb. C-2-23). Im Ansatz mit FaEO war kein HMMF ($[M+H]^+$ m/z (+) 127) mehr nachweisbar, dafür konnte HDMF ($[M+H]^+$ m/z (+) 129) nachgewiesen werden. Zwar entstand auch im Ansatz mit pET (Kontrolle) eine geringe Menge an HDMF, dieses kann jedoch wie bereits in Kapitel C-2.1.1 beschrieben durch die gleichzeitig ablaufende chemische Bildung erklärt werden. Mit FaEO bildete sich in 15 Minuten bereits fünfmal mehr HDMF als im Ansatz mit pET nach 45 Minuten. Die Menge an HMMF nahm aufgrund der Instabilität der Verbindung und der Reaktion mit dem umgebenden wässrigen Milieu in jedem Ansatz kontinuierlich ab. Aus diesem Grund war es auch nicht möglich kinetische Daten zu der Umsetzung von HMMF durch FaEO zu gewinnen. Wird HMMF als Substrat zum Ansatz dazu gegeben ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass ein unbekannter Teil mit Wasser reagiert und so dem Enzym nicht mehr zur Verfügung steht. Aus diesem Grund fehlte ein wichtiger Beweis der enzymatischen Umsetzung und es musste ein anderer Versuchsaufbau gewählt werden. Wir entschlossen uns deshalb HMMF *in situ* aus D-Fructose-1,6-diphosphat zu bilden und einer Konkurrenzreaktion mit MBS sowie FaEO in Gegenwart von NADH zu unterwerfen.

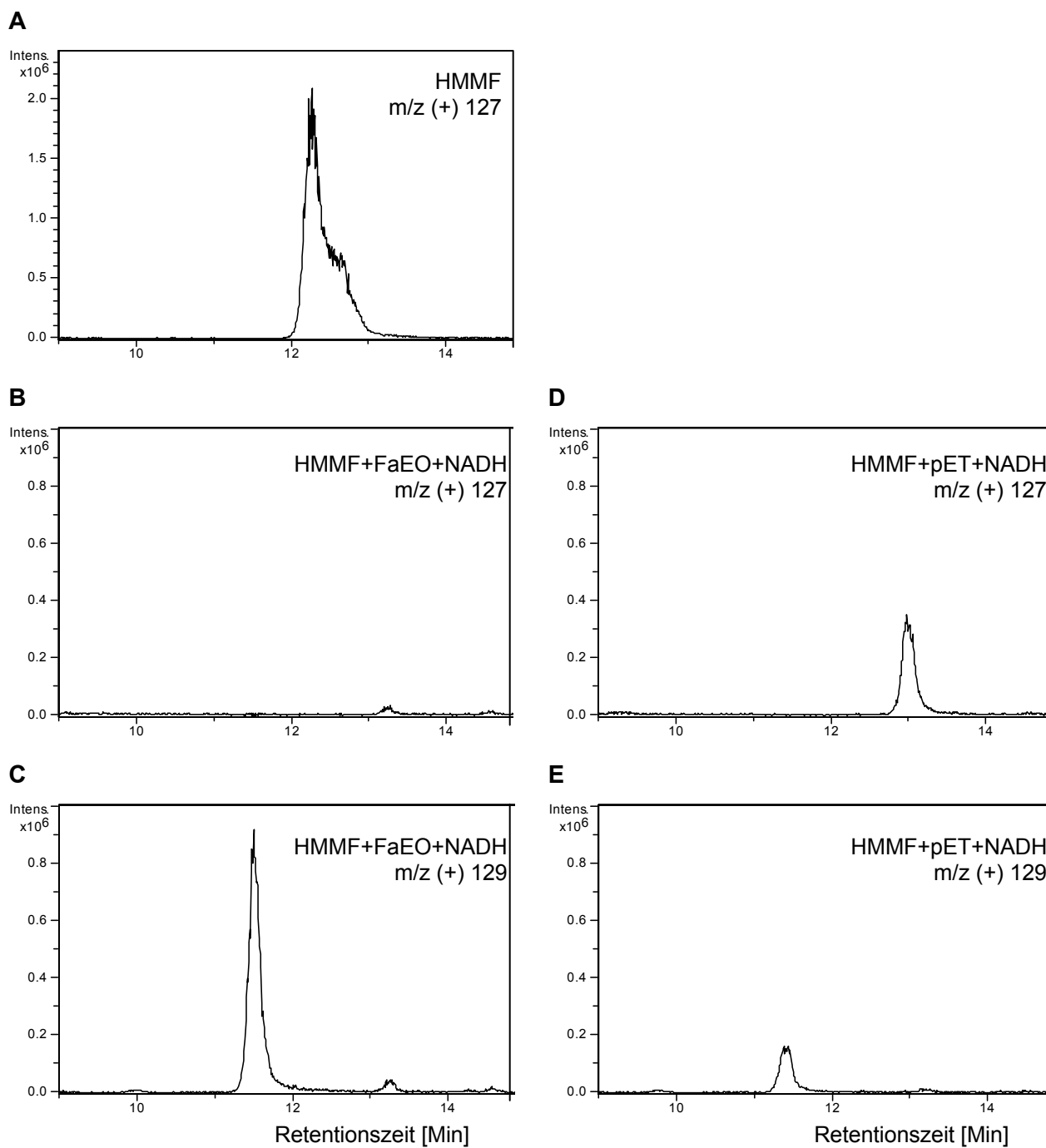


Abb. C-2-23: HPLC-MS-Analytik der enzymatischen Umsetzung von HMMF zu HDMF durch FaEO unter Verbrauch von NADH; HMMF, EIC m/z (+) 127 [HMMF+H]⁺ (A), HMMF mit FaEO, EIC m/z (+) 127 [HMMF+H]⁺ (B), HMMF mit FaEO, EIC m/z (+) 129 [HDMF+H]⁺ (C), HMMF mit pET, EIC m/z (+) 127 [HMMF+H]⁺ (D), HMMF mit pET, EIC m/z (+) 129 [HDMF+H]⁺ (E), Reaktionszeit: 15 Minuten (B,C); 45 Minuten (D,E).

Durch Zugabe von MBS sollte HMMF in den Thioether überführt oder durch Zugabe von FaEO und NADH in HDMF umgewandelt werden (Abb. C-2-24).

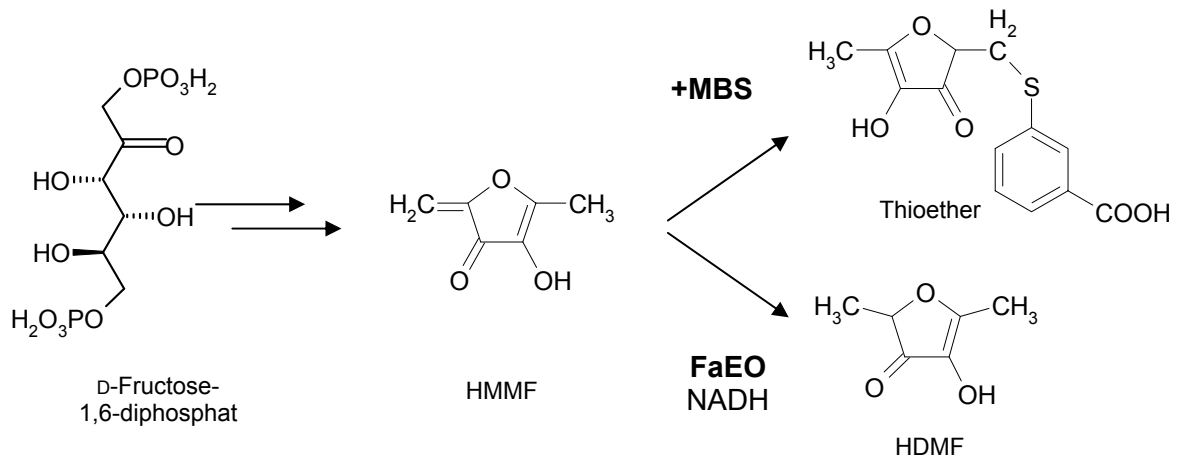


Abb. C-2-24: Konkurrenzreaktion von FaEO und MBS um HMMF.

Dass MBS in der eingesetzten Konzentration, 0,04 mg/ml, die Enzymaktivität nicht beeinflusst, wurde zuvor in photometrischen Aktivitätstests mit PQ überprüft. Abb. C-2-25 A zeigt die während der Konkurrenzreaktion von FaEO und MBS um HMMF entstandene Menge an HDMF. Die gleichzeitige Zugabe von MBS und FaEO/NADH lieferte geringere Mengen an HDMF als die Umsetzung mit FaEO/NADH alleine. Betrachtet man die Menge an gebildetem Thioether (Abb. C-2-25 B) wird deutlich, dass die Zugabe von FaEO zum Ansatz mit MBS die gebildete Menge Thioether verringert. Außerdem zeigte sich, dass FaEO eine höhere Affinität zu HMMF besitzt als MBS, da die Mengen der beiden daraus gebildeten Produkte sich stark unterscheiden. HDMF wurde nach 350 Minuten in einer Menge von etwa 400 nmol pro mmol D-Fructose-1,6-diphosphat gebildet. Wobei nach der gleichen Zeit MBS nur ca. 35 nmol an HMMF abfangen und in den Thioether umwandeln konnte.

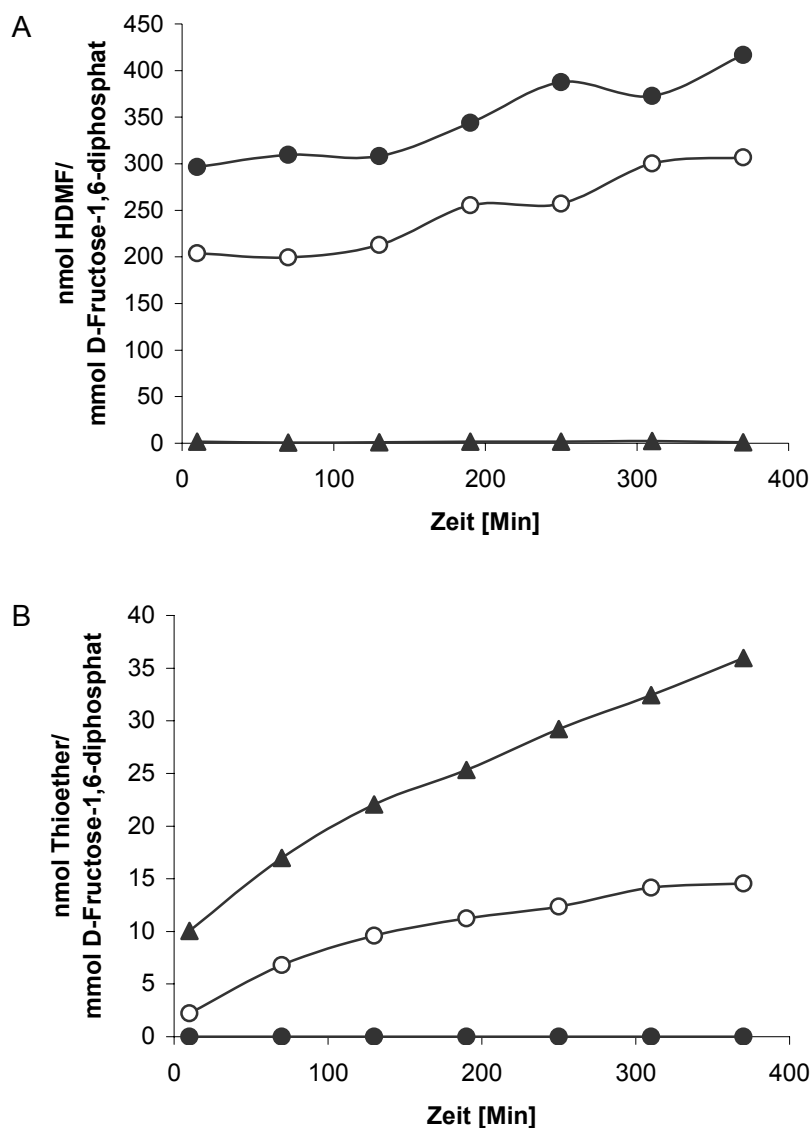


Abb. C-2-25: Bildung von HDMF (A) und Bildung des Thioethers (B) während der Konkurrenzreaktion von FaEO und MBS um aus D-Fructose-1,6-diphosphat entstandenes HMMF; D-Fructose-1,6-diphosphat + NADH + FaEO (●), D-Fructose-1,6-diphosphat + NADH + FaEO + MBS (○), D-Fructose-1,6-diphosphat + MBS (▲).

2.2.4 Nachweis von HMMF *in vivo*

2.2.4.1 Nachweis in der Erdbeerfrucht

Dass HMMF in bisher durchgeführten Studien mit Erdbeeren nicht identifiziert wurde, liegt wahrscheinlich an der hohen Instabilität und dem dementsprechend schwierigen Nachweis dieser Verbindung. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie mit der stabilisierten Form, dem Thioether gearbeitet. Durch die Injektion einer MBS-Lösung in Erdbeeren verschiedener Reifestadien sollte die HDMF-Biosynthese auf der Stufe von HMMF unterbrochen und der indirekte Nachweis der Verbindung als Thioether erbracht werden. Diese Applikationsmethode wurde bereits mit markierten Prekursoren von HDMF zur Aufklärung von dessen Biosynthese angewendet (Roscher und Mitarbeiter, 1998; Schwab, 1998; Wein und Mitarbeiter, 2001). Um die Bedingungen während der Fruchtreifung so realistisch wie möglich zu simulieren wurden ganze Erdbeeren eingesetzt. Reifende Erdbeeren bilden auch nach Abtrennung von der Mutterpflanze HDMF (Pérez und Mitarbeiter, 1996). Die von Schwab (1998) beschriebene Methode der Injektion der Applikationslösung in die Frucht wurde der Stielapplikationsmethode von Roscher und Mitarbeitern (1998) vorgezogen, da hier gewährleistet ist, dass die Verbindungen in der Frucht zur Verfügung stehen und nicht im Stiel verbleiben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Früchte zunächst tief gefroren und anschließend über XAD-2-Adsorptionschromatographie aufgearbeitet. Diese Methode bietet die Möglichkeit, polare Substanzen abzutrennen und schließlich zwei Fraktionen, den Glycosidextrakt (Elution mit Methanol) und den Aromaextrakt (Elution mit Diethylether) zu erhalten (Roscher und Mitarbeiter, 1998). Die Extrakte sind nach dem Ankonzentrieren und dem Überführen der Substanzen des Diethyletherextraktes in Acetonitril direkt mittels HPLC-MS/MS auf die Zielverbindungen hin untersucht worden. Der aus HMMF und MBS gebildete Thioether konnte in Früchten des pinkfarbenen und roten Reifezustandes eindeutig nachgewiesen werden (Abb. C-2-26). Im Gegensatz dazu wurde in grünen Früchten kein HMMF abgefangen, was die reifekorrelierte Bildung von HDMF in der Erdbeerfrucht bestätigt. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Erdbeeren aller Reifestadien ebenso aufgearbeitet. Die MS/MS-Daten aus pinkfarbenen Früchten zeigten, dass es sich bei der Verbindung der Masse 280 tatsächlich um den Thioether handelte, da Retentionszeit und Fragmentierungsmuster mit denen der Referenz (Abb. C-2-19) übereinstimmten.

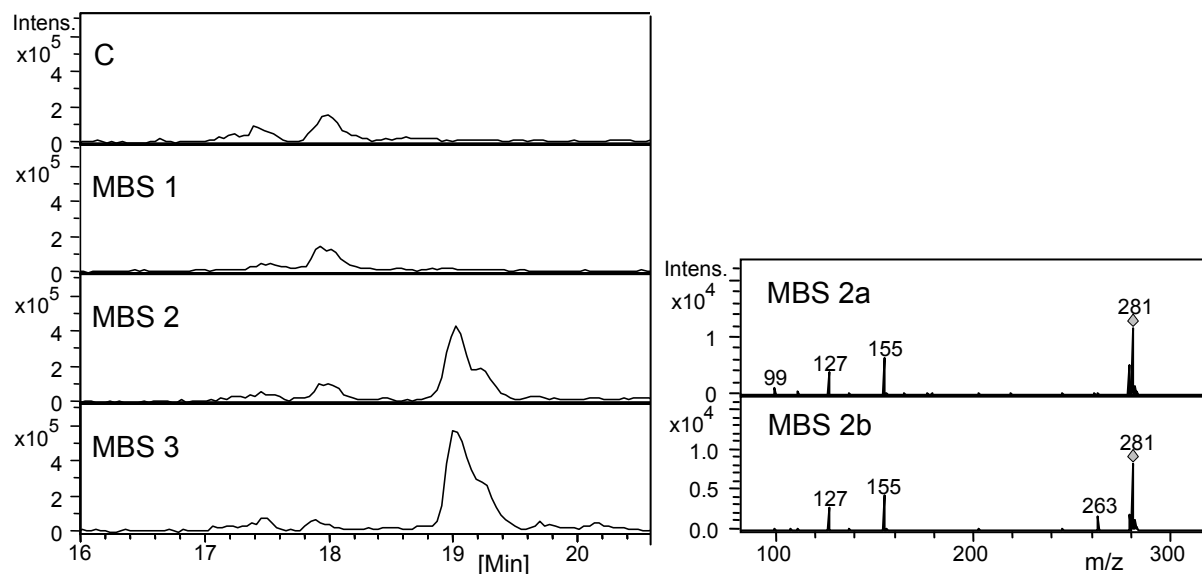


Abb. C-2-26: HPLC-MS/MS-Analytik des Thioethers aus HMMF und MBS nach Injektion von MBS in Erdbeerfrüchte; Ionenchromatogramm m/z (+) 281 [Thioether+H]⁺ des methanolischen Extrakts aus unbehandelten pinkfarbenen Erdbeeren (C), mit MBS behandelten grünen (MBS 1), pinkfarbenen (MBS 2) und roten (MBS 3) Erdbeeren; Produkt-Ionenspektrum von m/z (+) 281 aus dem Methanolextrakt aus pinkfarbenen, behandelten Erdbeeren; Isomer 1 RT: 19,0 Minuten (MBS 2a) und Isomer 2 RT: 19,2 Minuten (MBS 2b).

2.2.4.2 Inkorporationsstudien von 6-¹³C-D-Glucose in HMMF

Roscher und Mitarbeiter (1998), Schwab (1998) sowie Wein und Mitarbeiter (2001) konnten durch Inkorporationsstudien mit markierten Vorläufern von HDMF den in Abb. B-6 dargestellten Biosyntheseweg von HDMF in der Erdbeere postulieren. Die Aussage, HMMF sei auf diesem Weg der aus D-Fructose-1,6-diphosphat entstandene Prekursor von HDMF, sollte nun ebenfalls durch Inkorporationsstudien belegt werden. Es wurden wässrige Lösungen von 6-¹³C-D-Glucose an Erdbeeren des frühen pinkfarbenen Reifegrades appliziert und die Biosynthese von HDMF zwei Tage später auf der Stufe von HMMF durch Applikation von MBS unterbrochen. Anschließend sind die Früchte wie in Kapitel C-2.2.4.1 aufgearbeitet und untersucht worden. Der Markierungsgrad wurde mit Hilfe der Flächenintegrale des Signals des Pseudomoleküliens der Verbindung [M+H]⁺ und des dazugehörigen Pseudomoleküliens des Isotopologs [M+1+H]⁺ berechnet.

Abb. C-2-27 zeigt Ausschnitte aus Massenspektren, die zu gleichen Retentionszeiten aus methanolischen Erdbeerextrakten aufgenommen wurden. Die Ergebnisse in Abb. C-2-27 A, B und C wurden aus einer Erdbeerfrucht, die mit 6-¹³C-D-Glucose und MBS behandelt wurde, erhalten. Der Markierungsgrad des Thioethers war hier mit 33 % mehr als doppelt so hoch wie in Erdbeeren ohne Zusatz von stabil markiertem Zucker (13 %) (Abb. C-2-27 A und

D). Das bedeutet, dass 6-¹³C-Glucose von der Erdbeerfrucht in HMMF und somit in den Thioether inkorporiert wurde. Weiterhin konnte die stabile Markierung in MS/MS-Experimenten klar dem Hydroxyfuranon-Teil des Thioethers zugeordnet werden. Der Markierungsgrad des Produkt-Ion [M-155+H]⁺ (Hydroxyfuranon-Teil) aus stabil markiertem Thioether war mit 19 % höher als ohne Markierung (3 %) (Abb. C-2-27 B und E). Im Gegensatz dazu wies das Produkt-Ion [M-126+H]⁺ (MBS-Teil) fast denselben Markierungsgrad im markiertem und unmarkiertem Thioether (6 % bzw. 4 %) auf und lag somit im Rahmen der natürlichen Schwankungsbreite (Abb. C-2-27 C und F).

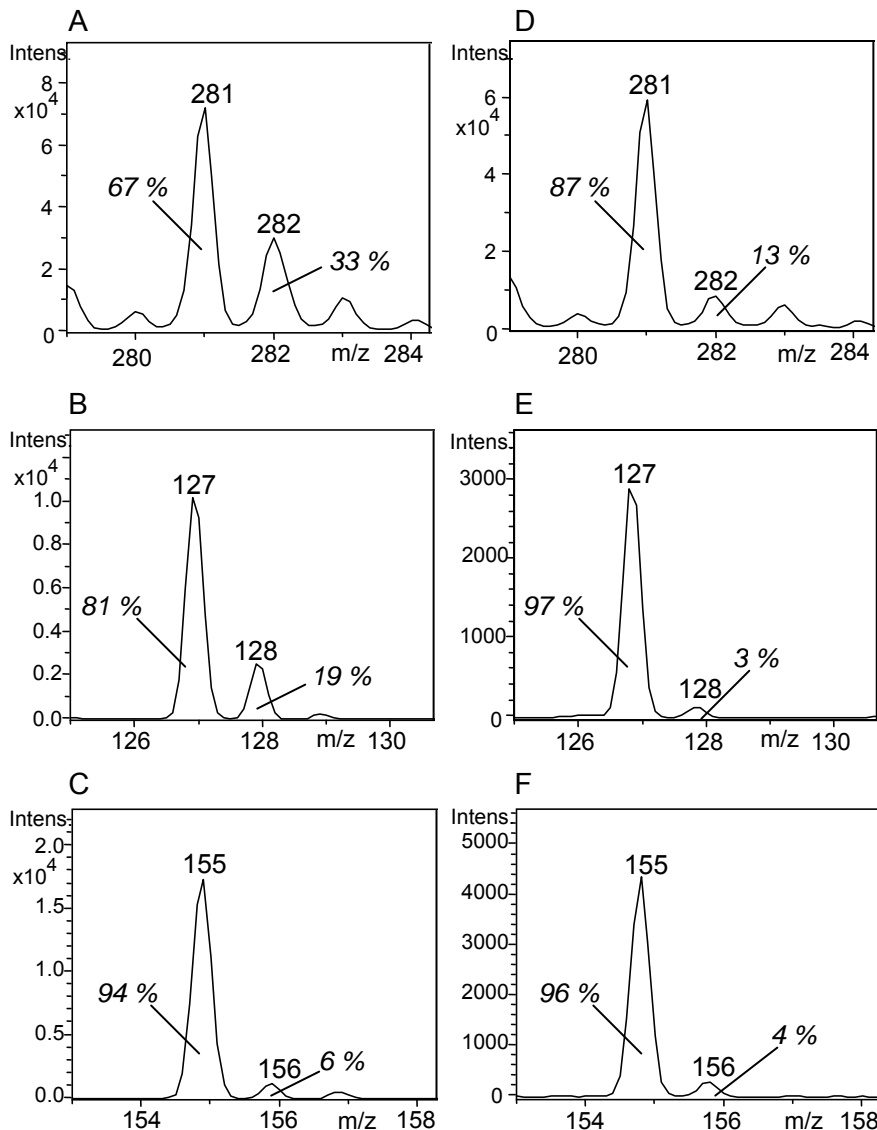


Abb. C-2-27: Ausschnitte aus Massenspektren des Thioethers, der aus Erdbeeren isoliert wurde, die mit 6-¹³C-D-Glucose und MBS (A, B, C) oder nur mit MBS (D, E, F) behandelt wurden; Pseudomolekülion [M+H]⁺ (A, D); Produkt-Ion [M-154+H]⁺ (B, E); Produkt-Ion [M-126+H]⁺ (C, F).

2.2.4.3 Nachweis von HMMF in anderen HDMF-bildenden Früchten

Neben der Erdbeere ist HDMF u. a. auch in der Himbeere (Klesk und Mitarbeiter, 2004; Honkanen und Mitarbeiter, 1980), Ananas (Rodin und Mitarbeiter, 1965; Fehl und Mitarbeiter, 1989; Pickenhagen und Mitarbeiter, 1981) und Mango (Pickenhagen und Mitarbeiter, 1981) nachgewiesen worden. Das Methoxyderivat wurde u. a. aus Kiwi (Takeoka und Mitarbeiter, 1986) und das Glucosid u. a. aus Tomaten (Krammer, 1994) isoliert. Zur Überprüfung, ob auch in diesen Früchten HMMF eine Rolle in der Biosynthese von HDMF spielt, wurden die gleichen Untersuchungen wie an der Erdbeere durchgeführt (Kap. C-2.2.4.1). Als Blindprobe dienten Äpfel, die kein HDMF bilden. Zunächst ist der HDMF-Gehalt in diesen Früchten ermittelt worden. Nur in Tomaten, Ananas und Himbeeren konnte HDMF bzw. eines seiner Derivate DMMF, HDMF- β -D-glucopyranosid nachgewiesen werden. In Kiwis wurde kein DMMF detektiert. Ebenso waren in Mangos und, erwartungsgemäß, in Äpfeln keine Furanone nachweisbar. All diese Ergebnisse sind rein qualitativ zu bewerten, weshalb hier keine Mengen- und/oder Konzentrationsangaben gemacht werden.

Bei der HPLC-MS/MS-Analyse von Früchten, die mit MBS-Lösung behandelt wurden, stellte sich heraus, dass der Thioether sowohl in Ananas als auch in Tomaten gebildet wurde (Abb. C-2-28). In Himbeeren konnten aufgrund der geringen Menge keine MS/MS-Daten des Ions m/z (+) 281 aufgenommen werden. In Mangos, Kiwis und Äpfeln war kein Thioether, folglich kein HMMF nachweisbar.

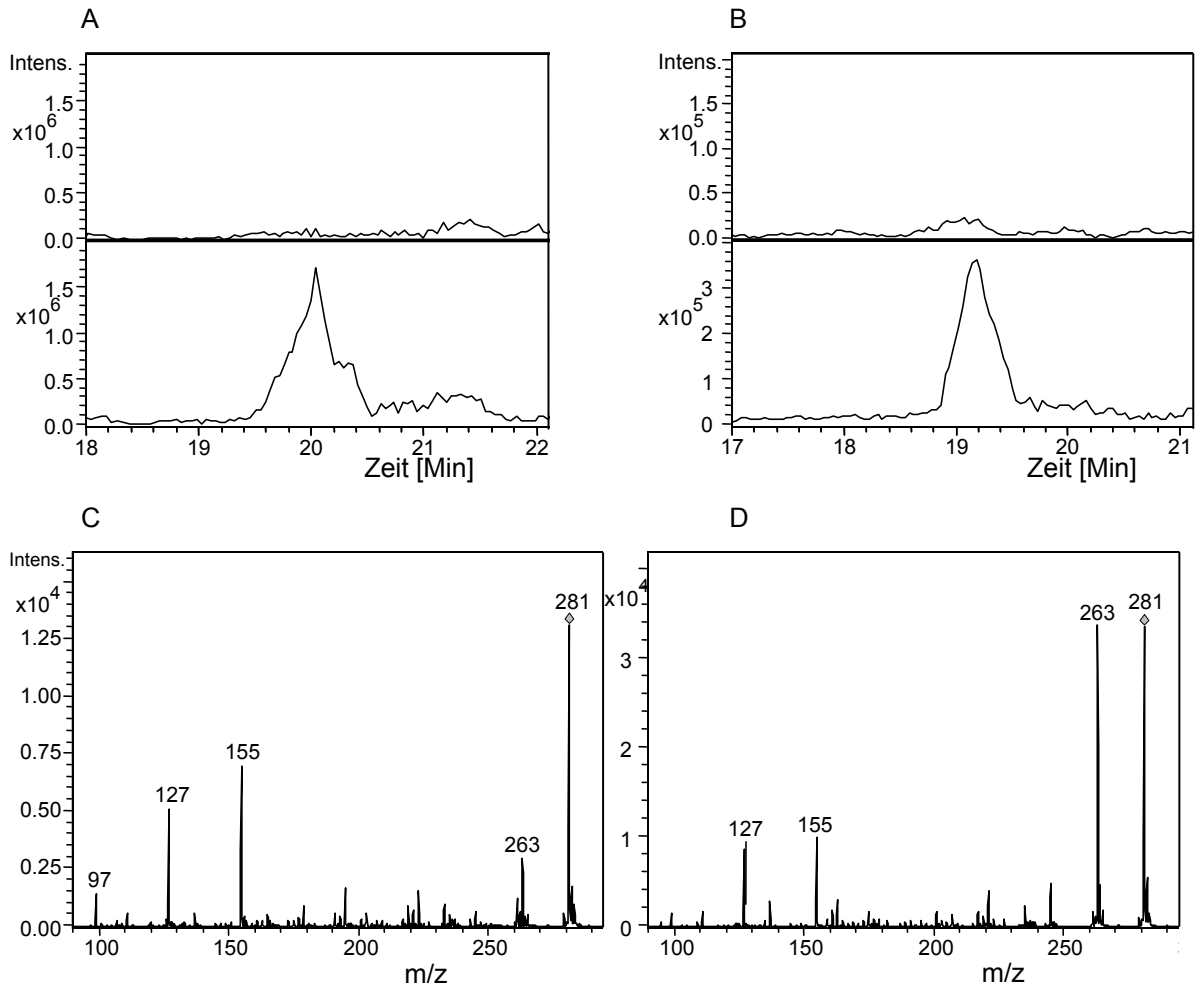


Abb. C-2-28: HPLC-MS/MS-Analyse des Thioethers (Ionenchromatogramm $[M+H]^+$ m/z (+) 281) aus Tomate und Ananas; Extrakt einer unbehandelten (oben) und einer behandelten (unten) Ananas (A); Extrakt einer unbehandelten (oben) und einer behandelten (unten) Tomate (B); Produktionenspektrum von m/z (+) 281, Isomer 1, RT: 19,5-20,0 Minuten im Extrakt einer behandelten Ananas (C) und Produktionenspektrum von m/z (+) 281, Isomer 2, RT: 20,0-20,2 Minuten im Extrakt einer behandelten Ananas (D).

2.3 DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Ursprünglich ist FaEO wegen seiner HDMF-bildenden Eigenschaft aus Erdbeeren isoliert worden (Raab und Mitarbeiter, 2006). Das korrespondierende Protein der cDNA, welches Peptidsequenzen von FaEO aufweist, wurde aber aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zunächst der Familie der Chinonoxidoreduktasen zugeordnet. Der Beweis, dass beide identisch sind, war bisher nicht erbracht worden. Deshalb wurden die HDMF-bildenden Eigenschaften des rekombinanten Proteins untersucht. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass aus D-Fructose-1,6-diphosphat mit NADH und dem heterolog exprimierten Enzym HDMF gebildet wurde. Wie allerdings bereits Hauck und Mitarbeiter (2002) gezeigt hatten, läuft die Bildung von HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat in Gegenwart von NADH auch ohne Enzym, also rein chemisch ab. D-Fructose-1,6-diphosphat stellte aufgrund der langen Umsetzungszeiten nicht das eigentliche Substrat von FaEO dar. Es wurde angenommen, dass D-Fructose-1,6-diphosphat zunächst chemisch in eine Zwischenstufe umgeformt wird, welche dann als Substrat für FaEO dient. Aus diesem Grund konnten keine echten Michaelis-Menten-Kinetiken aufgenommen werden. Dennoch wurde durch Variation der Substratmenge, eine Sättigungskurve für die HDMF-Bildung erhalten. Bei einer rein chemischen Bildung wäre eine Ursprungsgerade zu erwarten gewesen. Gleichzeitig wurden Kontrollansätze mit Proteinextrakt aus Zellen, welche mit dem leeren Vektor transformiert worden waren, durchgeführt. Die hier entstandene HDMF-Menge betrug nur 1/30 der in Anwesenheit von FaEO gebildeten Menge. Dies belegte, dass ohne FaEO nur die chemische Bildung abläuft und diese über die gebildeten Produktmengen gut von der enzymatischen Umsetzung differenziert werden konnte.

FaEO zeigte ein klares Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit bei pH 6. Dieses pH-Maximum unterscheidet sich von der pH-Abhängigkeit wenn PQ als Substrat dient (Kap. C-1.2.2). Der physiologische pH-Wert der Erdbeere verändert sich mit der Reifung. Im unreifen Zustand liegt er zwischen pH 3,5 und 4,6, nimmt dann bis zur weißen Reifungsphase auf pH 3,1 bis 3,3 ab und steigt im reifen bis überreifen Zustand wieder auf pH 3,5 bis 3,7 an (Perkins-Veazie, 1995, Woodward 1972). Diese niedrigen pH-Werte kommen allerdings hauptsächlich durch die in der Vakuole gelagerten Säuren zustande. Nachdem aber in Ermangelung von Signal- oder Transitpeptiden und der einfachen Aufreinigung aus dem löslichen Zellüberstand der Erdbeerfrucht (Raab und Mitarbeiter, 2006) davon ausgegangen wird, dass FaEO ein cytosolisches Enzym ist, sollte FaEO in der Lage sein bei maximaler Aktivität *in vivo* zu arbeiten, da im Cytosol ein neutraler pH herrscht.

Weil D-Fructose-1,6-diphosphat auf dem Weg zu HDMF unter anderem reduziert werden muss, wurden als Cosubstrate für FaEO verschiedene Reduktionsäquivalente getestet. Mit NADPH bildete FaEO in der gleichen Zeit fünfmal soviel HDMF wie mit Ascorbinsäure und 2,5-mal soviel wie mit NADH. NAD(P)H ist auch in der Literatur als das typische Cosubstrat

für Chinonoxidoreduktasen beschrieben. Ein weiteres Charakteristikum für einen Teil der Chinonoxidoreduktasen ist, wie bereits in Kap. C-1.2.4 beschrieben, ein kovalent- oder nicht-kovalent gebundener Flavin-Cofaktor. Dieser kann laut Luster und Buckhout (1989) bei der Aufreinigung von Proteinen verloren gehen und somit die Aktivität des Enzyms mindern. Bei der Umsetzung von D-Fructose-1,6-diphosphat mit NADH durch FaEO trat durch die Inkubation des Enzyms mit Flavin-Mononucleotid (FMN) ein Hemmeffekt auf. Nachdem keine Flavodoxin-Bindungsstelle anhand der Sequenz festgestellt wurde und auch das Absorptionsspektrum des Enzyms gegen einen Flavin-Cofaktor spricht (Kap. C-1.2.4), war dieser Versuch ein weiterer Beweis dafür, dass FMN nicht für die Aktivität des Enzyms benötigt wird.

Ein überzeugendes Argument für eine enzymatische Bildung von HDMF waren die Ergebnisse, die die Analytik des gebildeten HDMF mittels Chiralphasen-Kapillarzonenelektrophorese (cKZE) lieferte. HDMF besitzt an C-2 ein chirales Zentrum. Chemisch hergestelltes HDMF ist in der Regel racemisch. Dass Enzyme hingegen oftmals die Bildung eines Enantiomers bevorzugen, ist seit langem bekannt und wird industriell genutzt. Raab und Mitarbeitern (2003) gelang es mit Hilfe der cKZE die beiden Enantiomere von HDMF zu trennen und so deren Mengenverhältnis zu bestimmen. Die Analyse des mittels Erdbeerextrakt gewonnenen HDMFs zeigte einen Überschuss des (+)-Enantiomers. In dieser Studie wurde das durch die Inkubation von heterolog exprimierten Erdbeerprotein mit D-Fructose-1,6-diphosphat und NADH gewonnene HDMF untersucht. Ein Problem stellt die relativ hohe und pH-abhängige Racemisierungsgeschwindigkeit von HDMF in Lösung dar. Die Arbeitsgruppe um Raab (2003) zeigte, dass im schwach sauren Milieu die Racemisierung von HDMF am langsamsten abläuft. Deshalb wurden in dieser Studie die Ansätze bei pH 5 durchgeführt, wodurch noch eine akzeptable Aktivität des Enzyms gewährleistet war. Die Analyse mittels cKZE bestätigte das Ergebnis von Raab und Mitarbeitern (2003). Das im Reaktionsansatz entstandene HDMF war aus unterschiedlichen Mengen der beiden Enantiomere zusammengesetzt, wobei das (+)-Enantiomer im Überschuss vorlag. Zusammen mit diesem Ergebnis waren nun ausreichend Beweise gegeben, dass FaEO die Fähigkeit besitzt, HDMF aus D-Fructose-1,6-diphosphat zu bilden und es sich somit um das von Raab beschriebene Enzym handelt.

D-Fructose-1,6-diphosphat wurde von Roscher und Mitarbeitern (1998) als der Vorläufer von HDMF mit der höchsten Einbaurate *in vivo* beschrieben. In unseren Experimenten sprachen allerdings die enzymatischen Umsetzungszeiten von 16 bis 24 h, die für die Bildung von HDMF durch FaEO in *in vitro* Assays benötigt wurden, gegen eine direkte enzymatische Transformation des phosphorylierten Kohlenhydrats. Hauck und Mitarbeiter (2002) stellten in Studien fest, dass HDMF rein chemisch aus D-Fructose-1,6-diphosphat über die Zwischenverbindung 1-Desoxy-2,3-hexodiulose-6-phosphat (D1, Abb. C-2-5) entstehen

kann. Hierbei handelt es sich um eine sehr reaktive α -Dicarbonylverbindung. Auch bei der Entstehung von 4-Hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanon (HMF) in der Tomate und im Hefeextrakt spielt eine solche Diketo-Verbindung, 4,5-Dihydroxy-2,3-pentandion (DPD), eine wichtige Rolle. Diese entsteht spontan aus D-Ribulose-5-phosphat nach Wasser- und Phosphatelimination (Hauck und Mitarbeiter, 2003 a, c). Die Wahrscheinlichkeit, dass reaktive α -Dicarbonylverbindungen auch an der Biosynthese von HDMF in der Erdbeerfrucht beteiligt sein könnten, erschien zunächst plausibel, da die Bildung von HDMF im Zuge der Maillard-Reaktion über α -Dicarbonylverbindungen abläuft und das HDMF-bildende Enzym aus der Erdbeere aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in die Klasse der Chinonoxidoreduktasen eingeordnet wurde wobei als einziges bisher bekanntes Substrat PQ, eine *o*-Diketoverbindung, fungierte.

Die Arbeitsgruppe um Hauck (2003 c) wies die Verbindung D1 in der Tomate durch das Abfangreagenz *o*-Phenylendiamin nach, indem dieses in die Frucht injiziert, und das Produkt nach Aufreinigung mittels HPLC-MS/MS analysiert wurde. In der Erdbeerfrucht konnte D1 nicht nachgewiesen werden. Auch eine mögliche Dephosphorylierung der Verbindung in der Frucht wurde überprüft. Nach Darstellung der dephosphorylierten Referenz wurde gezielt nach dieser Verbindung in den Extrakten gesucht, diese jedoch nicht gefunden. Demzufolge wird davon ausgegangen, dass D1 in der Erdbeerfrucht nicht an der Biosynthese von HDMF beteiligt ist.

Einen wichtigen neuen Aspekt brachten die Studien von Mano und Mitarbeitern (2000 a, 2000 b, 2002, 2005). In diesen wurde ein Enzym (AtAER) charakterisiert, welches wie FaEO über Sequenzhomologien den Chinonoxidoreduktasen zugeordnet wurde. Im Laufe dieser Studien stellte sich allerdings heraus, dass die Hauptaufgabe des Enzyms die Reduktion von α , β -ungesättigten Aldehyden und Ketonen ist. Eine weitere Besonderheit zeigte sich in der katalysierten Reaktion. AtAER katalysiert nicht wie die schon lange bekannte Familie der Aldo-Keto-Reduktasen die Reduktion der Carbonylgruppe, sondern selektiv die der Doppelbindung in α , β -ungesättigten Carbonylstrukturen. Durch die Übertragung dieses Strukturmerkmals auf unsere Problematik postulierten wir HMMF, ein bisher unbekanntes α , β -ungesättigtes Hydroxyfuranon, als primäres Substrat von FaEO. Die Synthese dieses kommerziell nicht verfügbaren Stoffes wurde über eine Knoevenagel-ähnliche-Reaktion ausgehend von HMF und Formaldehyd durchgeführt. Neben der Vielzahl an Reaktionsprodukten erschwerte die Instabilität der Zielsubstanz, die aufgrund ihrer α , β -ungesättigten Doppelbindung konjugierte Additionsreaktionen mit nucleophilen Reaktionspartnern eingeht, die Aufreinigung von HMMF. Aus diesem Grund wurde eine gezielte konjugierte Addition zur Stabilisierung durchgeführt. Die NMR-Daten des gebildeten Thioethers bestätigten die Struktur. Reaktionsansätze mit FaEO, NADH und HMMF zeigten, dass HMMF durch das rekombinante Protein zu HDMF umgesetzt wird. Dadurch war gleichzeitig eine neue Substanz entdeckt, ein weiteres Substrat von FaEO gefunden und der

direkte Vorläufer von HDMF – zumindest *in vitro* – identifiziert. Vermutlich wurde HMMF aufgrund der hohen Labilität der Verbindung bislang in keiner Studie als Erdbeerinhaltsstoff beschrieben. Der Nachweis musste demzufolge in Form des stabilen Thioethers erfolgen. Durch die Applikation von MBS an Erdbeeren verschiedener Reifestadien sollte die Biosynthese von HDMF auf der Stufe des postulierten Intermediats gestoppt und anschließend die Fruchtextrikte auf die gebildete stabile Verbindung hin untersucht werden. HDMF wird in der Erdbeere reifekorreliert gebildet (Pérez und Mitarbeiter, 1996; Raab und Mitarbeiter, 2006). Dazu passen auch die Expressionsdaten von FaEO in der Erdbeerfrucht, die zeigen, dass die Enzymexpression erst in weißen Früchten beginnt und in roten Früchten ihr Maximum erreicht (Raab und Mitarbeiter, 2006). In dieser Studie gelang der Nachweis von HMMF, dem mutmaßlichen Vorläufer von HDMF, in Form seines Thioethers in Erdbeeren. In Übereinstimmung mit den oben genannten Daten konnten wir zeigen, dass auch die Menge an HMMF mit der Reifung der Frucht zunimmt. An Erdbeeren applizierte stabil markierte D-Glucose wird von der Frucht metabolisiert und für die Biosynthese von HDMF herangezogen (Roscher und Mitarbeiter, 1998). In Untersuchungen von Erdbeeren mit stabil markierter D-Glucose und MBS konnte die stabile Markierung in der Furanonstruktur des Thioethers von HMMF wieder gefunden werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Theorie, dass HDMF auf dem in Abb. C-2-30 dargestellten Weg *in vivo* gebildet wird.

Aus den Ergebnissen wurde gefolgert, dass auch in anderen HDMF-bildenden Früchten die Biosynthese des Aromastoffes über den gleichen Weg ablaufen könnte. Zur Überprüfung dieser Theorie wurden Früchte, deren HDMF-Gehalt bereits dokumentiert war, wie Ananas, Tomate, Kiwi, Himbeere und Mango, mit MBS behandelt und die Fruchtextrikte anschließend mit HPLC-MS/MS auf den Thioether hin untersucht. In Ananas und Tomate, in denen die größten Mengen an HDMF in der Literatur beschrieben wurden, gelang der Nachweis. Keine Hinweise auf HMMF konnten bei den Versuchen mit Kiwi, Himbeere und Mango gefunden werden, was allerdings seinen Grund im Detektionslimit haben könnte. Es ist nicht auszuschließen, dass mit größeren Einwaagen auch hier positive Ergebnisse erzielt werden könnten.

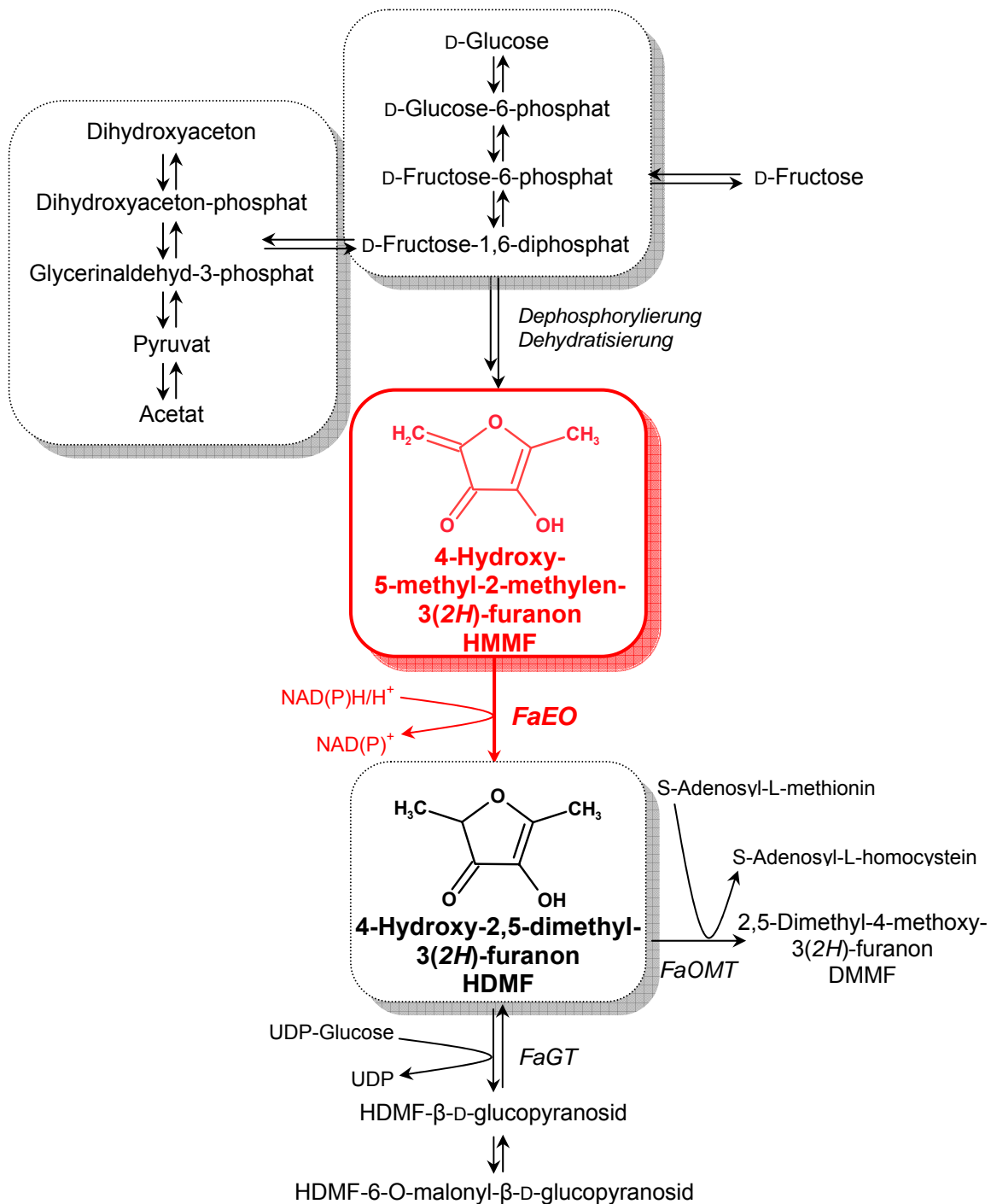


Abb. C-2-30: Postulierter Biosyntheseweg von HDMF in der Erdbeerfrucht nach Roscher und Mitarbeiter (1998), erweitert durch die neu gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit (rot). HMMF entsteht aus D-Fruktose-1,6-diphosphat über noch unbekannte Mechanismen und wird durch FaEO unter Verbrauch von NAD(P)H zu HDMF umgesetzt. FaOMT: *F. ananassa* O-Methyltransferase; FaGT: *F. ananassa* Glycosyltransferase.

Nachdem in Tomaten und Ananas HMMF als Substrat von FaEO und auch das enzymatische Reaktionsprodukt HDMF enthalten ist, lag es nahe, auch diese Früchte auf

ein ähnliches Enzym hin zu untersuchen. Durch Abgleich der Sequenzen einer Tomatenexpressionsdatenbank konnte ein Gen, dort beschrieben als „*putative quinone oxidoreduktase-like enzyme*“, mit einer 71 %igen Übereinstimmung zu *FaQR* gefunden werden. Die Klonierung, heterologe Expression und Charakterisierung dieses Enzyms wurde bereits in Kap. C-1.3 beschrieben. Auch in Ananasfrüchten wurde das Gen einer mutmaßlichen Chinonoxidoreduktase nachgewiesen (Moyle und Mitarbeiter, 2005), welches im Sequenzvergleich auf DNA-Ebene eine bedeutende Übereinstimmung mit *FaQR* und dem Gen von LeEO aufweist (Abb. D-4).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es gelungen ist, den letzten Schritt der Biosynthese von HDMF in Erdbeeren aufzuklären (Abb. C-2-30). Die Ergebnisse der *in vitro* Studien mit dem heterolog exprimierten Enzym zeigten, dass es sich um das von Raab und Mitarbeitern (2006) aus Erdbeerproteinextrakten isolierte und dort für die HDMF-Bildung verantwortliche Enzym handelte. Außerdem konnte durch *in vivo* und *in vitro* Studien der zuvor unbekannte und neu dargestellte Prekursor HMMF in der Erdbeerfrucht und in anderen HDMF-enhaltenden Früchten, wie Tomate und Ananas, identifiziert werden. Schließlich gelang es ein *FaEO* ähnliches Gen aus der Tomatenfrucht zu klonieren und das Protein LeEO heterolog zu exprimieren (Kap. C-1.3).

3 WEITERE UNGESÄTTIGTE 4-HYDROXY-3(2H)-FURANONE ALS SUBSTRATE VON FAEO

Aus der Klasse der Chinone akzeptierte FaEO nur PQ als Substrat. Unter den getesteten α , β -ungesättigten Ketonen und Aldehyden, wie *E3*-Hexen-2-on, *E2*-Hexenal, Hydroxyflavon und Zimtaldehyd zeigte FaEO nur mit HMMF Aktivität. Um die katalytische Aktivität von FaEO besser zu verstehen musste demzufolge nach Substanzen gesucht werden, die den scheinbar recht speziellen strukturellen Anforderungen des aktiven Zentrums von FaEO entsprachen. Deshalb sollten die Strukturen möglichst eng mit HMMF verwandt sein. Kommerziell konnten keine weiteren Substanzen mit HMMF-ähnlichen Strukturen bezogen werden, darum wurden über die bereits beschriebene Methode weitere Synthesen durchgeführt.

3.1 SYNTHESBEDINGUNGEN

Ledl und Mitarbeiter (1978) beschrieben bereits die Umsetzung von HMF mit Aceton (Abb. C-3-1). Neben Aceton wurde HMF von uns mit Acetaldehyd, Propanal, Butanal, (*E2*)-Hexenal und Zimtaldehyd zu den entsprechenden Produkten umgesetzt (Abb. C-3-1). Die so erhaltenen Syntheseprodukte konnten mittels präparativer Dünnschichtchromatographie gereinigt werden. Sie zeigten weit höhere Stabilitäten gegenüber konjugierten Additionsreaktionen als HMMF und waren demzufolge weniger reaktiv mit Wasser, Methanol und Ethanol. Deshalb war es möglich sie direkt, ohne Stabilisierungsschritt durch NMR-, HPLC-MS/MS-, GC-MS- und HPLC-DAD-Messungen zu charakterisieren. Die Produkte der Synthesen mit (*E2*)-Hexenal und Zimtaldehyd wurden nur mittels HPLC-MS/MS bestimmt.

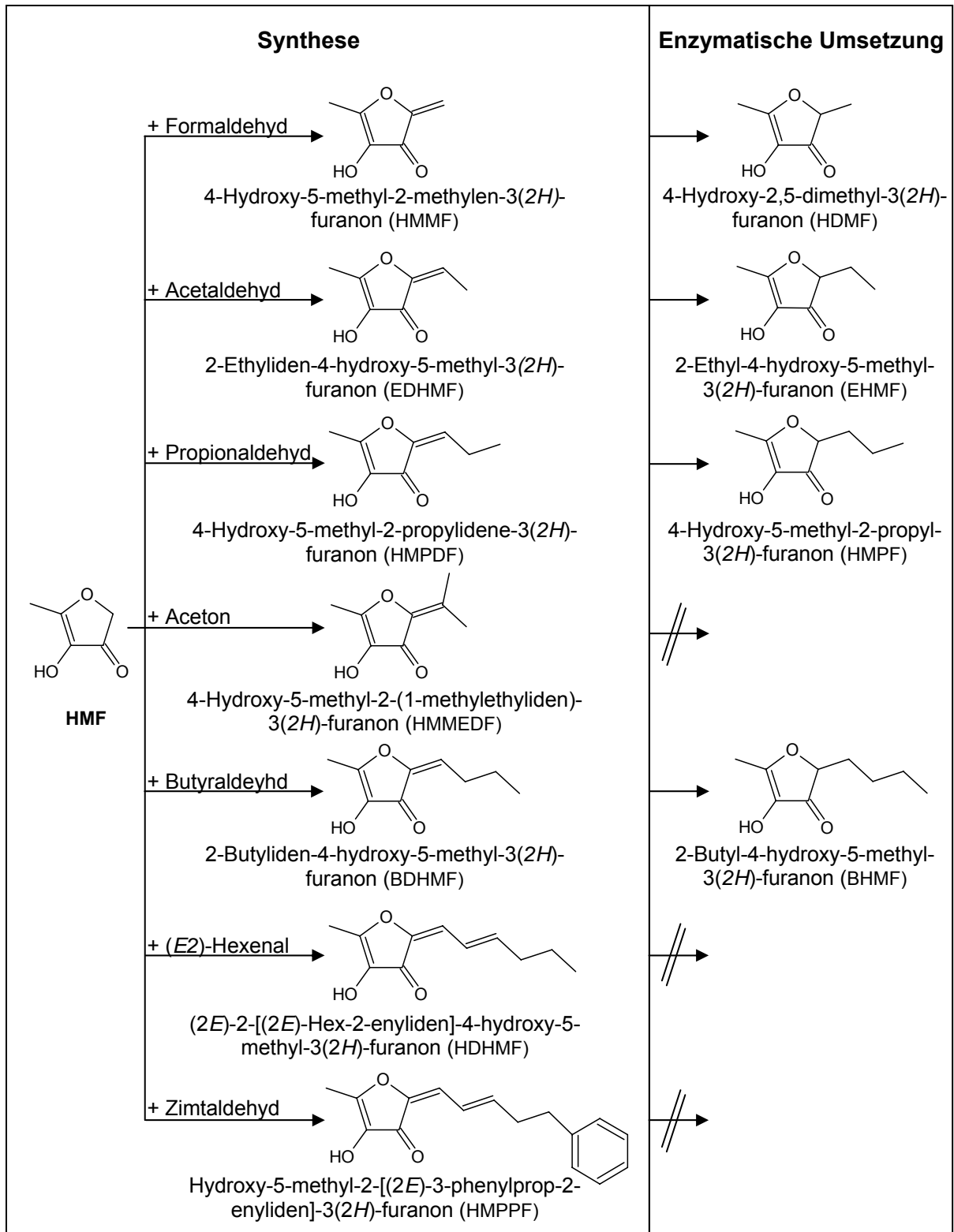


Abb. C-3-1: Synthese der α , β -ungesättigten Hydroxyfuranone und enzymatische Bildung der entsprechenden Produkte durch FaEO in Anwesenheit von NADH.

3.2 NMR-STUDIEN

Zur eindeutigen Strukturbestimmung der synthetisierten Verbindungen wurden NMR-Spektren aufgenommen. Durch die fehlende Tautomerie gestalteten sich die NMR-Spektren weitaus übersichtlicher (Tab. C-3-1 a-c). Da HMMEDF nicht als Substrat für FaEO diente (Kap. C-3.3) wurden keine NMR-Daten bestimmt. Die Nummerierung der Atome in Tabelle C-3-1 ist zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Strukturmerkmale genormt worden und entspricht somit nicht den IUPAC-Regeln. Die in jedem der Moleküle vorhandene CH₃-Gruppe in Position C-1 liefert im ¹H-Spektrum ein Singulett bei einer chemischen Verschiebung von 2,3 ppm und zeigt im COSY keine Kopplungen. Die Kopplungen im HMBC bestätigen die Struktur an C-2 und C-3. Bei EDHMF wurden keine HMBC-Messungen durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen der Wasserstoffatome an C-7 (EDHMF) und C-8 (HMPDF) erhöhen sich im ¹H-Spektrum durch eine Kettenverlängerung (entsprechen C-8 bzw. C-9 in HMPDF bzw. BDHMF) um 0,5 ppm. Auch die chemische Verschiebung der entsprechenden C-Atome verschiebt sich durch eine Kettenverlängerung um 9 ppm. Die erwarteten Nahkopplungen der benachbarten Wasserstoffatome wurden im COSY nachgewiesen. Durch diese Ergebnisse konnten die Strukturen klar bewiesen werden.

Tabelle C-3-1: ^1H NMR-Messung; HMQC (*heteronuclear multiple quantum correlation*); HMBC (*heteronuclear multiple quantum multiple bond correlation spectroscopy*), COSY (*correlation spectroscopy*);

Tabelle C-3-1 a: BDHMF

Pos.	^{13}C chemische Verschiebung (HMQC)	^1H chemische Verschiebung	J_{HH} [Hz]	Beobachtete NMR Kopplungen	
	δ [ppm]	δ [ppm]		COSY	HMBC
1	11,1	2,3	-	-	2/3
6	117,5	6,0	8,0 (7)	7	4/5
7	27,1	2,4	7,5; 7,6 (6,8)	6/8	6/5/9/8
8	21,8	1,6	7,4 (7,9)	7/9	6/9/7
9	13,0	1,0	7,4 (8)	8	8/7

Tabelle C-3-1 b: HMPDF

Pos.	^{13}C chemische Verschiebung (HMQC)	^1H chemische Verschiebung	J_{HH} [Hz]	Beobachtete NMR Kopplungen	
	δ [ppm]	δ [ppm]		COSY	HMBC
1	11,1	2,3	-	-	3/2/4
6	119,0	6,0	7,9 (7)	7	5/4
7	18,5	2,4	7,6; 7,7 (6,8)	6/8	5/6/8
8	12,3	1,1	7,6 (7)	7	6/7

Tabelle C-3-1 c: EDHMF

Pos.	^{13}C chemische Verschiebung (HMQC)	^1H chemische Verschiebung	J_{HH} [Hz]	Beobachtete NMR Kopplungen	
	δ [ppm]	δ [ppm]		COSY	HMBC
1	10,1	2,2	-	-	n. b.
6	110,6	5,9	7,5 (7)	7	n. b.
7	19,5	1,9	7,4 (6)	6	n. b.

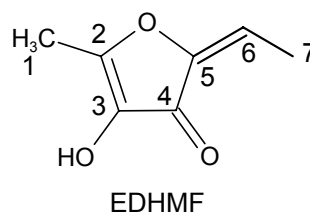
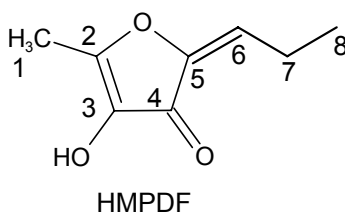
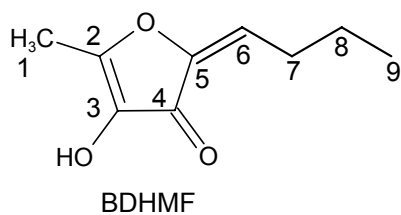


Abb. C-3-4: Strukturformeln von BDHMF, HMPDF und EDHMF; Die Nummerierung der C-Atome erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit nicht nach IUPAC-Regeln.

3.3 NACHWEIS DER ENZYMATISCHEN UMSETZUNG

Ob die synthetisierten Substanzen tatsächlich die von FaEO geforderten strukturellen Eigenschaften besitzen, sollte durch enzymatische Umsetzungen überprüft werden. Außerdem wurden zur weiteren Charakterisierung dieser bisher unbekannt Verbindungen HPLC-MS/MS-, HPLC-DAD-, GC-MS- und GC-O-Analysen durchgeführt.

3.3.1 Charakterisierung der enzymatischen Umsetzungen mittels HPLC-MS/MS

Die gereinigten Syntheseprodukte wurden in Wasser-Acetonitril-Gemische überführt und mittels HPLC-MS/MS vermessen (Abb. C-3-2). Die ähnlichen Fragmentierungsmuster ($[M-28+H]^+$, $[M-42+H]^+$, $[M-46+H]^+$, $[M-72+H]^+$ und $[M-74+H]^+$) resultierten aus der strukturell engen Verwandtschaft der Verbindungen. BDHMF nahm dennoch eine gewisse Sonderrolle ein, da diese Verbindung zunächst nur ein Produktion $[M-42+H]^+$ bildete, welches erst im MS³-Experiment in die für Furanone typischen Fragmente $[M-28+H]^+$, $[M-46+H]^+$ und $[M-56+H]^+$ zerfiel. Wie bei EDHMF, HDMF und HMMF entstand auch hier das Produkt-Ion $m/z (+) 44$.

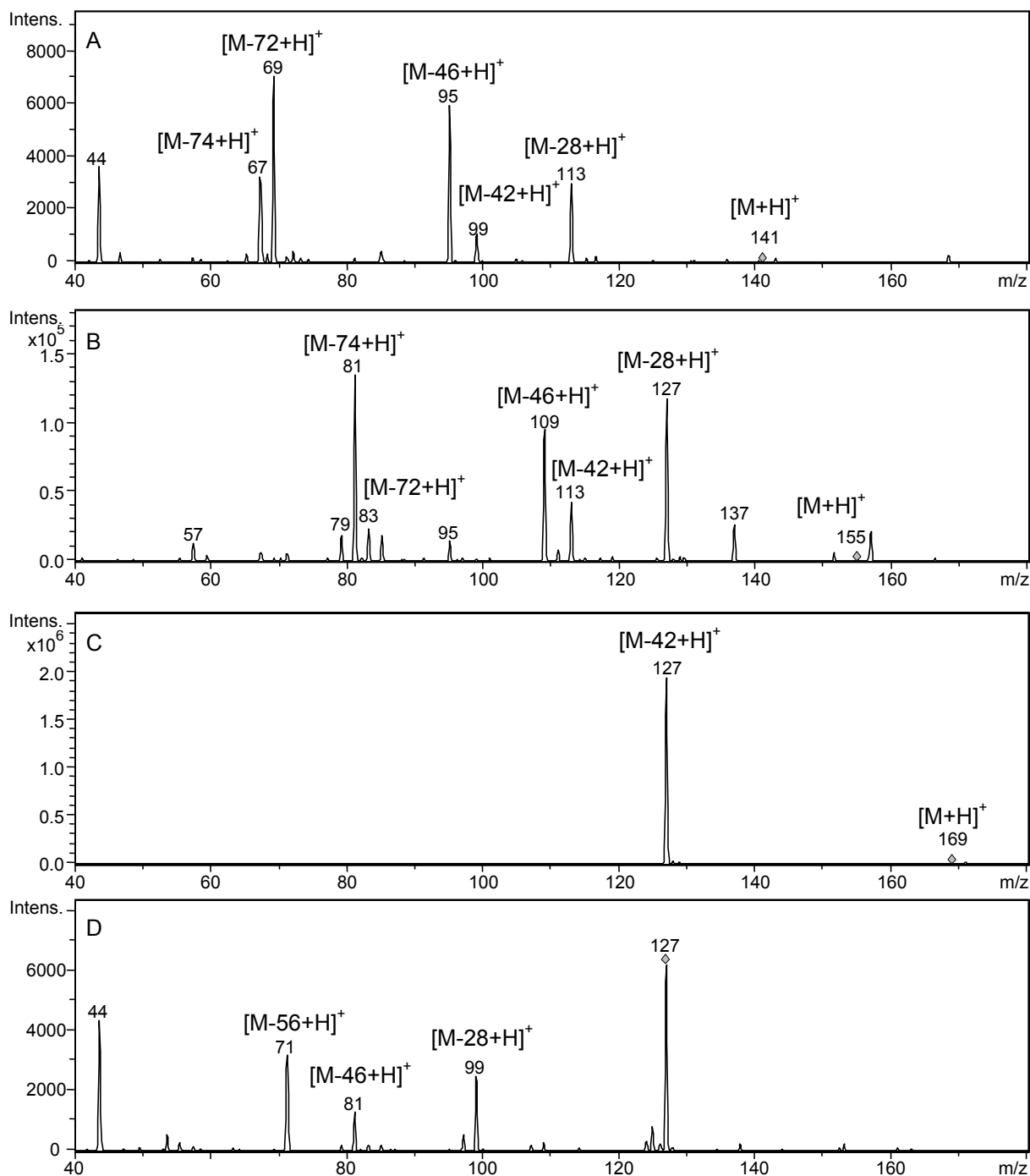


Abb. C-3-2: HPLC-MS/MS-Spektren der synthetisierten Verbindungen EDHMF, HMPDF und BDHMF; EDHMF m/z (+) 141 $[M+H]^+$ (A), HMPDF m/z (+) 155 $[M+H]^+$ (B), MS/MS-Spektrum von BDHMF m/z (+) 169 $[M+H]^+$ (C), MS^3 -Spektrum von BDHMF m/z (+) 127 $[M-42+H]^+$ (D).

Bei der HPLC-MS/MS-Analytik von HDHMF und HMPPF konnten zu verschiedenen Retentionszeiten, Signale des selben Masse-Ladungs-Verhältnisses und mit gleichen Fragmentierungsmustern detektiert werden (Abb. C-3-3). Beide Verbindungen fragmentierten ähnlich wie die oben beschriebenen Analoga und es entstanden, neben anderen, die Bruchstücke $[M-18+H]^+$, $[M-46+H]^+$, $[M-64+H]^+$ und $[M-74+H]^+$.

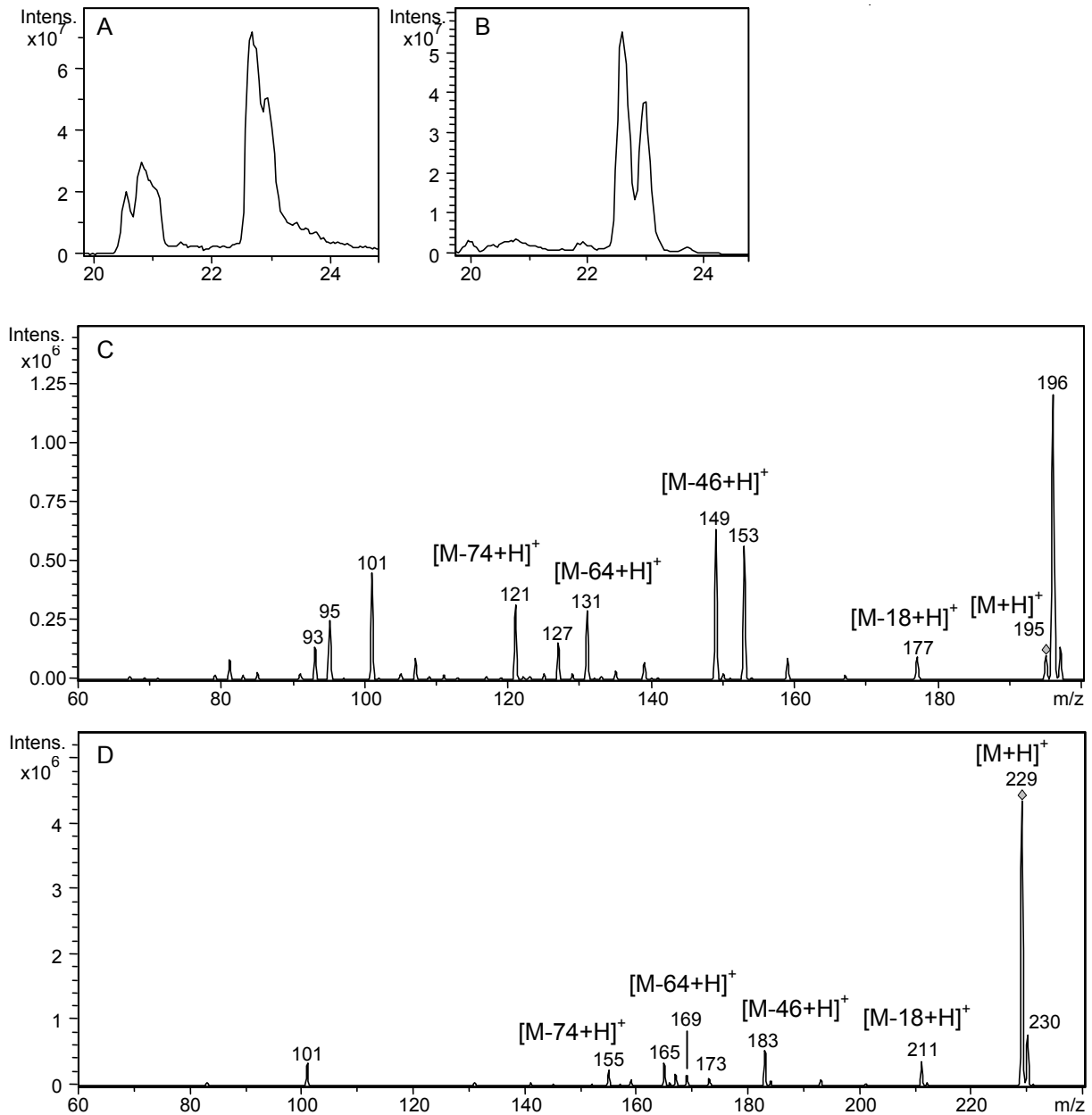


Abb. C-3-3: HPLC-MS/MS-Analytik von HDHMF und HMPPF; Ionenchromatogramm m/z (+) 195 $[M+H]^+$ HDHMF (A), Ionenchromatogramm m/z (+) 229 $[M+H]^+$ HMPPF (B), Produktionenspektrum HDHMF m/z (+) 195 $[M+H]^+$, RT=22,5-22,9 Minuten (C), Produktionenspektrum HMPPF m/z (+) 229 $[M+H]^+$, RT=22,4-22,7 Minuten (D).

Die Umsetzung der synthetisierten Verbindungen EDHMF, HMPDF, HMMEDF, BDHMF, HDHMF und HMPPF durch FaEO und NADH zu den gesättigten Analoga wurde durch HPLC-MS/MS-Analytik überprüft. Die Produktbildung in den Ansätzen mit EDHMF, HMPDF und BDHMF konnte durch den Nachweis von neu entstandenen Signalen nach der enzymatischen Umsetzung nachvollzogen werden (Abb. C-3-4). Die gebildeten Verbindungen eluierten etwas früher von der RP-Säule, übereinstimmend mit der erwarteten höheren Polarität der Produkte. Bei der Umsetzung von EDHMF wurden zwei, allerdings nicht basisliniengetreunte, Signale detektiert (Abb. C-3-4 A2).

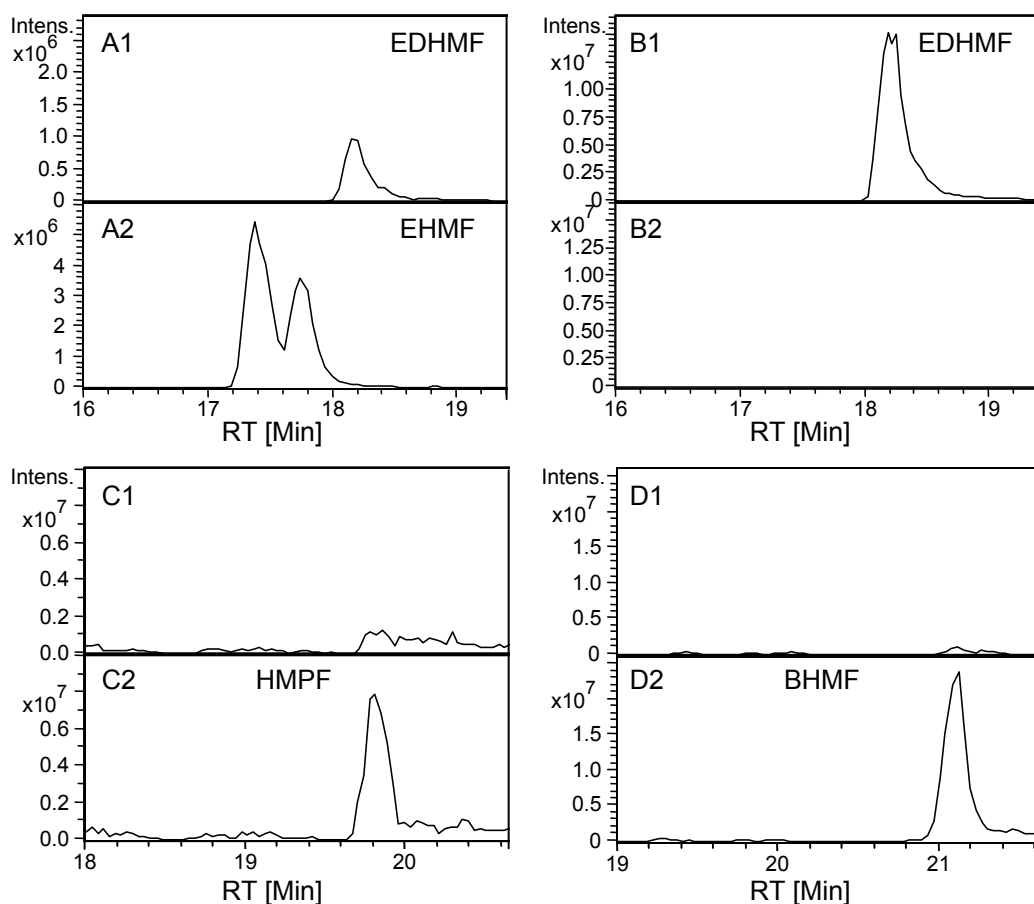


Abb. C-3-4: HPLC-MS/MS-Analytik der enzymatischen Umsetzung von EDHMF, HMPDF und BDHMF; Umsetzung von EDHMF mit FaEO (A) oder pET (B) unter Anwesenheit von NADH, Ionenchromatogramm m/z (+) 141 $[M+H]^+$ EDHMF (A1/B1), Ionenchromatogramm m/z (+) 143 $[M+H]^+$ EHMf (A2/B2), Umsetzung von HMPDF mit FaEO (C2) und pET (C1) unter Anwesenheit von NADH, Ionenchromatogramm m/z (+) 157 $[M+H]^+$ HMPf (C1/C2), Umsetzung von BDHMF mit FaEO (D2) und pET (D1) unter Anwesenheit von NADH, Ionenchromatogramm m/z (+) 171 $[M+H]^+$ BHMF (D1/D2); Retentionszeit (RT).

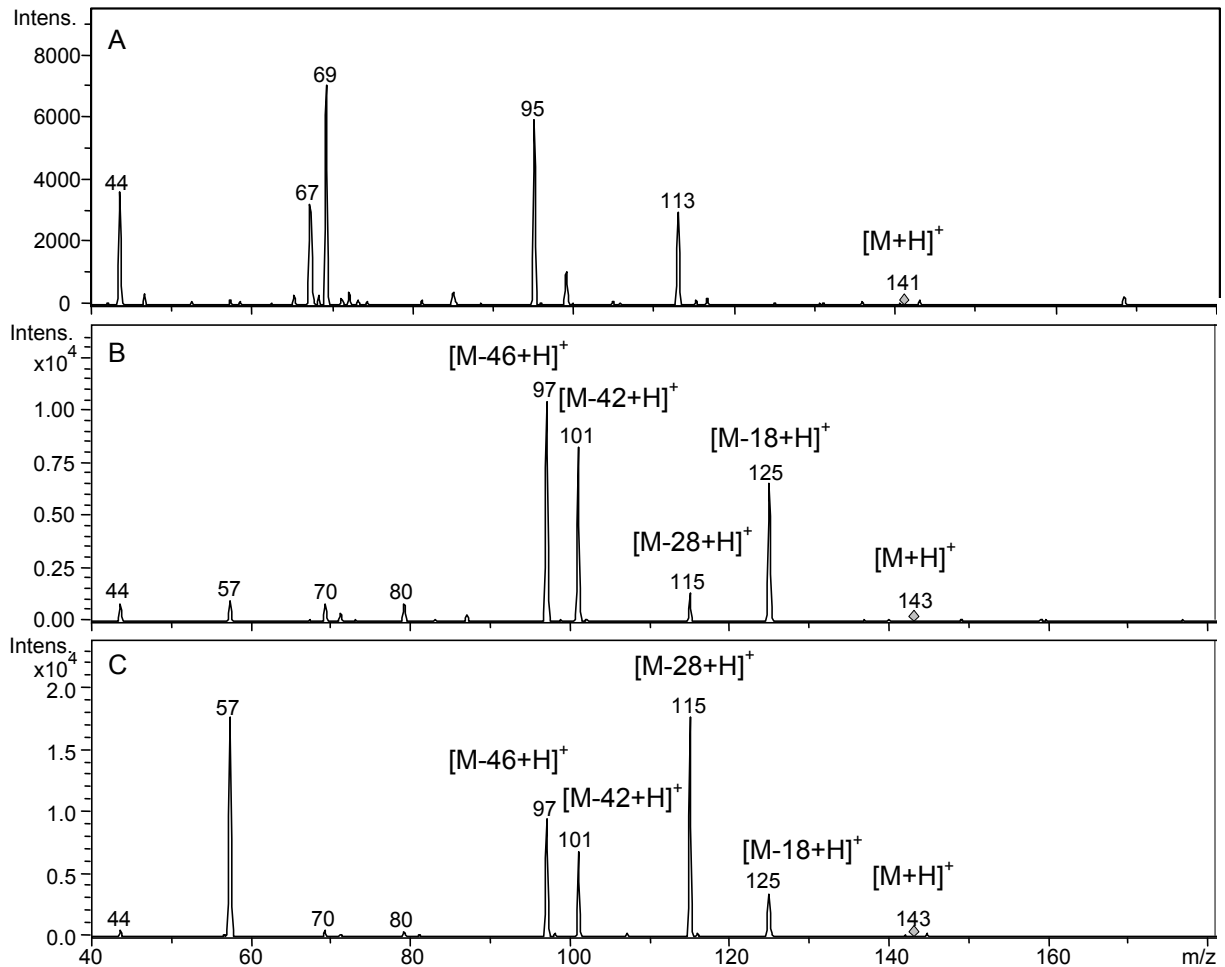


Abb. C-3-5: HPLC-MS/MS-Spektren des synthetisierten EDHMF und der daraus enzymatisch gewonnenen EHMf-Tautomere; EDHMF m/z (+) 141 [M+H]⁺ (A), EHMf m/z (+) 143 [M+H]⁺ (B), EHMf m/z (+) 143 [M+H]⁺ (C).

Die zwei aus EDHMF entstandenen Verbindungen konnten durch den Vergleich mit der Referenzsubstanz EHMf eindeutig als deren beide Tautomere identifiziert werden (Abb. C-3-5). Generell zeigten die MS/MS-Daten, dass die neu gebildeten Verbindungen ähnlich fragmentierten wie ihre ungesättigten Analoga. Die Fragmente [M-18+H]⁺ und [M-46+H]⁺ entstanden bei der Fragmentierung von EHMf, HMPF und BHMF. [M-28+H]⁺ und [M-42+H]⁺ bildeten sich aus dem Molekülion von EHMf und HMPF. Die Massendifferenz von [M-18+H]⁺ entsprach hierbei der Abspaltung von Wasser während [M-28+H]⁺ bzw. [M-56+H]⁺ auf die Abspaltung von ein bzw. zwei Molekülen CO schließen lässt. Für BHMF und HMPF waren keine Referenzsubstanzen kommerziell erhältlich. Es gelang jedoch über den Vergleich mit den Fragmentierungsmustern der Ausgangsprodukte (HMPDF und BDHMF) und denen der Referenzen (EHMF und HDMF) die Strukturen von BHMF und HMPF vorläufig zuzuordnen. Auch der Massenunterschied von 14 (CH₂-Gruppe), der sich durch die Spektren der einzelnen enzymatischen Produkte zieht, trug zur Zuordnung bei

(Abb. C-3-5/6). Die für eine endgültige Absicherung notwendigen NMR-Messungen gelangen aufgrund der zu geringen Produktmengen der enzymatischen Umsetzungen nicht.

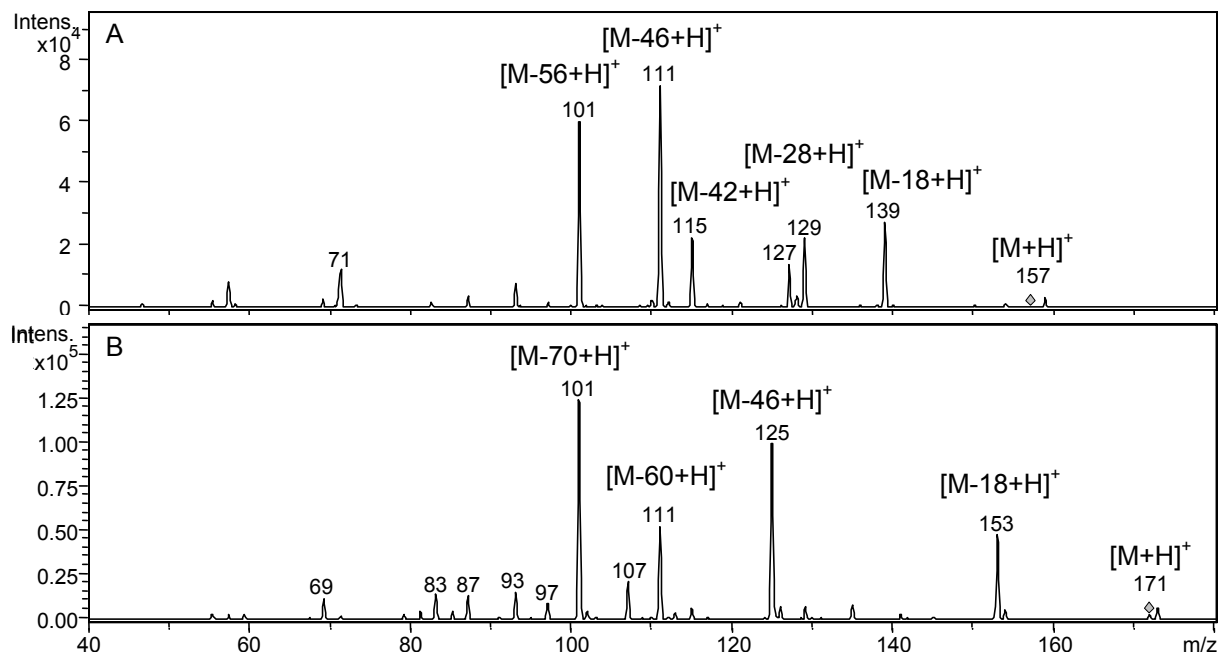


Abb. C-3-6: HPLC-MS/MS-Spektren der enzymatischen Produkte HMPF (A) (aus HMPDF) und BHMf (B) (aus BDHMF); HMPF m/z (+) 157 [M+H]⁺, BHMf m/z (+) 171 [M+H]⁺.

In den Ansätzen mit HMMEF, HDHMF und HMPPF wurden keine Produkte, weder als Resultat einer einfachen noch einer zweifachen Reduktion, detektiert. Es wird vermutet, dass HMMEF wegen der sterischen Hinderung durch die zusätzliche Methylgruppe an der Doppelbindung von FaEO nicht als Substrat akzeptiert wurde. Die Strukturen HMPPF und HDHMF enthalten sehr große Substituenten und trans-konjugierte Doppelbindungen, woraus ebenso eine sterische Hinderung resultieren kann. In den Kontrollansätzen mit pET entstanden keine entsprechenden Verbindungen.

3.3.2 Charakterisierung der enzymatischen Umsetzungen mittels HPLC-DAD

HDMF zeigt ein typisches UV-Spektrum mit einem Maximum bei 289 nm (Rodin und Mitarbeiter, 1965). Das synthetisierte EDHMF zeigt Maxima bei 259 nm und 352 nm während das durch FaEO reduzierte Produkt EHMf das für Hydroxyfuranone typische Absorptionsmaximum bei 288 nm aufweist (Abb. C-3-7). Die Spektren von HMPDF (Absorptionsmaxima bei 259 und 349 nm), BDHMF (Absorptionsmaxima bei 259 und 349 nm), HMPF (Absorptionsmaximum bei 288 nm) und BHMf (Absorptionsmaximum bei 290 nm) bestätigen die postulierten Strukturen von HMPF und BHMf.

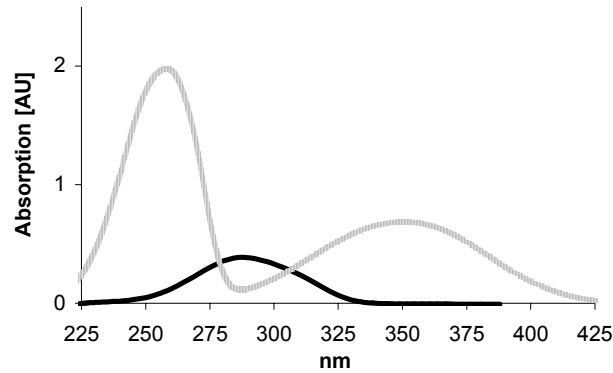


Abb. C-3-7: UV-Spektren von EHDMF (grau) und EHMf (schwarz) generiert in HPLC-DAD-Messungen.

3.3.3 Charakterisierung der enzymatischen Umsetzungen mittels GC-MS

Sowohl die Syntheseprodukte HMMF, EDHMF, HMPDF als auch BDHMF sowie die Produkte der enzymatischen Umsetzung mit FaEO wurden mittels GC-MS analysiert. Durch Vergleich der Fragmentierungsmuster von EDHMF, HMPDF und BDHMF konnte die unterschiedliche Kettenlänge im Fragment $[M-71]^+$ durch einen Massenunterschied von 14 nachvollzogen werden (Abb. C-3-8). Die Massenspektren von HMPDF und BDHMF zeigten außerdem das Fragmentation der Masse 55, welches aus EDHMF in nur geringer Intensität entsteht. Das Fragment $[M-15]^+$ wurde nur im Massenspektrum von BDHMF detektiert. Die gesättigten enzymatischen Produkte wurden gaschromatographisch in zwei Tautomere aufgetrennt (Abb. C-3-8) und konnten massenspektrometrisch unterschieden werden. Das Massenspektrum des später eluierenden Tautomers von EHMf wies zusätzliche Bruchstücke, wie $[M-15]^+$, $[M-43]^+$ und $[M-71]^+$ auf. Auch die beiden Tautomere des HMPF und BHMF unterschieden sich in ihren Fragmentierungsmustern. Die Massenspektren der später eluierenden Tautomere wiesen ebenfalls zusätzliche Fragmente auf.

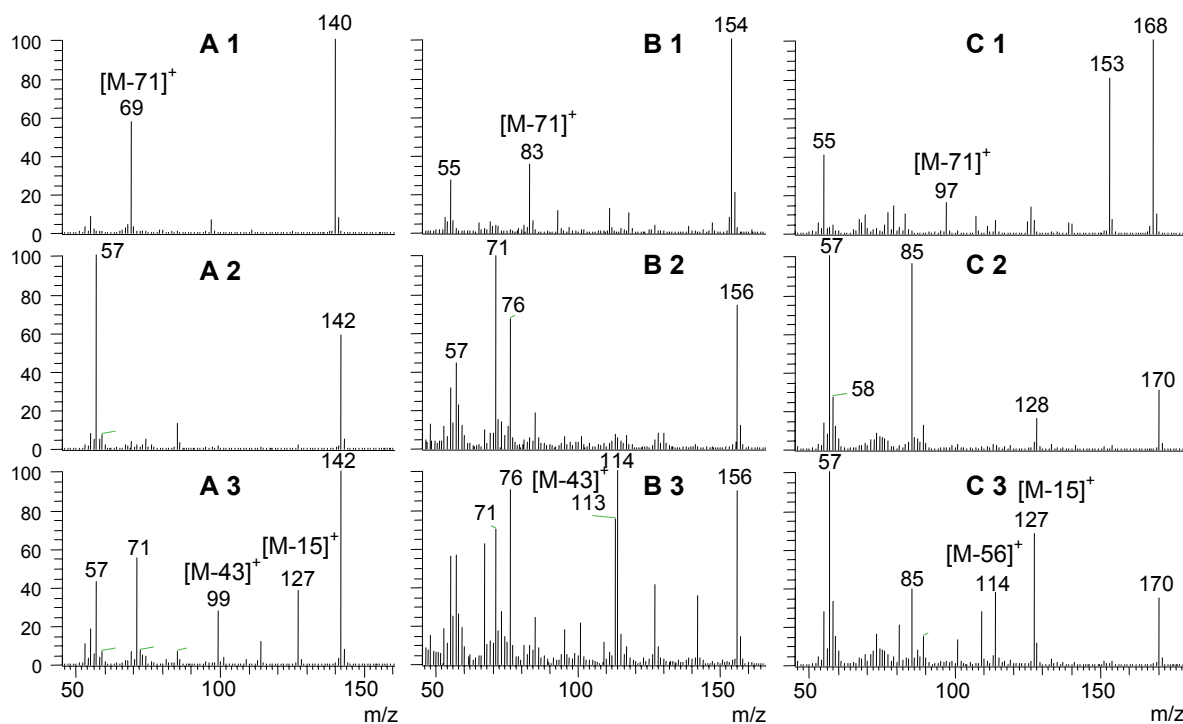


Abb. C-3-8: GC-MS-Analyse der synthetisierten Verbindungen und ihrer enzymatisch gewonnenen Analoga; EDHMF (A1), EHMf Tautomer 1 (A2), EHMf Tautomer 2 (A3), HMPDF (B1), HMPf Tautomer 1 (B2), HMPf Tautomer 2 (B3), BDHMF (C1), BHMf Tautomer 1 (C2), BHMf Tautomer 2 (C3).

3.4 DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Studien war die Identifizierung weiterer Verbindungen, welche die selektiven strukturellen Anforderungen von FaEO an sein Substrat erfüllen sollten. Deshalb mussten Substanzen mit einer möglichst hohen Ähnlichkeit zu HMMF gefunden werden. Keine kommerziell erhältlichen Substanzen entsprachen diesen Voraussetzungen. Aus diesem Grund wurden HMMF-ähnliche Substanzen synthetisiert. Durch Variation des Reaktionspartners von HMF ist laut Ledl und Mitarbeitern (1978) ein großes Produktspektrum an α , β -ungesättigten Verbindungen zugänglich. So konnten durch die Reaktionen mit Acetaldehyd, Propionaldehyd, Aceton, Butyraldehyd, (*E*2)-Hexenal und Zimtaldehyd EDHMF, HMPDF, HMMEDF, BDHMF, HDHMF und HMPPF synthetisiert werden (Abb. C-3-1). Die Stabilität dieser Verbindungen war größer als die von HMMF und es konnten NMR-Daten von EDHMF, HMPDF und BDHMF erhalten werden, ohne dass diese vorher durch die Bildung eines Thioethers stabilisiert werden mussten. Umsetzungsversuche mit den α , β -ungesättigten Hydroxyfuranonen ergaben, dass nur EDHMF, HMPDF und BDHMF als Substrate akzeptiert wurden. HMMEDF enthielt an der Doppelbindung eine zusätzliche Methylgruppe, HDHMF und HMPPF je eine konjugierte Doppelbindung und einen großen Substituenten. Es wird davon ausgegangen, dass diese Verbindungen aufgrund einer sterischen Hinderung nicht in das aktive Zentrum gelangen können. Somit müssen potentielle Substrate von FaEO an der α , β -ungesättigten Doppelbindung mindestens ein Wasserstoffatom am β -C-Atom tragen und dürfen gleichzeitig keine trans-konjugierte Doppelbindung in direkter Nachbarschaft haben (Abb. C-3-9). Weitere Doppelbindungen, in Konjugation zur α , β -ungesättigten Doppelbindung,

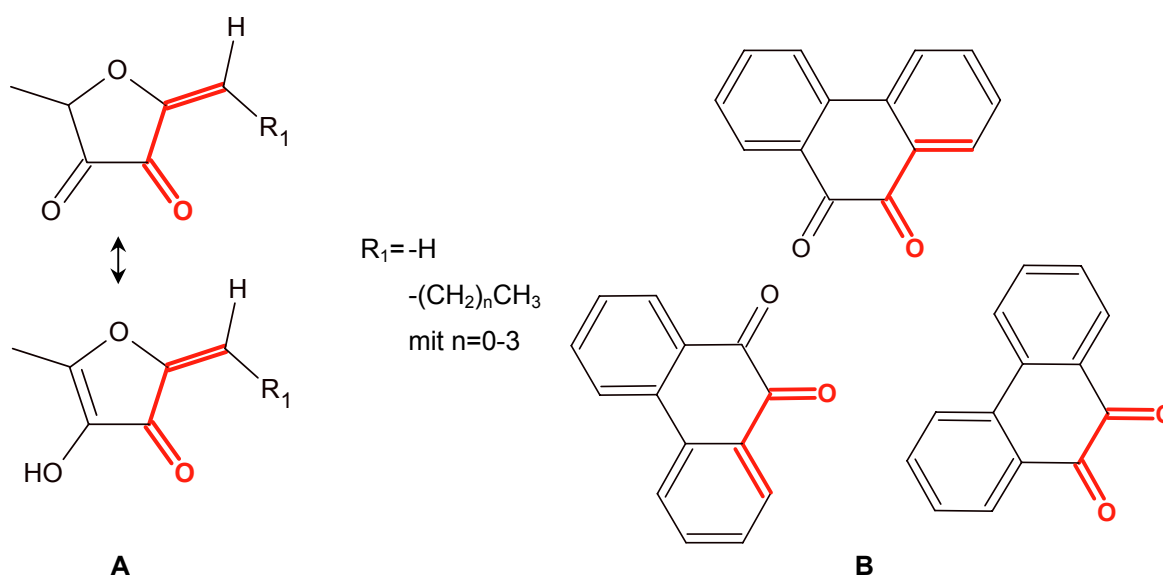


Abb. C-3-9: Strukturelle Voraussetzungen für Substrate von FaEO am Beispiel der α , β -ungesättigten Hydroxyfuranone (A) und Möglichkeiten für Angriffspunkte von FaEO am Beispiel von 9,10-Phenanthrenchinon (B).

scheinen sich ebenfalls negativ auszuwirken, denn (*E2*)-Hexenal wurde trotz den anderen erfüllten Kriterien nicht umgesetzt. Die Tatsache dass Benzil nicht als Substrat akzeptiert wurde zeigt, dass das aktive Zentrum von FaEO nur planare Moleküle verwenden kann, wie es bei PQ und den ungesättigten 4-Hydroxy-3(2H)-furanonen der Fall ist. PQ bietet verschiedene Angriffspunkte für FaEO (Abb. C-3-9 B). Aus diesem Grund wäre neben dem Angriff auf die C-C-Doppelbindung auch der Angriff auf die Ketogruppe denkbar. Liegen die ungesättigten 4-Hydroxy-3(2H)-furanone als Diketo-Tautomer vor, haben sie die größte strukturelle Ähnlichkeit zu PQ. In diesem Fall wäre auch in diesem Molekül die Reduktion der Ketogruppe an C3 statt der Doppelbindung an C2 denkbar. Das würde bedeuten, dass sich das Molekül erst anschließend in die energetisch günstigere Form des gesättigten 4-Hydroxy-3(2H)-furanons umlagert (Abb. C-3-9 A).

Aus den oben genannten Ergebnissen wird deutlich, warum das Protein FaEO (*Fragaria ananassa* Enon Oxidoreduktase) genannt wurde, obwohl zunächst das entsprechende Gen aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zur Familie der Chinonoxidoreduktasen gerechnet wurde. Diese Verwandtschaft konnte auch durch die Umsetzung von PQ nachgewiesen werden. Die biochemischen Studien der Eigenschaften des Enzyms zeigten aber klar, dass die Hauptaufgabe *in vivo* eine andere, nämlich die der Reduktion eines α , β -ungesättigten Enons, HMMF ist. Mano und Mitarbeiter (2002) gaben ihrem Enzym aus *A. thaliana*, welches die Reduktion der Doppelbindung von α , β -ungesättigten Alkenalen und -enonen katalysiert, zu Beginn den Namen NADPH: 2-Alkenal/on α , β -Hydrogenase (ALH), später wurde auf Vorschlag der Internationalen Vereinigung von Biochemie und Molekularbiologie *Arabidopsis thaliana* Alkenal Reduktase (AtAER) daraus (Mano und Mitarbeiter, 2005). Bisher ist neben dem von Mano beschriebenen Enzym AtAER nur ein weiteres mit einer ähnlichen Aktivität bekannt. Hierbei handelt es sich um die Leukotrien B₄ 12-Hydroxy-Dehydrogenase bzw. die Alkenal/on Oxidoreduktase (AOR) aus der Rattenleber (Dick und Mitarbeiter, 2001). Alle drei Enzyme (FaEO, AtAER, RnAOR) haben gemeinsam, dass ihr durch Sequenzähnlichkeiten postulierter Name aufgrund neuer biochemischer Erkenntnisse geändert werden musste. Es zeigt sich somit, dass eine Ähnlichkeitsuntersuchung von Proteinen anhand ihrer Sequenzen alleine für eine Klassifizierung nicht ausreicht. Besonders in einer heterologen Familie wie die der NAD(P)H abhängigen Chinonoxidoreduktasen bzw. der MDR sind biochemische Studien zur Charakterisierung der Eigenschaften unabdingbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Studie bisher unbekannte Verbindungen der Familie der α , β -ungesättigten 4-Hydroxy-3(2H)-furanone dargestellt und charakterisiert wurden. Zusätzlich fungieren drei Verbindungen, EDHMF, HMPDF und BDHMF, als Substrate für FaEO, was Klarheit in dessen Strukturanforderungen an Substrate brachte. Nur ein Produkt der enzymatischen Umsetzung, EHMF, stellt eine bekannte Verbindung dar. HMPF und BHMF waren bislang unbekannt und konnten im Rahmen dieser Studie genauer

beschrieben werden. Die Reaktion *in vivo* (Kap. C-2) und die strukturellen Anforderungen des als Chinonoxidoreduktase eingestuftes Enzyms machten eine Umbenennung in Enon Oxidoreduktase unumgänglich.

4 CHARAKTERISIERUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN ENZYMATISCHEN EIGENSCHAFTEN VON FAEO

FaEO wurde zunächst aufgrund von Sequenzähnlichkeiten der Klasse der NAD(P)H abhängigen Chinonoxidoreduktasen zugeordnet. Es stellte sich aber heraus, dass neben Chinonen auch α , β -ungesättigte Hydroxyfuranone, von FaEO als Substrate akzeptiert und umgesetzt wurden. Der Ablauf dieser beiden Reaktionen sollte nun anhand der kinetischen Daten und insbesondere anhand des Reaktionsmechanismus genauer untersucht werden.

4.1 KINETISCHE DATEN

FaEO benötigt als Oxidoreduktase zur Umsetzung ein Reduktionsäquivalent - hier in Form von NADH oder NADPH - zusätzlich zum Substrat. In diesem Fall wird von einer Reaktion zweiter Ordnung gesprochen. Um dennoch kinetische Daten nach Michaelis-Menten aufnehmen zu können, wurden die Reaktionsbedingungen einer pseudo-ersten Ordnung geschaffen, in dem das zweite Substrat, z. B. NADH, im großen Überschuss zugegeben wurde. Die enzymatische Umsetzung ist damit von dessen Konzentration unabhängig und es war möglich K_m - und v_{max} -Werte für das erste Substrat zu bestimmen. Die Auswertung erfolgte unter Anwendung des Linearisierungsverfahrens nach Hanes mit dem Programm Hyper32 (Version 1.0.0).

Für PQ mit NADH im Überschuss wurde ein k_{cat}/K_m -Wert von $0,66 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ bestimmt. Bei den Reduktionsäquivalenten stellte sich heraus, dass mit PQ im Überschuss NADPH besser ($k_{cat}/K_m = 0,15 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$) umgesetzt wurde als NADH ($k_{cat}/K_m = 0,03 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$).

Auch bei der Umsetzung von EDHMF, HMPDF oder BDHMF benötigt FaEO NAD(P)H als Cosubstrat. EDHMF, HMPDF und BDHMF wurden für jede Messreihe frisch synthetisiert, gereinigt und als Reinsubstanz eingewogen. In Ethanol gelöst, wurden definierte Mengen der Substrate ($140 \mu\text{M}$ bis $2,85 \text{ mM}$) zu Ansätzen mit NADH (12 mM) und FaEO in Phosphatpuffer pH 7,0 gegeben und bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ für 35 Minuten inkubiert. Anschließend wurde mittels HPLC-MS/MS die Menge an entstandenem Produkt quantifiziert und über das Linearisierungsverfahren nach Hanes k_{cat} - und K_m -Werte berechnet. Nach Mehrfachbestimmungen ergab sich folgendes Bild: HMPDF ist mit einem k_{cat}/K_m -Wert von $0,0026 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ das beste Substrat, gefolgt von BDHMF mit $0,0019 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ und EDHMF mit $0,0009 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$. Für HMMF konnten aufgrund der hohen Instabilität in wässrigen Lösungen keine kinetischen Daten bestimmt werden (Kap. C-2.2.3).

Tab. C-4-1: Kinetische Daten von FaEO bestimmt über das Linearisierungsverfahren nach Hanes.

	K_m [μM]	V_{max} [nmol s⁻¹mg⁻¹]	k_{cat} [s⁻¹]	k_{cat}/K_m [s⁻¹μM⁻¹]
EDHMF	2141 ± 73	56 ± 3	1,94	0,0009
BDHMF	824 ± 400	41 ± 17	1,43	0,0019
HMPDF	1043 ± 265	78 ± 9	2,69	0,0026
PQ	12 ± 4	177 ± 49	6,62	0,6580
NADPH	325 ± 220	1220 ± 437	42,35	0,1524
NADH	361 ± n. b.	270 ± n. b.	9,35	0,0259

4.2 REAKTIONSMECHANISMUS

Zwei mögliche Reaktionsmechanismen von Chinonoxidoreduktasen sind in der Literatur beschrieben. Zum Einen die von DT-Diaphorase-ähnlichen Enzymen katalysierte Zwei-Elektronen-Übertragung und zum anderen eine Ein-Elektronen-Übertragung, welche von ζ -Crystallin-ähnlichen Enzymen katalysiert wird. Unterscheiden lassen sich die beiden durch den Nachweis der gebildeten Produkte. Bei der Zwei-Elektronen-Übertragung entstehen stabile Produkte, wohingegen bei der Ein-Elektronen-Übertragung Radikale detektiert werden können (Kap. B-3).

4.2.1 Nachweis einer Ein-Elektronen-Übertragung

4.2.1.1 Elektronen-Spin-Resonanz (ESR)-Messungen

Mit der Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) wird die resonante Absorption von elektromagnetischer Strahlung durch paramagnetische Ionen oder Moleküle in einem statischen Magnetfeld gemessen. Dadurch können Radikale nachgewiesen werden. Anfangs wurde versucht die Semichinonradikale des PQs direkt zu bestimmen. Da bekannt ist, dass das Phenanthrenchinonradikal Sauerstoff zum Sauerstoffradikalanion reduziert und dabei selbst zum PQ wird (Abb. B-7) musste der enzymatische Assay unter Sauerstoffausschluss in Formiergas durchgeführt werden. Zunächst gelang es nicht Radikale nachzuweisen. Dies lag entweder an einer zu geringen Menge an entstandenen Semichinonradikalen, deren Instabilität, an einer möglichen Sauerstoffkontamination, die den Abbau der Semichinonradikale verursacht, oder an der Abwesenheit von Radikalen. Nachdem Sauerstoffradikalanionen als solche in Lösung nicht mit ESR-Messungen nachweisbar sind (Iyanagi und Yamazaki, 1970), kam im zweiten, diesmal aeroben Versuch der Radikalfänger Tempol (Abb. C-4-1 B) zum Einsatz. Tempol selbst ist radikalisch und erzeugt somit während der ESR-Messung ein Signal. Sind andere Radikale in der Lösung vorhanden, reagieren diese mit Tempol zu gesättigten Verbindungen und führen so zur Abnahme des Tempolsignals. In Abb. C-4-1 A sind die ESR-Intensitäten dreier

verschiedener Ansätze gezeigt. In zweien wurde FaEO in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Zur Kontrolle wurde im dritten Ansatz eine Proteinfraction aus Zellen, welche den leeren Vektor enthielten (pET), verwendet. Die Abnahme des Tempolsignals konnte in den Ansätzen mit enzymatisch aktiven FaEO gezeigt werden. Auch im Kontrollansatz ist ein geringer Verbrauch von Tempol zu beobachten, allerdings handelt es sich hierbei um einen weitaus langsameren und somit mutmaßlich anderen Prozess. Des Weiteren wurden Versuche mit „Spin Traps“ durchgeführt. Hierbei handelt es sich um Verbindungen, die zur Stabilisierung labiler Radikale eingesetzt werden. Das heißt ein eventuell vorhandenes Semichinonradikal könnte durch den Einsatz einer „Spin Trap“ stabilisiert und somit länger detektiert werden. Verwendet wurden α -(4-Pyridyl-1-oxid)-N-*tert*-butylnitron (POBN) und α -Phenyl-*tert*-butylnitron (PBN). In Ansätzen mit PQ, NADH und FaEO konnte im Gegensatz zu Kontrollansätzen ohne exprimiertes FaEO ein Signal für Radikale detektiert werden, dessen Intensität in Gegenwart von Sauerstoff sogar noch zunahm. Diese Daten bestätigten das Ergebnis mit Tempol. Reaktionsansätze mit den ungesättigten Hydroxyfuranonen wurden nicht durchgeführt.

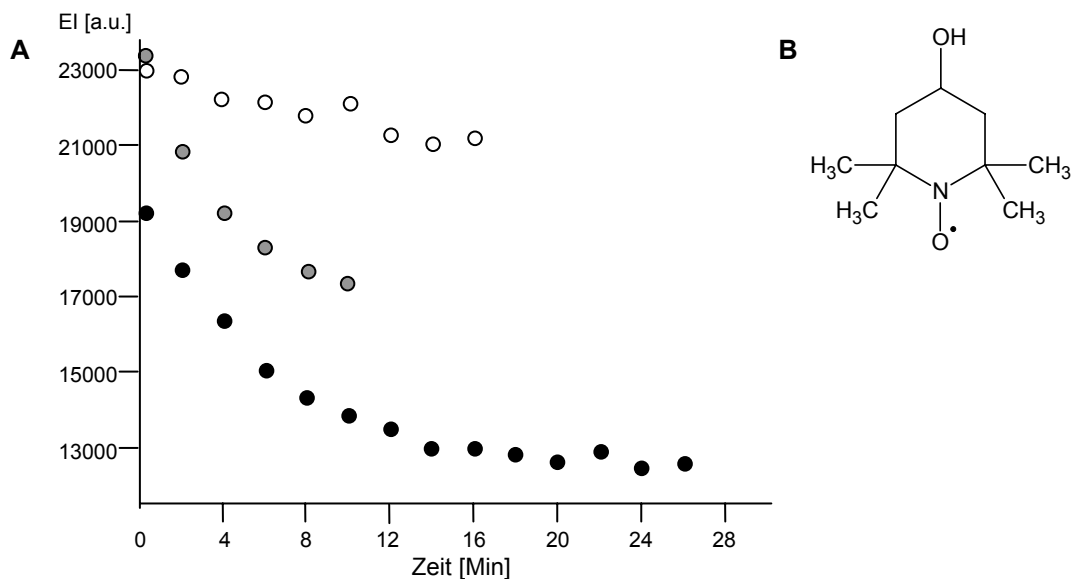


Abb. C-4-1: ESR-Messung mit Tempol; Abnahme der Intensität in zwei Ansätzen mit enzymatischer Aktivität (A) (schwarz und grau, FaEO, NADH, PQ). Kontrollansatz ohne FaEO (pET, NADH, PQ) (weiß), Strukturformel von Tempol (B).

4.2.1.2 Reduktion von Cytochrom c

Cytochrom c gehört zu den bekannten biologischen Redoxsystemen den Cytochromen. Diese Biokatalysatoren mit Häm-Struktur enthalten ein zentrales Eisenatom, welches reversibel über einen Valenzwechsel ein Elektron binden und wieder abgeben kann. Diese Eigenschaft macht die Cytochrome zu wichtigen Mitgliedern in allen an zellulären Membranen stattfindenden Elektronentransportketten. Cytochrom c ist in der reduzierten Form (Ferrocycyochrom) ein farbiger Komplex und weist im Gegensatz zur oxidierten Form (Ferricytochrom) ein Absorptionsmaxima im sichtbaren Spektralbereich bei 550 nm auf. Des Weiteren nimmt Cytochrom c aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaft eine Sonderstellung unter den Cytochromen ein. So kann es als beweglicher Elektronenüberträger außerhalb der lipophilen Membran dienen. Wegen der guten Löslichkeit in Wasser wurde Cytochrom c in dieser Studie als Indikator für eventuell gebildete Radikale eingesetzt. Es galt zu prüfen, ob diese im Enzymassay durch eine Ein-Elektron-Übertragung von NADH auf PQ durch FaEO und unter Umständen zusätzlich durch eine anschließende Reduktion von Sauerstoff durch das Semichinonradikal entstehen. Eine Reaktion von Ferricytochrom c mit Radikalen zum Ferrocycyochrom c kann photometrisch durch die Zunahme der Absorption bei 550 nm beobachtet und die Menge an gebildeten Superoxidradikalanionen über den molaren Extinktionskoeffizienten des reduzierten Cytochrom c ($\epsilon_{550}=2,1 \cdot 10^3 \text{ [l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$) mit Hilfe des Lambert-Beer'schen-Gesetzes berechnet werden.

In den Reaktionsansätzen zum Nachweis von Semichinonradikalen konnte die Bildung von Ferrocycyochrom anhand der Absorptionzunahme bei 550 nm verfolgt werden. Nur wenn sich alle zur enzymatischen Umsetzung notwendigen Verbindungen (PQ, NADH) und das Enzym (FaEO) im Reaktionsansatz befanden, wurde eine Absorptionzunahme und damit eine Bildung von Ferrocycyochrom beobachtet (Abb. C-4-2 B). Zur Abgrenzung einer Superoxidradikalanion-unabhängigen Reduktion des Ferricytochroms wurde der Ansatz in Gegenwart von Superoxiddismutase (SOD) wiederholt. Diese sollte die gebildeten Superoxidradikalanionen abfangen und somit deren Reaktion mit Ferricytochrom verhindern. Eine dennoch stattfindende Bildung des reduzierten Ferrocycyochroms ließe sich also auf die direkte Reduktion durch Semichinonradikale zurückführen. Über den Extinktionskoeffizienten von Ferrocycyochrom konnte ein Unterschied in den beiden Reaktionen berechnet werden. Mit SOD wurden 0,9 nmol weniger Ferrocycyochrom c gebildet als ohne (7,3 nmol).

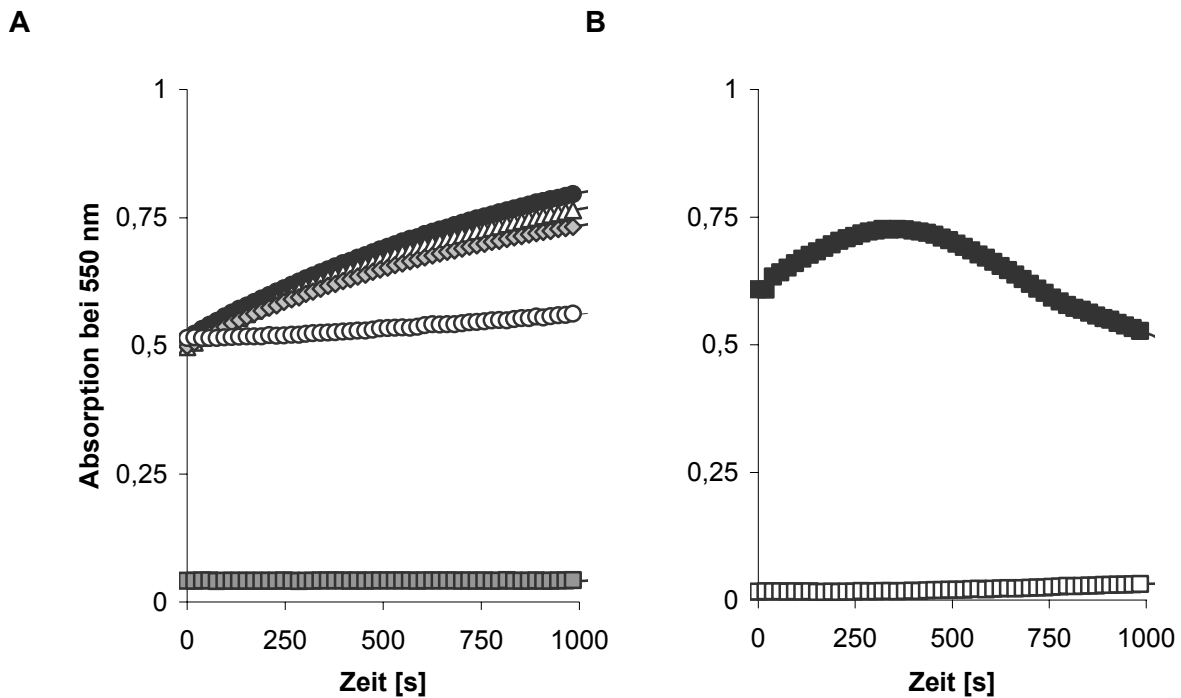


Abb. C-4-2: Absorptionsänderung bei 550 nm durch die radikalische Reduktion von Cytochrom c während der enzymatischen Katalyse; Umsetzung von EDHMF (A) durch FaEO unter Verbrauch von NADH in Gegenwart von Cytochrom c ●; Kontrollreaktionen: ohne NADH △, ohne FaEO ◇, ohne EDHMF ○, ohne Cytochrom c ■; Umsetzung von PQ ■ und EHDMF □ durch FaEO unter Verbrauch von NADH in Gegenwart von Cytochrom c mit Blindwertkorrektur (B). Es wurde je die Absorption des Kontrollansatzes ohne NADH von den gemessenen Werten subtrahiert.

Führte man die Reduktion von Ferricytochrom c mit EDHMF als Vertreter der α , β -ungesättigten Hydroxyfuranone durch, konnten keine eindeutigen Schlüsse gezogen werden. Abb. C-4-2 A zeigt einen Anstieg der Absorption bei 550 nm im Reaktionsansatz mit allen zur Umsetzung notwendigen Substanzen. Allerdings wurde eine Absorptionzunahme auch beobachtet, wenn einzelne Reaktionspartner nicht zugesetzt wurden. Durch die Kontrolle der NADH-Abnahme bei 340 nm vor und nach der enzymatischen Umsetzung, welche als Indikator für eine enzymatische Umsetzung dienen sollte, konnte verfolgt werden, dass in den Blindwerten wie erwartet keine Umsetzung von NADH erfolgte. Dies bedeutete, dass entweder die Reduktion von Ferricytochrom zu Ferrocycytochrom in diesen Ansätzen durch andere Abläufe stattfinden musste, oder die Absorptionzunahme bei 550 nm durch andere in den Ansätzen vorhandene Substanzen entstand. Letzteres konnte durch die Kontrollreaktion ohne Ferricytochrom ausgeschlossen werden, da in diesem Fall keine Absorptionzunahme beobachtbar war. Ohne den Zusatz an EDHMF konnte ein nur leichter Absorptionsanstieg beobachtet werden. Wurde kein NADH oder kein Enzym eingesetzt, zeigte die zeitabhängige Kurve der Absorptionzunahme bei 550 nm innerhalb der ersten 15 Minuten den gleichen Verlauf wie ein Ansatz mit NADH bevor sie leicht abflachte. In

Anbetracht dieser Kontrollexperimente konnte zwar darauf geschlossen werden, dass nicht die enzymatische Reaktion für die Bildung von Radikalen und somit für die Reduktion von Ferricytochrom c verantwortlich war, die Anwesenheit von Radikalen in der Lösung kann aber nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Abschließend verglichen wir die Absorptionzunahme bei 550 nm in zwei Reaktionsansätzen, der eine mit PQ der zweite mit EDHMF als Substrat, von denen die jeweiligen Blindreaktionen ohne NADH subtrahiert wurden (Abb. C-4-2 B). Aufgrund der deutlich unterschiedlichen Kurvenverläufe wird angenommen, dass die enzymatische Umsetzung von PQ im Gegensatz zu der von EDHMF über radikalische Zwischenstufen abläuft.

4.2.2 Nachweis einer Zwei-Elektronen-Übertragung

4.2.2.1 Bildung von stabilen Produkten

PQ kann enzymkatalysiert durch eine Zwei-Elektronen-Übertragung in sein Dihydro-Derivat (Dihydroxyphenanthren, DHP, Abb. C-4-3) überführt werden. Diese Catechol-Verbindung wird allerdings in der Literatur als instabil und demzufolge schlecht nachweisbar beschrieben (Maruyama und Mitarbeiter, 2003). Deshalb bietet sich die Möglichkeit an, DHP durch eine zweifache Acetoxylierung in das stabile Diacetoxyphenanthren (DAP) zu überführen und so der Analytik zugänglich zu machen (Abb. C-4-3). Zunächst wurde die Referenzsubstanz aus PQ und Essigsäureanhydrid, gelöst in THF, unter Zugaben von Zinkstaub, Wasser und Triethylamin synthetisiert und nach einem Umkristallationsschritt die Struktur mittels NMR-Messungen (Abb. D-3) bestätigt. Anschließend sind HPLC-MS/MS-Daten generiert worden, um das eventuelle Reaktionsprodukt der enzymatischen Umsetzung eindeutig identifizieren zu können und eine Eichgerade aufzunehmen (Abb. D-4).

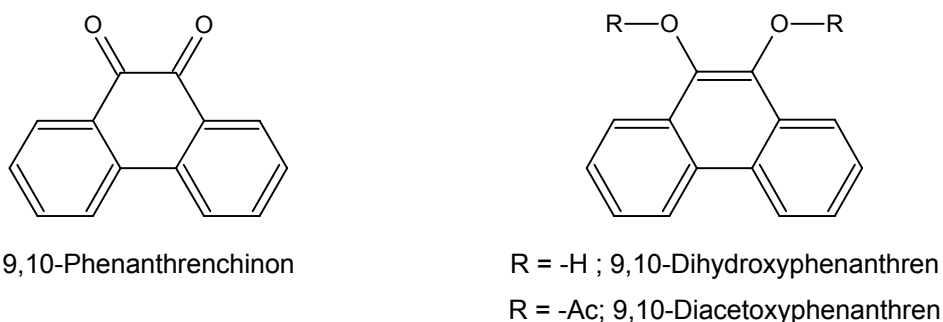


Abb. C-4-3: Strukturformeln von 9,10-Phenanthrenchinon und seinen Derivaten.

Aliquote der anschließend durchgeführten enzymatischen Umsetzungen von PQ wurden mit Essigsäureanhydrid bei 80 °C erhitzt und mit Trichloracetat vermischt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde ein Teil der oberen Phase zur HPLC-UV-Analytik verwendet. Als Kontrolle dienten die gleichen Ansätze, durchgeführt ohne exprimiertes FaEO. Über die Eichgerade konnten Mengen von 0,4 - 0,6 µg/ml des diacetoxylierten Produkts nachgewiesen werden, was einer Umsetzungsrate von weniger als 1 % entsprach.

Dass bei der enzymatischen Umsetzung der ungesättigten Hydroxyfuranone durch FaEO stabile Produkte, nämlich die gesättigten Analoga entstehen, wurde bereits im Kapitel C-3.3 gezeigt.

4.2.2.2 Stöchiometrischer Verbrauch von NAD(P)H

Bei einer Zwei-Elektronen-Übertragung wird NADH in äquimolaren Mengen zum angebotenen Substrat verbraucht. Demzufolge müsste der in Abb. C-4-4 gezeigte Kurvenverlauf bei photometrischen Messungen entstehen, wenn man ein Viertel der vorgelegten NADH-Menge an Substrat zudosiert, wartet bis ein konstanter Wert erreicht ist und erneut zudosiert (Mano und Mitarbeiter, 2002).

Abb. C-4-5 zeigt die Ergebnisse des nach gleichem Schema wie von Mano und Mitarbeiter (2002) gestalteten Versuchs. NADH (100 nmol) wurden in einem Ansatz mit FaEO in Phosphatpuffer (pH 7,0) vorgelegt und nach gewissen Zeiten je 25 nmol PQ zudosiert. Dabei ist stets die NADH-Abnahme durch die Abnahme der Absorption bei 340 nm verfolgt worden. Es stellte sich heraus, dass bereits durch eine Zugabe von 25 nmol PQ das gesamte NADH verbraucht wurde. Auch die anschließend zugegebenen 100 nmol NADH und weitere 100 nmol NADH (Daten nicht gezeigt) sind durch die ersten 25 nmol PQ umgesetzt worden.

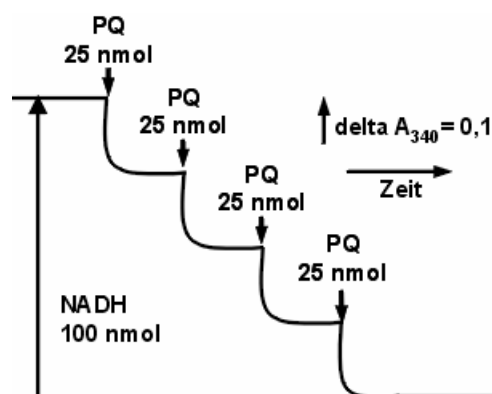


Abb. C-4-4: Erwarteter stöchiometrischer Verbrauch von NADH während einer Zwei-Elektronen-Übertragung auf PQ beobachtet durch die Extinktionsabnahme bei 340 nm; nach Mano und Mitarbeiter (2002).

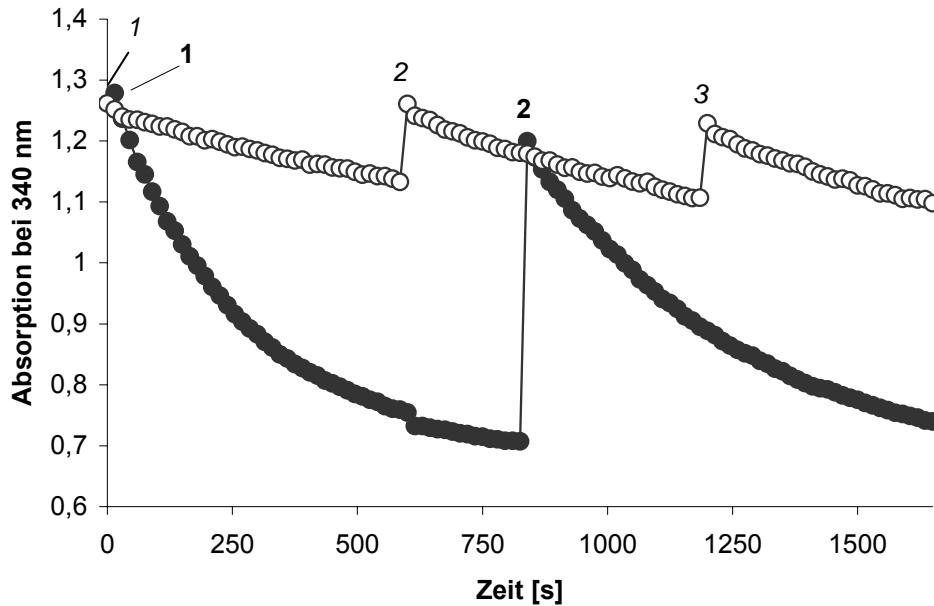


Abb. C-4-5: Zeitlicher Verlauf der photometrischen Messung der Oxidation von NADH durch FaEO mit PQ ● oder EDHMF ○ bei 340 nm; Versuchsaufbau nach Mano und Mitarbeitern (2002, Abb. C-4-4); Durch die Zugabe von FaEO (1/1) zum Reaktionsansatz mit 100 nmol NADH und 25 nmol PQ ● oder 77 nmol EDHMF ○ in Phosphatpuffer wurde die Reaktion gestartet. Zum Reaktionsansatz mit PQ ● wurden nach 880 Sekunden (2) weitere 100 nmol NADH zudosiert. Zum Reaktionsansatz mit EDHMF ○ erfolgte eine Zugabe von weiteren 77 nmol EDHMF nach 600 (2) und 1200 (3) Sekunden.

Durch die Eigenabsorption der α , β -ungesättigten Hydroxyfuranone bei 340 nm (Kap. C-3.3.2) konnte in einem ähnlichen Versuchsansatz mit EDHMF die Menge des verbrauchten NADH nicht exakt quantifiziert werden. Zwar wurde eine Abnahme der Absorption bei 340 nm beobachtet, diese war aber von der Geschwindigkeit her nicht mit der von PQ zu vergleichen (Abb. C-4-5). Da ein Teil der Absorptionsabnahme zudem aus der Umwandlung von EDHMF zu EHMf (Kap. C-3.3.2) resultiert, können Aussagen über die Stöchiometrie aufgrund der ähnlichen Absorptionsmaxima von NADH und EDHMF nicht getroffen werden.

4.3 DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

In Pflanzen werden lösliche Chinonoxidoreduktasen üblicherweise in zwei Gruppen eingeteilt, die der DT-Diaphorase- und die der ζ -Crystallin-ähnlichen Enzyme. Das wichtigste Unterscheidungsmerkmal dieser beiden Gruppen ist der von ihnen katalysierte Reaktionsmechanismus. DT-Diaphorase-ähnliche Enzyme katalysieren die Zwei-Elektronen-Übertragung und produzieren somit stabile, vollständig reduzierte Hydrochinone. Diese werden durch Konjugationsreaktionen mit z. B. Zuckerresten hydrophiler gemacht und können so einfacher aus dem Organismus ausgeschieden werden. ζ -Crystallin-ähnliche Enzyme dagegen zeichnen sich durch eine Ein-Elektronen-Übertragung aus. Die entstandenen reaktiven Semichinonradikale sind in der Lage z. B. Sauerstoff zu reduzieren und Superoxidradikalanionen zu generieren.

Da FaEO zum Einen stabile Produkte, nämlich Hydroxyfuranone, bildet, zum Anderen aber bei der Umsetzung von PQ kein Produkt bisher fassbar war, sollte der Reaktionsmechanismus genauer studiert werden.

Die kinetischen Daten von FaEO zeigten, dass NADPH gegenüber NADH das bessere Cosubstrat ist und zu höherer katalytischer Aktivität führt. Diese resultiert alleine aus der höheren Umsetzungsgeschwindigkeit ($1220 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ NADPH, $270 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ NADH), denn im K_m -Wert unterscheiden sich die beiden Cosubstrate kaum ($325 \text{ }\mu\text{M}$ NADPH, $361 \text{ }\mu\text{M}$ NADH). Mit diesen Werten liegt FaEO im normalen Bereich für Chinonoxidoreduktasen. Dick und Mitarbeiter (2001) postulierten, dass Reduktasen im Gegensatz zu Dehydrogenasen NADPH als Cosubstrat bevorzugen. DT-Diaphorase-ähnliche Enzyme werden wie die Dehydrogenasen als unspezifisch gegenüber den Cosubstraten beschrieben (Cadenas, 1995).

Auch der K_m -Wert von $12 \text{ }\mu\text{M}$ von FaEO für PQ mit NADH als Cosubstrat passt gut zu Literaturwerten anderer Chinonoxidoreduktasen. So setzt eine QR aus *Staphylococcus aureus* PQ mit einem K_m -Wert von $50 \text{ }\mu\text{M}$ (Maruyama und Mitarbeiter, 2003) um, eine QR aus Zucchini weist für Chinone K_m -Werte von $2\text{-}6 \text{ }\mu\text{M}$ auf (Trost und Mitarbeiter, 1997) und ζ -Crystallin aus der Kamelaugen-Linse katalysiert die Umsetzung von PQ mit einem K_m -Wert von $17 \text{ }\mu\text{M}$ (Duhaiman und Mitarbeiter, 1995). Die Umsetzungsgeschwindigkeit v_{max} für PQ liegt mit $177 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ eher im unteren Bereich anderer Enzyme derselben Familie. So können die bereits eben beschriebenen Chinonoxidoreduktasen PQ mit Geschwindigkeiten von bis zu $1059 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ umsetzen.

Unterschiede ergaben sich bei der Bestimmung der kinetischen Daten der ungesättigten 4-Hydroxy-3(2H)-furanone. Generell stellte sich heraus, dass HMPDF vor BDHMF und EDHMF aufgrund der katalytischen Effizienzen ($0,0026 \text{ s}^{-1} \text{ }\mu\text{M}^{-1}$ HMPDF, $0,0019 \text{ s}^{-1} \text{ }\mu\text{M}^{-1}$ BDHMF, $0,0009 \text{ s}^{-1} \text{ }\mu\text{M}^{-1}$ EDHMF) das beste Substrat darstellt. Betrachtet man die K_m -Werte der ungesättigten 4-Hydroxy-3(2H)-furanone zeigt sich, dass diese in einer anderen Dimension liegen als für PQ und um ca. den Faktor 1000 erhöht sind. Dick und Mitarbeiter

(2004) postulieren, dass Enzyme, die einen hohen K_m -Wert und gleichzeitig eine hohe Maximalgeschwindigkeit aufweisen, für hohe Substratkonzentrationen optimal sind, denn so wird das Enzym erst spät gesättigt und gewährleistet eine schnelle Umsetzung. Seien hingegen nur geringe Substratkonzentrationen vorhanden, wäre ein niedriger K_m -Wert von Vorteil. Viele Pflanzen sind in der Lage schlechte katalytische Raten, wie sie oft im Sekundärmetabolismus zu finden sind zu kompensieren, in dem das Enzym zu einem bestimmten Zeitpunkt sehr stark exprimiert wird (Pichersky und Gang, 2000). Auch die Expression an einem bestimmten Ort in der Zelle kann die katalytische Effizienz indirekt erhöhen, in dem z. B. das Substrat besser zugänglich wird (Aharoni und Mitarbeiter, 2000). Keines der Substrate, für die kinetische Daten bestimmt wurden, stellt ein physiologisches Substrat von FaEO in der Erdbeerfrucht dar. Nimmt man an, dass die katalytische Effizienz für HMMF aufgrund der Strukturähnlichkeit mit denen der anderen ungesättigten 4-Hydroxy-3(2H)-furanonen vergleichbar ist, sollten folgende Fakten bedacht werden. FaEO wird in der Erdbeere reifekorreliert exprimiert. Die Expression erreicht das Maximum in reifen Früchten (Raab und Mitarbeiter, 2006) und in diesem Stadium sind gleichzeitig die größten Mengen an Substrat (HMMF) vorhanden. Schlechte katalytische Effizienz wäre somit durch hohe Expression kompensiert, denn eine effektive Bildung von HDMF wäre dennoch gewährleistet.

Zur Bestimmung des Reaktionsmechanismus sollte der Nachweis einer radikalischen Ein-Elektronen-Übertragung über Elektronen-Spin-Resonanz-(ESR)-Messungen und über die Reduktion von Cytochrom c geführt werden. Hierbei stellte sich heraus, dass durch die beiden Radikalfänger Tempol, bei der ESR-Messung, und Cytochrom c, in photometrischen Messungen, Radikale während den enzymatischen Umsetzungen von PQ nachgewiesen wurden. Als Vertreter der ungesättigten Hydroxyfuranone wurde EDHMF für die Messungen mit Cytochrom c eingesetzt. Da sich die generierten Daten stark von denen mit PQ unterscheiden wird postuliert, dass mit EDHMF als Substrat keine Radikale aus der enzymatischen Umsetzung resultieren.

Der Nachweis einer Zwei-Elektronen-Übertragung sollte über eventuell gebildete stabile Produkte und über die stöchiometrische Umsetzung von NADH erfolgen. Die stabilen Produkte bei der Umsetzung der ungesättigten Hydroxyfuranone, sind wie bereits beschrieben, die entsprechenden gesättigten Verbindungen. Diese konnten durch verschiedene Methoden, wie HPLC-MS/MS, GC-MS und HPLC-DAD, nachgewiesen werden (Kap. C-3.3). Das Produkt einer Zwei-Elektronen-Übertragung auf PQ ist das entsprechende Dihydroxyphenanthren. Es gelang in den Reaktionsansätzen Dihydroxyphenanthren nachzuweisen, allerdings betrug die gebildete Menge weniger als 1 % des eingesetzten PQ, was nicht mit den photometrisch bestimmten kinetischen Daten konform geht. Folglich scheint diese gebildete Menge an Dihydroxyphenanthren, wie auch

bei Maruyama und Mitarbeitern (2003) für die *S. aureus* Chinonoxidoreduktase beschrieben, das Resultat einer Nebenreaktion zu sein.

Als letztes wurde überprüft in welchen stöchiometrischen Mengen NADH umgesetzt wird. Im Versuch mit FaEO oxidierten 25 nmol PQ mehr als 300 nmol NADH. Dieses Ergebnis ließ sich nur damit erklären, dass ein Elektron, das auf PQ übertragen wird und zur Bildung des reaktiven Semichinonradikals führt, anschließend auf molekularen Sauerstoff weitergegeben wird und somit das Sauerstoffradikalanion bildet. Auf diesem Weg wird das Substrat regeneriert. Demzufolge steht PQ immer zur Verfügung und es können „nicht-stöchiometrische“ Mengen an NADH umgesetzt werden (Abb. B-7). In den Ansätzen mit EDHMF konnte eine weitaus langsamere Absorptionsabnahme beobachtet werden, welche aber durch die Eigenabsorptionen von EDHMF überlagert wird. Die so erhaltenen Ergebnisse konnten aber dahingehend interpretiert werden, dass im Falle der Hydroxyfuranone eine radikalische Umsetzung ausgeschlossen werden kann. Fasst man alle Ergebnisse zusammen, so können die in Abb. C-4-6 dargestellten Reaktionsmechanismen postuliert werden. FaEO katalysiert abhängig von dem ihm zur Verfügung stehenden Substrat eine Ein- oder eine Zwei-Elektronen-Übertragung. Dieses Phänomen wurde in der Familie der NADPH-abhängigen Oxidoreduktasen für einzelne Enzyme bereits beschrieben. So katalysiert AtAER genau wie FaEO mit PQ die Oxidation der Reduktionsäquivalente durch eine Ein-Elektronen-Übertragung (Mano und Mitarbeiter, 2005). In Gegenwart von α , β -ungesättigten Aldehyden oder Ketonen werden auf deren Doppelbindung zwei Elektronen übertragen. Auch ein Enzym aus der Familie der AKR (Aldo-Keto-Reduktasen) soll verschiedene Mechanismen katalysieren, da bei einer Mutation im aktiven Zentrum nur eine Eigenschaft verloren geht. Die zweite, die Reduktion von PQ, bleibt erhalten (Schlegel und Mitarbeiter, 1998). Daraus wurde gefolgert, dass zwei unterschiedliche aktive Zentren für die beiden Umsetzungen verantwortlich sein könnten. Im Fall von FaEO spricht für diese These auch der Unterschied in den pH-Optima (Kap. C.1.2.2/C.1.3.2).

Iyanagi und Yamazaki (1970) beschrieben für Flavoenzyme die Möglichkeit, dass abhängig vom Redoxpotential des Substrates und der Stabilität des gebildeten Produkts ein oder zwei Elektronen übertragen werden können. Außerdem hängt dies davon ab, wie stark das Substrat an das Enzym gebunden ist bzw. wie leicht sich das Produkt vom Enzym lösen kann. Es besteht also auch die Möglichkeit, dass sich die Zwei-Elektronen-Übertragung auf die ungesättigten 4-Hydroxy-3(2H)-furanone aus zwei nacheinander ablaufenden Ein-Elektronen-Übertragungen zusammensetzt, wobei das intermediär gebildete Radikal den Enzym-Substrat-Komplex nicht verlassen kann. Tedeschi und Mitarbeiter (1995) beschreiben diesen Ablauf auch für die obligatorische Zwei-Elektronen-Übertragung der DT-Diaphorase. Hier findet die zweite Ein-Elektronen-Übertragung mit einer viel höheren Geschwindigkeit statt als die erste, so dass keine intermediären Radikale freigesetzt werden

können. Allerdings gilt zu beachten, dass es sich bei diesen Beispielen im Gegensatz zu FaEO um Flavoproteine handelt, welche aufgrund des Flavin-Cofaktors andere

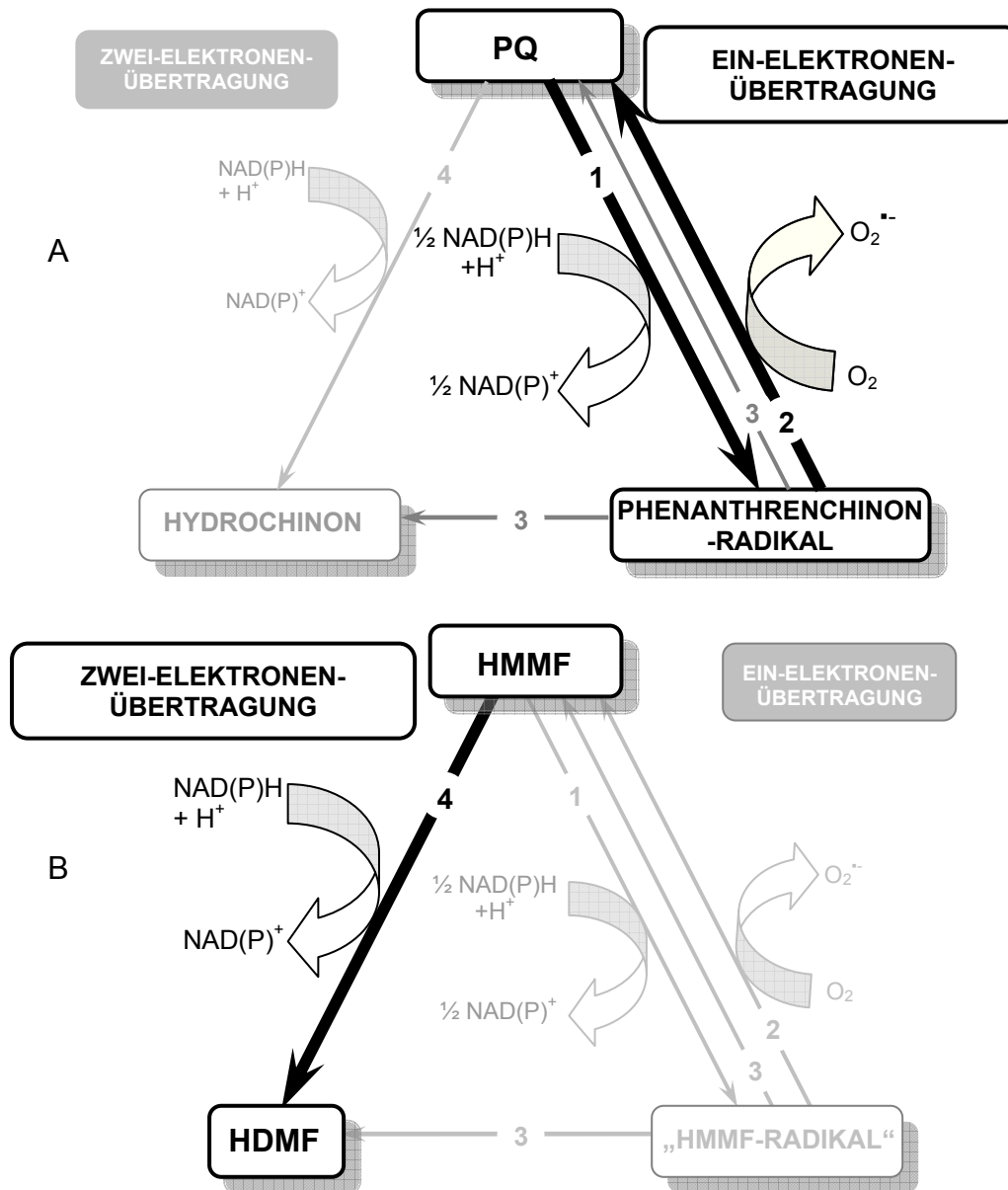


Abb. C-4-6: Schema der substratabhängigen Reaktionsmechanismen von FaEO (adaptiert nach Maruyama und Mitarbeiter, 2003); Steht PQ (A) zur Verfügung, katalysiert FaEO mit NAD(P)H eine Ein-Elektronen-Übertragung (1/2); wird ein ungesättigtes 4-Hydroxy-3(2H)-furanon (B) als Substrat verwendet, läuft die enzymatische Umsetzung über eine Zwei-Elektronen-Übertragung ab (4); HMMF/HDMF stehen für EDHMF/EHMF, HMPDF/HMPF und BDHMF/BHMF. Die Disproportionierung von Phenanthrenchinonradikalen zum Hydrochinon und PQ (A 3) findet nur in sehr geringem Ausmaß statt.

Redox-Möglichkeiten besitzen. Die genauen Abläufe der Elektronenübertragung durch FaEO müssen demzufolge durch weitere Studien geklärt werden. Die Zuordnung von FaEO zu einer der Gruppen der NAD(P)H-abhängigen Chinonoxido-reduktasen bleibt somit schwierig. Dies geht teilweise konform mit dem Versuch FaEO über Ähnlichkeitsanalysen phylogenetisch einzuordnen. Unerwarteter Weise wurde die Enonoxido-reduktase auch abseits der Enzyme von Mano und Mitarbeitern (2002) sowie Dick und Mitarbeitern (2001), welche auch substratabhängig zwei verschiedene Reaktionen katalysieren, eingegliedert. Dies könnte zu der Annahme veranlassen, dass die Fähigkeit von FaEO, LeEO, AtAER und RnAOR substratabhängig zwei verschiedene Mechanismen zu katalysieren in der Familie der Chinonoxido-reduktasen weit verbreitet ist und auch die anderen bereits biochemisch charakterisierten Familienmitglieder diese Anlage besitzen, jedoch nur aufgrund der fehlenden bzw. nicht getesteten „zweiten Substratklasse“ nicht als solche beschrieben wurden.

D MATERIAL UND METHODEN

1 MATERIAL

1.1 CHEMIKALIEN

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Sigma, Fluka, Aldrich (alle Deisenhofen, Deutschland) in p. a. Qualität bezogen. Die Lösungsmittel wurden zusätzlich über eine Vigreuxkolonne rektifiziert. Zur Identifizierung von Verbindungen wurden Referenzverbindungen des Arbeitskreises Schwab neben den eigens synthetisierten Verbindungen verwendet. 6-¹³C-D-Glc (Markierungsgrad 99 %) wurde von der Firma Deutero GmbH, Kastellaun, Deutschland bezogen.

1.2 ENZYME

- Restriktionsendonucleasen:
 - Xho I, 20 U/μl (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland)
 - Nco I, 10 U/μl (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland)
- T4 DNA Ligase 400 U/μl (Promega, Madison, WI, USA)
- Taq DNA Polymerase 5 U/μl (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland)
- Deep VentR® DNA Polymerase 2 U/μl (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland)
- RNase H 5 u/μl (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland)

1.3 ZELLEN

- JM 109 kompetente Zellen (Promega, Madison, WI, USA)
- BL21(DE3) *pLysS* kompetente Zellen (Novagen, San Diego, USA)

1.4 PFLANZENMATERIAL

Das Pflanzenmaterial wurde, wenn nicht anders angegeben, von einem lokalen Händler oder aus eigenem Anbau ohne genauere Spezifikationen bezogen.

1.5 SONSTIGES MATERIAL

- *Glassbeads* 106 μM (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Talon™-Harz (BD Biosciences, Clontech, Mountain View, CA, USA)
- Säulenchromatographie
 - Lichroprep® RP 18, Korngröße 43 - 47 μm (Merck, Darmstadt, Deutschland)
 - Silica-Gel 60, 0,04-0,063 mm (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- Desoxynucleotide Triphosphate (dNTPs) (Promega, Madison, WI, USA)
- Festphasenextraktion
 - Hydrabond Festphasenkartuschen (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

2.5 LÖSUNGEN ZUM BLOTTEN

Tris/Glycine/MeOH-Puffer:	5 %	Tris
	5 %	Glycine
	5 %	MeOH in H ₂ O
Ponceau-Lösung:	2 %	Ponceau
	3 %	Trichloressigsäure in H ₂ O
Blocklösung:	5 %	Milchpulver in PBS/Tween in H ₂ O
PBS/Tween:	1 g	Tween / 1 l PBS in H ₂ O
PBS-Puffer:	5,8 M	Na ₂ HPO ₄
	1,5 M	NaH ₂ PO ₄
	6,8 M	NaCl
		pH 7,3 - 7,4 in H ₂ O
TBS-Puffer:	0,5 M	Tris
	1,5 M	NaCl
		pH 7,5 in H ₂ O
Nitrobluetetrazolinum (NBT):	0,5 g / 10 ml	Dimethylformamid 70%
Bromochlorindolylphosphat (BCIP):	0,5 g / 10 ml	Dimethylformamid 100%
Alkaline-Phosphatase-Puffer:	100 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
	100 mM	Tris
		pH 9,5

2.6 LÖSUNGEN ZUR GELEXTRAKTION

<i>Membrane Wash Solution:</i>	10 mM	Kaliumacetat (pH 5,0)
	80 %	Ethanol
	16,7 µM	EDTA (pH 8,0)
<i>Membrane Binding Solution:</i>	4,5 M	Guanidinisothiocyanat
	0,5 M	Kaliumacetat (pH 5,0)
<i>1X TE buffer:</i>	10 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	1 mM	EDTA (pH 8,0)
<i>1X TBE buffer:</i>	89 mM	Tris
	89 mM	Borsäure
	2 mM	EDTA (pH 8,0)
<i>1X TAE buffer:</i>	40 mM	Tris
	5 mM	Natriumacetat
	1 mM	EDTA (pH 8,0)

2.7 FÄRBE- UND ENTFÄRBE LÖSUNGEN FÜR DIE SDS-PAGE

Coomassie-Färbelösung :	120 ml	MeOH
	24 ml	CH ₃ COOH
	330 mg	Coomassie Brilliantblau G-250
	120 ml	Wasser
Entfärbelösung:	10 %	MeOH
	7 %	CH ₃ COOH
		in H ₂ O

2.8 LADEPUFFER ZUR GELELEKTROPHORESE

0,21 %	Orange G
0,2 M	EDTA
50 %	Glycerin
	in H ₂ O

2.9 LÖSUNGEN FÜR DIE MINIPREP

<i>Wizard® SV Cell Lysis Solution:</i>	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS
<i>Wizard® SV Neutralization Solution:</i>	4,09 M	Guanidinhydrochlorid
	759 mM	Kaliumacetat
	2120 mM	Essigsäure
		pH 4,2

Wizard® SV 96 Resuspension Solution:

50	mM	Tris-HCl (pH 7,5)
10	mM	EDTA
100	µg/ml	RNase A

Wizard® SV 96 Wash Solution:

60	%	Ethanol
60	mM	Kaliumacetat
8,3	mM	Tris-HCl (pH 7,5)
40	µM	EDTA (pH 8,0)

2.10 BRADFORD-REAGENZ

(Bradford, 1976)

0,01	%	Coomassie Brilliantblau G-250
4,8	%	Ethanol
8,5	%	Phosphorsäure

2.11 PUFFER

McIlvaine-Puffer (0,05 M):

0,05	M	Zitronensäure-Monohydrat und
0,1	M	Na ₂ HPO ₄ wurden in einem bestimmten Verhältnis gemischt um den gewünschten pH-Wert zu erhalten.

Phosphatpuffer (0,1 M):

1	M	Na ₂ HPO ₄ wurde mit
1	M	NaH ₂ PO ₄ im entsprechenden Verhältnis gemischt und mit H ₂ O 1:10 verdünnt

Tris/HCl-Puffer (0,05 M):

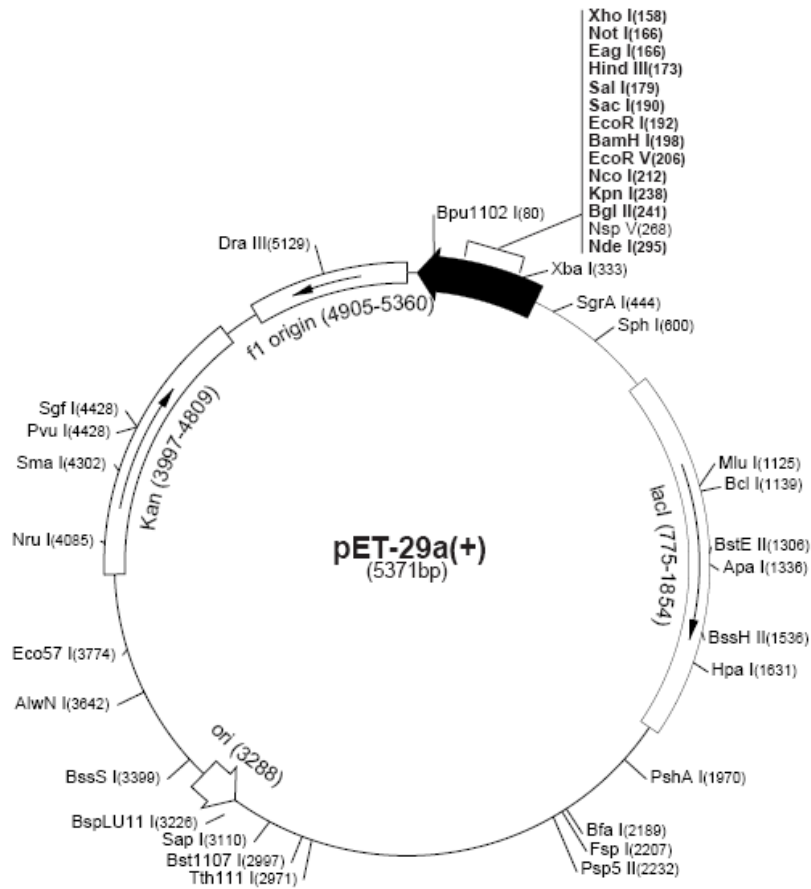
0,1	M	TRIS (25 ml) wurde mit
0,1	M	HCl titriert bis der gewünschte pH erreicht war und mit H ₂ O auf 50 ml aufgefüllt.

CAPS-Puffer (0,1 M):

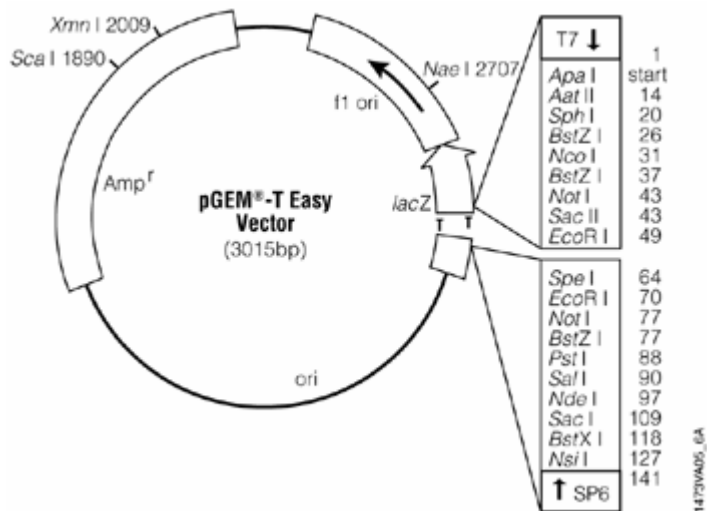
2,21	g	CAPS wurden in
90	ml	H ₂ O gelöst, und mit NaOH titriert bis der gewünschte pH-Wert erreicht war. Anschließend wurde mit H ₂ O auf
100	ml	aufgefüllt und 1:1 verdünnt.

2.12 VEKTOREN

pET 29 a (+) (Novagen, San Diego, USA)



pGemT easy (Promega, Mannheim, Deutschland)



3 METHODEN

3.1 KLONIERUNG UND HETEROLOGE EXPRESSION

3.1.1 Isolation von RNA aus Tomaten

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Tomatenmaterial (Knospen, Fruchtfleisch, Schale) wurde mit dem *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) gearbeitet. Diese Methode basiert auf der selektiven Bindung von RNA an Kieselgelmembranen in Anwesenheit von hohen chaotropen Salzkonzentrationen. Frisches Tomatenmaterial (50-100 mg) wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, in einem mit flüssigen Stickstoff gekühlten Zentrifugenröhrchen mit einem Pistill fein zerrieben, in 450 µl Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) gelöst und gut homogenisiert (Vortex). Dieser Schritt dient zur Zellyse und zur Inaktivierung von RNAsen durch Guanidin-Isothiocyanat. Anschließend wurde für eine Minute bei 56 °C schüttelnd inkubiert und die Lösung auf den *QIAshredder* (Qiagen, Hilden, Deutschland) gegeben. Störendes Zellmaterial wurde durch Zentrifugation der Probe entfernt und mit dem Pellet weitergearbeitet. Nach Zugabe von 225 µl Ethanol wurde die Lösung auf eine *RNeasy mini column* (Qiagen, Hilden, Deutschland) gegeben, für 15 Minuten bei 8000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um DNA-Reste abzutrennen wurden 350 µl Puffer RW1 auf das Säulchen gegeben und wieder zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die DNase-Behandlung erfolgte mit 80 µl DNase I Mix in 15 Minuten bei 30 °C. Anschließend wurde zunächst mit 350 µl Puffer (RW 1) und später mit 500 µl Puffer RPE gewaschen. Nach zwei Zentrifugationsschritten (2 Minuten, 8000 x g), um das Säulchen zu trocknen, wurde schließlich mit 50 µl RNase freiem H₂O bei 8000 x g für eine Minute eluiert.

3.1.2 Herstellung von cDNA

Für die cDNA-Synthese wurde das System von Invitrogen *SuperScriptTM III Reverse Transkriptase* verwendet. Diese Transkriptase ist eine verbesserte Version der M-MLV RT mit erhöhter Temperaturstabilität und geringer RNase H Aktivität. Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 1 µl Oligo(dT)₂₀ (50 µM)
- 1 µl dNTPs (Promega) (10 mM)
- 11 µl isolierte RNA

Zur Aufschmelzung der Sekundärstruktur der RNA wurde diese Mischung für 5 Minuten auf 65 °C erhitzt und anschließend zur Hybridisierung der Primer auf Eis 1 Minute gekühlt.

Nach einem Zentrifugationsschritt, um die Lösung zu sammeln, wurden

- 4 µl First-Strand-Buffer (Invitrogen) (5x)
- 1 µl Dithiothreitol (0,1 M)
- 0,5 µl RNase out (Invitrogen) (40 U / µl)
- 1 µl SuperScript™ III RT (200 U / µl)

zugegeben und das Ganze wurde vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten bei 50 °C wurde die Reaktion bei 70 °C nach 15 Minuten gestoppt.

Um zur cDNA komplementäre RNA aus der Lösung zu entfernen, wurde 20 Minuten bei 37 °C mit

- 1 µl RNase H (2 U / µl) inkubiert.

3.1.3 Amplifizierung des gewünschten Gens aus der cDNA

Als Enzym wurde *Deep Vent* der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Die Reaktionslösung setzte sich wie folgt zusammen:

- 5 µl ThermoPol Reaction Buffer (NEB, 10 x)
- 1 µl dNTPs (Promega) (10 mM)
- 2 µl Primer 1 (vgl. Kap. D.2.3)
- 2 µl Primer 2 (vgl. Kap. D.2.3)
- 1 µl cDNA
- 38 µl H₂O (RNase-frei)
- 1 µl Pfu (*Deep Vent*_R[®], NEB) (2 U / µl)

Als Temperaturabfolge in der PCR wurde verwendet:

Programm 1

2 Minuten	94 °C	
30 Sekunden	94 °C	} x 35
30 Sekunden	58 °C	
2,5 Minuten	72 °C	
5 Minuten	72 °C	
Lagerung	8 °C	

3.1.4 Gelelektrophorese zur Kontrolle der PCR

Ein Agarosegel wurde wie folgt hergestellt:

- 80 ml TAE
- 1,1 g Agarose
- 4 µl Ethidiumbromid

Das Gel wurde in eine horizontale Elektrophoresekammer (mit TAE) der Firma Roth gelegt und nach dem Einfüllen der Proben-Ladepuffer-Mischungen bei 85 V entwickelt.

Größenstandard:

2-Log *DNA-ladder*,

100 bp *DNA-ladder*, (beide New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland)

Anschließend wurde das Ergebnis in einer Geldokumentationsanlage im UV-Licht überprüft.

3.1.5 Gelextraktion

Die Extraktion der Zielbande aus dem DNA-Gel wurde mittels dem Geextraktionskit Wizard SV der Firma Promega durchgeführt. Dieser nutzt die Möglichkeit DNA selektiv an Kieselgelmembranen in Anwesenheit von hohen chaotropen Salzkonzentrationen zu binden (Kap. D.3.1).

Dafür wurde eine horizontale Gelelektrophorese wie in Kap. D.3.4 durchgeführt, die Zielbande im UV-Licht lokalisiert, mit einem Skalpell ausgeschnitten und gewogen. 10 µl pro 10 mg Gel *Membrane Binding Solution* wurden zugegeben und die Agarose bei 65 °C in 10 Minuten durch vortexen geschmolzen.

Die so erhaltene Lösung wurde auf eine *SV Minicolumn* gegeben und bei 16.000 x g 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das Säulchen zunächst mit 700 µl anschließend mit 500 µl *Membrane Wash Solution* gewaschen. Durch Zentrifugation wurde das Säulchen vollständig getrocknet und schließlich die DNA nach 1 Minute Inkubation mit 50 µl Nuclease-freiem H₂O eluiert.

3.1.6 Ligation in pGemT-Easy

A-tailing:

5 µl Gelextrakt
1 µl Taq Puffer (NEB) (10 x)
0,2 µl dATPs (10 mM)
1 µl Taq (NEB)
2,8 µl H₂O

Diese Mischung wurde für 25 Minuten bei 70 °C inkubiert.

Für die Ligation setzte sich die Reaktionsmischung wie folgt zusammen:

5 µl Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase (Promega, Madison, USA)
1 µl pGemT-Easy Vector (Promega, Madison, USA) (50 ng / µl)
3 µl modifiziertes PCR-Produkt
1 µl T4 DNA Ligase (Promega, Madison, USA) (3 Weiss U / µl)

Es wurde über Nacht bei 4 °C ligiert.

3.1.7 Transformation

Die Hitzeschocktransformation erfolgte unabhängig von den verwendeten Zellen nach folgendem Schema:

Die kompetenten Zellen (20 µl) wurden gefroren auf Eis inkubiert und mit dem Plasmid der Ligation (5 µl) durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Nach 20 Minuten auf Eis, wurden die Zellen einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden ausgesetzt und sofort wieder für 2 Minuten auf Eis gekühlt. Die Bakteriensuspension wurde mit 950 µl SOC-Medium vermischt und 1,5 Stunden bei 37 °C mit 500 Upm geschüttelt. Verschiedene Mengen der Kultur wurden auf LB_{x-Gal/Amp/IPTG}-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.1.8 Blau-Weiß-Selektion und *Colony PCR*

Der Vektor pGemT-Easy enthält eine für β-Galactosidase kodierende Sequenz. Bei einer erfolgreichen Ligation wird diese unterbrochen und die resultierenden rekombinanten Klone können durch ein Farbscreening auf Indikatorplatten identifiziert werden, da sie im Gegensatz zu blaugefärbten nicht rekombinanten Kolonien weiß gefärbt sind.

Dennoch sollte eine weitere Kontrolle u. a. der Richtung des Inserts durchgeführt werden. Hierfür wurde die Colony-PCR als Methode gewählt. Zur folgenden Reaktionslösung wurden mit einem sterilen Zahnstocher Zellen einer weißen Kolonie gegeben.

- 12,5 µl PCR Master Mix
 - 50 U / µl Taq, je 400 µM dNTPs, 3 mM MgCl₂
 - (Promega, Madison, USA)
- 0,25 µl Primer 1 (Kap. D.2.3)
- 0,25 µl Primer 2 (Kap. D.2.3)
- 12 µl H₂O

Die PCR wurde mit Programm 1 (Kap. D.3.3) durchgeführt und die Lösungen anschließend auf amplifizierte Sequenzen hin mittels einer horizontalen Gelelektrophorese (Kap. D.3.1.4) untersucht.

3.1.9 Miniprep

Von in der Colony-PCR positiv getesteten Kolonien wurde eine Übernachtskultur in LB_{Amp}-Medium angesetzt und aus dieser am nächsten Tag das Konstrukt isoliert. Dafür wurde der *Miniprep-Kit Wizard SV* der Firma Promega (Madison, USA) verwendet.

4 ml einer Übernachtskultur wurden bei 10.000 x g in 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgeschüttelt. Nachdem die Röhrchen kurz auf dem Kopf stehen gelassen wurden um jegliches Medium zu entfernen wurde das Zellpellet in 300 µl *Cell Resuspension Solution* (Promega, Madison, USA) gelöst. Durch das in der *Cell Lysis Solution* (300 µl, Promega, Madison, USA) vorhandene NaOH und SDS wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurden 10 µl Alkaline Protease zugegeben. Nach maximal 5 Minuten wurde

mit 350 µl *Neutralization Solution* (Promega, Madison, USA) neutralisiert. Das Lysat wurde bei 10.000 x g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in eine *Spin Column* gegeben und für 1 Minute bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, wurde mit 750 µl *Column Wash Solution* gewaschen und wiederum für eine Minute zentrifugiert. Der Waschschrift wurde mit 250 µl wiederholt und anschließend die DNA mit Nuclease-freiem Wasser von der Säule eluiert. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

3.1.10 Restriktionsanalyse

5 µl DNA wurden mit 0,5 µl der Restriktionsenzyme Nco I (10 U / µl, New England Biolabs) und 0,25 µl Xho I (20 U / µl, New England Biolabs) in 4 µl Puffer (Buffer Y⁺/Tango, MBI Fermentas) und 10 µl RNase freiem Wasser für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme bei 80 °C für 10 Minuten inaktiviert.

Um eine Selbstligation zu vermeiden, wurden mit 1 µl Phosphatase bei 37 °C in 30 Minuten die Phosphatreste an den Enden abgeschnitten. Anschließend wurde das Enzym bei 65 °C in 10 Minuten inaktiviert.

3.1.11 Sequenzieren

Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

3.1.12 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE diente als Überprüfung der zuvor aus *E. coli* isolierten Proteinfraction auf Größe und Reinheit des Zielproteins. Die Auftrennung erfolgte in einem Tris-Glycin-Fertig-Gel (12 %) (Anamed, Darmstadt, Deutschland) in einer Mini-Vertikal-Doppel-Elektrophorese-Kammer (Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in 25 mM Tris/Glycine/SDS-Puffer (pH 8,3) bei 30 mA. Zur Identifizierung der getrennten Proteinfractionen wurde ein Protein Marker *Roti®-Mark Prestained* der Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

Probenvorbereitung:

Die Probe wurde zur Denaturierung mit einem Gemisch aus Ladepuffer und SDS-Lösung (2:3) gut vermischt und 10 Minuten bei 95 °C gekocht. Nach dem Abkühlen auf Eis und dem Abzentrifugieren eventuell ausgefallener Proteine wurde der Überstand auf das Gel aufgetragen.

Nach der Auftrennung wurden die Proteinbanden mit Coomassie-Färbelösung für ca. 15 Minuten gefärbt und mehrmals in frischer Entfärbelösung entfärbt.

3.1.13 Western-Blot

3.1.13.1 Durchführung des Blots:

Der Blot wurde, getränkt in Tris/Glycine/MeOH-Puffer, wie folgt zusammen gebaut:

Kathode - Faserpolster - Whatman-Papier - SDS-Gel (ungefärbt) – Nitrocellulosemembran – Whatman-Papier – Faserpolster – Anode.

Das Ganze wurde gut gekühlt 60 Minuten bei 100 V in einer Criterion-Blotkammer (Biorad, München, Deutschland) mit Plattenelektroden in Tris-Glycine-Methanol-Puffer geblottet.

3.1.13.2 Antikörperfärbung des Blots:

Zunächst wurde die Nitrocellulose mit Ponceau-Lösung angefärbt und mit Wasser vorsichtig entfärbt, damit das Resultat des Blots kontrolliert werden konnte. Sichtbare Banden wurden vorsichtig mit Bleistift auf der Seite der Nitrocellulose die kein Protein enthielt markiert. Anschließend wurde das Ganze, um unspezifische Anlagerungen des Antikörpers zu vermeiden, über Nacht schüttelnd in Blocklösung eingelegt. Am nächsten Tag wurde der AntiHis-Antikörper (Novagen, San Diego, USA) in Blocklösung verdünnt (0,5 µl in 500 µl), auf die Proteinseite der Membran gegeben und 1 Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/Tween wurde die zweite Antikörperlösung, 1 µl AntiMaus (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in 10 ml Blocklösung, aufgegeben und wiederum 1 Stunde inkubiert. Nach fünf Waschschritten, dreimal mit PBS/Tween und zweimal mit TBS-Puffer wurde schließlich mit Nitrobluetetrazolinum und Bromochlorindolylphosphat in Alkaline-Phosphatase-Puffer im Dunkeln gefärbt.

3.1.14 Proteinexpression

3.1.14.1 Vor- und Übernachtskultur

25 ml LB-Medium mit 25 µl Kanamycin und 15 µl Chloramphenicol wurden mit Bakterien (BL 21 DE (3) *pLys*, mit pET 29 a x *FaQR* / *LeQR* bzw. ohne Insert) aus einem Glycerinstock angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurden am nächsten Morgen 20 ml entnommen und mit 800 ml LB-Medium mit 800 µl Kanamycin und 480 µl Chloramphenicol verdünnt. Diese Kultur wurde bei 37 °C und 120 rpm solange inkubiert bis die stündliche Kontrolle der optischen Dichte bei 600 nm einen Wert zwischen 0,4 und 0,6 ergab und somit die log-Phase erreicht war.

3.1.14.2 Enzymexpression

Zum Start der Enzymexpression wurde IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zur Bakterienkultur zugegeben und diese im Schüttelinkubator bei 16 °C über Nacht inkubiert.

3.1.15 Isolierung und Reinigung des Enzyms

3.1.15.1 Affinitätschromatographie

Die Isolierung und Reinigung wurde nach dem *Talon™ Metal Affinity Resins User Manual* (BD Biosciences, Clontech, Mountain View, CA, USA, 2003) durchgeführt.

Die Bakterienkultur nach der Expression des Enzyms wurde zunächst zentrifugiert und die Zellen so als Pellet gesammelt. Es stellt sich heraus, dass ein anschließender Gefrier-Tau-Schritt (-20 °C) die Enzymausbeute, aufgrund des besseren Zellaufschlusses, erhöhte. Der eigentliche Aufschluss erfolgte dann durch eine der zwei folgenden Methoden. Bei der einen Methode gelang es die Zellen zu zerstören indem das Zellpellet mit der 2,5 fachen Menge an Glasperlen (*Glassbeads*) in einem gekühlten Mörser zerrieben wurde bis sich eine pastenartige Masse ergab. Aus dieser wurde dann mit Extraktions-/Waschpuffer (50 mM Natriumphosphat, 300 mM Natriumchlorid, pH 7,0) das lösliche Enzym extrahiert. Die ertragreichere Variante war der Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall. Hierfür wurde eine Ultraschallsonde (Bandelin Sonorex TK 52, Schalltec, Mörfelden, Deutschland) in die bereits mit Extraktions-/Waschpuffer verdünnte Bakterienlösung eingebracht und die Zellen mittels Ultraschall schonend aufgebrochen (5 x 30 Sekunden, 10 % Power).

Bei beiden Methoden erfolgte anschließend ein Zentrifugationsschritt um die unlöslichen Zellrückstände abzutrennen. Der Überstand wurde anschließend auf nach Herstelleranweisungen vorbereitetes Talon™ Harz aufgegeben und 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. In diesem Schritt adsorbiert der His-Tag am Enzym an die Bindungsstellen des Harzes. Der folgende Zentrifugationsschritt sowie die anschließenden Waschschrte mit Extraktions-/Waschpuffer dienten dazu die nicht gebundenen Störproteine im Überstand zu entfernen. Zur Elution wurde das Harz in eine vom Hersteller mitgelieferten *gravity flow column* gefüllt, noch einmal mit Extraktions-/Waschpuffer gewaschen und schließlich wurde das Zielprotein mit Elutionspuffer (50 mM Natriumphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 150 mM Imidazol; 1,5 ml pro 400 ml Kultur) vom Harz gelöst. Die so erhaltene Fraktion wurde mittels Bradford-Assay und SDS-Gelelektrophorese charakterisiert.

3.1.15.2 Ultrafiltration

Wegen Verunreinigungen in der aus Kap. D.3.15.1 erhaltenen Enzymlösung musste ein weiterer Reinigungsschritt durchgeführt werden. Deshalb wurden Ultrafiltrationseinheiten der Marke Amicon® Ultra 4 (Millipore, Molsheim, Deutschland) verwendet um durch Größenausschluss unerwünschte Proteine abzutrennen. Zunächst wurde die verdünnte (max. 4 mg/ml) Proteinlösung auf einen Filter mit der definierten Porengröße von 50 kDa gegeben und zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt nun alle Proteine kleiner als 50 kDa. Dieser wiederum wurde über eine Membran der Größe 30 kDa filtriert, so dass sich im Überstand nun alle Proteine zwischen 30 und 50 kDa, also auch die Zielproteine mit 34,7 kDa (FaEO) bzw. 41,7 kDa (LeEO) befanden. Die Konzentration des Proteins in der so

erhaltenen Lösung wurde mittels Bradford-Assay bestimmt und die Lösung zur weiteren Charakterisierung auf 0,3 mg/ml mit Phosphatpuffer verdünnt.

Das Problem hierbei waren die Spezifikationen der angebotenen Ultrafiltrationsmembranen. Die eigentliche Anwendung liegt in der Proteinkonzentration. Aus diesem Grund werden die Poren bei der Produktion in einem gewissen Spezifikationsbereich zweckmäßig bevorzugt zu klein als zu groß gewählt. Das hat in diesem Fall zur Folge dass manche Chargen an der 50 kDa-Membran auch das Zielprotein mit einer Größe von ca. 35 kDa retentierten. Dies konnte aber mittels Bradford-Assay und SDS-PAGE überprüft werden.

3.1.16 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinlösung (1-10 μ l) wurde mit Puffer auf 100 μ l aufgefüllt, mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und gut vermischt. Nach 2 Minuten wurde die Extinktion bei 595 nm gegen einen Blindwert (100 μ l Puffer + 1 ml Bradford-Reagenz) gemessen (Bradford, 1976).

Eichgeraden wurden mit variierenden Mengen Rinderserumalbumin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland, 1 mg/ml) erstellt.

Eichgerade: $y = 0,0364 x + 0,009$

y = Absorption

x = Proteinkonzentration [mg/ml]

Bestimmtheitsmaß

$R = 0,9821$

3.2 BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNGEN

Wenn nicht anders angegeben wurden für photometrische Studien Assays in *96-well-plates* durchgeführt und nach einmaligem Schütteln, bei 340 nm und 30 °C einer kontinuierlichen Messung (ein Messpunkt alle 15 – 20 Sekunden) am Photometer (Tecan) unterzogen. Für die Auswertung der Extinktionsabnahme und somit der Umsetzung von NADH, wurde ausschließlich die Steigung im linearen Bereich zu Beginn der Messung verwendet. Diese wurde über den Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{(\text{NADH})} = 6,3 \times 10^3$ (Lasch, 1987) in die verbrauchte Menge an NADH pro Zeit umgerechnet.

Ein Standardansatz entsprach folgender Zusammensetzung:

360 μ M NADH, 6 μ g FaEO bzw. LeEO, 0,1 M Phosphatpuffer, variable Mengen PQ in 250 μ l.

3.2.1 Inhibitorenstudien

Als Inhibitoren wurden folgende Substanzen getestet: Cibacron Blue, Nitrofurantoin und Dicumarol.

3.2.1.1 *LeEO*

Als Kontrolle ohne hemmende Substanz wurde zu einem Standardansatz mit 0,48 µg LeEO PQ bis zu Endkonzentrationen von 8 µM, 24 µM, 40 µM und 96 µM pipettiert und die NADH-Abnahme beobachtet. Das Ganze wurde unter Zugabe von Inhibitorlösung (Endkonzentration 0,03 mM) wiederholt.

Die erhaltenen Daten wurden als Michaelis Menten Kinetiken betrachtet und die K_m - und v_{max} -Werte über das Hanes-Verfahren berechnet.

3.2.1.2 *FaEO*

Für FaEO wurde die Studie wie für LeEO durchgeführt, nur dass zusätzlich Inhibitorkonzentrationen von 0,06 mM im Ansatz eingesetzt wurden.

3.2.2 Substratscreening

Als Substrate wurden die in Abb. C-1-2 aufgelisteten Substanzen und die synthetisierten Verbindungen HMMF, EDHMF, HMPDF, HMMEDF und BDHMF verwendet.

Um die bakterielle Enzymaktivität von der von FaEO abzugrenzen bzw. um den Reinheitsstatus von FaEO zu kontrollieren, wurde für jede enzymatische Umsetzung ein Kontrollansatz mit Proteinextrakt aus Zellen mit leerem Vektor durchgeführt.

Zeigte dieser keine Aktivität, war abgesichert, dass jegliche enzymatische Aktivität mit FaEO tatsächlich vom Zielprotein stammt und keine bakteriellen Verunreinigungen mehr vorhanden waren.

3.2.2.1 *Photometrisches Substratscreening*

Für jede Verbindung wurde der gleiche Standardassay mit 1,5 µg Enzym durchgeführt. Alle Substrate wurden zur besseren Vergleichbarkeit in 96 %igem Ethanol gelöst und in einer Endkonzentration im Ansatz von 40 µM bzw. 120 µM verwendet. Als Maximalkonzentration an Ethanol im Ansatz bei der noch keine Hemmung auftrat wurden 15% ermittelt. Deshalb wurden in Standardassays nie mehr als 8 % Ethanol eingesetzt. Am Photometer wurde eine eventuelle Umsetzung über die NADH-Abnahme bei 340 nm beobachtet und die Reaktionsgeschwindigkeit unter Abzug der Kontrolle als „umgesetzte Menge NADH pro Sekunde und mol Enzym“ berechnet. Zur Auswertung wurde nur die lineare Extinktionsabnahme im Anfangsbereich der Umsetzung verwendet.

3.2.2.2 *Substratscreening mittels HPLC-MS/MS*

Die oben bereits beschriebenen Assays wurden entweder nach der photometrischen Messung für HPLC-MS/MS-Experimente herangezogen oder extra angesetzt und in diesem Fall 30 Minuten bei 30 °C und 400 rpm inkubiert. Die synthetisierten Verbindungen wurden grob aufgereinigt, mit NaOH neutralisiert und in unbekanntem Konzentrationen zum Ansatz

gegeben. Eine eventuelle Produktbildung wurde durch die Analyse der erwarteten Ionenchromatogramme bzw. durch Untersuchung der Chromatogramme auf gegenüber den entsprechenden Blindwerten neu vorhandene Verbindungen hin kontrolliert (Kap. D-4.3.3.2).

3.2.2.3 *Substratscreening mittels GC-MS*

Bei sehr leichtflüchtigen oder unpolaren Verbindungen, wie z. B. Hexenal und Heptenal, aber auch bei den ungesättigten Hydroxyfuranonen wurden zusätzlich GCMS-Untersuchungen angeschlossen. Hierfür wurde ein 1 ml Standardassay für 30 Minuten bei 30°C und 400 rpm inkubiert, anschließend zweimal mit 1 ml Diethylether extrahiert, die Extrakte vereinigt und nach dem Trocknen über Na₂SO₄ auf 100 µl im Stickstoffstrom eingeeengt. Diese Lösung wurde anschließend für GCMS-Experimente verwendet und auf neu entstandene Verbindungen bzw. die erwarteten Massenspuren hin untersucht.

3.2.3 pH-Studien

Für eine Messung des pH-Optimums wurden, um einen möglichst breiten pH-Bereich abdecken zu können, verschiedene Puffersysteme verwendet. Für den Bereich pH 3,0 bis 8,0 wurde McIlvaine-Puffer, ein Citronensäure-Phosphat-Puffer, eingesetzt. Von pH 5,8 bis 8,0 kam Phosphatpuffer zum Einsatz, von pH 7,1 bis 8,9 ein Tris/HCl-Puffer und den Bereich von pH 10,2 bis 11,1 deckte ein CAPS-Puffer ab. Ein Problem war, dass die Menge von 215 µl Puffer in einem 250 µl Ansatz nicht immer ausreichte um diesen zu puffern. Deshalb wurde vor der Zugabe des Substrat, also vor Start der enzymatischen Reaktion sowie nach der Messung, der pH-Wert noch einmal gemessen und diese Messwerte als tatsächliche pH-Werte in die Studie einbezogen, wobei sich die Werte während der Messung nicht veränderten. Das zweite Problem war die pH-abhängige Stabilität von NADH. Dieses zersetzt sich in sauren Lösungen, so dass eine enzymatische Reaktion am Photometer durch die NADH-Abnahme bei 340 nm vorgespielt wird. Deshalb wurden zu jedem Ansatz Blindwerte ohne Substrat durchgeführt, die den rein chemischen Abbau von NADH erfassen sollten. Die Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeiten erfolgte dann über die blindwertkorrigierte Extinktionsabnahme bei 340 nm.

Der Assay setzte sich wie folgt zusammen: 240 µM NADH, 3 µg FaEO bzw. LeEO gelöst in dem entsprechenden Puffer. Zum Starten der Reaktion wurden 120 µM PQ dazu pipettiert und die Extinktion sofort gemessen.

3.2.4 Michaelis-Menten-Kinetik

Die Daten der „steady state“ Kinetiken wurden über das Hanes-Linearisierungsverfahren ausgewertet und die Standardabweichungen aus drei Versuchen berechnet.

K_m- und v_{max}-Werte wurden für alle Substrate, für die die Oxidoreduktasen Aktivität zeigten bestimmt, also für PQ, NADH, NADPH, EDHMF, HMPDF und BDHMF.

Zunächst wurde in Vorversuchen der grobe Bereich des K_m -Wertes bestimmt damit anschließend für die eigentliche Messung ein Substratkonzentrationsbereich passend zum K_m -Wert gewählt werden konnte. Die Assays wurden in 250 μ l 0,1 M Phosphatpuffer durchgeführt und die Reaktion durch Zugabe des Cosubstrates NADH bei photometrischen Messungen, und durch Zugabe des Substrates bei Messungen mittels HPLC-MS/MS gestartet.

Die Enzymmengen variierten von 0,9 mg bis 1,5 mg, wurden aber bei der Berechnung von k_{cat} normalisiert [$\text{nmol Substrat s}^{-1} \text{ nmol}^{-1} \text{ Enzym}$] und beeinflussen den K_m -Wert per Definition nicht.

3.2.4.1 Photometrische Bestimmung

Die Substratkonzentration von PQ wurde im Bereich von 1,6 μ M bis 112,0 μ M variiert während 360 μ M Kosubstrat (NADH) verwendet wurde. Für NADH und NADPH wurden Konzentrationen von 40 μ M bis 1200 μ M bei einer Cosubstratkonzentration (PQ) von 120 μ M eingesetzt. Das Kosubstrat wurde im Fall von PQ nicht im Überschuss zugegeben, da angesichts des Reaktionsmechanismus immer ausreichend PQ zur Verfügung stand und so denkbare Hemmeffekte durch den eingesetzten Ethanol oder das Chinon selbst minimal gehalten werden konnten.

3.2.4.2 Bestimmung mittels HPLC-MS

Die Cosubstratkonzentration (NADH) für kinetische Messungen der ungesättigten Hydroxyfuranone EDHMF, HMPDF und BDHMF, die in Konzentrationen von 140 μ M bis 2,85 mM eingesetzt wurden, betrug 12 mM.

Für HPLC-MS-Messungen wurde jeder Assay einzeln angesetzt und für exakt 35 Minuten bei 30 °C und 400 rpm inkubiert, da die zeitlich direkt angeschlossene HPLC-MS-Analyse der Probe 40 Minuten dauerte und so parallel der nächste Assay inkubiert werden konnte.

Zur HPLC-MS-Messung wurde eine Methode die auf EHMf, BHMF bzw. HPMDf optimiert war verwendet (Kap. D-4.3.3.1). Da in Ermangelung von Referenzsubstanzen keine Eichgeraden für BHMF und HMPf erstellt werden konnten, wurde aufgrund der sehr ähnlichen Ionisation die EMHF-Eichgerade für die Berechnung aller Kinetiken verwendet. Die berechneten erhaltenen Mengen an BHMF und HMPf sind somit „EHMF-Äquivalente“.

$$\text{EMHF-Eichgerade: } y = 1480414225 x \\ R^2 = 0,99672$$

$$x_{\text{EHMF}} = c(\text{EHMF}) \text{ in der Lösung}$$

$$x_{\text{HMPF}} = c(\text{HMPF}) \text{ in der Lösung}$$

$$x_{\text{BHMF}} = c(\text{BHMF}) \text{ in der Lösung}$$

$$y_{\text{EHMF}} = \text{Area } m/z (+) \ 143$$

$$y_{\text{HMPF}} = \text{Area } m/z (+) \ 157$$

$$y_{\text{BHMF}} = \text{Area } m/z (+) \ 171$$

3.2.5 Untersuchung auf Cofaktoren

Um zu sehen ob es sich bei FaEO um ein Flavoenzym handelt, bzw. ob die Zugabe der Cofaktoren Flavin-Mononucleotid (FMN) oder Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) die Aktivität steigert, wurde das Enzym in einer 200 μM FAD- oder FMN-Lösung für eine Stunde auf Eis inkubiert (Luster und Buckhout, 1989; Maryuama und Mitarbeiter, 2003). Anschließend wurde in Standardassays das so behandelte Enzym eingesetzt und die Aktivität mit unbehandeltem Enzym verglichen. Das unbehandelte Enzym wurde in der gleichen Verdünnung verwendet und auch auf Eis inkubiert, jedoch ohne jegliche Zusätze.

3.2.6 Temperaturoptimum

Um das Temperaturoptimum der enzymatischen Reaktion zu bestimmen, wurden Standardassays bei verschiedenen Temperaturen (20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C) angesetzt und die Umsetzungsgeschwindigkeiten miteinander verglichen. Höhere und niedrigere Temperaturen waren aufgrund der Beschaffenheit des Messgerätes (Tecan Safire, TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) nicht möglich.

Pro Temperatur wurden zwei Konzentrationen an PQ (24 μM , 48 μM) umgesetzt.

3.2.7 Test auf Metallionen

Um zu testen, ob Metallionen an der Katalyse von FaEO oder LeEO beteiligt sind, wurde EDTA zu Standardansätzen mit 80 μM PQ und 0,5 μg FaEO oder 1,85 μg LeEO in verschiedenen Konzentrationen (0 mM, 4 mM, 8 mM) zugesetzt. Es folgte eine photometrische Messung der Umsetzung und eine Auswertung über die Abnahme an NADH.

3.2.8 Versuche zur Charakterisierung der HDMF-bildenden Eigenschaft

3.2.8.1 Nachweis einer Sättigungskinetik

Um zu zeigen, dass die Umsetzung von D-Fructose-1,6-diphosphat durch FaEO und NADH zu HDMF gesättigt werden kann, wurden Assays mit verschiedenen Konzentrationen an D-Fructose-1,6-diphosphat (14 - 147 mM) durchgeführt. Die Konzentration an NADH im 2 ml Ansatz betrug 1,41 mM und es wurden nur über Talonharz gereinigte FaEO (60 μg)- bzw. pET (3 μg)-Fraktionen eingesetzt. Das Ganze wurde bei 30 °C und 400 rpm für 24 h inkubiert und anschließend HPLC-MS-Messungen (Kap. D-4.3.3.2) unterzogen. Die Quantifizierung des gebildeten HDMF erfolgte durch Integration der Peakfläche der

Ionenchromatogramm m/z (+) 129 bei 11,5 Minuten über eine Eichgerade der Referenzsubstanz.

Eichgerade HDMF: $y = (23529766x+155703)$

$y = \text{Area [EIC m/z (+) 129, RT: 11,5 Minuten]}$

$x = \mu\text{g HDMF im zur Messung eingesetzten Volumen}$

3.2.8.2 pH-Studie

Die pH-Studie wurde in McIlvaine-, Phosphat- und Trispuffer durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 58 mM D-Fructose-1,6-diphosphat, 1,41 mM NADH und eine nur über Talonharz gereinigten FaEO (30 μg)- bzw. pET (1,5 μg)-Fraktion in 1 ml Puffer verwendet. Der gewünschte pH-Wert wurde nach dem Lösen des Substrates, welches leicht sauer reagiert, mit NaOH korrigiert. Die Assays wurden für 24 h bei 30 °C und 400 rpm inkubiert und anschließend der HPLC-MS-Analytik (Kap. D-4.3.3.2) unterzogen. Die Auswertung erfolgte wie in Kap. D-3.2.8.1.

3.2.8.3 Cosubstrate

Um zu sehen welches das beste Reduktionsäquivalent für FaEO darstellt, wurden die gleichen Reaktionsansätze (58 mM D-Fructose-1,6-diphosphat, 100 μl FaEO bzw. pET in 1 ml) unter Zugabe von 6,7 mM Ascorbinsäure, 1,4 mM NADH oder 1,6 mM NADPH durchgeführt und anschließend auf die gebildete Menge an HDMF mittels HPLC-MS (Kap. D-4.3.3.2) untersucht. Hierbei musste für den Ansatz mit Ascorbinsäure der pH-Wert mit NaOH eingestellt werden. Die Auswertung erfolgte wie in Kap. D-3.2.8.1.

3.2.9 Hitze-Kälteinaktivierung

Für diesen Versuch wurde die Enzymlösung (FaEO oder pET) unbehandelt für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt oder für 24 h bei -20 °C gelagert und anschließend für die Assays verwendet. In jedem 1 ml Ansatz befanden sich 58 mM D-Fructose-1,6-diphosphat und 1,41 mM NADH mit 30 μg Protein welches nur über Talonharz gereinigt war. Nach 24 h wurden die Ansätze per HPLC-MS analysiert (Kap. D-4.3.3.2). Die Auswertung erfolgte wie in Kap. D-3.2.8.1.

3.2.10 Festphasenextraktion

RP-18-Festphasenkartuschen (Hydrabond, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurden mit zweimal 2 ml Methanol und dreimal mit 2 ml Wasser vorkonditioniert. Nach der Probenaufgabe wurde mit 2 ml Wasser gewaschen und anschließend mit 2 ml Diethylether eluiert. Das im Ether vorhandene Restwasser wurde bei -20 °C ausgefroren, die Etherphase

anschließend im Stickstoffstrom vorsichtig zur Trockne eingengt und der Rückstand in 100 µl Wasser aufgenommen.

3.2.11 Enzymatische Assays zur Charakterisierung des gebildeten HDMF mittels chiraler Kapillaronenelektrophorese

Um zu zeigen, dass das im Assay gebildete HDMF enzymatisch entstand, wurde es mittels chiraler Kapillaronenelektrophorese (cKZE) untersucht.

HDMF zeigt die geringste Racemisierungsgeschwindigkeit bei schwach sauren pH-Werten, deshalb wurde der Assay bei pH 5 durchgeführt. Es wurden 1,98 g D-Fructose-1,6-diphosphat in 8 ml Phosphatpuffer (0,1 M, pH 5,0) gelöst, der pH-Wert mit 0,1 M NaOH korrigiert, mit 100 mg NADH versetzt und mit 1 g FaEO in 24 h bei 30 °C umgesetzt. Anschließend wurde mittels mehrerer Festphasenextraktionen (Kap. D-3.2.10) aufgereinigt, der Rückstand in 500 µl Ammoniumacetatpuffer (0,1 M, pH 4) aufgenommen und mittels cKZE vermessen.

3.3 VERSUCHE ZUR IDENTIFIZIERUNG DES VORLÄUFERS VON HDMF

3.3.1 Synthese, Stabilisierung und Reinigung von 4-Hydroxy-5-methyl-2-methylen-3(2H)-furanon

Das Syntheseprotokoll beruht auf denen von Ledl und Mitarbeitern (1978) und Ballesteros und Mitarbeitern (1983) verwendeten Vorschriften zur Durchführung einer Knoevenagel-Reaktion. HMF (Norfuraneol, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) (43,8 mmol) wurde zu einer Mischung aus 20 mmol Kupferacetat und 25 mmol Natriumacetat gegeben. Diese Mischung wurde in 75 ml konzentrierter Essigsäure gelöst, mit 50 mmol Formaldehyd versetzt und unter Rückfluss und Rühren für eine Stunde auf 50 °C erhitzt und nach dem Abkühlen mit 150 ml Wasser verdünnt. Nach mehrmaliger Flüssig-flüssig-Extraktion mit Diethylether und einengen der organischen Phase mittels Vigreuxkolonne blieben am Schluss ca. 5 ml Lösung übrig. Zu dieser Lösung wurde MBS (0,39 mmol) gegeben und das Ganze wurde über Nacht und im Dunkeln einer konjugierten Additionsreaktion unterzogen. Hierbei bildete sich der stabilere Thioether. Um die Synthese und die Abfangreaktion zu kontrollieren wurde an dieser Stelle eine erste HPLC-MS/MS-Messung durchgeführt. Untersuchungen zum Thioether mittels HPLC-MS/MS wurden mit der in Kap. D-4.3.3.4 beschriebenen Methode 4 durchgeführt. Der erste Schritt der Aufreinigung des gebildeten Thioethers war eine präparative Umkehrphasen-Säulenchromatographie (16 x 4 cm, Lichroprep® RP 18, Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Probe wurde vorsichtig auf die mit 20 % Acetonitril äquilibrierte Säule gegeben und in folgenden Schritten eluiert: 100 ml 20 % Acetonitril, 50 ml 30 % Acetonitril, 50 ml 40 % Acetonitril und 200 ml 50 % Acetonitril. Es wurden 5 ml Fraktionen gesammelt, welche sogleich einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether unterzogen wurden, um die Zeit in polarem Lösungsmittel so kurz wie möglich

zu halten. Die Zielverbindung eluierte während der ersten 50 ml 50 % Acetonitril. Fraktionen in denen die Zielverbindung vermutet wurde (Gelbfärbung), wurden mittels HPLC-MS/MS (Kap. D-4.3.3.4) untersucht. Thioether-haltige Lösungen wurden vereinigt und über Na_2SO_4 getrocknet. Nachdem die Lösung im Stickstoffstrom auf wenige Milliliter reduziert wurde, wurde als zweiter Schritt eine Kieselgel-Säulenchromatographie (25 x 2,5 cm, Kieselgel 60, 0,04-0,063 mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Das Säulenmaterial wurde in einer 1:1 Mischung aus Pentan und Diethylether aufgeschlämmt und die Säule damit gefüllt. Nach der Probenaufgabe wurde mit folgendem Gradient eluiert: 100 ml Pentan/Ether 1:1, 100 ml Pentan/Ether 3:7, 200 ml reiner Diethylether. Die Adduktverbindung eluierte mit 100 ml reinem Ether. Wiederum wurden die gelb gefärbten Fraktionen durch eine HPLC-MS/MS-Analyse (Kap. D-4.3.3.4 Methode 4) kontrolliert und, wenn sie die Zielverbindung enthielten, vereinigt. Für NMR-Messungen wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in NMR-Lösungsmittel (deuteriertes Chloroform) aufgenommen.

3.3.2 Lagerungsversuche von HMMF

Frisch synthetisiertes und über eine präparative HPLC gereinigtes HMMF wurde in gleichen Mengen in verschiedene Lösungsmittel, Diethylether (Et_2O), Chloroform (CHCl_3), Tetrahydrofuran (THF), Acetonitril (CH_3CN) oder Propanol, überführt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden die Lösungen mittels HPLC-MS/MS analysiert (Kap. D-4.3.3.4).

3.3.3 Weitere Stabilisierungsansätze

Um zu testen, welche Thiolverbindung für eine Umsetzung mit HMMF am Besten geeignet ist, wurden Thiophenol, Thiobenzoessäure, Furfurylmercaptan und MBS (je ca. 1 mmol) zu dem frisch synthetisierten HMMF (aus einem Ansatz mit 0,5 mmol Norfuraneol und 0,5 mmol Formaldehyd) gegeben. Die Reaktion lief über Nacht bei Raumtemperatur. Die Produktbildung wurde am nächsten Tag mittels HPLC-MS/MS untersucht (Kap. D-4.3.3.3).

3.3.4 Einfluss von MBS auf die Aktivität von FaEO

Der Einfluss von MBS auf FaEO wurde in 250 μl Reaktionsansätzen mit PQ und NADH photometrisch überprüft. MBS wurde in Konzentrationen von 0,008 bis 0,2 mg/ml im Ansatz verwendet. Die Reaktionsansätze setzten sich aus 3 μg FaEO, 360 μM NADH und 120 μM PQ zusammen. Anschließend wurden die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten miteinander verglichen.

3.3.5 Konkurrenzreaktion von MBS und FaEO um HMMF

Es wurden vier verschiedene 1 ml-Reaktionen durchgeführt. Alle wurden in 0,1 M Phosphatpuffer angesetzt und bei 30 °C inkubiert, wobei wenn verwendet MBS nach 10 minütiger Inkubation zugegeben wurde und alle 60 Minuten ein Aliquot zur direkten HPLC-MS/MS-Messung entzogen wurde. Der erste Ansatz bestand aus 40 mg D-Fructose-1,6-diphosphat und 0,04 mg MBS und sollte die Bildung des Thioethers aus HMMF zeigen. Der zweite Ansatz setzte sich aus 40 mg D-Fructose-1,6-diphosphat, 4 mg NADH und 1,5 µg FaEO zusammen und stellte die enzymatische Umsetzung des chemisch entstandenen HMMFs durch FaEO dar. Der Ansatz mit 40 mg D-Fructose-1,6-diphosphat und 4 mg NADH wurde als Kontrollreaktion der enzymatischen Umsetzung eingesetzt. Die eigentliche Kontrollreaktion fand im Ansatz mit 40 mg D-Fructose-1,6-diphosphat, 4 mg NADH, 0,04 mg MBS und 1,5 µg FaEO statt. Die Quantifizierung der entstandenen Mengen HDMF und Thioether erfolgte über Kalibriergeraden, die zuvor über die Summe der selektiven Bruchstücke der Zielverbindungen aus HPLC-MS/MS-Experimenten (Kap. D-4.3.3.5) aufgenommen wurden.

Kalibriergeraden:

Thioether: $x = [(y \cdot 0,3744) / (546956683,35 - y)]$

$x = \mu\text{g Thioether}$

$y = \text{Fläche des Signals bei der Retentionszeit 19,2-19,2 Minuten}$

HDMF: $x = [(y \cdot 0,675) / (6167611,1449 - y)]$

$x = \mu\text{g HDMF}$

$y = \text{Fläche des Signals bei der Retentionszeit 11,3-11,7 Minuten}$

Bruchstücke, die durch selektive Fragmentierung der Verbindungen entstanden und in die Quantifizierung mit eingeflossen sind:

HDMF $[M+H]^+$ 129: $m/z (+) 43,6 / 57,4 / 83,1 / 87 / 101 / 109,9 / 127,9 / 147,8$

Thioether $[M+H]^+$ 281: $m/z (+) 99 / 111 / 126,9 / 154,9 / 176,9 / 202,9 / 218,9 / 244,9 / 263,0$

3.3.6 *In vivo* Studien

3.3.6.1 Applikationslösungen

- stabil markierte 6-¹³C-D-Glucose in H₂O (1 M)
- 3-Mercaptobenzoessäure (MBS) in Ethanol (0,3 M)
- Reines H₂O
- Reines Ethanol
- o-Phenylendiamin (PD) in H₂O (0,3 M)

3.3.6.2 Erdbeeren

In das Innere der frisch gepflückten Erdbeeren, die noch Kelchblätter und Teile des Stängels enthielten, wurden 100 µl der 6-¹³C-D-Glucoselösung, 50 µl MBS-Lösung oder 50-150 µl PD mit einer GC-Spritze injiziert. Jede Frucht wurde einzeln in einer Glasschale im Sonnenlicht gelagert. Für die Markierungsversuche wurde zunächst 6-¹³C-D-Glucoselösung und anschließend MBS-Lösung über je zwei, insgesamt also vier, aufeinander folgende Tage injiziert. Beim Nachweis von nicht markiertem HMMF wurde MBS über drei aufeinander folgende Tage an die Erdbeere appliziert. Die Früchte mit PD wurden zwei Tage gelagert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Erdbeeren eingefroren. Zu jedem Versuch wurde je ein Blindansatz mit dem entsprechenden Lösungsmittel durchgeführt und im Verlauf genauso behandelt.

3.3.6.3 Andere Früchte

Bei Tomaten wurden die Früchte mit Stängel verwendet und die Applikationslösungen (MBS oder PD) in das Innere der Frucht injiziert. Hier galt besondere Vorsicht, da durch den hohen Innendruck der Frucht die Lösung wieder herausgedrückt werden kann. Auch Kiwis wurden im Ganzen verwendet. Die Ananas- und Mangofrüchte wurden in acht Teile, einmal quer und zweimal kreuzförmig längs, zerschnitten. Nach der Applikation wurden die Oberflächen mit Ethanol (70 %ig) besprüht und die Fruchtstücke in Alufolie eingepackt um einen Befall mit Mikroorganismen möglichst gering zu halten. In die einzelnen Früchte der Himbeere wurden sehr kleine Volumina der Lösungen appliziert. Äpfel wurden als ganze Früchte verwendet.

Die Volumina an Applikations-Lösung wurden auf die Masse der verwendeten Früchte hochgerechnet, es galt: 1 ml Lösung pro 100 g Frucht. Von allen Früchten, Tomate, Kiwi, Ananas, Mango, Himbeere und Apfel, wurden ca. 15 – 20 g pro Aufarbeitung verwendet.

3.3.6.4 Aufarbeitung der Früchte

Die gefrorenen Früchte wurden mit einem Ultra-Turrax und 15 – 20 ml Wasser zerkleinert und gut homogenisiert. Das Homogenat wurde 15 Minuten bei 5000 x g und 4 °C zentrifugiert und der klare Überstand nach Filtration durch Glaswolle auf eine mit Methanol gereinigte und mit Wasser vorkonditionierte XAD-Festphasensäule gegeben. Der Rückstand wurde erneut mit 15 – 20 ml Wasser aufgeschlämmt, zentrifugiert, filtriert und auf die Festphase gegeben. Als erstes wurde die Säule mit 100 ml Wasser gespült, um alle Salze und sonstige wasserlösliche Substanzen zu entfernen. Nach dem Trocknen der Säule im Luftstrom wurde zunächst mit 100 ml Diethylether und anschließend mit 100 ml Methanol eluiert. Der Methanol-Extrakt wurde am Rotationsverdampfer bei 40 °C eingengt. Mittels einer Vigreuxkolonne wurde der Diethylether-Extrakt vorsichtig ankonzentriert und der Rückstand in Acetonitril aufgenommen. Erfolgt keine direkte Messung der Proben mittels

HPLC-MS/MS (Kap. D-4.3.3.4 bzw. Kap. D-4.3.3.6 bei Verwendung von stabil markierter D-Glucose) wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

3.3.6.5 Umsetzung von Q1 mit alkalischer Phosphatase

Zur Dephosphorylierung von Phosphorsäure-mono-[2,3-dihydroxy-3-(3-methyl-chinoxalin-2-yl)-propyl]-ester (Q1) wurde dieses zunächst durch die Umsetzung von 50 mg D-Fructose-1,6-diphosphat mit 2 mg NADH und 1,1 mg PD in 0,1 M Phosphatpuffer dargestellt. Anschließend wurde das mit NaOH alkalisierte Produkt mit 5 µl alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und mittels HPLC-MS/MS (Kap. D-4.3.3.2) analysiert.

3.4 VERSUCHE ZUR IDENTIFIZIERUNG WEITERER SUBSTRATE

3.4.1 Synthese und Reinigung von HMMF-Derivaten

Für die Synthese von weiteren ungesättigten Hydroxyfuranonen mit unterschiedlich langen Seitenketten wurde die gleiche Vorschrift, wie in Kap. D-3.3.1 bereits beschrieben, verwendet. Allerdings wurden statt der C₁-Verbindung Formaldehyd C₂-, C₃- und länger-kettige Verbindungen, nämlich Acetaldehyd, Propionaldehyd, Aceton, Butyraldehyd, (*E2*)-Hexenal und Zimtaldehyd verwendet. Daraus ergaben sich die analogen 4-Hydroxy-3(*2H*)-furanon

-Verbindungen EDHMF, HMPDF, HMMEDF, BDHMF, HDHMF und HMPPF. Diese Verbindungen zeigten weitaus höhere Stabilität als HMMF weshalb keine Stabilisierung mit MBS nötig war. Auch die Aufreinigung erforderte weniger Aufwand und eine präparative Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60 F 254, 5 x 20 cm, 0,25 mm, Merck, Darmstadt, Deutschland) in Pentan/Ether 1:1 des Etherextraktes gefolgt von einer präparativen HPLC erbrachte ausreichende und reine Mengen der gewünschten Substanz. Die mit Diethylether extrahierten Fraktionen wurden mittels HPLC-MS/MS (Kap. D-4.3.3.1) auf die Zielverbindung getestet, vereinigt und für NMR-Messungen in deuteriertes Chloroform überführt.

3.5 VERSUCHE ZUR AUFLÄRUNG DES REAKTIONSMEECHANISMUS

3.5.1 Synthese von 9,10-Diacetoxyphenanthren

Die Synthese erfolgte wie von Maruyama und Mitarbeitern (2003) beschrieben. PQ (0,1 g) wurde in 19 ml Tetrahydrofuran gelöst und mit 50 mg Zinkstaub, 0,5 ml Essigsäureanhydrid, 1 Tropfen H₂O und 3 Tropfen Triethylamin versetzt. Diese Mischung wurde bei Raumtemperatur für 20 Minuten gerührt bevor erneut 50 mg Zinkstaub, 1 Tropfen H₂O und 3 Tropfen Triethylamin zugegeben wurden. Nun wurde auf 55 °C für eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 40 ml Chloroform zugegeben und die organische Phase mehrere Male mit NaHCO₃-Lösung im Scheidetrichter gewaschen. Nach

dem Trocknen der Chloroform-Lösung mit Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel abgezogen und der vorher gelbe Feststoff durch Umkristallisation in 40 °C warmen Toluol gereinigt bis keine Färbung mehr vorhanden war. Zur NMR-Analytik wurde der Feststoff in deuteriertem Chloroform, zur Analytik mittels HPLC-MS/MS (Kap. D-4.3.3.7 Methode Infusion) in 50 %igem Acetonitril aufgenommen.

3.5.2 Nachweis von Diacetoxyphenanthren in enzymatischen Umsetzungen

Um eventuell während der enzymatischen Umsetzung von PQ entstandenes Dihydroxyphenanthren nachzuweisen, wurde dieses in das stabilere Diacetoxyderivat (Diacetoxyphenanthren, DAP) überführt. Dafür wurden zu einem Reaktionsansatz aus 0,1 mM NADH, 20 μl FaEO in 1,5 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer und PQ in einer Endkonzentration von 20 μM gegeben. Anschließend wurde bei 30 °C für 5 bzw. 10 Minuten inkubiert. Ein 500 μl Aliquot dieser Lösung wurde mit 20 μl Essigsäureanhydrid bei 80 °C für 5 Minuten erhitzt und mit 170 μl Trichloracetat (10 %) intensiv vermischt bevor bei 14000 x g für 5 Minuten zentrifugiert wurde. Ca. 40 μl der oberen Phase wurden für HPLC-UV-MS/MS-Messungen verwendet (Kap. D-4.3.3.2 Methode 2 ohne Manuelles MS₂). Zur Kontrolle wurden die gleichen Proben durch Inkubation mit einer Proteinfraction aus Zellen mit dem leeren Vektor hergestellt. Zur quantitativen Analytik wurden HPLC-UV- den HPLC-MS/MS-Messungen vorgezogen, da aufgrund der schlechten Ionisierbarkeit keine für die Quantifizierung zufrieden stellenden MS- bzw. MS/MS-Daten generiert werden konnten. Eine Eichgerade wurde mittels synthetisierter Referenz über UV-Detektion (255 nm) aufgenommenen.

Eichgerade DAP: $y = 36923x + 113,08$

$$R^2 = 0,9994$$

$y = \text{Area [UV 255 nm , Retentionszeit 22,5 Minuten)}$

$x = \text{mg/ml DAP}$

3.5.3 Reduktion von Cytochrom c

Die Reduktion von Ferricytochrom (Cytochrom c) zu Ferrocycytochrom erfolgte nach der von Maruyama und Mitarbeitern (2003) beschriebenen Methode. Die Absorptionsänderung wurde bei 30 °C und 550 nm an einem Mikrotiterplattenleser Safire von Tecan verfolgt.

Die Reaktionsansätze enthielten je 0,18 bzw. 0,36 mM NADH, je 0,04, 0,08 oder 0,16 mM PQ, je 3 μg FaEO sowie pro Ansatz 12 μM Cytochrom c in 0,1 mM Phosphatpuffer pH 7. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PQ gestartet. Zusätzlich wurden Blindwerte ohne Enzym bzw. und/oder ohne Substrat und Cytochrom c gemessen. Um Aussagen bezüglich der Umsetzung von NADH treffen zu können, wurde nach Beendigung der Reaktionen zusätzlich die Absorption aller Ansätze bei 340 nm gemessen. Um die durch Superoxidradikalanionen verursachte Reduktion des Ferricytochroms zu bestimmen, wurde

den Reaktionsansätzen zusätzlich 200 U Superoxiddismutase zugesetzt und der Verlauf der Absorption bei 550 nm wie oben verfolgt. Der Versuch mit ungesättigten Hydroxyfuranonen als Substrate wurde prinzipiell wie oben durchgeführt jedoch mit folgenden Änderungen. Als Substrat wurde EDHMF in einer Konzentration von 4,3 mM im Ansatz und als Kosubstrat NADH in einer Konzentration von 0,36 mM eingesetzt. Von FaEO wurden 9 µg verwendet. Von allen eingesetzten Lösungen wurden Absorptionsspektren über einen Bereich von 200 bis 650 nm aufgenommen um einen eventuellen Einfluss auf die Messungen bei 340 und 550 nm ausschließen zu können. Lediglich Cytochrom c zeigte eine für NADH-Abnahmen relevante Absorption bei 340 nm, welche aber in den entsprechenden Auswertungen durch Blindwerte herausgerechnet werden konnte (Abb. D-1).

3.5.4 Elektronen-Spin-Resonanz-Messung

Für den Nachweis von eventuell entstehenden Radikalen während der enzymatischen Umsetzung von PQ mit FaEO und NADH wurden verschiedene Reaktionsmischungen (250 µl) hergestellt, welche sofort mittels Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) analysiert wurden.

Ansatz 1 (anaerob):

- 110 µl Puffer
- 40 µl PQ (4mM)
- 20 µl FaEO (0,3 µg/µl)
- 80 µl NADH (2mM)

Ansatz 2 (aerob):

- 220 µl Puffer
- 10 µl PQ (2 mM)
- 10 µl FaEO (0,3 µg/µl)
- 10 µl NADH (2 mM)
- 60 µl Tempol (0,1mM)

Ansatz 3 (aerob):

- 220 µl Puffer
- 10 µl PQ (2 mM)
- 10 µl pET
- 10 µl NADH (2 mM)
- 60 µl Tempol (0,1mM)

Ansatz 4 (anaerob)

- 180 µl POBN (4,38mM in Puffer)
- 20 µl PQ (4 mM)
- 10 µl FaEO (0,3 µg/µl)
- 40 µl NADH (2 mM)

Ansatz 5 (anaerob)

- 180 µl POBN (4,38mM in Puffer)
- 20 µl PQ (4 mM)
- 10 µl pET
- 40 µl NADH (2 mM)

Ansatz 6 (aerob)

180 μ l PBN
(5 mM in Puffer 10 % MeOH)
20 μ l PQ (4 mM)
10 μ l FaEO (0,3 μ g/ μ l)
40 μ l NADH (2 mM)

Ansatz 7 (anaerob)

180 μ l PBN
(5 mM in Puffer 10 % MeOH)
20 μ l PQ (4 mM)
10 μ l FaEO (0,3 μ g/ μ l)
40 μ l NADH (2 mM)

4 GERÄTE

4.1 HOCHAUFLÖSENDE-GASCHROMATOGRAPHIE

GC:	Trace GC 2000 Ultra (Thermo Electron Corporation, Dreieich, Deutschland)
Autosampler:	Autoinjector AI 3000
Injektor:	Split-Splitless-Injektor (1:20), Temperatur : 200°C
Trennsäule:	BPX-5, 0,25 mm x 60 cm
Temperaturprogr.:	40°C (5 min isotherm) - 5°C/min - 200°C (25 min isotherm)
Trärgas:	Helium 200 kPa
MS:	Trace DSQ
Massenbereich:	45 – 350 u
Temperaturen:	Ionenquelle: 220°C, Kopplungsteile: 280°C
Ionisation:	Elektronenstoßionisierung (EI+), 70 eV
Photomultiplier:	1195 V
Datenaufnahme und -auswertung:	Xcalibur für Windows (Home Page Version 1.4, Thermo Electron Corporation 1998-2003)

4.2 HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE MIT DIODENARRAY-DETEKTION

HPLC:	HPLC-DAD-Anlage LaChrom (Merck Hitachi, Darmstadt, Deutschland)
Pumpensystem:	quaternäre Pumpe mit Degasser (L7100)
Probengeber:	Autosampler (L 7200)
Fließmittel :	A: 0,05 % Ameisensäure in Wasser B: 0,05 % Ameisensäure in Acetonitril
Fluss:	1 ml/min
Gradient :	0 - 10 min: 0 - 20 % B; 10 - 20 min: 20 - 100 % B
Detektoren:	Diodenarraydetektor (DAD) (L7455)
Datenaufnahme und -auswertung:	HPLC-System-Manager (HSM), Version 4.0 (Merck Hitachi)

4.3 HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE MIT UV-DETEKTION UND MASSENSPEKTROMETRIE

4.3.1 Hochleistungs-Flüssigchromatographie

Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Deutschland)

Pumpe: Agilent G 1311A Quat Pumpe

Injektor: Agilent Sample Injector Model G 1313A ALS

Trennsäule: (1) Eurospher 100 C18 (100 × 2,0 mm; 5 µm)
(Grom Analytik & HPLC GmbH, Rottenburg, Deutschland)

(2) Luna 5u C18(2) 100 A, 150 x 200 mm, 5 µ Micron
(Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)

Vorsäule: Security Guard Cartridges
(Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)

Fließmittel: A: Wasser + 0,05 % Ameisensäure
B: Acetonitril + 0,05 % Ameisensäure (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

Fluss: 0,2 ml/min

Gradient: 0 min: 100 % A; 10 min: 20 % B ; 20 min: 100 % B;
25 min: 100 % B; 30 min: 100 % A; 40 min: 100 % A

Säulentemperatur:
20 °C

4.3.2 UV-Detektor

Agilent G 1314A VWD UV-Detektor (Agilent Technologies, Deutschland) mit variabler Wellenlänge. Alle Messungen wurden, wenn im Text nicht anders erwähnt, bei 285 nm durchgeführt.

4.3.3 Massenspektrometer

Esquire 3000^{plus} (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland)

Datenaufnahme und –auswertung:

Bruker Daltonics Esquire 5.1 (Build 230), Data Analysis Version 3.1 (Build 76)

Nebulizer: 30,0 psi

Dry Gas: 9,0 l/min

Dry Gas Temperature: 330 °C

4.3.3.1 Methode 1

Scan range:	20-300	<i>m/z</i>		
Polarity:		positive		
Max. Acc. Time:	200	ms		
Target Ions:	30.000			
Capillary:	-4000	V	23	nA
End Plate Offset:	-500	V	1015	nA
Skimmer:	40,0	V		
Cap Exit:	101,7	V		
Oct 1 DC:	12,0	V		
Oct 2 DC:	1,7	V		
Trap Drive:	32,7			
Oct RF:	112,2	V		
Lens 1:	-5,0	V		
Lens 2:	-60,0	V		

4.3.3.2 Methode 2

Scan range:	20-500	<i>m/z</i>		
Polarity:		positive		
Max. Acc. Time:	200	ms		
Auto MS ₂ :	<i>m/z</i> (+) 129			
Target Ions:	40.000			
Capillary:	-4000	V	4	nA
End Plate Offset:	-500	V	28	nA
Skimmer:	40,0	V		
Cap Exit:	100,7	V		
Oct 1 DC:	12,0	V		
Oct 2 DC:	1,7	V		
Trap Drive:	31,8			
Oct RF:	112,2	V		
Lens 1:	-5,0	V		
Lens 2:	-60,0	V		

4.3.3.3 Methode 3

Scan range:	20-500	<i>m/z</i>		
Polarity:		positive/negative		
Max. Acc. Time:	200	ms		
Time Fragment 1:	5-17 Minuten			
Target Ions:	10.000 (-) / 20.000 (+)			
Capillary:	± 3566	V	208	nA
End Plate Offset:	± 500	V	30	nA
Skimmer:	± 40,0	V		
Cap Exit:	±100,7	V		
Oct 1 DC:	-12,0	V		
Oct 2 DC:	± 1,7	V		
Trap Drive:	36,4			
Oct RF:	112,2	V		
Lens 1:	±5,0	V		
Lens 2:	± 60,0	V		

Time Fragment 2: 17-35 Minuten

Target Ions:	10.000 (-) / 20.000 (+)			
Capillary:	± 3566	V	1310	nA
End Plate Offset:	± 500	V	423	nA
Skimmer:	± 40,0	V		
Cap Exit:	± 112,1	V		
Oct 1 DC:	± 12,0	V		
Oct 2 DC:	± 1,7	V		
Trap Drive:	47,2			
Oct RF:	120,0	V		
Lens 1:	± 5,0	V		
Lens 2:	± 60,0	V		

4.3.3.4 Methode 4

Scan range:	20-500	m/z		
Polarity:		positive		
Max. Acc. Time:	200	ms		

Time Fragment 1: 5-17 Minuten

Auto MS ₂ :	m/z (+) 129			
Target Ions:	40.000			
Capillary:	-4000	V	4	nA
End Plate Offset:	-500	V	30	nA
Skimmer:	40,0	V		
Cap Exit:	100,7	V		
Oct 1 DC:	12,0	V		
Oct 2 DC:	1,7	V		
Trap Drive:	31,8			
Oct RF:	112,2	V		
Lens 1:	-5,0	V		
Lens 2:	-60,0	V		

Time Fragment 2: 17-35 Minuten

Auto MS ₂ :	m/z (+) 281			
Target Ions:	40.000			
Capillary:	-4000	V	2	nA
End Plate Offset:	-500	V	25	nA
Skimmer:	40,0	V		
Cap Exit:	112,1	V		
Oct 1 DC:	12,0	V		
Oct 2 DC:	1,7	V		
Trap Drive:	41,7			
Oct RF:	112,2	V		
Lens 1:	-5,0	V		
Lens 2:	-60,0	V		

4.3.3.5 Methode 5

Scan range:	20-500	<i>m/z</i>		
Polarity:		positive		
Max. Acc. Time:	200	ms		
Time Fragment 1: 7-14 Minuten				
Manuelles MS ₂ :	<i>m/z (+)</i> 129			
Target Ions:	40.000			
Capillary:	-4000	V	2	nA
End Plate Offset:	-500	V	28	nA
Skimmer:	40,0	V		
Cap Exit:	100,5	V		
Oct 1 DC:	12,0	V		
Oct 2 DC:	1,7	V		
Trap Drive:	31,7			
Oct RF:	111,6	V		
Lens 1:	-5,0	V		
Lens 2:	-60,0	V		
Time Fragment 2: 18-23 Minuten				
Manuelles MS ₂ :	<i>m/z (+)</i> 281			
Target Ions:	40.000			
Capillary:	-4000	V	4	nA
End Plate Offset:	-500	V	25	nA
Skimmer:	40,0	V		
Cap Exit:	112,1	V		
Oct 1 DC:	12,0	V		
Oct 2 DC:	1,7	V		
Trap Drive:	41,7			
Oct RF:	112,2	V		
Lens 1:	-5,0	V		
Lens 2:	-60,0	V		

4.3.3.6 Methode 6

Scan range:	20-500	<i>m/z</i>		
Polarity:		positive		
Max. Acc. Time:	200	ms		
Time Fragment: 17-23 Minuten				
AutoMS ₂ :	<i>m/z (+)</i> 282			
Target Ions:	40.000			
Capillary:	+ 4000	V	4	nA
End Plate Offset:	- 500	V	28	nA
Skimmer:	40,0	V		
Cap Exit:	99,5	V		
Oct 1 DC:	12,0	V		
Oct 2 DC:	1,7	V		
Trap Drive:	30,8			
Oct RF:	107,3	V		
Lens 1:	- 5,0	V		
Lens 2:	- 60,0	V		

4.3.3.7 Methode Infusion

Infusionsnadel (Cole Parmer, Illinois, USA)		
Nebulizer:	30,0	psi
Dry Gas:	9,0	l/min
Dry Gas Temperature:	330	°C
Fluss:	150	µl/h
Scan range:	20-500	m/z
Polarity:		positive/negative
Max. Acc. Time:	200	ms
Target Ions:	40.000	
Smart Parameter settings:		
a) m/z (+)	209	
b) m/z (+)	235	
c) m/z (+)	295	

4.4 PRÄPARATIVE HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE MIT UV-DETEKTION

HPLC:	Analytische HPLC Maxi-Star (Knauer, Berlin, Deutschland)
Pumpensystem:	HPLC Maxi Star Niederdruckpumpe mit analytischem Pumpenkopf und Dynamic Mixing Chamber (Knauer, Berlin, Deutschland)
Degasser:	4-Wege-Degasser (Knauer, Berlin, Deutschland)
Mischkammer:	dynamische Mischkammer (Knauer)
Injektor:	Vier-Wege-Ventil Nr. 7125 (Rheodyne), Probenschleife 225 µl (Knauer, Berlin, Deutschland)
Trennsäule :	Synergi 4u Fusion RP-80, 250 mm x 15 mm, 4 micron (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)
Fließmittel :	A: 0,05 % Ameisensäure in Wasser B: 0,05 % Ameisensäure in Acetonitril
Fluss:	5 ml/min
Gradient :	0 - 10 min: 0 - 20 % B; 10 - 20 min: 20 - 100 % B
Detektoren:	UV-Detektor Nr. 29815 mit variabler Wellenlänge (Knauer, Berlin, Deutschland)
Datenaufnahme und -auswertung:	Eurochrom 2000 (Knauer, Berlin, Deutschland)
Ausgabe:	HP-Drucker (Hewlett Packard)

4.5 NUCLEAR-MAGNETISCHE-RESONANZ-SPEKTROSKOPIE

Die ^1H -NMR-Spektren wurden bei 500,13 MHz mit einem Bruker DRX 500 (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) Spektrometer aufgenommen. Die Verbindungen wurden in deuteriertem Lösungsmittel gelöst. Die chemische Verschiebung wurde auf das Lösungsmittelsignal bezogen. Die ein- und zweidimensionalen COSY-, HMQC- und HMBC-Spektren wurden mit der Software XWin-NMR (Bruker, Karlsruhe, Deutschland) bearbeitet und ausgewertet.

4.6 GASCHROMATOGRAPHIE-OLFAKTOMETRIE

Die hochauflösende Gaschromatographie wurde mittels einer Trace GC der Firma Thermo Finnigan (Dreieich, Deutschland) durchgeführt. Diese war ausgestattet mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) mit Schreiber (Servogor 120, BBC Goerz Metrawatt) und einem *Sniffing-port*. Die Probenaufgabe erfolgte direkt auf die Säule (*on column*-Technik) und die Ofentemperatur wurde mit einer Rate von 15 °C/Minute von 40 °C (2 Minuten) auf 230 °C (10 Minuten) erhöht. Helium diente als Trägergas bei einem konstanten Druck von 80 kPa. Nach der Trennung über die DB-FFAP-Säule (30 cm x 0,32 mm, 0,25 µm Filmdicke, J&W Scientific, Folsom, USA) wurden die herausströmenden Substanzen gesplittet und zum FID bzw. zum *sniffing-port* geleitet.

4.7 CHIRALE KAPILLARZONENELEKTROPHORESE

Gerät:	P/ACE system MDQ (Beckman, Fullerton, CA, USA)
Injektion:	hydrodynamische Injektion am anodischen Ende der Kapillare (0,5 psi, 10 sec)
Trennsäule:	Fused silica (30 / 40,2 cm, i.D. 50 µm)
Temperatur:	25 °C
Spannung:	10 kV
Laufpuffer:	50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 4) + 20 mM Heptakis-(2,3-O-diacetyl-6-O-sulfato)- β -cyclodextrin (HDAS- β -CD)
Waschlösungen:	0,1 M NaOH (2 min), Laufpuffer (2 min)
Detektor:	UV-Spektralphotometer mit variabler Wellenlänge (Knauer, Berlin, Deutschland)
Ausgabe:	HP-Drucker (Hewlett Packard)

4.8 ELEKTRONEN-SPIN-RESONANZ

Mikrowellenfrequenz:	ca. 9,8286 GHz
MW-Leistung:	2 mW
Modulationsamplitude:	1 Gauss (= 0,1 mT)

Verstärkung: 8×10^4

Sweep Breite des Magnetfeldes: 60 Gauss (= 6 mT)

Je nach Signal-Intensität wurde zwischen 1 bis 20-mal addiert.

Die O₂-freie Atmosphäre wurde in einem anaeroben Zelt der Firma Coy, gefüllt mit 5% H₂ und 95% N₂-Gasgemisch (Formiergas) geschaffen.

4.9 SONSTIGE GERÄTE

- Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Mini-Vertikal-Doppel-Elektrophorese-Kammer mit Stromversorgung Consort E 835 (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Mini-Horizontal-Gelelektrophoresekammer (Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit Stromversorgung (CONSORT E132, Turnhout, Belgien)
- Blotkammer Criterion (Biorad, München, Deutschland)
- Wasserentkeimung Purelab Plus UV/UF PL 5124 02 (USF, Pausbach-Baumbach, Deutschland)
- Schüttelinkubatoren
 - Laborschüttler 3020 (GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland)
 - Schüttelinkubator 3031 (GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland)
- Autoklav HST 4-5-7(Zirbus Technology, Bad Grund, Deutschland)
- Photometer
 - Mikrotiterplattenleser Safire (Tecan, Crailsheim, Deutschland)
 - Photometer specord 200 (Analytic Jena AG, Jena, Deutschland)
- Zentrifugen
 - Sorvall RC 5B Plus ;Rotoren SLA-3000 und SS-34 (Kendro, Hanau, Deutschland); Rotor 11150/13215 (Sigma, Osterode am Harz, Deutschland)
 - Zentrifuge 4K15 Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 - Zentrifuge 5415R Eppendorf Rotor FA 45-24-11(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Ultraschallsonde (Bandelin UW 2070, Bandelin, Berlin, Deutschland)
- PH-Meter CG 820 (Schott Geräte, Hofheim, Deutschland)
- Ultraschallbad Bandelin Sonorex TK 52 (Schalltec, Mörfelden, Deutschland)
- PCR-Gerät Primus 96 (Peqlab, Erlangen, Deutschland)
- Rotavapor Rotationsverdampfer Laborotta 4000 mit Vakuumpumpe Rotovac (Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland)

5 ZUSÄTZLICHE DATEN

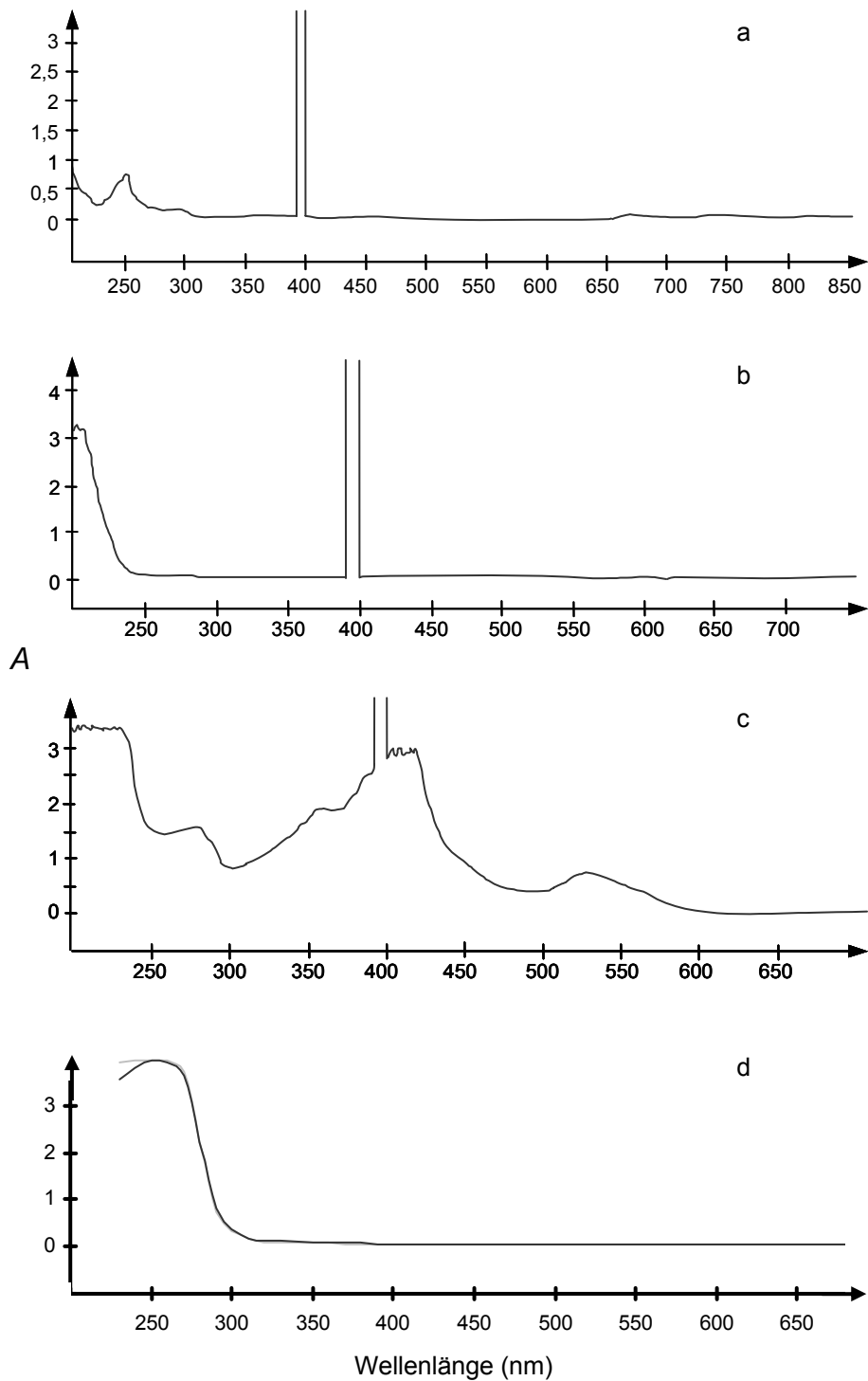


Abb. D-1: Absorptionsspektren; 9,10-Phenanthrenchinon (a), Superoxiddismutase (b); Cytochrom c (c), FaEO/LeEO (d); A: Absorption in AU, Sprunghafter Anstieg bei a, b und c bei 380-400 nm ist auf den Lampenwechsel zurückzuführen.

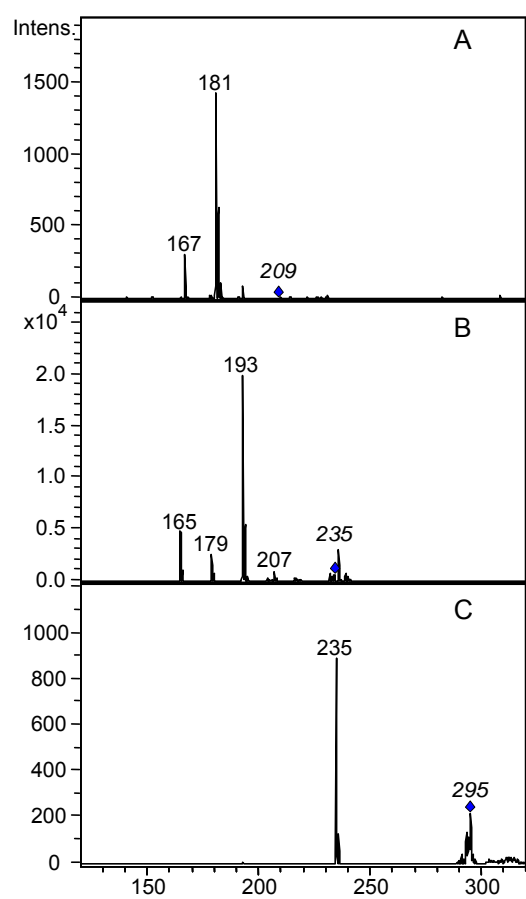


Abb. D-2: MS/MS-Daten von PQ (A), Dihydroxyphenanthren (DHP) (B) und Diacetoxyphenanthren (DAP) (C); aufgenommen durch Infusionsexperimente ohne vorgeschaltete HPLC (Methode Kap. D-4.3.3.5); Kursiv: $[M+H]^+$.

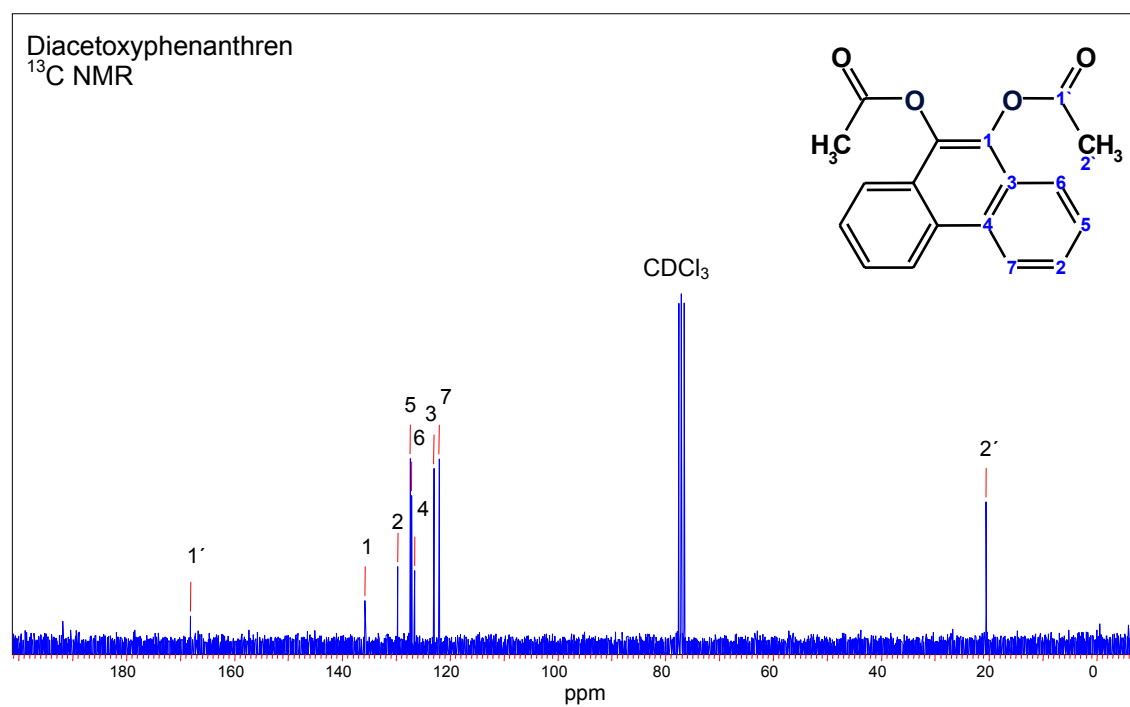
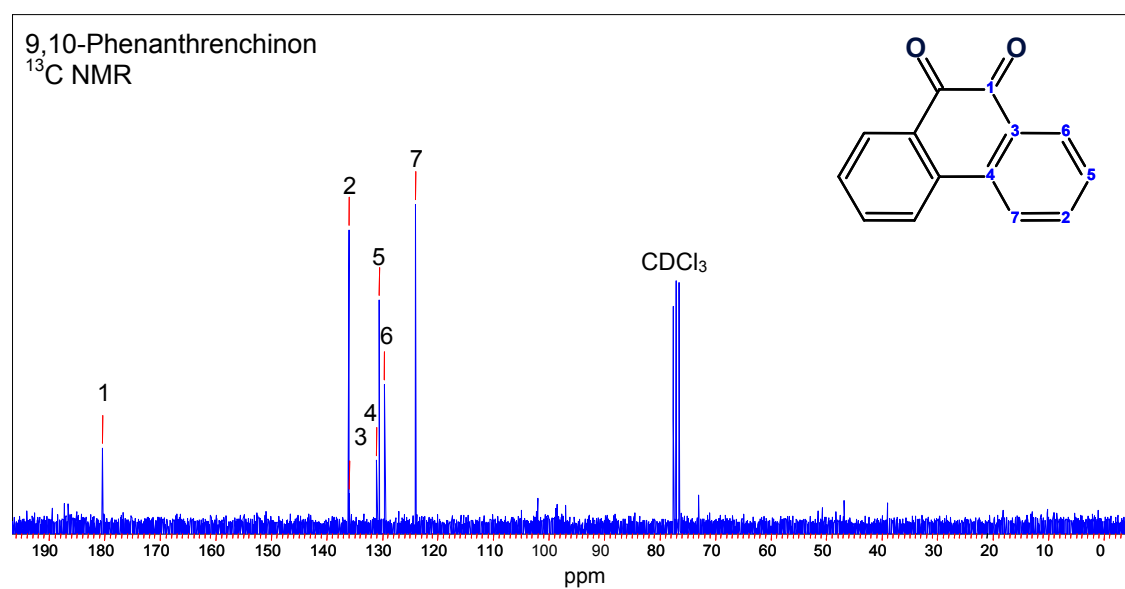


Abb. D-3: ^{13}C NMR-Daten von PQ und Diacetoxyphenanthren (DAP).

<i>L. esculentum</i> EO	ATGGAAGCTCTGTTATCTTCCACTACTCTTCAACTCAAACCCCTTCATCCACCCTCTTCT	60
<i>F. ananassa</i> EO	-----	
<i>A. comosus</i> _putQR	-----	
Übereinstimmung	-----	
<i>L. esculentum</i> EO	TTCTCTTCTCTTCACTCTCCATTTTCTTCTATTTCTGTTCTTAGAGTAAAGGGTAGCAAA	120
<i>F. ananassa</i> EO	-----	
<i>A. comosus</i> _putQR	-----	
Übereinstimmung	-----	
<i>L. esculentum</i> EO	AAAGCTGAAACTTTTATTCAAAGAAGCAATTTTCCACTGTTTTGCCACTTAGAGTCTCT	180
<i>F. ananassa</i> EO	-----	
<i>A. comosus</i> _putQR	-----	
Übereinstimmung	-----	
<i>L. esculentum</i> EO	GCTAGTTCTCAAGCAGCAGCTGCTGAAACATCCACAAGCATTCTATTCCCTCTGAAATG	240
<i>F. ananassa</i> EO	-----ATGGCTGCAGCTCCAAGCGAGTCCATACCCTCTGTAAT	39
<i>A. comosus</i> _putQR	-----	
Übereinstimmung	-----gc-g--aca-cc-caagca--tctat-ccttctg-aa-	
<i>L. esculentum</i> EO	AAAGCTTGGAGTTATACTGATTATGGAAG---TGTTGATGTTTTGAAGTTGGAGTCCAAT	297
<i>F. ananassa</i> EO	AAGGCCTGGGTCTATTCCAGAGTATGGAAAACTTCTGATGTTCTCAAGTTGATCCAAGT	99
<i>A. comosus</i> _putQR	-----	
Übereinstimmung	aaagcttgg-a-ttat-c-ga-tatggaag---t-ttgatgtttt-aagtt-ga-tc-aat	
<i>L. esculentum</i> EO	GTTGCAGTTCCTGACATTAAGGAAGATCAAGTCTTGATTAAGATTGTTGCTGCTGCTCTT	357
<i>F. ananassa</i> EO	GTGGCTGTTCCCTGAAGTTAAAGAGGATCAGGTGCTGATCAAGGTTGTTGCTGCTTCTCTT	159
<i>A. comosus</i> _putQR	-----	
Übereinstimmung	gt-gc-gttcctga-attaaggaagatcaagt-ttgattaagattgttgctgct-ctctt	
<i>L. esculentum</i> EO	AACCCGTGTTGATTTTAAACGACGGCTCGGAAAATTTAAGGCCACTGATTCTCCACTTCCA	417
<i>F. ananassa</i> EO	AACCCGGTTGATTTTAAAGAGGGCTCTTGGTTACTTCAAGGACACTGACTCTCCCTACCT	219
<i>A. comosus</i> _putQR	-----	
Übereinstimmung	aacc-cgttgattttaaa-ga---ctcgg--a-tttaagg-cactgattctcc-ct-cc-	
<i>L. esculentum</i> EO	ACTGTGCCAGGTTATGATGTTGCTGGTGTGGTAGTGAAAGTTGGTAGTCAGGTAAAGGGA	477
<i>F. ananassa</i> EO	ACAGTTCAGGGTATGATGATGCTGGTGTGGTGGTAAAGGTCGGAAGCCAAGTAACCAAG	279
<i>A. comosus</i> _putQR	-----	
Übereinstimmung	ac-gt-ccagg-tatgatgt-gctggtgtggttagtgaaagtgg-agtcaggtaa-gga	
<i>L. esculentum</i> EO	TTAAAAGAAGGGGATGAAGTATATGGAGATATACATGAGAAAGCATTAGATGGACCAAAG	537
<i>F. ananassa</i> EO	TTTAAGGTGGGGATGAAGTGTATGGGGATCTCAATGAGGCAGCATTGGTGAACCCAACA	339
<i>A. comosus</i> _putQR	-----ACGAAGTATATGGGGACATAAACGAGAGGCGTTGGAGAATCTGAAG	47
Übereinstimmung	tt-aaag-aggggAtGAAGTaTATGGgGAtaTaaAtGAGaaaGCaTTgGagaacCcaAag	
<i>L. esculentum</i> EO	CAATTTGGATCCTTAGCTGAGTACACTGCTGTTGAAGAGAACTTAGTTGCTTTGAAACCC	597
<i>F. ananassa</i> EO	AGGTTTGGTCTTTGGCAGAGTACACTGCTGCAGATGAAAGAGTATTGGCTCACAAACCC	399
<i>A. comosus</i> _putQR	CAATTCGATCGCTGGCGGAGTACACCGACTCGAGGAGAGCTGCTGGCTGTAAAACCT	107
Übereinstimmung	caaTtTGaTCctTgGCaGAGTACACTGCTGttGAaGAgAaacTatTgGCTttgAAACCC	
<i>L. esculentum</i> EO	AAGAATCTTAGTTTTGGCGAGGCTGCTGCTCTTCCCTTAGCTATTGAGACTGCTTATGAA	657
<i>F. ananassa</i> EO	AAAGACTTGAGCTTCATTGAAGCTGCTAGCTTCCCTTGGCTATTGAAACTGCCTATGAA	459
<i>A. comosus</i> _putQR	AAGAATCTGGACTTTGCGCAGGCTGCTAGTCTTCCCTTGGCCATCGAGACGGCATAAGAA	167
Übereinstimmung	AAgaAtcTgagcTTtgcgAgGCTGCTagTCTTCCttTgGcTAtTGAaGActGctTatGAA	
<i>L. esculentum</i> EO	GGTCTTGAGAAAGCTGGATTTCTTCTGGCAAATCCATTCTTGTGTTGGGAGGTGCTGGC	717
<i>F. ananassa</i> EO	GGGCTTGAAAGAGCTGAACCTTCTGCTGTAAGTCTATCCTTGTGTTGGGAGCGCCGGG	519
<i>A. comosus</i> _putQR	GGCCTCGAGAGAGCTGGATTTTCCGCGGGTAAATCGGTTCTTGTGTTGGGTGGCGCTGGC	227
Übereinstimmung	GGtCTtGAgAgAGCTGgAtTTTCTgCtGGtAAaTCcaTtCTTGTGTTTGGGAGGcGCTGGc	
<i>L. esculentum</i> EO	GGTGTGATCCCTAGTAATCCAGCTTGCATAACATGTAATTGGTGCTTCTAAAGTAGCA	777
<i>F. ananassa</i> EO	GGTGTGGAACACATAATATCAGCTTGCAGAGCATGTTTTGGTGCTTCCAAGTAGCA	579
<i>A. comosus</i> _putQR	GGAGTCGGCTCGCTTGTGATTCAGCTAGCAAGGCATGCTACGGTGCTCGAAAGTTGCG	287
Übereinstimmung	GGtGTtGGatCaCttgTaAtTcAGCTtGCaAagCATGtTtTtGGTGctTctAAAGTAgCa	
<i>L. esculentum</i> EO	GCTACCTTAGCACAGGGAA GTTGAACCTCTGAAAAGCTTAGGAGCTGATTAGCTATT	837
<i>F. ananassa</i> EO	GCTACTGCAAGCACTAAGAACTGGATTTCTTGAGAACCTTGGGTGTTGATTGGCTATC	639
<i>A. comosus</i> _putQR	GCCACTTAGCACCGGAAAGCTGGAGCTGTGAAGAGTCTGGGTGCCGATTAGCGATT	347
Übereinstimmung	GCTActtCtAGCACTgggAagTGAaAcTctTGAaaAgctTgGGtGctGATTtAgCTAtT	

<i>L. esculentum</i> EO	GACTACACTAAGGAGAAATTTTGAAGATCTGCCTGACAAAGTTTGATGTTGTTTATGATTC	897
<i>F. ananassa</i> EO	GATTACACCAAGGAGAACATCGAGGACCTGCCAGAGAAATTTGATGTAGTGTATGATGCA	699
<i>A. comosus_putQR</i>	GACTACACCAAGGAAAAATTGAGAAGTACCTGAGAAAGTTTGATGTAGTGTATGATGCT	407
Übereinstimmung	GAcTACACcAAGGAgAAcaTtGaaGAtCTgCctGAgAAgTTTGATGTaGTgTATGATgCa	
<i>L. esculentum</i> EO	GTTGGTCAGGGTGAAAAGCGGTGAAAGGTAGTGAAAGGAAGGTGGGAGTGTGGTAGTGCTA	957
<i>F. ananassa</i> EO	GTTGGGGAGACAGATAAGGCTGTGAAAGCGGTGAAAGAAGGCGGGAAGGTAGTAACAATA	759
<i>A. comosus_putQR</i>	GTTGGTCAGTGCsAAANGAAGCGTGAAAGCAGTGAAAGAAGGGGGCAGCCTCGTGGTGATC	467
Übereinstimmung	GTTGGTcAGggtGAAaAggCgGTGAAAGcGcaGTGAAaGAAGGtGGgAgtGTgGTagtgaTa	
<i>L. esculentum</i> EO	ACAGGGGCAGTAACCTCCACCAGGTTT TAGATTTGTGGTGACATCAAAATGGAGAGATGTTG	1017
<i>F. ananassa</i> EO	GTAGGTCCAGCAACGCCACCGCTATCCATTTTGTGCTTACCTCTAAAGGGTCTGTGTTG	819
<i>A. comosus_putQR</i>	ATAGGCCAGTCCAGCCCCCGGCTTCATATTCAATCGTCACGTCCAAATGGGGAGATCCTG	527
Übereinstimmung	atAGGtcCAGtaACgCCaCCgGgttTcagaTTtgTggTtACaTctAAATGGggagaTgtTG	
<i>L. esculentum</i> EO	AAGAACTGAACCATACTTGGAAGTGGGAAGGTGAAACCAGTGATAGATCCAAAGGGA	1077
<i>F. ananassa</i> EO	GAGAACTGAAGCCTTACTTGAGAGTGGGAAGGTGAAAGCCAGTTCCTTGATCCCACAAGT	879
<i>A. comosus_putQR</i>	GCGAAGCTCAACCCTTATCTCGAAAGTGGGAAGGTGAAAGCCTCTTCTGGACCCAAAGGGG	587
Übereinstimmung	gaGAAaCTgAAcCctTActTgGaaAGTGGGAAGGTGAAgCCagTtcTaGatCCaAaggGa	
<i>L. esculentum</i> EO	CCATCTCTCAATTTGATAAGGTTGTGGATGCTTTCTCTTATCTTGAACTGGAAGAGCCACT	1137
<i>F. ananassa</i> EO	CCATATCCCTTTACTAAACTTGTGAGCATTGGTTACCTTGAGAGTTCCAGAGCTACC	939
<i>A. comosus_putQR</i>	CCATTCCTTTCACTCAGGTGGTCGAGGCATTCTCTTATCTCGAAACCGGAAGAGGTACT	647
Übereinstimmung	CCATtccCtTtacTaAggTtGtTGaaGCaTtctcTTAtCTtGaaActggaAGAGctACT	
<i>L. esculentum</i> EO	GGGAAAGTTGTTATTCATCCCATTCCT-----	1164
<i>F. ananassa</i> EO	GGAAAAGGTGGTTGTGTATCCCATCCCATGA-----	969
<i>A. comosus_putQR</i>	GGAAAAGGTCGTTATCTATCCAAATGCTTGAGATTAAAAATAGCAAAAGAGGATCTTAGCC	707
Übereinstimmung	GGaAAgGTTGTTaTttATCCcATtcCtTga-----	
<i>L. esculentum</i> EO	-----	1164
<i>F. ananassa</i> EO	-----	969
<i>A. comosus_putQR</i>	TTGGTGTGCTTTTGCATGTATATTTCCGGTTTTAAAGAGGAAAAAAGTTCTAAAACTGCT	767
Übereinstimmung	-----	
<i>L. esculentum</i> EO	-----	1164
<i>F. ananassa</i> EO	-----	969
<i>A. comosus_putQR</i>	CGAACTTTGTAGGAAGAGAGTATGTATGTAATCAGTATAAATGTGTAATAAGATACTCC	827
Übereinstimmung	-----	
<i>L. esculentum</i> EO	-----	1164
<i>F. ananassa</i> EO	-----	969
<i>A. comosus_putQR</i>	ATACTATGGAGTTGAACAAG	847
Übereinstimmung	-----	

Abb. D-4: Sequenzvergleich (CLUSTALW) auf Nucleotidebene von LeEO (*L. esculentum* Enonoxidoreduktase), FaEO (*F. ananassa* Enonoxidoreduktase) und einer putativen Chinonoxidoreduktase aus *Ananas comosus* (Ananas, Acc. Nr.: BAC22575); Schattierung: grün: konserviert in allen.

E LITERATUR

- Aharoni, A.; Keizer, L. C. P.; Bouwmeester, H. J.; Zhongkui, S.; Alvarez-Huerta, M.; Verhoeven, H. A.; Blaas, J.; van Houwelingen, A. M. M. L.; De Vos, R. C. H.; van der Voet, H.; Jansen, R. C.; Guis, M.; Mol, J.; Davis, R. W.; Schena, M.; van Tunen, A. J.; O'Connell, A. P.; **Identification of the SAAT Gene Involved in Strawberry Flavor Biogenesis by Use of DNA Microarrays**; *The Plant Cell*; **2000**, 12, 647-661.
- Aharoni, A.; Giri, A. P.; Verstappen, F. W. A.; Berteaux, C. M.; Sevenier, R.; Sun, Z.; Jongsma, M. A.; Schwab, W.; Bouwmeester, H. J.; **Gain and Loss of Fruit Flavor Compounds Produced by Wild and Cultivated Strawberry Species**; *The Plant Cell*; **2004**, 15, 3110-3131.
- Azodanlou, R.; Darbellay, C.; Luisier, J. L.; Villettaz, J. C.; Amadò, R.; **Quality Assessment of Strawberries**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2003**, 51, 715-721.
- Azodanlou, R.; Darbellay, C.; Luisier, J. L.; Villettaz, J. C.; Amad, R.; **Changes in flavour and texture during the ripening of strawberries**; *European Food Research and Technology*; **2004**, 218, 167-172.
- Babiychuk, E.; Kushnir, S.; Belles-Boix, E.; Van Montagu, M.; Inzé, D.; **Arabidopsis thaliana NADPH Oxidoreductase Homologs Confer Tolerance of Yeasts toward the Thiol-oxidizing Drug Diamide**; *Journal of Biological Chemistry*; **1995**, 270, 26224-26231.
- Ballesteros, P.; Roberts, B. W.; Wong, J.; **Synthesis of Di-tert-butyl Methylenemalonate, a Sterically Hindered 1,1-Dicarbonyl Alkene**; *Journal of Organic Chemistry*; **1983**, 48, 3603-3605.
- Belitz, H.-D.; Grosch, W.; **Lehrbuch der Lebensmittelchemie**; **1992**, 4. Auflage, Berlin Heidelberg; Springer-Verlag.
- Blank, I.; Sen, A.; Grosch, W.; **Potent odorants of the roasted powder and brew of Arabica coffee**; *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*; **1992**, 195, 239-245.
- Blank, I. and Schieberle, P.; **Analysis of the Seasoning-like Flavour Substances of a Commercial Lovage Extract (*Levisticum officinale* Koch.)**; *Flavour and Fragrance Journal*; **1993**, 8, 191-195.
- Blank, I. and Fay, L. B.; **Formation of 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone and 4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone through Maillard Reaction Based on Pentose Sugars**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **1996**, 44, 531-536.
- Bohren, K. M.; Bullock, B.; Wermuth, B.; Gabbay, K. H.; **The aldo-keto reductase superfamily. cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases**; *Journal of Biological Chemistry*; **1989**, 264, 9547-9551.
- Borrás, T.; Perrson, B.; Jörnvall, H.; **Eye Lens z-Crystallin Relationships to the Family of "Long-Chain" Alcohol/Polyol Dehydrogenases. Protein Trimming and Conservation of Stable Parts**; *Biochemistry*; **1989**, 28, 6133-6139.
- Bradford, M. M.; **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding**; *Analytical Biochemistry*; **1976**, 72, 248-254.

- Brock, B. J.; Rieble, S.; Gold, M. H.; **Purification and Characterization of a 1,4-Benzoquinone Reductase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium***; Applied and Environmental Microbiology; **1995**, 61, 3076-3081.
- Bruche, G.; Schmarr, H.-G.; Bauer, A.; Mosandl, A.; Rapp, A.; Engel, L.; **Stereoisomere Aromastoffe LI: Stereodifferenzierung chiraler Furanone Möglichkeiten und Grenzen der herkunftsspezifischen Aromastoff-Analyse**; European Food Research and Technology; **1991**, 193, 115-118.
- Bruche, G.; Dietrich, A.; Mosandl, A.; **Stereoisomeric flavour compounds LXXI: determination of the origin of aroma-active dihydrofuranones**; Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung; **1995**, 201, 249-252.
- Buttery, R. G.; Krammer, G. E.; Ling, L. C.; **Identification of 2,5-Dimethyl-4-Hydroxy-3(2H)-Furanone (Furaneol) and 5-Methyl-4-Hydroxy-3(2H)-Furanone in Fresh and Processed Tomato**; Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie; **1994**, 27, 592-594.
- Buttery, R. G.; Takeoka, G. R.; Ling, L. C.; **Furaneol: Odor Threshold and Importance to Tomato Aroma**; Journal of Agricultural and Food Chemistry; **1995**, 43, 1638-1640.
- Cadenas, E.; **Antioxidant and prooxidant functions of DT-Diaphorase in quinone metabolism**; Biochemical Pharmacology; **1995**, 49, 127-140.
- Christians, T. and Holzgrabe, U.; **New single-isomer chiral selector for capillary electrophoresis: the highly water-soluble heptakis(2-N,N-dimethylcarbamoyl)-[beta]-cyclodextrin**; Journal of Chromatography A; **2001**, 911, 249-257.
- Constam, D.; Muheim, A.; Zimmermann, W.; Fiechter, A.; **Purification and partial characterization of an intracellular NADH:quinone oxidoreductase from *Phanerochaete chrysosporium***; Journal of General Microbiology; **1991**, 137, 2209-2214.
- Deyashiki, Y.; Ohshima, K.; Nakanishi, M.; Sato, K.; Matsuura, K.; Hara, A.; **Molecular Cloning and Characterization of Mouse Estradiol 17 β -Dehydrogenase (A-Specific), a Member of the Aldoketoreductase Family**; Journal of Biological Chemistry; **1995**, 270, 10461-10467.
- Dick, R. A.; Kwak, Mi K.; Sutter, T. R.; Kensler, T. W.; **Antioxidative Function and Substrate Specificity of NAD(P)H- dependent Alkenal/one Oxidoreductase. A new role for Leukotriene B₄ 12-Hydroxydehydrogenase/15-Oxoprostaglandin 13-Reductase**, Journal of Biological Chemistry; **2001**, 276, 40803-40810.
- Dick, R. A. and Kensler, T. W.; **The Catalytic and Kinetic Mechanisms of NADPH-dependent Alkenal/one Oxidoreductase**; Journal of Biological Chemistry; **2004 a**, 279, 17269-17277.
- Dick, R. A.; Yu, X.; Kensler, T. W.; **NADPH Alkenal/One Oxidoreductase Activity Determines Sensitivity of Cancer Cells to the Chemotherapeutic Alkylating Agent Irofulven**; Clinical Cancer Research; **2004 b**, 10, 1492-1499.
- dpa/lsw; **Erdbeersaison hat begonnen**; Stuttgarter Zeitung; **2006**, 2-5-2006.
- Duhaiman, A. S.; Rabbani, N.; AlJafari, A. A.; Alhomida, A. S.; **Purification and Characterization of ζ -Crystallins from the Camel Lens**; Biochemical and Biophysical Research Communications; **1995**, 215, 632-640.

- Edwards, K. J.; Thorn, J. M.; Daniher, J. A.; Dixon, N. E.; Ollis, D. L.; **Crystallization and Preliminary X-ray Diffraction Studies on a Soluble *Escherichia coli* Quinone Oxidoreductase**; Journal of Molecular Biology; **1994**, 240, 501-503.
- Edwards, K. J.; Barton, J. D.; Rossjohn, J.; Thorn, J. M.; Taylor, G. L.; Ollis, D. L.; **Structural and Sequence Comparisons of Quinone Oxidoreductase, ζ -Crystallin, and Glucose and Alcohol Dehydrogenases**; Archives of Biochemistry and Biophysics; **1996**, 328, 173-183.
- Emanuelsson, O.; Nielsen, H.; Brunak, S.; von Heijne, G.; **Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence**; Journal of Molecular Biology; **2000**, 300, 1005-1016.
- Ernster, L.; Navazio, F.; **Soluble Diaphorase in Animal Tissues**; Acta Chemica Scandinavica; **1958**, 12, 595-602.
- Ernster, L.; Danielson, L.; Ljunggren, M.; **DT diaphorase I. Purification from the soluble fraction of rat-liver cytoplasm, and properties**; Biochimica et Biophysica Acta; **1962**, 58, 171-188.
- Ernster, L.; **DT Diaphorase: A Historical Review**; Chemica Scripta; **1987**, 27A, 1-13.
- Farine, J. -P.; Le Quere, J. -L.; Duffy, J.; Everaerts, C.; Brossut, Rémy; **Male sex pheromone of cockroach *Eurycotis floridana* (walker) (Blattidae, Polyzosteriinae): Role and composition of tergites 2 and 8 secretions**; Journal of Chemical Ecology; **1994**, 20, 2291-2306.
- Fehl, A. J.; Marcott, C.; **Capillary Gas Chromatography/Fourier Transform Infrared Spectroscopy Using an Injector/Trap and Liquid/Liquid Extraction**; Analytical Chemistry; **1989**, 61, 1596-1598.
- Fei, Z.; Tang, X.; Alba, R.; White, J.; Ronning, C.; Martin, G.; Tanksley, S.; Giovannoni, J.; **Comprehensive EST Analysis of Tomato and Comparative Genomics of Fruit Ripening**; Plant Journal; **2004**, 40, 47-59.
- Given, N. K.; Venis, M. A.; Grierson, D.; **Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric-fruit**; Planta; **1988**, 174, 402-406.
- Haleva-Toledo, E.; Naim, M.; Zehavi, U.; Rouseff, R. L.; **4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone Formation in Buffers and Model Solutions of Citrus Juice**; Journal of Agricultural and Food Chemistry; **1997**, 45, 1314-1319.
- Hancock, J. F.; **Strawberries**; **1999**, Oxon, New York; CABI Publishing; Crop Production Science in Horticulture.
- Hauck, T.; Bruhlmann, F.; Schwab, W.; **4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone Formation by *Zygosaccharomyces rouxii*: Effect of the Medium**; Journal of Agricultural and Food Chemistry; **2003 a**, 51, 4753-4756.
- Hauck, T.; Landmann, C.; Brühlmann, F.; Schwab, Wilfried; **Formation of 5-Methyl-4-hydroxy-3[2H] furanone in Cytosolic Extracts obtained from *Zygosaccharomyces rouxii***; Journal of Agricultural and Food Chemistry; **2003 b**, 51, 1410-1414.
- Hauck, T.; Landmann, C.; Raab, T.; Brühlmann, F.; Schwab, W.; **Chemical formation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone from D-fructose 1,6-diphosphate**; Carbohydrate Research; **2002**, 337, 1185-1191.

- Hauck, T.; Hübner, Y.; Brühlmann, F.; Schwab, W.; **Alternative pathway for the formation of 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione, the proposed precursor of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone as well as autoinducer-2, and its detection as a natural constituent of tomato fruit**; *Biochimica et Biophysica Acta*; **2003** c, 1623, 109-119.
- Hayashi, M.; Ohzeki, H.; Shimada, H.; Unemoto, T.; **NADPH-specific quinone reductase is induced by 2-methylene-4-butyrolactone in *Escherichia coli***; *Biochimica et Biophysica Acta*; **1996**, 1273, 165-170.
- Hayashida, Y.; Nishimura, K.; Slaughter, J. C.; **The Importance of the Furanones HDMF and HEMF in the Flavour Profile of Japanese Barley Miso and their Production during Fermentation**; *J Sci Food Agric*; **1998**, 78, 88-94.
- Heineke, D.; Riens, B.; Grosse, H.; Hoferichter, P.; Peter, U.; Flügge, U.-I.; Heldt, H. W.; **Redox Transfer across the Inner Chloroplast Envelope Membrane**; *Plant Physiology*; **1990**, 95, 1131-1137.
- Hecquet, L.; Sancelme, M.; Bolte, J.; Demuyne, C.; **Biosynthesis of 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone by *Zygosaccharomyces rouxii***; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **1996**; 44, 1357-1360.
- Henry, D. W.; Silverstein, R. M.; **A Rational Synthesis of 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, a Flavor Component of Pineapple**; *Journal of Organic Chemistry*; **1966**; 6, 2391-2394.
- Hiebl, J.; Ledl, F.; Severin, T.; **Isolation of 4-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-5-methyl-3(2H)-furanone from Sugar Amino Acid Reaction Mixtures**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **1987**, 35, 990-993.
- Hirata, T.; Tamura, Y.; Yokobatake, N.; Shimoda, K.; Ashida, Y.; **A 38 kDa allylic alcohol dehydrogenase from the cultured cells of *Nicotiana tabacum***; *Phytochemistry*; **2000**, 55, 297-303.
- Hirvi, T.; Honkanen, E.; **The volatiles of Two New Strawberry Cultivars, "Annelie" and "Alaska Pioneer", Obtained by Backcrossing of Cultivated Strawberries with Wild Strawberries, *Fragaria vesca*, Rügen and *Fragaria virginiana***; *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*; **1982**, 175, 113-116.
- Hodge, J. E.; Fisher, B. E.; Nelson, H. A.; **Dicarbonyls, reductones and heterocyclics produced by reaction of reducing sugars with secondary amine salts**; *Am. Soc. Brew. Chem. Proc.*; **1963**, 83, 84-92.
- Honkanen, E.; Pyysalo, T.; Hirvi, T.; **The Aroma of Finnish Raspberries, *Rubus idaeus*, L.**; *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*; **1980**, 180-182.
- Honkanen, E.; Takeoka, G. R.; Buttery, R. G.; **Isolation and identification of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone glucoside from tomatoes**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **1994**, 42, 1595-1597.
- Huber, U. A.; **Homofuronol: A Powerful Tool to Prepare and Improve Sophisticated High Quality Flavors**; *Perfumer & Flavorist*; **1992**, 17, 15-19.
- Hulo, N.; Bairoch, A.; Bulliard, V.; Cerutti, L.; De Castro, E.; Langendijk-Genevaux, P. S.; Pagni, M.; Sigrist, C. J. A.; **The PROSITE database**; *Nucleic Acids Research*; **2006**, 34, D227-D230.

- Iyanagi, T.; Yamazaki, I; **One-electron-transfer reactions in biochemical systems V. Difference in the mechanism of quinone reduction by the NADH dehydrogenase and the NAD(P)H dehydrogenase (DT-diaphorase)**; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*; **1970**, 216, 282-294.
- Iyanagi, Takashi; **On the Mechanisms of One- and Two-Electron Transfer by Flavin Enzymes**; *Chemica Scripta*; **1987**, 27 A, 31-36.
- Jennings, W. G. and Sevenants, M. R.; **Volatile Esters of Bartlett Pear. III.**; *Journal of Food Science*; **1964**, 29, 158-163.
- Jezussek, M.; Schieberle, P.; **A New LC/MS-Method for the Quantification of Acrylamide Based on a Stable Isotope Dilution Assay and Derivatization with 2-Mercaptobenzoic Acid. Comparison with two GC/MS Methods**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2003**, 51, 7866-7871.
- Kallio, Heikki; **Identification of Vacuum Steam-Distilled Aroma Compounds in the Press Juice of Arctic Bramble**; *Journal of Food Science*; **1976**, 41, 555-562;
- Kitajima-Ihara, Tomomi and Yagi, Takao; **Rotenone-insensitive internal NADH-ubiquinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: the enzyme expressed in *Escherichia coli* acts as a member of the respiratory chain in the host cells**; *FEBS Letters*; **1998**, 421, 37-40.
- Kim, W. H.; Chung, J. H.; Back, J. H.; Choi, J.; Cha, J. H.; Koh, H. Y.; Han, Y. S.; **Molecular Cloning and Characterization of an NADPH Quinone Oxidoreductase from *Kluyveromyces marxianus***; *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*; **2003**, 36, 442-449.
- Klesk, K.; Qian, M.; Martin, R. R.; **Aroma Extract Dilution Analysis of cv. Meeker (*Rubus idaeus* L.) Red Raspberries from Oregon and Washington**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2004**, 52, 5155-5161.
- Koga, T.; Moro, K.; Matsudo, T.; **Antioxidative Behaviors of 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone and 4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone against Lipid peroxidation**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **1998**, 46, 946-951.
- Krammer, G. E.; Takeoka, G. R.; Buttery, R. G.; **Isolation and Identification of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone Glucoside from Tomatoes**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **1994**, 42, 1596-1597.
- Kumagai, Y.; Wakayama, T.; Li, S.; Shinohara, A.; Iwamatsu, A.; Sun, G.; Shimojo, N.; **ζ-Crystallin catalyzes the reductive activation of 2,4,6-trinitrotoluene to generate reactive oxygen species: a proposed mechanism for the induction of cataracts**; *FEBS Letters*; **2000**, 478, 295-298.
- Larsen, M. and Poll, L.; **Odour thresholds of some important aroma compounds in strawberries**; *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*; **1992**, 195, 120-123.
- Larsen, M.; Poll, L.; Olsen, C. E.; **Evaluation of the aroma composition of some strawberry (*Fragaria ananassa* Duch) cultivars by use of odour thresholds**; *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*; **1992**, 195, 536-539.
- Lasch, J.; **Enzymkinetik**; **1987**, Berlin Heidelberg; Springer-Verlag.

- Laskowski, M. J.; Dreher, K. A.; Gehring, M. A.; Abel, S.; Gensler, A. L.; Sussex, I. M.; **FQR1, a Novel Primary Auxin-Response Gene, Encodes a Flavin Mononucleotide-Binding Quinone Reductase**; *Plant Physiology*; **2002**, 128, 578-590.
- Lavid, N.; Schwab, W.; Kafkas, E.; Koch-Dean, M.; Bar, E.; Larkov, O.; Ravid, U.; Lewinsohn, E.; **Aroma Biosynthesis in Strawberry: S-Adenosylmethionine: Furaneol O-Methyltransferase Activity in Ripening fruits**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2002**, 50, 4025-4030;
- Ledl, F.; Severin, T.; **Bräunungsreaktionen von Pentosen mit Aminen**; *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*; **1978**, 167, 410-413.
- Ledl, F.; **4-Hydroxy-2-hydroxymethyl-5-methyl-2,3-dihydrofuran-3-on: ein Zuckermwandlungsprodukt ?**; *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*; **1979**, 169, 176-178.
- Li, R.; Bianchet, M. A.; Talalay, P.; Amzel, L. M.; **The Three Dimensional Structure of NAD(P)H:Quinone Reductase, a Flavoprotein Involved in Cancer Chemoprotection and Chemotherapy: Mechanism of the Two-Electron Reduction**; *Proceedings of the national Academy of Sciences*; **1995**, 92, 8846-8850.
- Li, X.; Hiramoto, K.; Yoshida, M.; Kato, T.; Kikugawa, K.; **Identification of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (DMHF) and 4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF) with DNA Breaking Activity in Soy Sauce**; *Food and Chemical Toxicology*; **1998**, 36, 305-314.
- Lilie, H.; Schwarz, E.; Rudolph, R.; **Advances in Refolding of Proteins Produced in *E. coli***; *Curr.Opin.Biotechnol.*; **1998**, 9, 497-501.
- Lilley, P. E.; Stamford, N. P.; Vasudevan, S. G.; Dixon, N. E.; **The 92-min region of the *Escherichia coli* chromosome: location and cloning of the *ubiA* and *alr* genes**; *Gene*; **1993**, 129, 9-16.
- Lottspeich, F.; Zorbas, H.; **Bioanalytik**; **1998**, Heidelberg, Berlin; Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Luster, D. G.; Buckhout, T. J.; **Purification and Identification of a Plasma Membrane Associated Electron Transport Protein from Maize (*Zea mays* L.) Roots**; *Plant Physiology*; **1989**, 91, 1014-1019.
- Manning, K.; **Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin**; *Planta*; **1994**, 194, 62-68.
- Manning, K.; **Genes for Fruit Quality in Strawberry**; Cockshull, K. E., Gray, D., Seymour, G. B., and Thomas, B.; *Genetic and Environmental Manipulation of Horticultural Crops*; **1998**, 5, 51-61.
- Mano, J.; Yoon, H. J.; Asada, K.; Babiychuk, E.; Inze, D.; Mikami, B.; **Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of NADPH: azodicarbonyl/quinone oxidoreductase, a plant ζ -crystallin**; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*; **2000 a**, 1480, 374-376.
- Mano, J.; Babiychuk, E.; Belles-Boix, E.; Hiratake, J.; Kimura, A.; Inze, D.; Kushnir, S.; Asada, K.; **A novel NADPH:diamide oxidoreductase activity in *Arabidopsis thaliana* P1 ζ -crystallin**; *FEBS Journal*; **2000 b**, 267, 3661-3671.

- Mano, J.; Torii, Y.; Hayashi, S.; Takimoto, K.; Matsui, K.; Nakamura, K.; Inze, D.; Babiychuk, E.; Kushnir, S.; Asada, K.; **The NADPH:Quinone Oxidoreductase P1- ζ -crystallin in Arabidopsis Catalyzes the α , β -Hydrogenation of 2-Alkenals: Detoxication of the Lipid Peroxide-Derived Reactive Aldehydes**; Plant and Cell Physiology; **2002**, 43, 1445-1455.
- Mano, J.; Belles-Boix, E.; Babiychuk, E.; Inze, D.; Torii, Y.; Hiraoka, E.; Takimoto, K.; Slooten, L.; Asada, K.; Kushnir, S.; **Protection against Photooxidative Injury of Tobacco Leaves by 2-Alkenal Reductase. Detoxication of Lipid Peroxide-Derived Reactive Carbonyls**; Plant Physiology; **2005**, 139, 1773-1783.
- Maruyama, A.; Kumagai, Y.; Morikawa, K.; Taguchi, K.; Hayashi, H.; Ohta, T.; **Oxidative-stress-inducible *qorA* encodes an NADPH-dependent quinone oxidoreductase catalysing a one-electron reduction in *Staphylococcus aureus***; Microbiology; **2003**, 149, 389-398.
- Mayerl, F.; Näf, R.; Thomas, A. F.; **2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone glucoside: Isolation from strawberries and synthesis**; Phytochemistry; **1989**, 28, 631-633.
- Meyers, K. J.; Watkins, C. B.; Pritts, M. P.; Liu, R. H.; **Antioxidant and Antiproliferant Activities of Strawberries**; Journal of Agricultural and Food Chemistry; **2003**, 51, 6887-6892.
- Milo, C.; Reineccius, G. A.; **Identification and Quantification of Potent Odorants in Regular-Fat and Low-Fat Mild Cheddar Cheese**; Journal of Agricultural and Food Chemistry; **1997**, 45, 3590-3594.
- Mosandl, A.; Bruche, G.; Askari, C.; Schmarr, H.-G.; **Stereoisomeric flavor compounds XLIV: Enantioselective analysis of some important flavor molecules**; Journal of High Resolution Chromatography; **1990**, 13, 660-662.
- Moyle, R. L.; Crowe, M. L.; Ripi-Koia, J.; Fairbairn, D. J.; Botella, J. R.; **PineappleDB: An online pineapple bioinformatics resource BMC**; Plant Biology; **2005**, 5, 21.
- Newman, L. M.; Garcia, H.; Hudlicky, T.; Selifonow, S. A.; **Directed evolution of the dioxygenase complex for the synthesis of furanone flavor compounds**; Tetrahedron; **2004**, 60, 729-734.
- Nordling, E.; Jornvall, H.; Persson, B.; **Medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR). Family characterizations including genome comparisons and active site modelling**; European Journal of Biochemistry; **2002**, 269, 4267-4276.
- Nunomura, N.; Sasaki, M.; Asao, Y.; Yokotsuka, T.; **Isolation and Identification of 4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone, as a Flavor Component in Shoyu (Soy Sauce)**; Agricultural and Biological Chemistry; **1976**, 40, 491-495.
- Ohloff, G.; **Riechstoffe und Geruchssinn**; **1990**, Berlin Heidelberg; Springer-Verlag.
- Orruño, E.; Apenten, R. O.; Zabetakis, I.; **The role of β -glucosidase in the biosynthesis of 2, 5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Elsanta)**; Flavour and Fragrance Journal; **2001**, 16, 81-84.
- Perkins-Veazie, P.; **Growth and ripening of strawberry fruit**; Janick, Jules; Horticultural Reviews; **1995**, 8, 267-297; John Wiley & Sons, Inc..
- Persson, B.; Zigler, J. S.; Jornvall, H.; **A Super-Family of Medium-Chain Dehydrogenases/Reductases (MDR). Sub-Lines including zeta-Crystallin, Alcohol**

- and Polyol Dehydrogenases, Quinone Oxidoreductases, Enoyl Reductases, VAT-1 and other Proteins**; *European Journal of Biochemistry*; **1994**, 226, 15-22.
- Pérez, A. G.; Rios, J. J.; Sanz, C.; Olías, J. M.; **Aroma Components and Free Amino Acids in Strawberry Variety Chandler during Ripening**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **1992**, 40, 2232-2235.
- Pérez, A. G.; Olías, R.; Sanz, C.; Olías, J. M.; **Furanones in Strawberries: Evolution during Ripening and Postharvest Shelf Life**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **1996**, 44, 3620-3624.
- Pérez, A. G.; Olías, R.; Olías, J. M.; Sanz, C.; **Biosynthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone and Derivatives in in Vitro Grown Strawberries**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **1999**, 47, 655-658.
- Pérez, A. G.; Olías, R.; Luaces, P.; Sanz, C.; **Biosynthesis of Strawberry Aroma Compounds through Amino Acid Metabolism**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **2002**, 50, 4037-4042.
- Pichersky, E.; Gang, D. R.; **Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective**; *Trends in plant science*; **2000**, 5, 439-445.
- Pickenhagen, W.; Velluz, A.; Passerat, J.-P.; Ohloff, G.; **Estimation of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (Furaneol ®) in Cultivated and Wild Strawberries, Pineapples and Mangoes**; *Journal of the Science of Food and Agriculture*; **1981**, 32, 1132-1134.
- Pisarnitskii, A. F.; Demechenko, A. G.; Egorov, I. A.; Cvelesiani, R. K.; **Methylpentoses are probable Precursors of furanones in fruits**; *Applied Biochemistry and Microbiology*; **1992**, 28, 97-100.
- Preininger, M.; Grosch, W.; **Evaluation of Key Odorants of the Neutral Volatiles of Emmentaler Cheese by the Calculation of Odour Activity Values**; *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*; **1994**, 27, 237-244.
- Preusch, P. C.; Siegel, D.; Gibson, N. W.; Ross, D.; **A note on the inhibition of DT-diaphorase by dicoumarol.**; *Free Radical in Biology and Medicine*; **1991**, 11, 77-80.
- Pyysalo, T.; Honkanen, E.; Hirvi, T.; **Volatiles of Wild Strawberries, *Fragaria vesca* L., Compared to Those of Cultivated Berries, *Fragaria x ananassa* cv. Senga Sengana**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **1979**, 27, 19-22.
- Raab, T.; Knecht, A.; Schmitt, U.; Holzgrabe, U.; Schwab, W.; **Tautomerism of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone; Evidence for its enantioselective biosynthesis**; *Chirality*; **2003**, 15, 573-578.
- Raab, T.; **Untersuchungen zur Erdbeerfruchtreifung Biosynthese von 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone Veränderungen enzymatischer Aktivitäten während des Reifeprozesses**; Dissertation: Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2004**.
- Raab, T.; López-Ráez, J. A.; Klein, D.; Caballero, J.-L.; Moyano, E.; Schwab, W.; Muñoz-Blanco, J.; **FaQR, Required for the Biosynthesis of the Strawberry Flavor Compound 4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3(2H)-Furanone, Encodes an Enone Oxidoreductase**; *The Plant Cell*; **2006**, 18, 1023-1037.

- Rao, P. V.; Krishna, C. M.; Zigler, J. S. Jr.; **Identification and Characterization of the Enzymatic Activity of ζ -Crystallin from Guinea Pig Lens**; *The Journal of Biological Chemistry*; **1992**, 267, 96-102.
- Rao, P. Vasantha; Gonzalez, Pedro; Persson, Bengt; Jörnvall, Hans; Garland, Donita; Zigler, J. Samuel Jr.; **Guinea Pig and Bovine ζ -Crystalline Have Distinct Functional Characteristics Highlighting Replacements in Otherwise Similar Structures**; *Biochemistry*; **1997**, 36, 5353-5362.
- Re, Luciano; Maurer, Bruno; Ohloff, Günther; **Ein einfacher Zugang zu 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon (Furaneol), einem Aromabestandteil von Ananas und Erdbeere**; *Helvetica Chimica Acta*; **1973**, 56, 1882-1894.
- Rodin, J. O.; Himel, Chester M.; Silverstein, Robert M.; Leeper, Robert W.; Gortner, Willis A.; **Volatile Flavor and Aroma Components of Pineapple. I. Isolation and Tentative Identification of 2,5-Dimethyl-4-Hydroxy-3(2H)-Furanone**; *Journal of Food Science*; **1965**, 30, 280-284.
- Roscher, R.; Koch, H.; Herderich, M.; Schreier, P.; Schwab, W.; **Identification of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone β -D-Glucuronide as the Major Metabolite of a Strawberry Flavour Constituent in Humans**; *Food and Chemical Toxicology*; **1997 a**, 35, 777-782.
- Roscher, R.; Herderich, M.; Steffen, J. P.; Schreier, P.; Schwab, W.; **2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanone in strawberry fruits**; *Phytochemistry*; **1996**, 43, 155-159.
- Roscher, R.; Schreier, P.; Schwab, W.; **Metabolism of 2, 5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in Detached Ripening Strawberry Fruits**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **1997 b**, 45, 3203-3205.
- Roscher, R.; Bringmann, G.; Schreier, P.; Schwab, W.; **Radiotracer Studies on the Formation of 2, 5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in Detached Ripening Strawberry Fruits**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **1998**, 46, 1488-1493.
- Roscher, R.; **Biosynthese und Metabolismus von 4-Hydroxy-2, 5-dimethyl-3[2H]-furanon (Furaneol®)**; Dissertation: Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **1998**.
- Sasaki, M.; Nunomura, N.; Matsudo, T.; **Biosynthesis of 4-Hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone by Yeasts**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **1991**, 39, 934-938.
- Sasaki, M.; **Isolation and Identification of 4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone from Isolated Soybean Protein and Shoyu**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **1996**, 44, 230-235.
- Sasaki, T.; Yamakoshi, J.; Saito, M.; Kasai, K.; Matsudo, T.; Kikuchi, M.; Koga, T.; Mori, K.; **Synthesis of 4-Hydroxy-3(2H)-furanone Acyl Derivatives and Their Anti-cataract Effect on Spontaneous Cataract Rats (ICR/f)**; *Bioscience Biotechnology Biochemistry*; **1998**, 62, 2145-2154.
- Scarpellino, R.; Soukup, R. J.; **Key Flavors from Heat Reactions of Food Ingredients**; Acree, Terry E. and Teranishi, Roy; *Flavor Science, Sensible Principles and Techniques*; **1993**, 10, 309-335; Washington DC; American Chemical Society.
- Schieberle, P.; **Primary Odorants in Popcorn**; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **1991**, 39, 1141-1144.

- Schieberle, P.; **Formation of Furanol in Heat-Processed Foods**; ACS symposium series; **1992**, 490 Flavour Precursors, 164-174.
- Schieberle, P.; Grosch, W.; **Potent odorants of rye bread crust-differences from the crumb and from wheat bread crust**; European Food Research and Technology; **1994**, 198, 292-296.
- Schieberle, P.; Hofmann, T.; **Evaluation of the Character Impact Odorants in Fresh Strawberry Juice by Quantitative Measurements and Sensory Studies on Model Mixtures**; Journal of Agricultural and Food Chemistry; **1997**, 45, 227-232.
- Schlegel, B. P.; Ratnam, K.; Penning, T. M.; **Retention of NADPH-Linked Quinone Reductase Activity in an Aldo-Keto Reductase Following Mutation of the Catalytic Tyrosine**; Biochemistry; **1998**, 37, 11003-11011;
- Schreier, P.; Mosandl, A.; **Aromaforschung heute**; Chemie in unserer Zeit; **1985**, 1, 22-31.
- Schwab, W.; **Application of Stable Isotope Ratio Analysis Explaining the Bioformation of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in Plants by a Biological Maillard Reaction**; Journal of Agricultural and Food Chemistry; **1998**, 46, 2266-2269.
- Schwab, W.; Roscher, R.; **4-Hydroxy-3(2H)-furanones: Natural and Maillard products**; Recent Research Developments in Phytochemistry; **1997**, 1, 643-673.
- Schwab, W.; Aharoni, A.; Raab, T.; Garcia Pérez, A.; Sanz, C.; **Cytosolic aldolase is a ripening related enzyme in strawberry fruits**; Phytochemistry; **2001**, 56, 407-415.
- Schwab, W.; **Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites?**; Phytochemistry; **2003**, 62, 837-849.
- Sparla, F.; Tedeschi, G.; Trost, P.; **NAD(P)H:(Quinone-Acceptor) Oxidoreductase of Tobacco Leaves Is a Flavin Mononucleotide-Containing Flavoenzyme**; Plant Physiology; **1996**, 112, 249-258.
- Sparla, F.; Tedeschi, G.; Pupillo, P.; Trost, P.; **Cloning and heterologous expression of NAD(P)H:quinone reductase of *Arabidopsis thaliana*, a functional homologue of animal DT-Diaphorase**; FEBS Letters; **1999**, 463, 382-386.
- Sundt, E.; **The development and future of flavour research**; Nearingsmiddelindustrien; **1970**, 23, 5-13.
- Takeoka, G. R.; Güntert, M.; Flath, R. A.; Wurz, R. E.; Jennings, W.; **Volatile Constituents of Kiwi Fruit (*Actinidia chinensis* Planch.)**; Journal of Agricultural and Food Chemistry; **1986**, 34, 576-578.
- Tedeschi, G.; Shiuan, C.; Massey, V.; **DT-Diaphorase, Redox Potential, Steady-State, and Rapid Reaction Studies**; The Journal of Biological Chemistry; **1995**, 270, 1198-1204.
- Thorn, J. M.; Barton, J. D.; Dixon, N. E.; Ollis, D. L.; Edwards, K. J.; **Crystal Structure of *Escherichia coli* QOR Quinone Oxidoreductase Complexed with NADPH**; Journal of Molecular Biology; **1995**, 249, 785-799.
- Tokitomo, Y.; Steinhaus, M.; Büttner, A.; Schieberle, P.; **Odor-active Constituents in Fresh Pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) by Quantitative and Sensory Evaluation**; Bioscience Biotechnology Biochemistry; **2005**, 69, 1323-1330.

- Trost, P.; Bonora, P.; Scagliarini, S.; Pupillo, P.; **Purification and Properties of NAD(P)H:(quinone-acceptor) Oxidoreductase of Sugarbeet Cells**; European Journal of Biochemistry; **1995**, 234, 452-458.
- Trost, P.; Foscarini, S.; Preger, V.; Bonora, P.; Vitale, L.; Pupillo, P.; **Dissecting the Diphenylene Iodonium-Sensitive NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase of Zucchini Plasma Membrane**; Plant Physiology; **1997**, 114, 737-746.
- Vollhardt, K. P. C.; Schore, N. E.; **Organische Chemie**; **1995**, 2. Auflage; Weinheim; VCH.
- Watson, L.; Dallwitz, M. J.; **The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information retrieval.**; <http://delta-intkey.com>; **1992**.
- Wein, M.; Lewinsohn, E.; Schwab, W.; **Metabolic Fate of Isotopes during the Biological Transformation of Carbohydrates to 2, 5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in Strawberry Fruits**; Journal of Agricultural and Food Chemistry; **2001**, 49, 2427-2432.
- Wein, M.; Lavid, N.; Lunkenbein, S.; Lewinsohn, E.; Schwab, W.; Kaldenhoff, R.; **Isolation, cloning and expression of a multifunctional O-methyltransferase capable of forming 2, 5-dimethyl-4-methoxy-3(2H)-furanone, one of the key aroma compounds in strawberry fruits**; The Plant Journal; **2002**, 31, 755-765.
- White, P. J.; **Recent advances in fruit development and ripening: an overview**; Journal of Experimental Botany; **2002**, 53, 1995-2000.
- Wijaya, C. H.; Ulrich, D.; Lestari, R.; Schippel, K. Ebert G.; **Identification of Potent Odorants in Different Cultivars of Snake Fruit [*Salacca zalacca* (Gaert.) Voss] Using Gas Chromatography-Olfactometry**; Journal of Agricultural and Food Chemistry; **2005**, 53, 1637-1641.
- Willhalm, B.; Stoll, M.; Thomas, A. F.; **2,5-Dimethyl 4-hydroxy-2,3-dihydrofuran-3-one**; Chem. Ind.; **1965**, 18, 1629-1630.
- Winski, S. L.; Faig, M.; Bianchet, M. A.; Siegel, D.; Swann, E.; Fung, K.; Duncan, M. W.; Moody, C. J.; Amzel, L. M.; Ross, D.; **Characterization of a Mechanism-Based Inhibitor of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 by Biochemical, X-ray Crystallographic, and Mass Spectrometric Approaches**; Biochemistry; **2001**, 40, 15135-15142.
- Wishart, D. S.; Knox, C.; Guo, A. C.; Shrivastava, S.; Hassanali, M.; Stothard, P.; Chang, Z.; Woolsey, J.; **DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration**; Nucleic Acids Research; **2006**, 34, D668-D672.
- Woodward, J. R.; **Physical and Chemical Changes in Developing Strawberry Fruits**; Journal for the Science of Food and Agriculture; **1972**, 23, 465-473.
- Wrobel, R. L.; Matvienko, M.; Yoder, J. I.; **Heterologous expression and biochemical characterization of an NAD(P)H:quinone oxidoreductase from the hemiparasitic plant *Triphysaria versicolor***; Plant Physiology Biochemistry; **2002**, 40, 265-272.
- Zabetakis, I.; Holden, M.A.; **A Study of Strawberry Flavour Biosynthesis**. In: Bioflavour 95: Analysis - Precursor studies - Biotechnology. P. Etievant und P. Schreier (Hrsg.); INRA Editions, Paris; **1995**, 211-216.
- Zabetakis, I.; Holden, M. A.; **The effect of 6-deoxy-D-fructose on flavour bioformation from Strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Elsanta) callus cultures**; Plant Cell, Tissue and Organ Culture; **1996 a**, 45, 25-29.

- Zabetakis, I., Grawshaw, J.W.; Robinson, D.S.; **The Biosynthesis of 2, 5-Dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one and its Derivatives in Strawberry.** In: Flavour Science - Recent Developments. A.J. Taylor und D.S. Mottram (Hrsg.); The Royal Society Chemostry, Cambridge; **1996 b**, 90-93.
- Zabetakis, I.; **Enhancement of flavour biosynthesis from strawberry (*Fragaria x ananassa*) callus cultures by *Methylobacterium* species;** Plant Cell, Tissue and Organ Culture; **1997 a**, 50, 179-183.
- Zabetakis, I.; Holden, M. A.; **Stawberry Flavour: Analysis and Biosynthesis;** Journal of the Science of Food and Agriculture; **1997 b**, 74, 421-434.
- Zabetakis, I.; Gramshaw, J. W.; **1,2-Propanediol in Strawberries and its Role as a Flavour Precursor;** Food Chemistry; **1998**, 61, 351-354.
- Zabetakis, I.; Gramshaw, J. W.; Robinson, D. S.; **2, 5-Dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one and its derivatives: analysis, synthesis and biosynthesis - a review;** Food Chemistry; **1999**, 65, 139-151.
- Zabetakis, I.; Moutevelis-Minakakis, P.; Gramshaw, J. W.; **The role of 2-hydroxypropanal in the biosynthesis of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Elsanta) callus cultures;** Food Chemistry; **1999**, 64, 311-314.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Klein Dorothee
Geburtsdatum: 09.10.1979
Geburtsort: Schweinfurt
Staatsangehörigkeit: deutsch
Adresse: Am Eichenberg 3
63872 Heimbuchenthal

SCHULISCHE AUSBILDUNG

1985 - 1989 Grundschule Sailauf
1989 - 1998 Hanns-Seidel-Gymnasium Hösbach
1998 Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM

1998 - 2002 Studium der Lebensmittelchemie
am Lehrstuhl für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Julius-
Maximilians-Universität Würzburg unter Herrn Prof. Dr. Peter Schreier
Okt. 2000 Vorexamen
Okt. 2002 1. Staatsexamen
Juni - Nov. 2006 Praktikum für Lebensmittelchemiker am Bayerischen Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Erlangen.
Abschluss des Praktikums mit dem 2. Staatsexamen

PROMOTION

Feb. 2003-Feb. 2006 Promotion am Fachgebiet für Biomolekulare Lebensmitteltechnologie
der TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Department für Lebensmittel
und Ernährung unter der Leitung von Prof. Dr. Wilfried Schwab.
2005 zehnwöchiger Forschungsaufenthalt an der Universidad de Córdoba,
in Córdoba, Spanien, Durchführung von in-situ-Hybridisierungs- und
Laser-capture-microdissection-Experimenten.

ANSTELLUNG

Seit Dez. 2006 Application Specialist Mass Spectrometry PSM Support, Applera
Corporation, Applied Biosystems, Darmstadt.