

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

Biosynthese von gelben Blütenfarbstoffen

verfasst von / submitted by

Aleksandra Simeonovic

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Master of Science (MSc)

Wien, 2022 / Vienna, 2022

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 862

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Chemie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dr. Christian Becker

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Heidi Halbwirth für die Möglichkeit, meine Masterarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen sowie für ihre Unterstützung und Motivation.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christian Becker, der mein Betreuer an der Universität Wien war.

Frau Dipl.-Ing. Silvija Marinovic danke ich für die Hilfe und Unterstützung während der gesamten Zeit und für die Möglichkeit viele verschiedene Arbeitsmethoden kennenzulernen. Bei Dc. Dipl.-Chem. Dr.rer.nat. Christian Molitor und MSc Julia Weissensteiner möchte ich mich für jegliche Unterstützung während des Arbeitsprozesses, Ihre Offenheit für Fragen und alle guten Ratschläge bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Daria Nitarska für ihre stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Vielen Dank auch allen Arbeitskollegen aus dem Institut für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Bedanken möchte ich mich bei Jürgen Greiner und Renate Paltram die im Labor immer vor Ort mit vielen konstruktiven und motivierenden Einfällen, mit Rat und Tat zur Seite standen. Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern Nadica und Zoran, meiner Schwester Tijana, meinem Freund Zivorad Stanojevic sowie meinen Großeltern für ihre immerwährende Unterstützung, Aufmunterung, Liebe und ihr Interesse an meiner Arbeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem besten Freund Stefan, der immer für mich da war, obwohl uns viele km trennen, mir immer auf meine wissenschaftlichen Fragen eine interessante Antwort gegeben und mich die ganze Zeit während meines Studiums im Ausland unterstützt hat.

Zusammenfassung

Pigmentmuster wie z.B. Punkte oder Linien auf Blütenblättern, dienen als Blütenmale zur Anlockung von Bestäubern und Samenverbreitern. Man unterscheidet zwischen sichtbaren und unsichtbaren Blütenmalen. Sichtbare Blütenmale entstehen durch die lokale Konzentration eines Pigments in Teilen der Blüte wie z.B. die purpurroten Punkte in den Blüten des Fingerhuts (*Digitalis* sp.). Manche Blüten enthalten aber auch für das menschliche Auge unsichtbare Markierungen, die auf die lokale Anreicherung von UV-absorbierenden Substanzen zurückzuführen sind. Das sind sogenannte UV-honey guides. *Rudbeckia hirta* ist eine Modellpflanze für die Untersuchung von UV-Blütenmalen. Die im Tageslicht einheitlich gelb gefärbten Blütenblätter von *R. hirta* weisen im UV-Licht zwei konzentrische Kreise auf, einen inneren dunklen und einen äußeren helleren. Zwei Arten von Pigmenten sind dafür verantwortlich: Carotinoide, die gleichmäßig über die Blüte verteilt und für die UV-Reflexion der äußeren Petalenhälften verantwortlich sind und im Inneren konzentrierte 6-Hydroxyflavonolderivate, die das UV-Licht absorbieren.

Obwohl die UV-honey guides und ihre physiologische Bedeutung bereits seit langem bekannt sind, ist die biochemische oder molekularbiologische Ursache ihrer Entstehung noch wenig erforscht. Insbesondere die Einführung einer zusätzlichen Hydroxygruppe an der Position 6 der Flavonole in den Asteraceae wurde bislang nur auf enzymatischer Ebene untersucht, da das dafür codierende Gen nicht bekannt ist.

Diese Masterarbeit beschreibt die Isolierung von cDNAs der Flavonol 6-Hydroxylase (F6H) aus *R. hirta* und *Tagetes erecta*. Die cDNAs wurden in Hefe funktionell exprimiert und das rekombinante F6H-Enzym aus *R. hirta* auf seine Substratspezifität untersucht. Dabei wurden die Enzymtests mit (¹⁴C)-markiertem Naringenin, Kämpferol, Quercetin, Dihydroquercetin, Apigenin und Eriodictyol als Substrate durchgeführt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die F6H in *R. hirta* eine hohe Spezifität für Flavonole aufweist und sowohl Kämpferol als auch Quercetin gute Substrate sind. Das Enzym wurde mit beiden Substraten im Detail charakterisiert. Durch kinetische Studien konnte gezeigt werden, dass Kämpferol das bevorzugte Substrat ist.

In Rahmen dieser Arbeit wurden auch die Enzymaktivitäten der Phenylalaninammoniumlyase, Chalkonsynthase, Flavanon 3-Hydroxylase, Dihydroflavonol 4-Reduktase, Flavonolsynthase und von inneren und äußeren Blütenteilen von *Rudbeckia hirta* untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Flavonoiden bei den meisten dieser Enzyme im inneren (dunkleren) Teil des Blütenblatts stattfindet. Neben der enzymatischen Aktivität wurde auch eine Genexpressionsanalyse von ausgewählten Genen der Flavonoid-Biosynthese durchgeführt. Basierend auf den Ergebnissen, die durch Experimente an dunkleren und helleren Teilen der Blütenblätter in voll entwickelten Blüten und in jungen Knospen von *R. hirta* erhalten wurden, kann gezeigt werden, dass bei manchen Genen die Genexpression in einem frühen Stadium der Blütenentwicklung, d.h. in jungen Knospen im dunkleren Teil der Blütenblätter, erfolgt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1 Rudbeckia hirta.....	2
1.2 Die Gattung Tagetes	3
1.3 Blütenfarbstoffe.....	3
1.4 Honey guides	6
1.5 Flavonoide	8
1.6 Einteilung der Flavonoide	9
1.7 Enzyme des Flavonoidbiosynthesewegs	11
1.8 Vorstufen der Flavonoidbiosynthese.....	12
1.9 Biosynthese der Chalkone	13
1.10 Biosynthese der Flavanone.....	14
1.11 Biosynthese der Flavone.....	14
1.12 Biosynthese der Dihydroflavonole.....	15
1.13 Biosynthese von Flavonole	15
1.14 Biosynthese der Leucoanthocyanidine	16
1.15 Biosynthese von Anthocyanidine	17
1.16 Modifikation von Flavonoiden.....	17
1.16.1 Hydroxylierung von Flavonoiden.....	17
1.16.2 Methylierung von Flavonoiden	20
1.16.3 Glykosylierung von Flavonoiden	20
1.16.4 Acylierung von Flavonoiden.....	20
2. Problemstellung.....	21
3. Material	22
3.1 Pflanzenmaterial	22
3.2 Bakterien- und Hefestämme.....	22
3.3 Chemikalien.....	22
3.4 Molekularbiologische Kits	23
3.5 Primer.....	24
3.6 Geräte	25
3.7 Puffer und Lösungen.....	25
3.7.1 TAE	25

3.7.2	TEK.....	26
3.7.3	TES-B*F.....	26
3.8	Tris/HCl Puffer 0,1 M	26
3.9	KP _i Puffer 0,1 M	26
3.10	Laufmittel.....	26
3.11	Nährmedien	27
3.11.1	Expressionsmedium	27
3.11.2	LB _{Amp}	27
3.11.3	SOC.....	27
3.11.4	SGI.....	28
3.11.5	YPGE.....	28
3.12	Plasmide	29
3.12.1	Vektoren für Hefe (<i>S. cerevisiae</i>).....	29
3.12.2	pYES 2.1-Vektor.....	29
4.	Methoden	30
4.1	Isolierung von RNA	30
4.2	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	30
4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
4.3.1	Die Komponenten der PCR.....	31
4.3.2	Primer design	32
4.3.3	High Fidelity-Proofreading PCR.....	33
4.3.4	Colony-PCR.....	34
4.3.5	Real-Time PCR	35
4.4	Agarosegelelektrophorese	37
4.4.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelelektrophorese	38
4.5	Die Klonierung von DNA-Fragmenten.....	39
4.5.1	Ligation	39
4.6	Transformation.....	40
4.6.1	Transformation in <i>E.coli</i> Top10 kompetenten Zellen.....	40
4.6.2	Transformation in <i>S. cerevisiae</i> kompetente Zellen INVSc1	40
4.7	DNA-Plasmid Isolierung.....	40
4.8	Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA	41
4.9	Heterologe Expression in <i>S. cerevisiae</i>	41
4.10	Proteinbestimmung nach Lowry	42

4.11	Enzymtests	44
4.12	Charakterisierung der F6H von <i>Rudbeckia hirta</i>	44
4.12.1	Bestimmung des pH-Optimums	45
4.12.2	Bestimmung des Temperaturoptimums.....	46
4.12.3	Bestimmung der Zeitlinearität	47
4.12.4	Bestimmung der Proteinlinearität	48
4.12.5	Substratspezifität.....	49
4.13	Präparation des Rohextraktes	50
4.14	Standardenzymtest	50
4.14.1	Phenylalaninammoniumlyase (PAL)-Bestimmung	50
4.14.2	Chalkonsynthase (CHS)-Bestimmung.....	51
4.14.3	Flavanon 3-Hydroxylase (FHT)-Bestimmung.....	51
4.14.4	Flavonolsynthase (FLS)-Bestimmung.....	52
4.14.5	Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR)-Bestimmung	53
5.	Ergebnisse	54
5.1	Flavonol 6-Hydroxylase der <i>Rudbeckia hirta</i> (<i>RhF6H</i>)	54
5.1.1	Klonierung und heterologe Expression der Flavonol 6-Hydroxylase	54
5.1.2	Nachweis der F6H-Aktivität (Nachweis der Enzymaktivität der rekombinanten F6H)	55
5.1.3	Charakterisierung der F6H	56
5.2	Nachweis von Enzymaktivitäten der Flavonoidbiosynthese in <i>Rudbeckia hirta</i>	60
5.2.1	Spezifische Aktivität von PAL	60
5.2.2	Spezifische Aktivität von CHS	61
5.2.3	Spezifische Aktivität von FHT	61
5.2.4	Spezifische Aktivität von DFR/F3'H	63
5.2.5	Spezifische Aktivität von FLS	64
5.3	Expressionsanalyse von Flavonoidgenen mittels qPCR in <i>Rudbeckia hirta</i>	65
5.3.1	Relative <i>F6H</i> -Expression.....	65
5.3.2	Relative <i>PAL</i> -Expression	65
5.3.3	Relative <i>CHS</i> -Expression	66
5.3.4	Relative <i>FLS</i> -Expression.....	67
5.3.5	Relative <i>F3'H</i> -Expression.....	67
5.3.6	Relative <i>GT</i> -Expression	68
5.3.7	Relative <i>RT</i> -Expression	69

5.4	Flavonol 6-Hydroxylase aus <i>Tagetes erecta</i> (TagF6H)	69
5.4.1	Klonierung und Heterologe Expression der Flavonol 6-Hydroxylase	69
6.	Diskussion	71
6.1	Charakterisierung der rekombinanten F6Hs aus <i>Rudbeckia hirta</i>	72
6.2	Flavonolbildung in <i>Rudbeckia hirta</i>	73
7.	Literaturverzeichnis	75

Abkürzungen

μL	Mikroliter
μM	mikromolar
Amp	Ampicillin
ANS	Anthocyanidinsynthase
Asc	L-Ascorbinsäure (Vitamin C)
Bq	Bequerel
BSA	Bovines Serumalbumin
CAW	Chloroform/Essigsäure/Wasser
cDNA	complementary DNA
CH3H	Chalkon 3-Hydroxylase
CHI	Chalkonisomerase
CHS	Chalkonsynthase
CoA	Coenzym A
DC	Dünnschichtchromatographie
DFR	Dihydroflavonol 4-Reduktase
DHK	Dihydrokämpferol
DHQ	Dihydroquercetin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dpm	disintegrations per minute
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F3'5'H	Flavonoid 3',5'-Hydroxylase
F3'H	Flavonoid 3'-Hydroxylase
F6H	Flavonol 6-Hydroxylase
F8H	Flavonol 8-Hydroxylase
FHT	Flavanon 3-Hydroxylase
FLS	Flavonolsynthase
FNS	Flavonsynthase
For	Forward
g	Gramm
GT	Glykosyltransferase
h	Stunden
HPLC	High-performance liquid chromatography
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalctopyranosid
kb	Kilobasen
K _m	Michaelis-Menten Konstante
Kpi	Kaliumdihydrogenphosphat
LB	Lysogeny broth
M	Mol

mA	Milliamper
max.	maximal
MCS	Multiple Cloning Site
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
mM	millimolar
mRNA	Messenger RNA
NADPH	β -Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphate reduziert
Nar	Naringenin
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OGT	O-Glucosyltransferase
OMT	O-Methyltransferase
PAL	Phenylalaninammoniumlyase
PCR	Polymerase Chain Reaktion
pH	potentia Hydrogenii
pmol	Picomol
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
Qu	Queretin
Rev	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotation per minute
rps18	Ribosomales 40S-Protein S18
RT	Reverse Transkriptase
FRT	Flavonol rhamnosyltransferase
Rubisco	Ribulose-1,5 biphosphat Carboxylase/-oxygenase
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDC	Sodium Deoxycholate
St.	Stadium
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
Taq-Polymerase	thermostabile DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1. Einleitung

Einer der wichtigsten Prozesse auf der Welt ist die Fortpflanzung, durch welche Pflanzen und Tiere die Verbreitung und das Überleben ihrer Art sichern. Die Vermehrung bei Pflanzen beginnt mit der Bestäubung, die zur Befruchtung und damit zur Bildung von Früchten und Samen führt. Die Bestäubung ist ein Prozess, bei dem Pollenkörner von den Staubblättern auf die Narbe der Fruchtblätter übertragen werden. Die Bestäubung von Pflanzen kann mit Hilfe von Wind, Wasser oder Tieren erfolgen, während nur wenige Pflanzen die Fähigkeit zur Selbstbestäubung entwickelt haben. Bei den meisten Pflanzenarten erfolgt die Bestäubung mit Hilfe von Insekten, Vögeln oder Fledermäusen. Bestäuber-Insekten oder Vögel landen auf der Suche nach Nahrung auf Blütenblättern, ernähren sich von Nektar und Pollen und bestäuben die Blüten.

Für eine erfolgreiche Bestäubung ist es entscheidend, dass die Pflanze den Bestäuber anlockt. Drei Eigenschaften können diese Interaktion auslösen: (1) Geruch, (2) Blütenfarbe und (3) Nährwert von Nektar und Pollen [32].

Wenn sich der Bestäuber der Pflanze nähert, ist das erste Signal, welches er normalerweise registriert, der Geruch. Da Tiere (insbesondere Insekten) bei der Kommunikation häufig auf Pheromone angewiesen sind, können sie auch duftende Bestandteile von Blumen erkennen - Terpene und andere flüchtige organische Verbindungen. Wenn der Bestäuber nahe genug kommt, registriert er auch ein visuelles Signal - die Farbe der Blüte (im sichtbaren und ultravioletten Bereich) gegenüber den umgebenden grünen Pflanzenteilen. Spezielle Blütenmuster (engl.: honey guides) auf der Blüte können das Insekt gezielter an jene Teile der Blüte führen, wo es mit nahrhaftem Nektar und Pollen belohnt wird [32].

1.1 *Rudbeckia hirta*

Die Gattung *Rudbeckia* (Rauher Sonnenhut, engl.: black-eyed susan) besteht aus 25 Arten von ein-, zwei- oder mehrjährigen Pflanzen, die ursprünglich aus Nordamerika stammen, aber schon seit langem in Europa angebaut werden. Diese Gattung gehört zur Familie der Asteraceae und wurde von Carl Linnaeus, einem schwedischen Botaniker und Taxonomen, zu Ehren seines Professors Olef Rudbeck Jr. und seines Vaters Olef Rudbeck Sr. benannt [25]; [43].

R. hirta blüht von Juli bis August. *R. hirta* kann eine ein- und zweijährige krautige Pflanze sein, deren Höhe zwischen 10-100 cm beträgt. Der Stängel ist aufrecht, nicht so verzweigt, rauhaarig und mit wenigen Blättern bestückt. Die Blätter sind unterschiedlich groß und haben lange Stiele. Man unterscheidet zwischen Grundblättern und Stängelblättern. Die Form der unteren Grundblätter ist in der Regel breit elliptisch, aber auch lanzettliche Blätter können auf der Pflanze gefunden werden. Die Ober- und Unterseite aller Blätter ist mit Haaren bedeckt (lateinisch: *hirtus*, *hirta*, *hirtum*), daher der Name *R. hirta*. Ganz oben am langen Stängel befindet sich ein Blütenkopf, dessen Breite 4-6 cm beträgt. Unter dem Blütenkopf sind die sogenannten Hüllenblätter, die in zwei oder drei Reihen organisiert und nach außen zurückgebogen sind. Im Inneren des Blütenkopfes befinden sich Röhrenblüten und Spreublätter, die ungefähr gleich groß sind, während an den äußersten Rändern Zungenblüten zu sehen sind. Die Farbe der Blütenblätter (Zungenblüten) variiert von gelb über orange bis rotbraun [53].



Abbildung 1: *R. hirta*, links: cv. *Indian Summer* [2], rechts: cv. *Sunbeckia Mia* [3]

1.2 Die Gattung Tagetes

Tagetes (Studentenblume, Samtblume, Englische Ringelblume) ist eine Gattung ein- und mehrjähriger, meist krautiger Pflanzen, die zur Familie der Korbblütler (Asteraceae) gehört. Diese Gattung umfasst etwa 50 Arten mit buschiger Form, intensivem Duft sowie verschiedenen Farben und Schattierungen. Sie stammt aus den trockenen und heißen Lebensräumen Nord- und Südamerikas, wird aber schon seit langem in Europa und auch weltweit kultiviert. *Tagetes* blüht von Juni bis zum ersten Frost und ist eine der bekanntesten Sommerblüher. *Tagetes* wird in zwei grundlegende Gruppen unterteilt: Amerikanisch, hoch (*Tagetes erecta* L.) Frankreich, niedrig (*Tagetes patula* L.) (Abbildung 2) [51].



Abbildung 2: *Tagetes*, links: *Tagetes erecta* [4], rechts: *Tagetes patula* [5]

1.3 Blütenfarbstoffe

Die Blütenfarbe entsteht durch das Vorhandensein von Pigmenten in Chloroplasten oder Vakuolen der Blütenzelle [32]. Während bei Tieren die Farbe auf der Reflexion und Brechung von Licht beruht, basiert sie bei Pflanzen hauptsächlich auf der Absorption durch verschiedene organische Verbindungen und der Wechselwirkung von Elektronen mit Sonnenlicht [69]. Die grüne Farbe der Blätter stammt von Chlorophyll a und b, die in Chloroplasten vorkommen und den größten Teil des einfallenden Lichts absorbieren und Licht im Bereich von 500-600 nm reflektieren, was der Wellenlänge von grünem Licht entspricht [46].

Die häufigste Klasse von Blütenpigmenten ist jene der Flavonoide, insbesondere Anthocyane, welche zur gelben, orangenen, roten, lila und blauen Pigmentierung beiträgt. Die drei wichtigsten Vertreter unter den Anthocyanen sind: Pelargonidin-Derivate, welche eine orange-rote Farbe bewirken, Cyanidin-Derivate, wodurch magentarote Pigmente entsteht, und Delphinidin-Derivate, welche blau-violette Farbtöne ergeben. Diese Grundverbindungen unterscheiden sich strukturell nur in der Substitution (genauer in der Anzahl der OH-Gruppen) am B-Ring [32]. Sie erscheinen einzeln oder in Kombination in den Blütenständen

und ergeben eine Reihe möglicher Schattierungen - von rosa, scharlachroten und rot-orangen Blüten mit Pelargonidin über karmesinroten und magentafarbenen Blüten mit Cyanidin bis hin zu rosa-violetten und blauen Blüten mit Delphinidin.

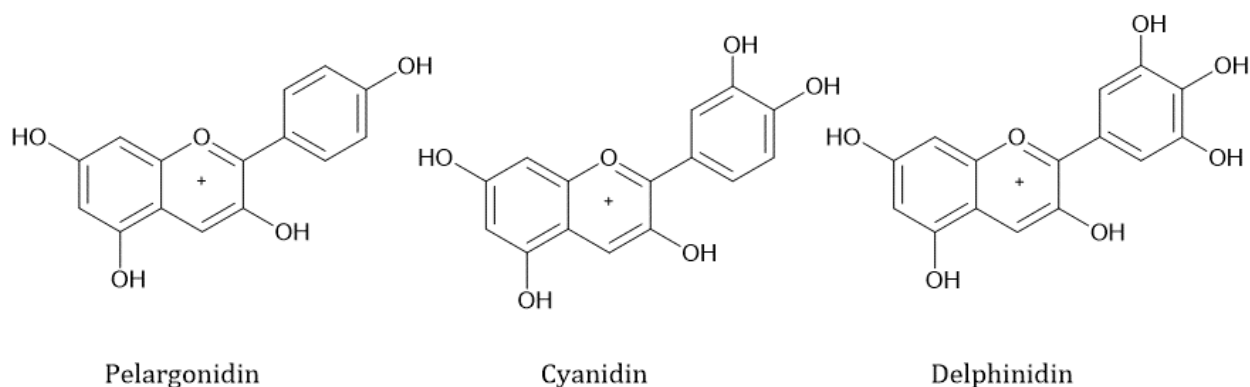


Abbildung 3: Anthocyanidine mit verschiedenen Hydroxylierungsstufen im B-Ring

Die Farbe von Anthocyanen wird durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst: Hydroxylierungsmuster, Pigmentkonzentration (bei niedriger Pigmentkonzentration kann die Farbe rosa sein, bei hoher Konzentration Rot und bei sehr hoher Konzentration Schwarz), das Vorhandensein von Copigmenten (Flavonoiden / Flavonolen), das Vorkommen von chelatbildenden Metallen, die Anwesenheit von aromatischen Acylsubstituenten (Phenolsäurereste), Glykosylierung der OH-Gruppe am B-Ring, Methylierung der OH-Gruppe sowie das Vorkommen anderer Pigmente. Durch Methylierung freier OH-Gruppen wird der Rotanteil des Farbstoffes leicht verstärkt (Vertiefung des Rottens) und das Anthocyanidin weiter stabilisiert. Eine Stabilisierung ohne Beeinträchtigung der Farbe wird auch durch Glykosylierung in Position 3 (manchmal 5, selten 3') erreicht. Alle Anthocyanidine treten *in vivo* als Glykoside (Anthocyane) auf [32].

Es gibt zwei Arten der Anthocyanidin-Copigmentierung inter- und intramolekular. Die intramolekulare Copigmentierung entsteht durch lose gebundene Flavone / Flavonole. Bisher dachte man, dass die einzige Funktion dieser Flavonoide in der Blüte darin besteht, den Farbton in Richtung Blau zu verschieben. Heute ist bekannt, dass alle Anthocyan-gefärbten Blüten, also nicht nur die blauen, Anthocyanidine und Flavone oder Flavonole (als Glykoside) enthalten (wobei das relative Verhältnis von Anthocyan-Flavon / Flavonol von Art zu Art variiert) was hauptsächlich dazu beiträgt, Pigmente bei einem pH-Wert des Blütensafts von 4,5 zu stabilisieren. Das Auftreten der Blaufärbung in Blüten kann auch durch das Vorhandensein einer aromatischen Acylierung (eine aromatische Hydroxyzimtsäure, die über den Zucker kovalent an das Anthocyanidin gebunden ist), die als intramolekulare Copigmente wirken, geschehen. Diese Gruppen stabilisieren das Molekül und schützen den Anthocyanidin-Chromophor vor dem Angriff durch Nukleophile (OH⁻). Neben Copigmenten sind einige Blaupigmente Komplexe mit Metallionen wie Mg²⁺ und Al³⁺. In Hortensienblüten beispielsweise erscheint das blaue Pigment in Form eines Komplexes mit Aluminium.



Abbildung 4: Blüten der Hortensie [23]

Die Farbe des Anthocyans kann unter anderem durch den pH-Wert der Umgebung beeinflusst werden, in der sich das Anthocyan befindet. Ein Beispiel dafür ist Kohl, der in einer sauren Umgebung eine rote Farbe und in einer alkalischen Umgebung eine blaue Farbe hat. Eine weitere sehr häufige Gruppe ist jene der Carotinoide, welche der Blüte eine typisch gelbe Farbe verleihen, obwohl auch Orange- und Rottöne auftreten. Intensiv orange Blüten können beispielsweise erhebliche Mengen an β -Carotin (z. B. in Narzissen) oder Lycopin (Ringelblume) enthalten. Andere Pigmente wie Chlorophyll (grün), Chinon (manchmal rot oder gelb), Betalaine (gelb rot oder lila) sind weniger häufig als Flavonoide und Carotinoide. In einigen Fällen kann die Farbe auch aus einer Mischung mehrerer unabhängiger Pigmente entstehen. In der Familie der Asteraceae kommen auch gelbe Flavonoide und gelbe Carotinoide vor. Die Verwendung zweier unabhängiger Wege für die Synthese des gelben Pigments mag wie eine unnötige Verschwendung von zellulären Ressourcen erscheinen, aber tatsächlich haben diese beiden Klassen eine völlig unterschiedliche UV-Absorption, was die Bildung von Mustern ermöglicht, welche Insekten zu den Blütenblättern leiten (engl.: honey guides).

Für die Färbung der gelben Flavonoide tragen Flavonole, Chalkone und Aurone am häufigsten bei. Flavonole wie Gossypetin und Quercetagenin (und deren Derivate) sind für die Farbe der Baumwollblüte (*Gossypium hirsutum*, Malvaceae), von Primel (*Primula vulgaris*, Primulaceae), *Chrysanthemum segetum* (Asteraceae), etc. verantwortlich. Das Vorkommen der OH-Gruppe in den Positionen 6 und 8 ist für eine intensive gelbe Farbe notwendig [32]. So wird die gelbe Farbe der Blüte bei der Gattung *Rudbeckia* und *Tagetes* durch das Vorhandensein von Quercetagenin (welches in Position 6 eine OH-Gruppe besitzt) erzeugt.

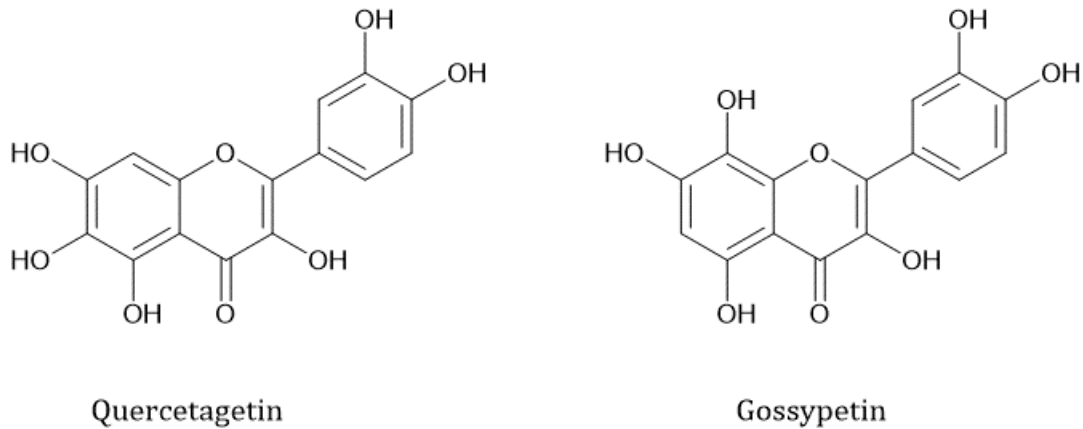


Abbildung 5: Chemische Struktur von Quercetagenin und Gossypetin, zwei Flavonole, die für die gelbe Färbung verantwortlich sind.

Aurone und Chalkone (generell: Anthochlore), die oft zusammen auftreten, kommen vor allem in den Gattungen *Coreopsis* und *Dahlia* der Familie der Asteraceae vor, obwohl sie auch in anderen Familien vorkommen können. Ihre Anwesenheit in gelben Blütenblättern lässt sich leicht durch Ammoniakwirkung zeigen, was zur Entwicklung einer roten Farbe führt. Neben Pflanzen mit farbigen Blüten können in der Natur auch Pflanzen mit weißen oder blassen Blüten vorkommen, was jedoch nicht bedeutet, dass Bestäuber sie nicht bemerken. Diese Pflanzen verwenden UV-Pigmente oder Verbindungen, die im UV-Bereich eine Absorption zeigen. Dazu zählen Verbindungen aus der Klasse der Flavone (Luteolin, Apigenin) und Flavonole (Quercetin, Kämpferol).

1.4 Honey guides

Blütenmale (engl.: honey guides) sind Muster auf einer Blüte, welche die Funktion haben, bestäubende Insekten zum Zentrum der Blüte zu führen, wo sich Fortpflanzungsorgane und der Nektar befinden. Sie treten besonders bei Blüten auf, die Bienen bestäuben [32].

Die meisten dieser Muster oder Markierungen sind für das menschliche Auge sichtbar und erscheinen als Punkte oder Linien auf den Blütenblättern, als Kontrastfarbe zur Farbe des Blütenblatts (z. B. gelber Punkt auf blauem Blütenblatt bei *Cymbalaria muralis*, Plantaginaceae) [32].

Neuere Forschungen haben gezeigt, dass es auch für das menschliche Auge unsichtbare Blütenmale gibt, da sie auf UV-Absorption basieren.

Sichtbare Hinweise resultieren oft aus der lokalen Konzentration eines bestimmten Anthocyanpigments in bestimmten Teilen der Blüten. So stammt z.B. bei *Digitalis purpurea* (Plantaginaceae) die rosa Farbe der Glockenkrone (Blüte) vom Pigment Cyanidin, während eine Reihe von purpurroten Punkten, welche die Blütenmale darstellen, aus konzentriertem Cyanidin stammen (Abbildung 6).

Beim roten Klatschmohn der *Papaver*-Arten kommt es zur lokalen Bildung von Pigmenten, die in anderen Teilen des Blütenblattes nicht vorhanden sind, sodass das Grundpigment des Blütenblattes Pelargonidinglykosid (Pelargonidin 3-Sophorosid) ist, während im inneren

Bereich der Blütenblätter schwarze Flecken aufgrund der Akkumulation von sehr großen Mengen an Cyanidinglykosiden (Cyanidin 3-Glukosid) erscheinen.



Abbildung 6: Beispiel für sichtbare honey guides (links: *Digitalis purpurea*) [1] und für unsichtbare honey guides (rechts: *R. hirta*) [2]

In der Natur kommen oft Blumen vor, bei denen für das menschliche Auge keine Blütenmale sichtbar sind. Dies verhindert jedoch nicht, dass Insekten sie entdecken und bestäuben können. Im Gegenteil, diese Blüten haben für das menschliche Auge unsichtbare Markierungen, die auf die lokale Anreicherung von UV-Pigmenten zurückzuführen sind [49].

Die erste Art, bei der UV-Blütenmale nachgewiesen wurden, war die *R. hirta* (Abbildung 6).

Thompsons Forschungen aus dem Jahr 1972 zeigten [68], dass die Blütenblätter unter Tageslicht einheitlich gelb waren, während die äußeren Teile der Blütenblätter unter UV-Licht reflektierend und hell, der innere Teil der Blütenblätter absorbierend und dunkel war. Er kam zu diesem Schluss, indem er die Blüten von *R. hirta* unter UV-Licht beobachtete, wo er zwei konzentrische dichromatische Kreise bemerkte, den inneren dunkleren und den äußeren helleren. Dieser innere dunklere Teil wird von den Insekten wahrgenommen, die gegenüber UV-Absorption empfindlich sind [6].

Die chemische Analyse ergab das Vorhandensein von zwei Arten von Pigmenten: Carotinoide, die gleichmäßig in der Blüte verteilt und für die UV-Reflexion verantwortlich sind und Bienen aus großer Entfernung anlocken, sowie Flavonoide (Mischung aus drei wasserlöslichen Flavonolen: Quercetagenin, Patulitrin und 6,7-Dimethoxyquercetin), die sich in UV-absorbierenden Zonen (oder dem inneren Teil der Blüte) befinden und die Funktion haben, Bienen, die bereits auf der Blüte gelandet sind, zum Nektar zu führen [68].

Neben der Fähigkeit, UV-Licht zu absorbieren, sind sie neben den Carotinoiden auch für die Bildung der gelben Blütenfarbe verantwortlich [31] [34].

Neben Flavonolen können auch andere Flavonoidklassen die Rolle von UV-Pigmenten wie Chalkone, Aurone usw. spielen, unabhängig von ihrer Farbe zeigen sie alle eine intensive Absorption im UV-Bereich [33].

1.5 Flavonoide

Flavonoide stellen die größte Gruppe der pflanzlichen Polyphenole dar, sie sind Sekundärmetaboliten mit großer Verbreitung in der Pflanzenwelt. Dies sind lösliche Pigmente, die in den Wurzeln, Blättern, Samen, der Epidermis von Früchten und in den Blüten höherer Pflanzen vorkommen und bei der Verarbeitung von Obst und Gemüse zu Saft werden, in dem sie gut löslich sind. Sie sind an der Färbung von Blumen sowie an der Bildung von UV-aktiven honey guides beteiligt. Bis heute wurden über 6.000 Verbindungen aus dieser Gruppe isoliert [30].

Flavonoide weisen eine große Anzahl biologisch signifikanter Aktivitäten auf, wie z. B. antioxidative Aktivität. Antioxidantien reduzieren beim Menschen oxidative Schäden, die durch freie Radikale oder aktive Sauerstoffspezies unter oxidativen Stressbedingungen verursacht werden können. Da sie ein breites Spektrum an antioxidativen Eigenschaften aufweisen, sind sie in der Lage, Metallionen zu binden und Chelate zu bilden sowie Radikalbildungsreaktionen zu unterbrechen. Flavonoide spielen eine wichtige Rolle bei der Vorbeugung einer Vielzahl chronischer und degenerativer Erkrankungen sowie bei der Vorbeugung bestimmter bösartiger Erkrankungen und Herz-Kreislauf-Störungen.

Verschiedene in vitro- und in vivo-Studien haben gezeigt, dass Flavonoide antioxidative, antimutagene, antivirale, antimikrobielle, entzündungshemmende, krebsbekämpfende und immunmodulatorische Wirkungen besitzen [13, 15, 52].

Quercetin ist eines der wichtigsten Bioflavonoide, die in den meisten Pflanzen vorkommen. Die biologische Aktivität vieler Pflanzen hängt von ihrem Inhalt ab. Quercetin ist an der Blockierung mehrerer Entzündungsprozesse beteiligt, daher ist es ein sehr gutes entzündungshemmendes Mittel. Es kann die Synthese und damit die Freisetzung von Histamin und anderen Entzündungsmediatoren blockieren, wodurch das Risiko einer Ansammlung von Entzündungsmediatoren an den Innenwänden von Arterien verringert wird [7].

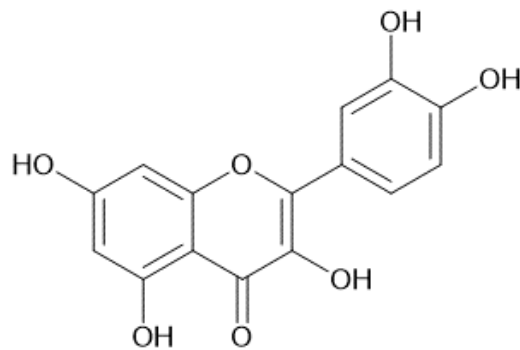


Abbildung 7: Chemische Struktur von Quercetin

Im Allgemeinen kommt der Begriff "Flavonoide" von dem lateinischen Namen flavus, was gelb bedeutet. Der Begriff wird verwendet, um eine Gruppe von chemischen Verbindungen zu beschreiben, deren Hauptstrukturgerüst aus 15 C-Atomen besteht, die in der Grundstruktur C6-C3-C6 angeordnet sind. Sie bestehen aus zwei aromatischen Ringen (A und B), die durch einen heterocyclischen Ring C miteinander verbunden sind. Diese Grundstruktur wird als Flavan bezeichnet, d.h. (2-Phenylchroman). Chalkone und Aurone sind zwar biochemisch mit Flavonoiden verwandt, werden aber nicht als Flavonoide betrachtet, da sich ihre chemische Struktur vom Flavan unterscheidet und es auch Unterschiede in der Nummerierung ihrer Ringsysteme gibt.

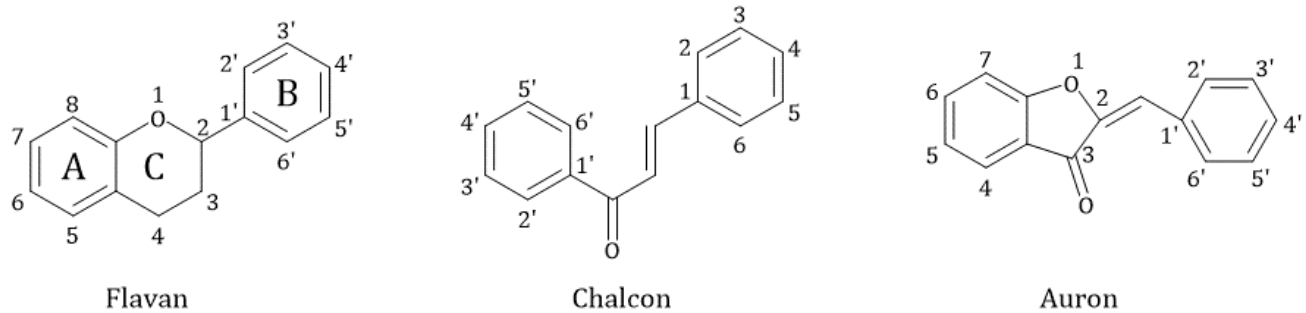


Abbildung 8: Nummerierung der Flavonoide, Chalkone und Aurone

1.6 Einteilung der Flavonoide

Die Flavonoidklassen unterscheiden sich nach dem Oxidationszustand des heterocyclischen Rings C. Somit differenziert man:

- Flavan
- Catechin
- Flavan 3,4-diol
- Flavanon
- Flavon
- Dihydroflavonol
- Flavonol
- Anthocyanidin

Die Strukturen dieser Verbindungen sind in der folgenden Abbildung 9 dargestellt.

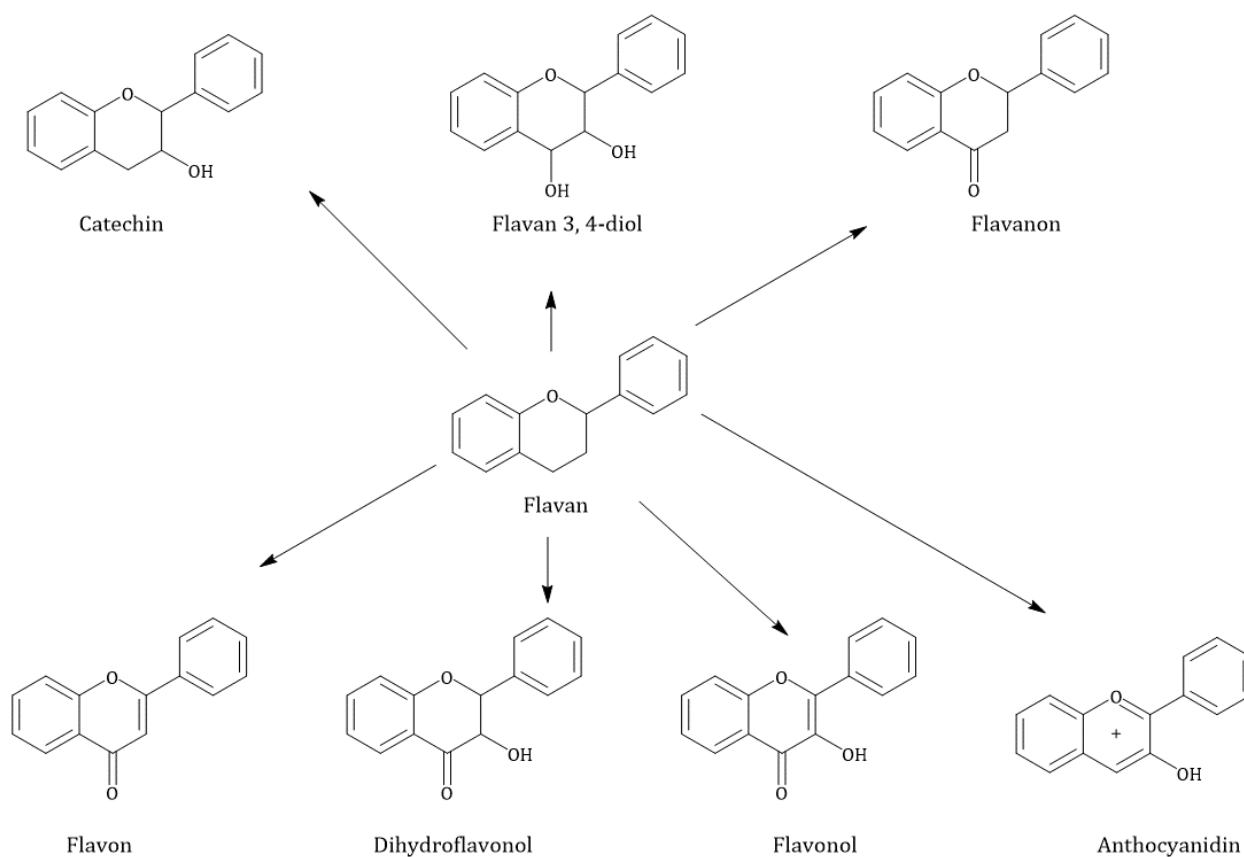


Abbildung 9: Einteilung der Flavonoide nach dem Oxidationszustand des Pyranrings

Modifikationen wie Hydroxylierung, Methylierung, Acylierung und Glykosylierung kommen innerhalb der Klasse der Flavonoide häufig vor. Somit können diese Modifikationen zu Veränderungen der Eigenschaften von Verbindungen wie Löslichkeit und Absorptionsverhalten führen und zur chemischen Stabilität beitragen.

1.7 Enzyme des Flavonoidbiosynthesewegs

Abbildung 10 gibt einen Überblick über den gesamten Flavonoidbiosyntheseweg. Die Abbildung gibt auch eine Übersicht über die an der Biosynthese der Flavonoide beteiligten Enzyme sowie über die Reaktionsschritte, die von ihnen katalysiert werden.

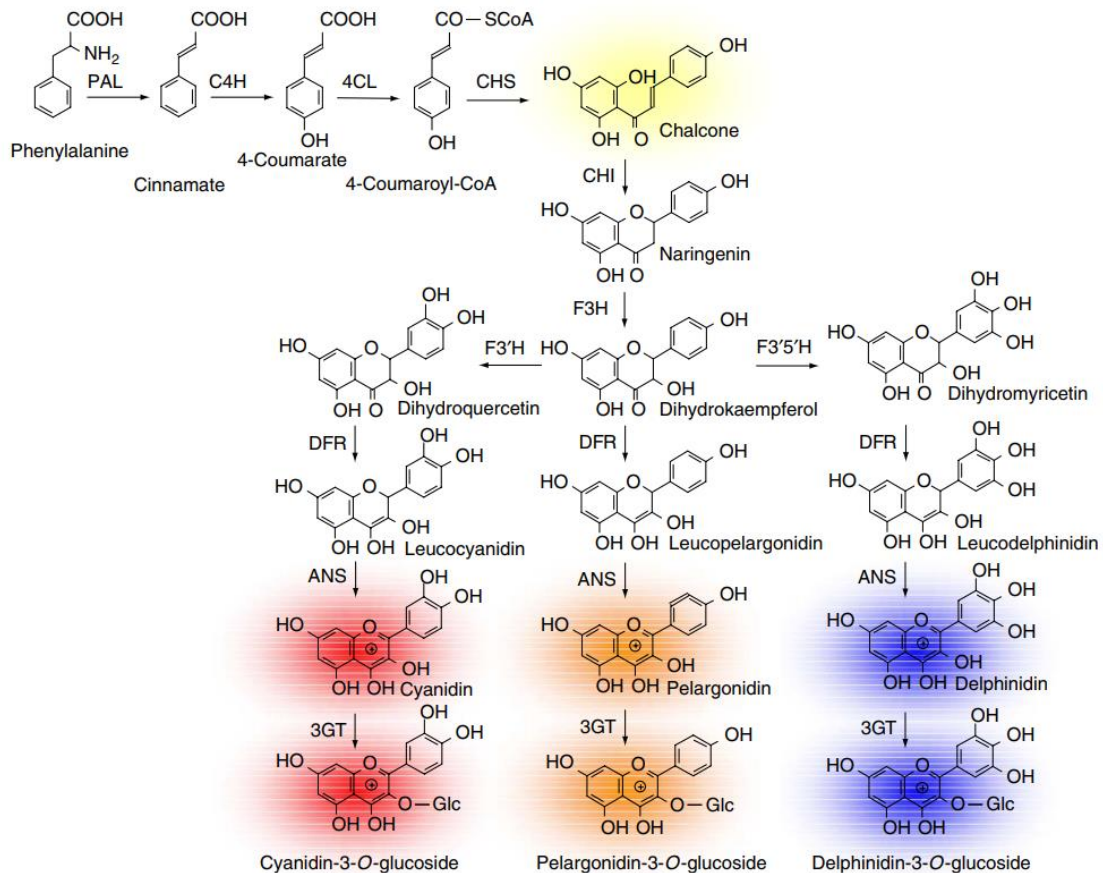


Abbildung 10: Übersicht über die Flavonoidbiosynthese [67]

1.8 Vorstufen der Flavonoidbiosynthese

Vorläufer in der Biosynthese der meisten Flavonoide sind Malonyl-CoA und der entsprechende *p*-Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester, am häufigsten *p*-Cumaroyl-CoA, oder auch Caffeoyl-CoA. Unter dem Einfluss des Enzyms Acetyl-CoA-Carboxylase reagiert Acetyl-CoA mit CO₂, was zur Biosynthese von Malonyl-CoA führt.

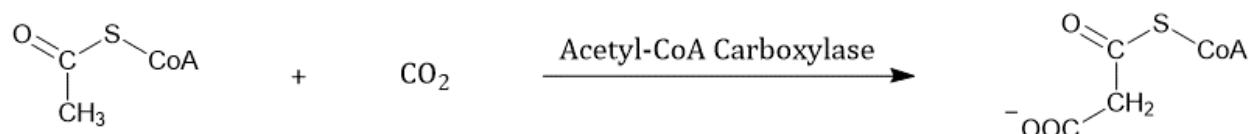


Abbildung 11: Synthese von Malonyl-CoA aus Acetyl-CoA durch Acetyl-CoA Carboxylase.

Die *p*-Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester sind nicht nur die Hauptvorstufen für die Synthese der meisten Flavonoide, Chalkone und Aurone, sondern auch Vorstufen für die Biosynthese vieler anderer Phenylpropane wie Lignin, Stilbene, Cumarine, etc. [22]

Die Phenylalaninammoniumlyase (PAL) katalysiert die Freisetzung der Amino- und Carboxylgruppen aus Phenylalanin, die zur Bildung von trans-Zimtsäure führt. Durch die Einführung einer Hydroxylgruppe an der para-Position der Zimtsäure wird *p*-Cumarsäure gebildet. Diese Reaktion wird durch das Enzym Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H) katalysiert.

Das Enzym *p*-Cumaroyl-CoA Ligase wandelt die *p*-Cumarsäure in *p*-Cumaroyl-CoA um. Mit Hilfe des Enzyms *p*-Cumaroyl-CoA 3-Hydroxylase wird die Hydroxylgruppe in Position 3 eingeführt, um Caffeoyl-CoA zu bilden (Abbildung 12).

Da diese Verbindungen eine Phenylgruppe und eine Seitenkette aus 3 C-Atomen enthalten, werden sie Phenylpropanoide genannt.

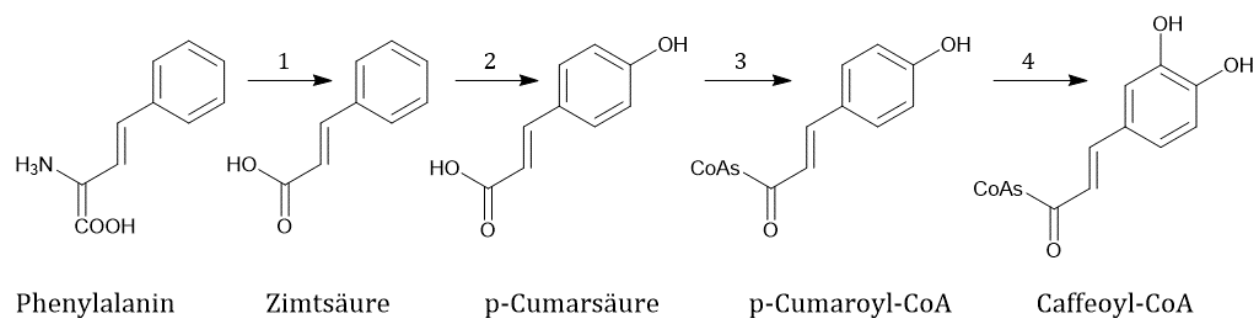


Abbildung 12: Biosynthese der Hydroxyzimtsäureester. 1: Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), 2: Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H), 3: *p*-Cumaroyl-CoA-Ligase (4CL), 4: *p*-Cumaroyl-CoA-Hydroxylase (CC3H).

1.9 Biosynthese der Chalkone

Im Biosyntheseweg der Flavonoide kommt es zunächst zur Bildung von Naringeninchalkon, aus dem später andere Klassen von Flavonoiden, aber auch Aurone und 6'-Desoxychalkone gebildet werden. Das Enzym, das die Bildung des Naringeninchalkons katalysiert, heißt Chalkonsynthase (CHS). Dieses Enzym wurde erstmals in Petersilie (*Petroselinum crispum*) nachgewiesen [44].

Das häufigste Substrat für die Chalkonsynthase ist *p*-Cumaroyl-CoA, aber zusätzlich dazu (bei den meisten Pflanzenarten) können *in vitro* einige andere *p*-Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester akzeptiert werden, wie z.B. Caffeoyl-CoA oder Cinnamoyl-CoA [62].

Das Enzym Chalkonsynthase selbst katalysiert die Reaktion zwischen drei Molekülen Malonyl-CoA und einem Molekül *p*-Cumaroyl-CoA zu Narinigininchalkon oder 6'-Hydroxychalkon, welches im B-Ring in Position 4 nur eine Hydroxylgruppe enthält. Aus Caffeoyl-CoA entsteht ein Eriodictyolchalkon (das im B-Ring zwei Hydroxylgruppen in Position 3 und 4 enthält).

Studien von Spribille und Forkmann, 1982, zeigten, dass das Enzym *in vivo* kein Caffeoyl-CoA als Substrat verwendet, wie durch Inkubation des Enzyms mit beiden Substraten festgestellt wurde, wobei nur *p*-Cumaroyl-CoA umgesetzt wurde. Daraus kann geschlossen werden, dass das Enzym Chalkonsynthase unter natürlichen Bedingungen *p*-Cumaroyl-CoA als Substrat bevorzugt.

Neu gebildete Chalkone reichern sich sehr selten im Pflanzengewebe an, da sie unter dem Einfluss der Chalkonisomerase sehr schnell stereospezifisch zu 2S-Flavanonen zyklisieren, die in weiterer Folge Intermediate für die Bildung anderer von Flavonoidklassen darstellen [39].

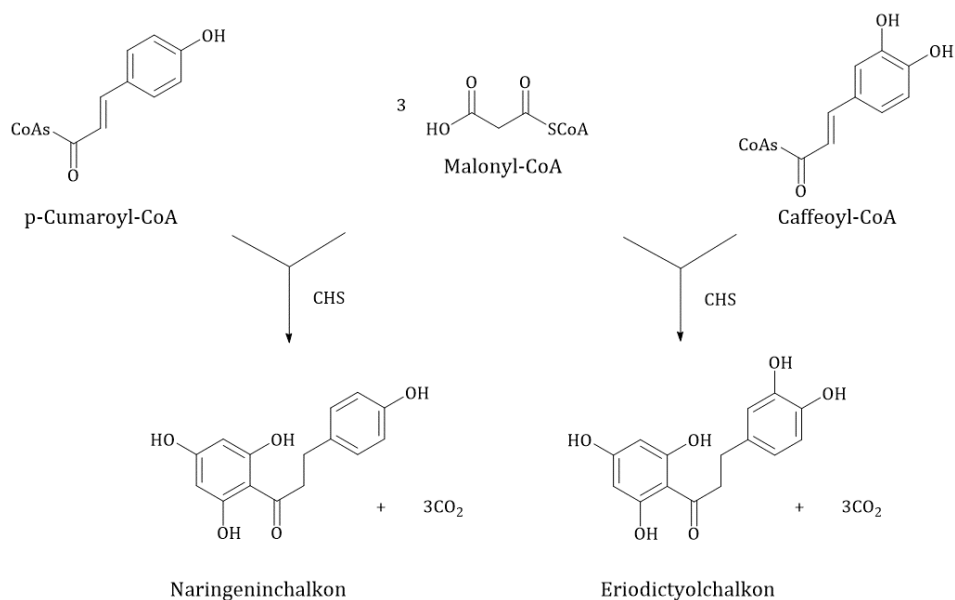


Abbildung 13: Biosynthese von Naringeninchalkon bzw. Eriodictyolchalkon

1.10 Biosynthese der Flavanone

Die Chalkonisomerase wurde erstmals in Sojabohnen nachgewiesen [54, 55]. Dieses Enzym katalysiert eine Reaktion, bei der eine stereospezifische Zyklisierung eines Chalkons auftritt, um 2S-Flavanone zu bilden, die Substrate für andere Enzyme im Biosyntheseweg darstellen. Die Zyklisierungsreaktion kann enzymatisch oder chemisch bzw. spontan sein. Eine chemische oder spontane Zyklisierung tritt auf, wenn die Chalkonisomerase nicht in den Zellen vorhanden ist. Dann wird ein racemisches Gemisch gebildet, das die beiden Enantiomere 2S- sowie 2R-Flavanon enthält. Da in der weiteren Biosynthese nur 2S-Flavanone verwendet werden, reichern sich 2R-Flavanone in Zellen an (z.B. bei Pflanzen, deren Blüten gelb sind). Die Anreicherung von 6'-Hydroxychalkonen in gelben Blüten von Nelken (*Dianthus caryophyllus*) und Sommeraster (*Callistephus chinensis*) wurde durch einen Mangel an CHI-Aktivität verursacht [19, 45, 66].

CHI-cDNA wurde zuerst aus französischen Bohnen im Prozess der Immunpräzipitation unter Verwendung von CHI-Antiserum isoliert [50].

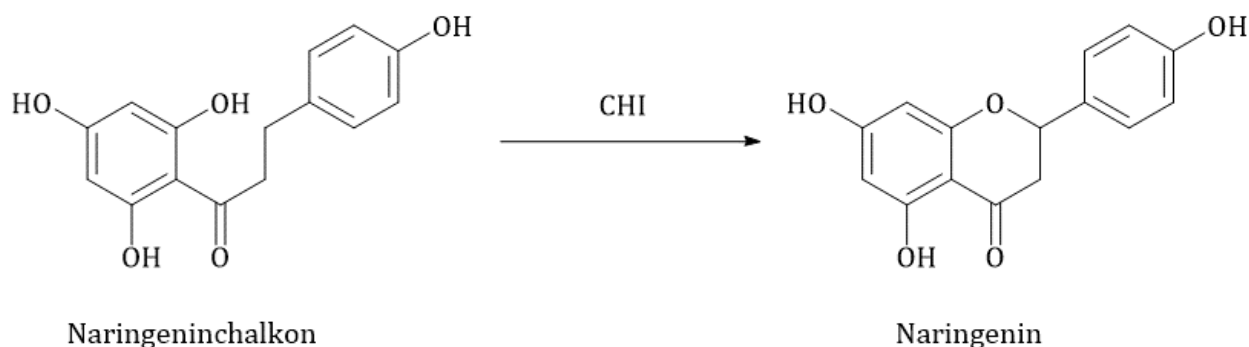


Abbildung 14: Biosynthese von Naringenin

1.11 Biosynthese der Flavone

Die Flavonsynthase (FNS) ist ein Enzym, das die Einführung einer Doppelbindung zwischen den C2- und C3-Atomen im Pyran-Ring von Flavanonen katalysiert, wodurch die Struktur der entsprechenden Flavone entstehen. Man unterscheidet zwei Arten von Flavonsynthasen: FNS I und FNS II.

FNS I ist löslich und gehört zur Klasse der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen, die als Cofaktoren molekularen Sauerstoff, 2-Oxoglutarat, Fe^{2+} und Ascorbat verwendet. Dieses Enzym wurde bisher nur in der Pflanzenfamilie Apiaceae gefunden. Im Gegensatz dazu wurde die FNS II, ein mikrosomales Enzym, bisher in den meisten Pflanzen identifiziert. Dieses Enzym gehört zur Klasse der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen, die NADPH als Cofaktor verwenden [48].

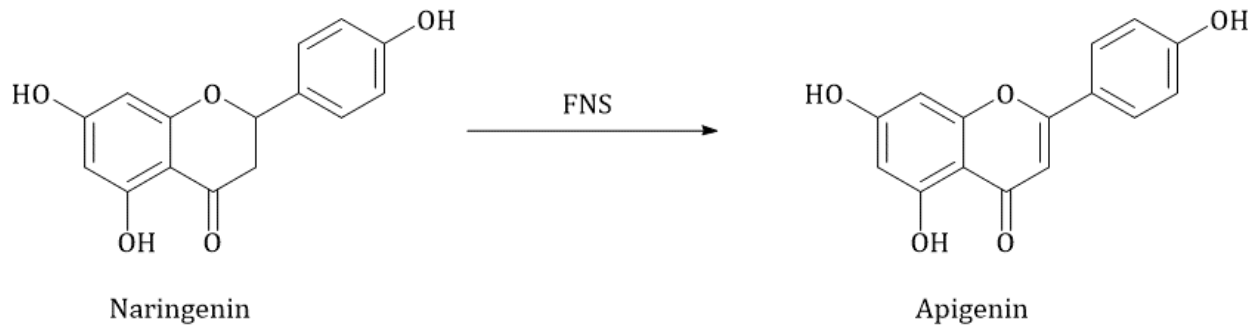


Abbildung 15: Biosynthese von Apigenin

1.12 Biosynthese der Dihydroflavonole

Das Enzym Flavanon 3-Hydroxylase (FHT) wurde erstmals im Enzymextrakt von *Matthiola incana* [20] nachgewiesen und später insbesondere in *Antirrhinum* und *Petunia* detailliert charakterisiert [11, 21].

Dieses Enzym katalysiert die stereospezifische Hydroxylierung von 2S-Flavanon an der C3-Position, um 2R, 3R-Dihydroflavonol zu bilden. FHT benötigt als Cofaktoren 2-Oxoglutarat, Fe^{2+} und Ascorbat sie zählt daher zur Gruppe der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen.

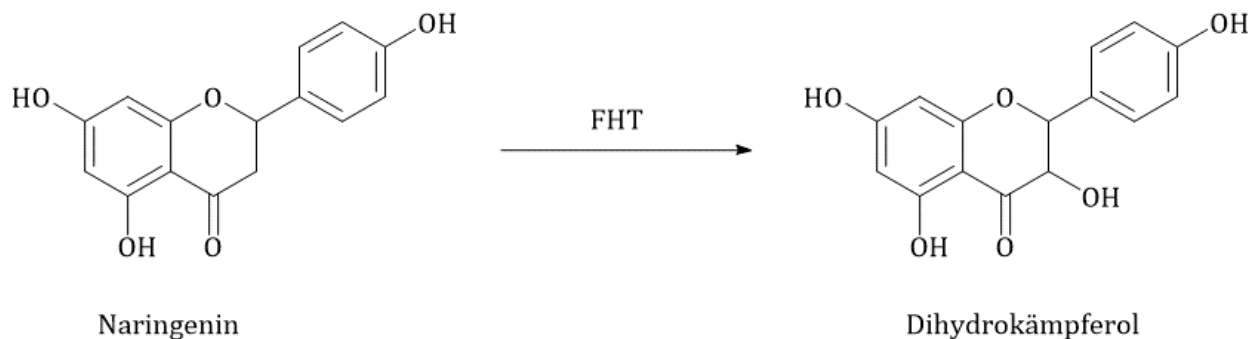


Abbildung 16: Biosynthese von Dihydrokämpferol

1.13 Biosynthese von Flavonole

Die Flavonolsynthase (FLS) katalysiert eine Reaktion, bei der Dihydroflavonole in Flavonole umgewandelt werden. Dadurch wird eine Doppelbindung zwischen den C2- und C3-Atomen im Pyranring eingeführt. Es verwendet 2-Oxoglutarat, Fe^{2+} und Ascorbat als Cofaktoren und gehört damit auch zu den 2-Oxyglutarat-abhängigen Dioxygenasen. Dieses Enzym wurde zuerst charakterisiert, indem das Enzym aus einer Petersilienzellkultur isoliert wurde, die während des Wachstums oder der Reproduktion mit UV-Licht bestrahlt wurde [12]. Zu den bekanntesten Flavonolen zählen Quercetin, Kämpferol und Myricetin.

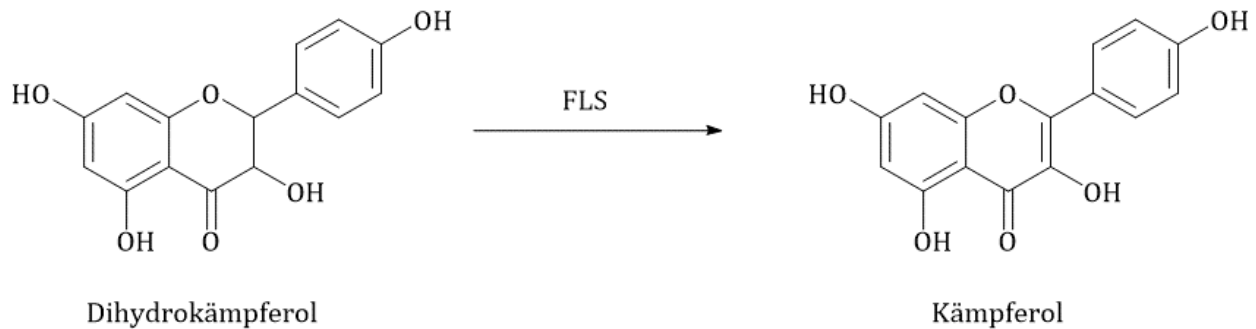


Abbildung 17: Biosynthese von Kämpferol

1.14 Biosynthese der Leucoanthocyanidine

Die Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR) katalysiert die stereospezifische Reduktion von Dihydroflavonolen zu Flavan-2,3-trans-2,4-cis-Diolen oder Leucoanthocyanidinen unter Verwendung von NADPH als Cofaktor.

Zunächst wurde anhand der Extraktion der DFR aus einer Douglasien-Zellkultur (*Pseudotsuga menziesii*) festgestellt, dass das gebildete Leucoanthocyanidin eine Vorstufe für die weitere Synthese der Catechine und Proanthocyanidine ist [64].

Später wurde anhand der Isolierung dieses Enzyms aus dem Blütenextrakt von *Matthiola incana* erkannt, dass die Aktivität von DFR auch für die weitere Synthese von Anthocyanen verantwortlich ist [35].

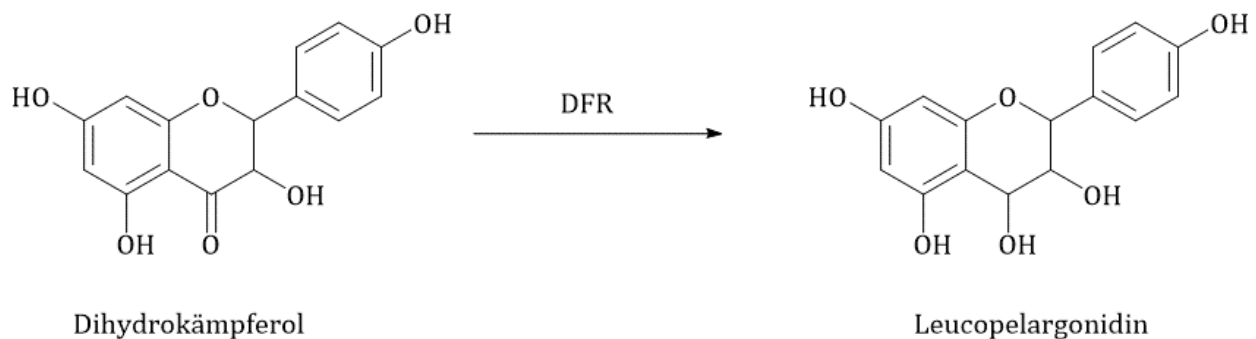


Abbildung 18: Biosynthese von Leucopelargonidin

1.15 Biosynthese von Anthocyanidinen

Die Anthocyanidinsynthase (ANS) katalysiert die Reaktion, um aus farblosen Leucoanthocyanidinen farbige Anthocyanidine zu erhalten. Die Aktivität dieses Enzyms wurde zuerst in vitro anhand der rekombinanten Anthocyanidinsynthase identifiziert, die durch Isolierung der cDNA Klone aus der roten und grünen Spezies von *Perilla frutescens* gewonnen wurde. Gereinigte, rekombinierte ANS katalysiert in Gegenwart von 2-Oxoglutarat, Fe^{2+} und Ascorbat bei zusätzlicher Ansäuerung mit HCl die Umwandlung von Leucoanthocyanidinen in die entsprechenden farbigen Anthocyanidine. Da unter physiologischen pH-Bedingungen die OH-Gruppe (Hydroxylgruppe) in der C3-Position von Anthocyanidinen instabil ist, erfolgt eine Stabilisierung durch die Glykosylierung dieser OH-Gruppe in Gegenwart des Enzyms Flavonoid 3-Glucosyltransferase (F3GT).

Bei der ANS-Reaktion wird aus 2-Oxoglutarat CO_2 freigesetzt. Basierend auf den oben genannten Cofaktoren, die für die Funktion des Enzyms notwendig sind, wird dieses Enzym in die Gruppe der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen eingeordnet [56].

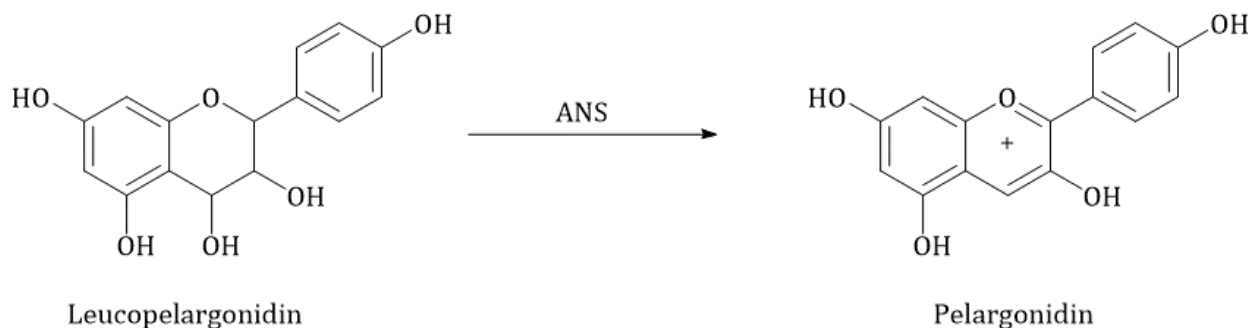


Abbildung 19: Biosynthese von Pelargonidin

1.16 Modifikation von Flavonoiden

Verschiedene Modifikationen von Flavonoiden, wie Hydroxylierung, Methylierung, Glykosylierung oder Acylierung, führen zu einer Vielfalt in Struktur und Funktion dieser Sekundärmetaboliten, was zur Entstehung neuer Arten führt. Bisher sind über 6000 Verbindungen dieser Gruppe bekannt.

1.16.1 Hydroxylierung von Flavonoiden

Die Enzyme, die für den Prozess der Hydroxylierung von Flavonoiden in Pflanzen verantwortlich sind, werden Hydroxylasen genannt. Man unterscheidet verschiedene Typen (Klassen) von Hydroxylasen, wie die Dioxygenasen, die im Cytosol lokalisiert sind und die 2-Oxoglutarat, Fe^{2+} und Ascorbat als Cofaktoren verwenden. Daneben differenzieren wir auch die Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase, welche NADPH und molekularen Sauerstoff als Cofaktor verwenden.

Die Klasse der Dioxygenasen umfasst die FHT, ein Enzym, das die Umwandlung von Flavononen in die entsprechenden Dihydroflavonole katalysiert. Weiters die F6H, welche erstmals aus *Chrysosplenium americanum* isoliert wurde und die Hydroxylierung von Flavonolen in der Position 6 katalysiert und welche neben Flavonole zusätzlich auch methylierte Flavonole als Substrat umwandelt [8, 18].

Die Klasse der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen umfasst die Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H), Flavonoid 3',5'-Hydroxylase (F3'5'H), sowie die F6H, welche aus *Tagetes patula* und *R.hirta* erstmals isoliert wurde. Diese Enzyme verwenden NADPH und molekularen Sauerstoff als Cofaktor [27, 57, 61].

1.16.1.1 Hydroxylierung im B-Ring

Enzyme wie die F3'H und F3'5'H führen eine zusätzliche B-Ring-Hydroxylierung an der 3'- oder 3'- und 5'-Position durch. Diese Enzyme sind P450-abhängige Monooxygenasen und verwenden Flavanone, Flavone, Dihydroflavonole und Flavonole als Substrate, jedoch keine Leucoanthocyanidine oder Anthocyanidine [38].

Der Grad der Hydroxylierung beeinflusst die Farbe der Anthocyane. Je größer die Zahl der Hydroxylgruppen im B-Ring ist, desto mehr verschiebt sich das Farbspektrum in Richtung des blauen Bereichs.

Neben der Hydroxylierung können auch andere Modifikationen wie Methylierung der Hydroxylgruppe oder aromatische Acylierung zu einer Verschiebung der Farbe führen.

F3'H und F3'5'H unterscheiden sich darin, dass F3'H nur 4'-hydroxylierte Substrate wie Naringenin oder Dihydrokämpferol akzeptiert, während F3'5'H in vitro sowohl 4'-hydroxylierte als auch 3',4'-hydroxylierte Substrate annimmt. Bei 4'-hydroxylierten Substraten wird die Hydroxylierung in den 3'- und 5'-Positionen durchgeführt, während bei 3',4'-hydroxylierten Substraten die Hydroxylierung nur in der 5'-Position durchgeführt wird.

Die Hydroxylierung von 6'-Deoxychalkon, in diesem Fall Isoliquiritigenin an der Position 3, wurde erstmals durch die Herstellung einer mikrosomalen Enzymfraktion aus *Dahlia variabilis*-Blütenblättern beobachtet. NADPH und molekularer Sauerstoff waren für diese Reaktion notwendig, sodass das Enzym, das diese Reaktion katalysiert, zu den P450-abhängigen Monooxygenasen gehört. Ob es sich um ein eigenständiges Enzym handelt oder ob es sich tatsächlich um eine F3'H handelt, lässt sich noch nicht mit Sicherheit sagen, da dieses Enzym wie die F3'H in der mikrosomalen Fraktion lokalisiert ist und nicht unabhängig von einer F3'H-Aktivität getestet werden kann [58, 59].

Eine große Anzahl von Flavonoiden enthält mindestens eine Hydroxylgruppe im B-Ring (in der 4'-Position). Ihre Bildung findet vor Beginn der eigentlichen Flavonoid-Biosynthese während der Biosynthese der Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester statt. Das häufigste Zimtsäure-Derivat ist das *p*-Cumaroyl-CoA, woraus ein Naringenin-Chalkon gebildet wird, welches in Position 4 eine Hydroxylgruppe enthält, sodass die anderen vom Naringenin-Chalkon abgeleiteten Klassen von Flavonoiden eine Hydroxylgruppe in Position 4' enthalten.

Da das CHS-Enzym in vitro neben *p*-Cumaroyl-CoA auch Caffeoil-CoA als Substrat akzeptiert, entsteht in diesem Fall Eriodictyolchalkon (welches zwei Hydroxylgruppen in Position 3' und 4' im B-Ring enthält). Wird Eriodictyolchalkon als Vorläufer für die weitere Biosynthese anderer Flavonoidklassen verwendet, entstehen die entsprechenden 3',4'-hydroxylierten Flavonoide [38].

Obwohl *p*-Cumaroyl-CoA das bevorzugte Substrat des CHS-Enzyms ist, wurde in einigen Fällen, wie zum Beispiel bei einer scharlachroten *Verbena*-Hybride, die Bildung einer kleinen Menge Cyanidin in Abwesenheit der F3'H-Aktivität beobachtet. Dies kommt daher, dass eine geringe Menge an Caffeoyle-CoA unabhängig von der Anwesenheit von *p*-Cumaroyl-CoA vom CHS-Enzym als Substrat verwendet wird.

Bei der durch CHS katalysierten Kondensationsreaktion von Caffeoyle-CoA mit 3 Molekülen Malonyl-CoA wird Eriodictyol gebildet, das eine Vorstufe für den Aufbau anderer Flavonoidklassen, darunter Cyanidin, ist [63].

1.16.1.2 Hydroxylierung im A-Ring

Verschiedene Enzymklassen können eine Hydroxylierung im A-Ring durchführen. So unterscheidet man zwischen Enzymen, die zu P450-abhängigen Monooxygenasen gehören, oder anderen, die zu 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen zählen. Man differenziert Flavonol-6-Hydroxylase, isoliert aus *Tagetes patula*, einer P450-abhängigen Monooxygenase, die NADPH und molekularen Sauerstoff als Cofaktor verwendet. Dieses Enzym führt eine Hydroxylierung an Position 6 durch und bevorzugt Quercetin als Substrat. Quercetin wird von diesem Enzym zu Quercetagetin umgewandelt, das in Position 6 eine Hydroxylgruppe besitzt.

Im Gegensatz zu F6H, die aus *Tagetes* isoliert wurde, katalysiert F6H, das aus *Chrysosplenium americanum* isoliert wurde, den gleichen Reaktionstyp, gehört jedoch zur 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenase, die 2-Oxoglutarat, Ascorbat und Fe²⁺ als Cofaktor verwendet und die neben Flavonolen zusätzlich methylierte Flavonole als Substrate akzeptiert [8].

Die Hydroxylierung an Position 8 erfolgt mit dem Enzym Flavonol 8-Hydroxylase, das aus *Chrysanthemum segetum* isoliert wird und bei Flavonolen und Flavanonen den Einbau der Hydroxylgruppe in Position 8 katalysiert. Dieses Enzym gehört zu den P450-abhängigen Monooxygenasen wie auch zu den 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen und verwendet NADPH und FAD als Cofaktoren [29].

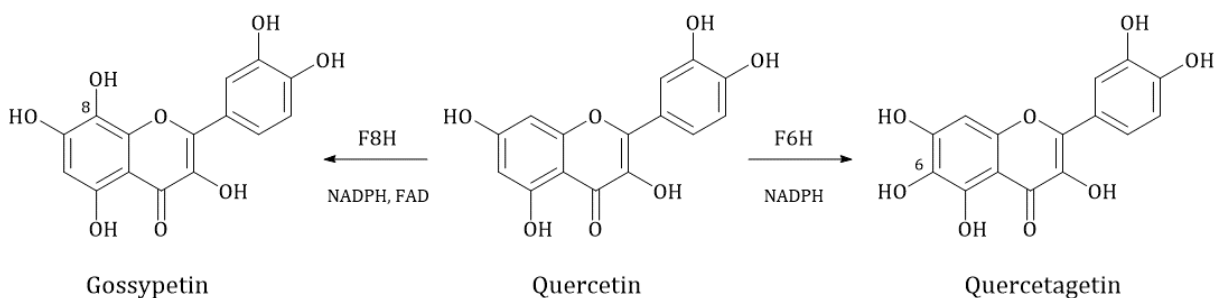


Abbildung 20: Einführung zusätzlicher Hydroxylgruppen in den A-Ring von Flavonoiden

1.16.2 Methylierung von Flavonoiden

Die Methylierung ist eine der wichtigsten Modifikationen von Flavonoiden, die durch das Enzym *O*-Methyltransferase katalysiert wird und zur Bildung von *O*-methylierten Flavonoiden führt, welche neue biologische Aktivitäten zeigen. 7-*O*-Methylquercetin (Rhamnetin) zum Beispiel hemmt die Bildung von Beta-Amyloid, während Quercetin diese Fähigkeit nicht besitzt [41, 42].

Die Methylierungsreaktion von Flavonoiden ist regioselektiv und substratspezifisch. Bei dieser Reaktion wird die Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf die Hydroxylgruppe von Flavonoiden übertragen. Die Methylierung von Hydroxylgruppen von Flavonoiden führt zu einer Abnahme der Reaktivität, aber auch zu einer Erhöhung der Stabilität [24].

1.16.3 Glykosylierung von Flavonoiden

Der Glykosylierungsprozess ist ein besonders wichtiger Schritt im Biosyntheseweg von Flavonoiden. Die Glykosylierung ist neben der Erhöhung der Löslichkeit von Molekülen auch eine Voraussetzung für die anschließende Acylierung des Zuckerrestes mit organischen Säuren.

Der Glykosylierungsprozess von Flavonoiden wird durch das Enzym *O*-Glykosyltransferase katalysiert, wodurch der Glukoserest von Uridin 5'-Diphospho-Glukose auf die Hydroxylgruppe phenolischer Substrate übertragen wird.

Die Glykosylierung von Anthocyanidinen ist ein wesentlicher Schritt im Biosyntheseweg. Da Anthocyanidine chemisch instabil sind, werden sie an Position 3 durch die Wirkung des Enzyms Flavonoid 3-*O*-Glukosyltransferase zu stabilen Anthocyanen glykosyliert.

Die Glykosyltransferase akzeptiert eine Vielzahl von Substraten und der Glykosylierungsprozess selbst ist positionsspezifisch. Bei Flavonolen ist die Glykosylierung in Position 3 am häufigsten, gefolgt von der Glykosylierung in Position 7. Bei Flavonolen findet die Glykosylierung am häufigsten in den Positionen 3, 5 und 7 statt, wobei Position 3 am häufigsten ist [10, 17, 65].

Der Prozess der Glykosylierung spielt auch eine sehr wichtige Rolle bei der Bildung von „honey guides“, weil die Glykosylierung bestimmter Flavonole zur Bildung von UV-absorbierenden Pigmenten führt, die sich dann in einem Teil der Blüte anreichern und so für das menschliche Auge unsichtbare Markierungen erzeugen.

1.16.4 Acylierung von Flavonoiden

Einer der letzten Schritte im Biosyntheseweg ist der Acylierungsprozess. Einerseits erhöht die Acylierung die Wasserlöslichkeit, andererseits werden Glukoside vor dem Angriff von Glukosidasen geschützt. Neben der Erhöhung der Stabilität von Anthocyanen spielt die Acylierung auch eine wichtige Rolle beim Transport von Flavonoiden durch die Vakuolenmembran [40].

Bei der Acylierung erfolgt die Veresterung der Hydroxylgruppe des Glycosylrestes von Anthocyanin mit Monocarbonsäuren oder Dicarbonsäuren, entweder aromatisch oder aliphatisch. Das Enzym, das diese Reaktion katalysiert, ist die Acyltransferase, die eine hohe Substratspezifität sowohl für aliphatische als auch für aromatische Carbonsäuren zeigt, die in Form von CoA-Estern vorliegen müssen, um akzeptiert zu werden [36, 37].

2. Problemstellung

Die lokale Akkumulation von UV-absorbierenden Pigmenten im inneren Teil der Blütenblätter von *R.hirta* führt zur Entstehung von UV-honey guides. Aus diesem Grund sieht das menschliche Auge eine einheitlich gelb gefärbte Blüte, während diese Blüte für Bienen in zwei Farben erscheinen. Es handelt sich um spezielle Flavonole, die neben den typischen Hydroxylierungen in Position 5 und 7 zusätzlich eine Hydroxylgruppe in Position 6 enthalten.

Obwohl die UV-honey guides und ihre physiologische Bedeutung bereits seit langem bekannt sind, ist die biochemische oder molekularbiologische Ursache ihrer Entstehung noch wenig erforscht. Daher ist es sehr wichtig, Enzyme zu erforschen, die die Reaktionen des Flavonolaufbaus in dem Teil der Blüte katalysieren, den wir als Blütenmale bezeichnen. Außerdem ist eine detaillierte Kenntnis der Gene, die diese Enzyme kodieren, ebenso von großer Bedeutung, weil dies erlaubt, Geneexpressionsstudien durchzuführen um mehr über die Beteiligung der Gene an bestimmten physiologischen Prozessen herauszufinden.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Flavonol 6-Hydroxylase, die die Hydroxylierung des A-Ring in der Position 6 katalysiert.

Dazu sollen cDNA Klone von F6Hs aus zwei verschiedenen Pflanzen, *R.hirta* und *T.erecta*, isoliert werden. Durch heterologe Expression der cDNA Klone in Hefe sollen rekombinante Enzyme für biochemische Untersuchungen gewonnen werden. Die rekombinante F6H der *R.hirta* sollte auf ihre Akzeptanz von verschiedenen Flavonoiden als Substrate getestet und das Enzym im Detail charakterisiert werden.

Außerdem soll im Rahmen dieser Arbeit der Flavonoidstoffwechsel in den Blüten von *R. hirta* untersucht werden. Dazu wurden Blütenblätter vor den Experimenten in innere (dunklere) und äußere (hellere) Teile der Blüte unterteilt, Enzymextrakte aus den beiden Blütenteilen gewonnen und auf das Vorhandensein von Enzymen der Flavonolbiosynthese getestet werden (PAL, CHS, DFR, FLS FHT).

Neben der enzymatischen Aktivität soll auch eine Genexpressionsanalyse von ausgewählten Genen der Flavonoid-Biosynthese durchgeführt werden, um zu sehen, ob die Genexpression mit der lokalen Akkumulation von Flavonolen im Inneren der Blüte korreliert

3. Material

3.1 Pflanzenmaterial

Die Untersuchungen wurden an Blüten von *T. erecta* cv. Antigua durchgeführt. Die Samen wurden von der Firma Austrosaat (Wien, Österreich) bezogen und im Sommer 2018 am Versuchsfeld der TU Wien kultiviert. Das Pflanzenmaterial wurde gesammelt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Untersuchungen wurden Blüten von *R. hirta* cv. Prairie Sun verwendet. Die Samen wurden von der Firma Benary (München, Deutschland) bezogen und im Sommer 2018 am Versuchsfeld der TU Wien kultiviert. Für die Expression der F6H wurden junge Petalen aus Knospen von *R. hirta* verwendet. Für die Genexpressionsanalyse wurden junge Knospen (Stadium 1) und voll entwickelte Blüten (Stadium 2) gesammelt. Von jedem Stadium wurden zwei Proben genommen, die erste aus dem äußeren Abschnitt der Blüte und die zweite aus dem inneren Abschnitt.

3.2 Bakterien- und Hefestämme

Für diese Arbeit wurden die folgende Bakterien- und Hefestämme verwendet:

TOP 10 One Shot	Bakterienstamm (<i>E.coli</i>)	Invitrogen
INVSc1	Hefestamm (<i>S.cerevisiae</i>)	Invitrogen

3.3 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden für diese Arbeit benötigt:

Reagens	Hersteller
Agar Agar	Merck
Agarose	Difco Laboratories
α -Ketoglutarat	Sigma-Aldrich
Ampicillin	Sigma
(¹⁴ C)-Apigenin	eigene Laborsynthese
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich
Chloroform	Merck
(¹⁴ C)-Dihydrokämpferol	eigene Laborsynthese
(¹⁴ C)-Dihydroquercetin	eigene Laborsynthese
Dimethylsulfoxid	Fluka
Dithiothreitol	Sigma
(¹⁴ C)-Eriodyctiol	eigene Laborsynthese
Essigsäure	Merck
Ethylacetat	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich

FeSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck
Folin-Ciocalteu	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt granuliert	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
(¹⁴ C)-Kämpferol	eigene Laborsynthese
Kupfersulfat	Merck
L-Tryptophan	Sigma
Lysozym	Roche
(¹⁴ C)-Malonyl Coenzym A	PerkinElmer
Methanol	Merck
MgCl ₂	Merck
Na-Ascorbat	Sigma-Aldrich
NADPH	Boehringer Mannheim
(¹⁴ C)-Naringenin	Eigene Laborsynthese
Natriumcarbonat	Merck
Natrium-Citrat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
(¹⁴ C)- <i>p</i> -Coumaroyl-Coenzym A	TransMIT
(¹⁴ C)-Phenylalanin	PerkinElmer
Polyclar AT	Serva
Quarzsand	Merck
Quercetin	Extrasynthese
Rotiszint® eco plus LSC-Universalcocktail	Roth
Salzsäure	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethane-Hydrochloride	Merck

3.4 Molekularbiologische Kits

Für die Untersuchungen wurden folgende molekularbiologische Kits verwendet:

μMACS mRNA Isolation Kit	Miltenyi Biotec
cDNA Synthesis Kit	Sigma
PCR GoTaq Polymerase Kit	Promega
Phusion High-Fidelity PCR Kit	Thermo Fisher
Wizard®SV Gel und PCR Clean-Up System	Promega
Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega
pYES2.1 Topo TA Cloning Kit	Invitrogen

3.5 Primer

Die PCR-Primer für die F6H-Genamplifikation aus *R.hirta* sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Primername	Sequenz 5'-3'	Annealing Temperatur (T _m)
Rh_F6H_FS_for	ATGGCACCAAACATTATAGACATATT	56,9 °C
Rh_F6H_FS_r_noST	TGAGAGACGAGAATCTTTACAAG	57,1 °C

Tabelle 1: Die Liste der verwendeten Primer für die Amplifizierung des F6H-Gens aus *R.hirta*

Die PCR-Primer für die F6H-Genamplifikation aus *T.erecta* sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Primername	Sequenz 5'-3'	Annealing Temperatur (T _m)
Tag_F6H_1_for	ATGGCATCAAACATCAATTCCACATG	60,1 °C
Tag_F6H_1_rev	CATGTAAAGATTGTTGTCGGACAATC	60,1 °C

Tabelle 2: Die Liste der verwendeten Primer für die Amplifizierung des F6H-Gens aus *T.erecta*

In Tabelle 3 sind die qPCR-Primer für die Genexpressionsanalyse aus *R.hirta* aufgelistet.

Primername	Sequenz 5'-3'
qRhF6H_for	GTGCATCGTCGGTGGATAC
qRhF6H_rev	CTCAGACGGTTTCTCCCAATAC
qRhRubiso_for	CAGTTCGGTGGAGGAACTTTAG
qRhRubiso_rev	CAAGATCGCGTCCCTCATTAC
qRhPAL_for	GTGAGCCAAGTAGCCAAGAA
qRhPAL_rev	GTCTACCACACGAAGCAAGT
qRhCHS_for	CCAGATCACCCATCTCATCTTC
qRhCHS_rev	GGAGACCAAGGAGTTTGGTTAG
qRhFLS_for	AAGGCACAATCCCAAGAGAG
qRhFLS_rev	GTCGATCACCGGAAGTTCAA
qRhF3'H_for	GGTGATCTAAAGGCGGATGAG
qRhF3'H_rev	TGAATGTCCAGCCAGTCAAG
qRhrps18_for	GATTGACCTTGAAACAACAACGA
qRhrps18_rev	TCTGGCTCTAAGACTAGGAGTT
qRhGT_for	GTGAGGGTTAGGACAGATGAAG
qRhGT_rev	CATCTCCTCCCATCACCATTT
qRhRT_for	GGCATAGAGTTGAGCGGATTAC
qRhRT_rev	CCCAAGTGGCAACTCGATAA

Tabelle 3: qPCR-Primer für die Genexpressionsanalyse aus *R.hirta*.

3.6 Geräte

Folgende Geräte wurden in dieser Arbeit verwendet:

Geräte	Hersteller
Allegra™ 21R Centrifuge	Beckman
Applied Biosystems StepOne™	Thermo Fisher Scientific
Biofuge 22R	Heraeus
Biofuge A	Heraeus
Certomat® BS-1	Braun Biotech Int.
Electrophoresis Power Supply (EPS600)	Pharmacia
Eppendorf PCR-Gerät	Eppendorf
Exsikkator	Glaswerk Wertheim
Heizblock (QBT2)	Grant
Kühlzentrifuge J2-21	Beckmann
Laborzentrifuge 2-15	Sigma
Laminar Air flow	TL 2448 HOLTEN
Laminar TL2448	Holten
Microprocessor pH/ION Meter pMX	WTW
Microwelle	Philips
Spectrophotometer	Beckman Coulter
Szintillationszähler	TriCARB 2100TR PACARD
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Thermoschrank B 6060	Heraeus Instruments
TLC Linearanalyser	Berthold LB 2842
Typhoon scanner	GE Healthcare
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	Julaba

3.7 Puffer und Lösungen

3.7.1 TAE

Für die Elektrophorese wurde eine 50 x konzentrierte Stammlösung eines TAE-Puffers hergestellt. Dazu wurden 242,0 g Tris und 18,61 g EDTA in einem Liter Wasser gelöst und mit Eisessig ein pH von 8 eingestellt.

Für die Elektrophorese wurde durch Verdünnen der Stammlösung mit destilliertem Wasser eine 1 x konzentrierte Lösung hergestellt.

3.7.2 TEK

Zur Herstellung der TEK-Pufferlösung für den Aufschluss der Hefezellen wurden 6,10 g Tris, 4,00 g EDTA und 7,46 g KCl in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst und anschließend bei 120°C für 30 min autoklaviert.

3.7.3 TES-B*F

Zur Herstellung der TES-B* - Pufferlösung für den Waschschrift nach dem Zellaufschluss bei der Hefeexpression wurden 6,00 g Tris, 0,37 g EDTA, 109,30 g Sorbitol und 0,31 g DTT in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst und anschließend bei 120°C für 30 min autoklaviert.

3.8 Tris/HCl Puffer 0,1 M

Zur Herstellung der Tris/HCl Puffer für die Enzymtests wurden

2,42 g Tris
0,80 g Ascorbinsäure

in einem Liter destillierten Wasser gelöst und der entsprechende pH-Wert mit konzentrierter HCl eingestellt.

3.9 KPi Puffer 0,1 M

Zur Herstellung der 0,1M KPi Puffer wurden

2,72 g KH_2PO_4
0,8 g Ascorbinsäure

in 200 mL destilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 10 N NaOH eingestellt.

3.10 Laufmittel

Als Laufmittel für Dünnschichtchromatographie nach erfolgten Enzymtests wurde CAW verwendet.

Chloroform, Essigsäure und H_2O wurden in einem Volumenverhältnis von 50 : 45 : 5 vermischt.

3.11 Nährmedien

Alle für diese Arbeit notwendigen Nährmedien wurden bei 120 °C für 30 min autoklaviert.

3.11.1 Expressionsmedium

Zur Herstellung des Expressionsmediums wurden

- 10 g Pepton
- 5 g Hefeextrakt
- 10 g NaCl

in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst, mit 4 mL 50% Glycerin und 1 mL 1 M MgSO_4 -Lösung versetzt und anschließend mit konzentrierter HCl ein pH von 7,50 eingestellt.

3.11.2 LB_{Amp}

Zur Herstellung des LB-Mediums wurden

- 10 g Peptone
- 5 g Hefeextrakt
- 10 g NaCl

in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert von 7 wurde mit 1 N NaOH eingestellt und bei 120 °C für 30 min autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde 1 mL Ampicillin-Lösung (100 mg/mL) zugesetzt.

Für LB_{Amp} Agarplatten wurde das LB-Medium mit 15 g Agar versetzt und bei 120°C für 30 min autoklaviert. Anschließend wurde das Medium auf ca. 60 °C abgekühlt, 1 mL Ampicillin-Lösung (100 mg/mL) hinzugegeben und in Petrischalen gegossen.

3.11.3 SOC

Zur Herstellung des SOC-Mediums wurden

- 20 g Pepton
- 5 g Hefeextrakt
- 0,6 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1 g MgCl
- 3,5 g Glucose

In 1 Liter deionisiertem Wasser gelöst und mit 1N NaOH auf einen pH-Wert von 7,50 eingestellt.

3.11.4 SGI

Zur Herstellung des SGI-Mediums wurden

1,0 g Pepton
6,7 g yeast nitrogen base (without aminoacids)
20,0 mg L-Tryptophan

in 900 mL deionisiertem Wasser gelöst. Nach dem Autoklavieren wurde mit 100 mL steril-filtrierter 20 %iger Glukoselösung auf ein Volumen von 1 Liter aufgefüllt.

Für SGI-Agarplatten wurde das SGI-Medium vor dem Autoklavieren mit 15 g Agar versetzt.

3.11.5 YPGE

Zur Herstellung des YPGE-Mediums wurden 10 g Pepton und 10 g Hefeextrakt in 970 mL destilliertem Wasser gelöst und bei 120 °C für 30 min autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde 30 mL absolutes Ethanol zugesetzt.

3.12 Plasmide

Plasmide sind kleine, ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die neben den „Chromosomen“ in Bakterien vorkommen, und die sich unabhängig von Bakterien-„Chromosom“ vervielfachen können. Plasmide können eine Größe zwischen 2 und mehr als 200 kbp besitzen und verschiedene genetische Funktionen erfüllen. Plasmide mit einer Größe von ca. 5 kb werden biotechnologisch als Vektoren benutzt.

3.12.1 Vektoren für Hefe (*S. cerevisiae*)

3.12.2 pYES 2.1-Vektor

Für die Expression der Gene in *S. cerevisiae* wird der pYES2.1/V5-His-TOPO Vektor verwendet, der ein 5900 bp langes high-copy Plasmid ist.

Da der Vektor linearisiert, mit 3'-Thymidin(T)-Überhängen vorliegt, können Insert-Fragmente mit Adenin-Überhängen effizient in den Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO eingebracht werden. Zusätzlich trägt der Vektor eine Ampicillinresistenz zur Selektion transformierter *E. coli*, sowie das URA3-Gen zur Selektion transformierter Hefezellen.

Das PCR-Produkt mit dA-Überhang wird zuerst in den pYES 2.1-Vektor ligiert und zur Subklonierung in *E. coli* transformiert. Positive Klone mit sense-Orientierung des Inserts werden mittels Colony-PCR selektiert, dann mit dem Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System die Plasmide isoliert und diese in Hefezellen transformiert.

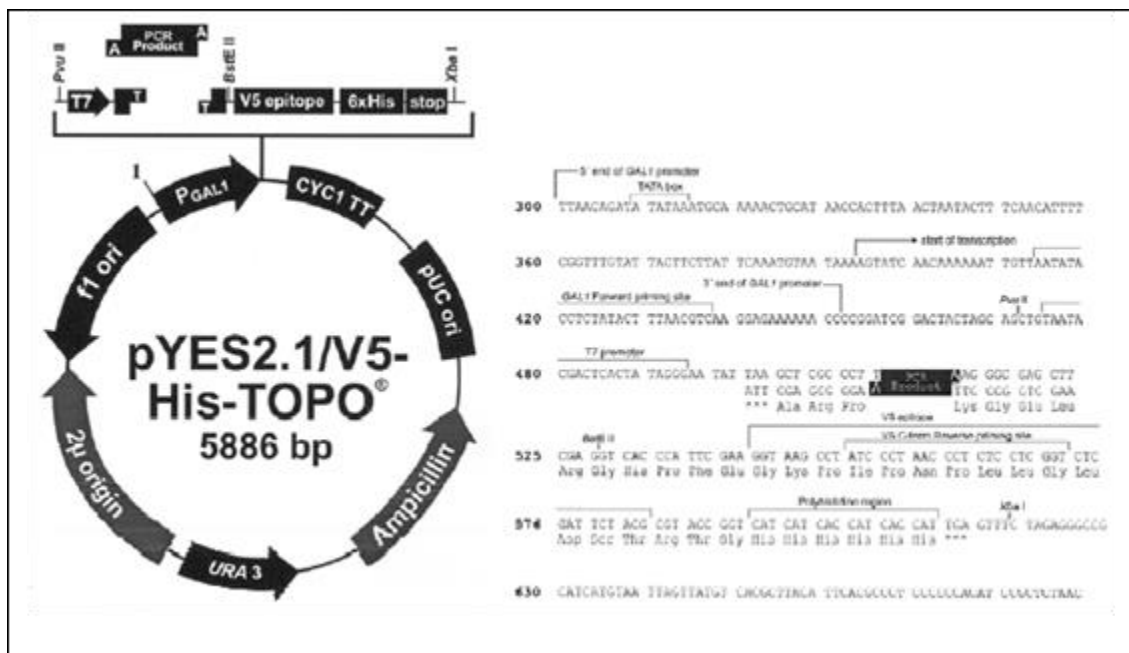


Abbildung 21: pYES 2.1-TOPO-Vektor

4. Methoden

4.1 Isolierung von RNA

Isolierte RNA ist relativ instabil und kann leicht durch RNasen abgebaut werden. Um das zu verhindern, muss man beim Arbeiten konsequent Handschuhe tragen und RNase-freie Reagenzien und Gerätschaften verwenden.

Die Isolierung der mRNA erfolgte mit dem μ MACS mRNA Isolation Kit. Bei dieser Methode werden magnetische Beads benutzt, welche auf ihrer Oberfläche oligo-(dT)-Stränge tragen. Das Trennprinzip beruht auf der Tatsache, dass die poly-A-Enden der mRNA an die oligo-(dT)-Stränge binden.

- 1,95 g (*R.hirta*) bzw. 1 g (*T.erecta*) Pflanzengewebe wurden in flüssigem Stickstoff homogenisiert.
- 80 mg des homogenisierten Pflanzenmaterials wurden in ein Reaktionsgefäß nach Eppendorf eingewogen und mit 1 mL Lysis/Binding Buffer versetzt, 3 min gevortext und danach 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert.
- Der Überstand wurde auf die LysatClear Säule aufgetragen und bei 13.000 rpm zentrifugiert.
- Pro Probe wurde eine spezielle Trennsäule (μ MACS-Säule) in den Separator (Magnetfeld-stander) eingesetzt und mit 100 μ L Lysis/Binding Buffer equilibriert.
- Anschließend wurden pro 1 mL Lysat 50 μ L oligo-(dT)-MicroBeads hinzugegeben und 2 bis 3 x homogenisiert.
- Das Lysat einschließlich der zugegebenen oligo-(dT)-MicroBeads wurde dann auf die Säule aufgetragen. Innerhalb des magnetischen Felds wurden die magnetischen Beads an deren oligo-(dT)-Stränge die mRNAs gebunden ist, zurückgehalten, während alle anderen Bestandteilen (rRNA, tRNA, Proteine usw.) die nicht binden, die Säule ungehindert passieren können.
- Zur Entfernung der nicht gebundenen Bestandteile wurde die Säule 2 x mit 200 μ L Lysis/Binding Buffer und 4 x mit 100 μ L Wash Buffer gespült.
- Anschließend wurde die an die oligo-(dT)-MicroBeads gebundene mRNA mit 120 μ L auf 70°C erhitztem Elution Buffer eluiert.

4.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Bei der Reversen Transkription erfolgt die Umwandlung der mRNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA. Die Reverse Transkriptase benötigt für die cDNA-Synthese einen DNA-Primer. Da jede mRNA einen polyA-Schwanz besitzt, wird ein oligo-(dT)-Primer zugegeben, der an diesem poly-A-Schwanz bindet und es der Reversen Transkriptase ermöglicht, ausgehend vom oligo-(dT)-Primer den DNA-Gegenstrang zu synthetisieren.

- In einem Eppendorf-Gefäß werden 14 µL mRNA-Lösung mit 1 µL oligo-(dT)-Primer versetzt, vorsichtig gevortext und kurz zentrifugiert.
- Anschließend inkubiert man 5 min bei 70 °C und kühlt danach den Reaktionsmix auf Eis ab.
- 5 µL Master-Mix wurden vorbereitet. Dieser besteht aus 4 µL 5 x RT-Buffer und 1 µL dNTPs. Als Oxidationsschutz enthält der 5 x RT-Buffer Dithiothreitol (DTT).
- 5 µL Master-Mix wurden pro Probe zugegeben, und anschließend wurden die Proben 2 min auf 42 °C erwärmt.
- Anschließend wurde 1 µL Reverse Transkriptase zugesetzt, und das Reaktionsgemisch kurz zentrifugiert.
- Danach erfolgten zwei Inkubationsschritte:
 1. 60 min bei 42 °C
 2. 10 min bei 70 °C
- Die auf diese Art hergestellte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann ein DNA-Stück in vitro enorm vervielfältigt werden. Die PCR besteht aus einer Abfolge von 20 - 40 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten: Denaturierung (Schmelzen), Annealing (Primer-Anlagerung) und Elongation (Strang-Verlängerung). Bei der Denaturierung kommt es zur Trennung der doppelsträngigen DNA bei der Temperatur von 94 - 95 °C. Im Anlagerungsschritt wird die Temperatur im Ansatz soweit gesenkt, dass die Primer an ihre komplementären Stellen der DNA anlagern können. Im letzten Schritt des Zyklus wird die Temperatur auf 72 - 75 °C erhöht. Bei dieser optimalen Temperatur synthetisiert die thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase, ausgehend von den gebundenen Primern, den entsprechenden Gegenstrang. Nach dem letzten Zyklus wird zusätzlich ein 5 - 15 minütiger Extensionsschritt bei 72 °C durchgeführt, um noch nicht vollständig verlängerten PCR-Produkte zu vervollständigen.

4.3.1 Die Komponenten der PCR

Um eine PCR-Reaktion durchzuführen, werden folgende Ingredienzien benötigt:

- Puffer
- MgCl₂-Lösung
- Desoxynukleotide (dNTPs)
- Primer
- *Taq*-DNA-Polymerase
- DNA-Matrize (template)

Bei der PCR-Reaktion werden thermostabile DNA-Polymerasen verwendet. Die meist verwendete ist die *Taq*-Polymerase aus dem Organismus *Thermus aquaticus*. In dieser Arbeit wurde neben der *Taq*-Polymerase auch Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase benutzt,

welche 280mal spezifischer als die *Taq*-Polymerase ist, und sogar eine Fehlerkorrektur- (so-gen. Proofreading Eigenschaft) bzw. 3'-5'-Exonuklease-Aktivität besitzt. Die optimale Mg^{2+} -Konzentration ist sehr wichtig, da sie die Enzymaktivität beeinflusst, die Schmelztemperatur der dsDNA erhöht und mit den dNTPs lösliche Komplexe bildet, welche die DNA-Polymerase als Substrate erkennt. Die DNA-Polymerase benötigt für den Start Ihrer Synthese ein freies 3'-OH-Ende, deshalb werden zwei Primer (vorwärts und rückwärts) benötigt, die so ausgewählt werden, dass sie an den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt anlagern können. Die Primer sind ca. 15 - 20 Basen lang und legen fest, dass der Bereich zwischen den beiden Primern amplifiziert wird. Die für die DNA-Synthese notwendigen dNTPs bilden mit den Mg^{2+} -Ionen einen löslichen Komplex. Dieser wird von der DNA-Polymerase unter Abspaltung von Pyrophosphat und Wasser mit dem jeweilig freistehenden 3'- Ende des Strangs verknüpft. Die Konzentration des verwendeten Puffers ist von der verwendeten DNA-Polymerase abhängig.

4.3.2 Primer design

Die Sequenz der Primer muss so ausgewählt werden, dass der Primer spezifisch an den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt bindet. Basierend auf den in der NCBI-Datenbank veröffentlichten Gensequenzen erfolgt das Primerdesign mittels einer Software.

Folgende Anforderungen werden an die Primer gestellt:

1. Die Primer sollen in der Regel etwa 15 - 20 Nukleotide lang sein, da kürzere Primer auch an andere Abschnitten binden können und es dadurch zur Bildung unspezifischen PCR-Produkten kommt.
2. An der Bindung zwischen Guanin (G) und Cytosin (C) sind drei Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt, während bei der Bindung von Adenin (A) und Thymin (T) nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind. Die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen hat einen Einfluss auf die Annealing- bzw. Schmelztemperatur der DNA. Damit die Primer an das Template gut binden können, sollen die Primer ein ausgeglichenes G/C zu A/T Verhältnis haben.
3. Der Schmelzpunkt der Primer soll zwischen 55 °C und 65 °C betragen.
4. Die Annealing Temperatur wird üblicherweise so festgelegt, dass sie 5 °C unter dem Schmelzpunkt der Primer liegt.
5. Die beiden Primer müssen etwa die gleiche Schmelztemperatur aufweisen. Wenn dies nicht den Fall ist, dann würde sich beim Annealingsschritt nur ein Primer anlagern jedoch nicht der andere. Als Folge würde sich kein PCR-Produkt bilden.
6. Die Primer sollen keine komplementäre Basen enthalten, da es sonst zur Ausbildung von Sekundärstrukturen, wie z.B. Haarnadelstrukturen kommen kann.
7. Die Primer sollen nicht komplementär zueinander sein, da es sonst zur Bildung von Primerdimeren kommt, was dazu führt, dass sich die Primer nicht am Template anlagern.

4.3.3 High Fidelity-Proofreading PCR

Bei der Proofreading PCR verwendet man z.B. die Q5-High Fidelity Polymerase, die zusätzlich zur 3'-5' Exonuklease-Aktivität eine Korrekturfunktion besitzt, die falsch eingebaute Nukleotide entfernt und damit die Genauigkeit der DNA-Synthese erhöht. Die Q5-High Fidelity Polymerase wurde mit einer Sso7d dsDNA Bindedomäne fusioniert, wodurch sie neben einer hohen Synthesegeschwindigkeit und Genauigkeit auch sehr lange Amplifikate (bis 20 kbp) produzieren kann.

4.3.3.1 PCR-Ansatz

Der Ansatz für die High Fidelity-Proofreading PCR enthielt in einem Gesamtvolumen von 25 μL .

<i>Komponente</i>	<i>Volumen [μL]</i>
<i>5X Q5 Reaction Buffer</i>	5 μL
<i>10 mM dNTPs</i>	0,5 μL
<i>10 μM Reverse Primer</i>	1,25 μL
<i>10 μM Forward Primer</i>	1,25 μL
<i>Template DNA</i>	1 μL
<i>Q5-High-Fidelity DNA-Polymerase</i>	0,25 μL
<i>Nuclease-Free Water</i>	15,75 μL

Nach Abschluss der PCR erfolgte die Auftrennung der gebildeten PCR-Produkte in einem 1%-igen Agarose-Gel mittels Elektrophorese. Ein Aliquot von 25 μL der gebildeten PCR-Produkte wurde mit 5 μL Ladepuffer versetzt, auf das Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (4.4).

4.3.3.2 PCR-Bedingungen

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initialer Denaturierungsschritt	98 °C	30 sec	1
Denaturierung	98 °C	10 sec	40
Annealing/ Anlagerung	ΔT Primer	30 sec	40
Elongation	72 °C	1 min	40
Final Elongation	72 °C	10 min	1

Tabelle 4: Proofreading PCR-Programm

4.3.3.3 A-Tailing

Die PCR Produkte (Amplifikate), die mit der Q5-Polymerase produziert wurden, haben blunt ends. Eine Klonierung ist daher nur in entsprechende Vektoren möglich.

Soll aber danach eine TA-Klonierung oder TOPO-TA-Klonierung erfolgen, wird zusätzlich eine 10-minutige Behandlung mit *Taq*-Polymerase durchgeführt. Dies führt dazu, dass an das 3'-Ende des Amplifikats ein Adenin-Rest zusätzlich angefügt wird. Diese Verfahren, das A-Tailing genannt wird, ist spezifisch notwendig für die Klonierung in T-Vektoren, die an 5'-Ende Thymin-Nukleotide besitzen, welche mit dem Adenin hybridisieren können.

4.3.3.4 A-Tailing Ansatz

Nach der Isolierung der DNA aus Gelstücken erfolgte das A-Tailing wie folgt:

Komponente	Volumen [μL]
<i>PCR-Produkt</i>	10 μL
<i>GoTaq-Polymerase</i>	0,3 μL
<i>GoTaq-Puffer (farblos)</i>	4 μL
<i>10 mM dNTPs</i>	0,4 μL

Die Reaktionsansätze wurden im Thermocycler für 10 min bei 72 °C inkubiert. Beim A-Tailing ist eine Aufreinigung für die nachfolgende Ligation nicht erforderlich.

4.3.4 Colony-PCR

Nach Inkubation der Platten über Nacht wurden sechs bis acht Kolonien mit einer Pinzette und einem Zahnstocher aufgenommen und auf eine andere Platte (Masterplatte) übertragen. Zusätzlich wurden die Kolonien mit einem Zahnstocher auf den Boden eines PCR-Röhrchens überführt. Danach wurden die Colony-PCRs durchgeführt.

4.3.4.1 Colony-PCR Ansatz

Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes betrug 20 μL .

Komponenten	Volumen [μL]
<i>5X Green GoTaq Reaction Buffer</i>	4 μL
<i>dNTPs (10 mM)</i>	0,4 μL
<i>Reverse Primer (10 μM)</i>	1 μL
<i>Forward Primer (10 μM)</i>	1 μL
<i>GoTaq DNA Polymerase</i>	0,2 μL
<i>Nuclease-Free Water</i>	13,4 μL

4.3.4.2 Colony-PCR Bedingungen

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initialer Denaturierungsschritt	95 °C	1 min	1
Denaturierung	94 °C	20 sec	30
Annealing/ Anlagerung	45-72 °C	45 sec	30
Elongation	72 °C	30 sec per kb	30
Final Elongation	72 °C	5 min	1

Tabelle 5: Colony-PCR Programm

4.3.5 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR ermöglicht die Bildung von PCR-Produkten in Echtzeit zu beobachten. Bei dieser Methode gibt es verschiedenen Möglichkeiten, die gebildeten Produkten zu detektieren. Eine Möglichkeit besteht darin einen Fluoreszenz-Farbstoff (SYBR Green) zu verwenden, der in der Lage ist in die DNA zu interkalieren. SYBR Green fluoresziert nur, wenn er sich zwischen die doppelsträngige DNA einlagert, während er in ungebundenem Zustand nicht fluoresziert. Er ist ein universaler Fluoreszenz-Farbstoff, der sich unabhängig von der Basenabfolge einlagert, und kann daher für jede beliebige PCR-Reaktion verwendet werden. Mit steigender Anzahl der Zyklen, werden immer mehr PCR-Produkte gebildet. Daher kann sich proportional zur Menge an gebildeter DNA SYBR Green in die doppelsträngige DNA einlagern, was zu einem Anstieg des Fluoreszenz-Signals führt.

4.3.5.1 Threshold cycle (Ct-Wert)

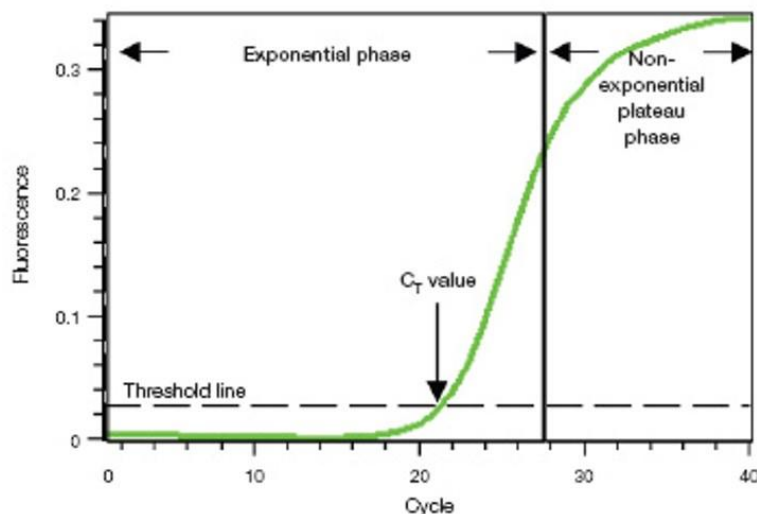


Abbildung 22: Schematische Darstellung einer Amplifikationskurve

Bei der Real-Time PCR wird die Amplifikationskurve in Echtzeit aufgezeichnet. Abbildung 21 zeigt eine typische Amplifikationskurve. Bei diesem Diagramm wird das Fluoreszenz-Signal gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen. Zu Beginn, bei niedriger Zyklenzahl, beobachtet man keinen Anstieg der Fluoreszenz, weil das Signal einfach zu gering und unter der Nachweisgrenze ist. Mit steigender Zyklenzahl bildet sich immer mehr PCR-Produkt und das Fluoreszenz-Signal überschreitet die Nachweisgrenze, sodass ein Anstieg des Fluoreszenz-Signals beobachtet werden kann. Mit zunehmender Zyklenzahl steigt die Menge der Produkte (DNA, Pyrophosphat, Monophosphatnukleotide) derartig an, sodass es zur Hemmung durch diese kommt, häufiger Produktfragmente miteinander hybridisieren, die Substrate langsam verbraucht werden und letztlich die Polymerasen und Nukleotide durch die Hitze langsam zerstört werden. Daher flacht die Amplifikationskurve wieder ab und erreicht bei höherer Zyklenzahl ein Plateau.

Um immer am Anfang der exponentiellen Phase messen zu können, wird häufig der Ct-Wert (engl. threshold cycle für Schwellenwert-Zyklus) bzw. der Cp-Wert (engl. crossing point) verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Der Ct-Wert ist für die Auswertung ein wichtiger Parameter, aus dem man eine quantitative Information erhält. Je höher die Ausgangsmenge an Template ist, umso weniger Zyklen sind notwendig, damit die Amplifikationskurve die Threshold-Linie schneidet, das heißt der Ct-Wert wird niedriger sein. Und umgekehrt, ist die Ausgangsmenge an Template gering, dann müssen mehrere Zyklen durchgeführt werden, bis die Amplifikationskurve die Threshold-Linie schneidet, daher ist der Ct-Wert hoch.

4.3.5.2 Relative Quantifizierung von Genen

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der Zielgene mit jenen eines Referenzgens, auch „House Keeping Gene“ (HKG) genannt, verglichen. Als Referenzgene bezeichnet man Gene, die keiner Regulation unterliegen und die unabhängig von Zelltyp, dem Zellstadium bzw. den Wachstumsbedingungen konstant exprimiert werden. Die Berechnung der Expressionsunterschiede (Ratio) kann über die Formel $2^{-(\Delta Ct)}$ erfolgen. Dabei wird für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}}$). In der folgenden Tabelle sind die zu untersuchenden Zielgene sowie die Referenzgene, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, angeführt.

	Zielgene
F6H	Flavonol 6-Hydroxylase
CHS	Chalkonsynthase
FLS	Flavonolsynthase
F3'H	Flavonoid 3'-Hydroxylase
RT	Reverse Transkriptase
GT	Glukosyltransferase
PAL	Phenylalaninammoniumlyase

	Referenzgene (HKG)
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/-Oxygenase
Rps 18	Ribosomales Protein S18

Tabelle 6: Ziel-und Referenzgene, die in dieser Arbeit verwendet werden.

4.3.5.3 Real-Time PCR Ansatz

Um herauszufinden wie stark die Expression der Zielgene in den verschiedenen Blütenstadien von *R.hirta* ist, wurde aus dem jeweiligen Pflanzenmaterial cDNA hergestellt und danach qPCR unter Verwendung des SYBR Green qPCR Master Mix (Applied Biosystems, Österreich) gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Komponenten	Volumen [μL]
<i>SYBR Green qPCR Master Mix</i>	10 μ L
<i>Reverse Primer (5 μM)</i>	1 μ L
<i>Forward Primer (5 μM)</i>	1 μ L
<i>cDNA</i>	8 μ L

4.3.5.4 Real-Time PCR Bedingungen

Die qPCR wurde in dem StepOnePlus qPCR Thermocycler (Applied Biosystems) durchgeführt.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Haltephase	95 °C	10 min	/
Denaturierung	95 °C	15 sec	40
Annealing/ Anlagerung	60 °C	1 min	40
Elongation	76 °C	15 sec	40

4.4 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarose-Gel-Elektrophorese werden die Moleküle (genomische DNA, Gesamt-RNA und PCR-Produkte) nach ihrem Molekulargewicht aufgrund ihrer Wander-Geschwindigkeit nach Anlegen eines elektrischen Felds aufgetrennt. Je nach Größe der Fragmente die aufgetrennt werden sollen, verwendet man Gele mit unterschiedlicher Konzentration an Agarose. Für kleinere Fragmente werden meisten 2%-ige Agarose-Gele, für größere Fragmente 1%-ige Agarose-Gele verwendet. Als Marker oder Größenstandard wurde eine 1 kbp Ladder verwendet. Bei Verwendung des 1 x TAE Laufpuffers wandern die negative geladenen Nukleinsäuren im Agarose-Gel in Richtung der Anode.

In dieser Arbeit wurde ein 1%-iges Gel hergestellt. Dazu wurde 4 g Agarose zu 392 mL Wasser und 8 mL 50 x TAE zugegeben. Das Ganze wurde in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die Lösung wurde danach auf 65 °C abgekühlt, mit SERVA DNA Stain Clear G versetzt, welches mit den DNA-Molekülen interkaliert und den Nachweis der DNA-Moleküle mittels UV-Licht ermöglicht. Anschließend wurde die Gel-Lösung in den Gel-schlitten mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Nach dem Abkühlen entstehen durch das Herausziehen des Kamms eine Reihe von Taschen im Gel.

Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer gestellt und die Kammer mit 1 x TAE Puffer gefüllt. Die Proben wurden in die Taschen pipettiert und mindestens 30 min elektrophoretisch aufgetrennt.

4.4.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelelektrophorese

Nach Abschluss der Auftrennung der Proben wird die Position der Fragmente im Agarose-Gel mit Hilfe eines „Typhoon 8600“-Imager bestimmt. Die DNA-Bande, die weiter untersucht werden sollte, wurde unter dem Fluoreszenzschirm identifiziert und ausgeschnitten und die DNA mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System aus dem Gel eluiert.

Die Isolierung der DNA wurde wie folgt durchgeführt:

- Die ausgeschnittene DNA-Bande wurde in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt
- Pro 10 mg Gel wurde 10 µL Membrane Binding Solution hinzugefügt. Die Mischung wurde gevortext und anschließend bei einer Temperatur von 55 - 65 °C inkubiert, bis sich das Gel-Stück vollständig aufgelöst hat.
- Eine SV Mini-Säule wurde auf ein Collection Tube aufgesetzt. Die Lösung, in dem das Gel-Stück aufgelöst wurde, wurde auf die SV Mini-Säule aufgetragen und das Säulchen bei Raumtemperatur für 1 min inkubiert.
- Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 16 000 x g für 1 min. Der Durchfluss wurde verworfen.
- Die SV Mini-Säule wurde wieder auf das Collection Tube aufgesetzt und mit 700 µL Membrane Wash Solution versetzt. Anschließend wurde erneut 1 min bei 16 000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen.
- Es erfolgte noch ein Waschschrift. 500 µL Membran Wash Solution wurden aufgetragen. Es wurde 5 min bei 16 000 x g zentrifugiert und der Durchfluss wieder verworfen.
- Die SV Mini-Säule wurde in ein steriles 1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 70 µL nukleasefreies Wasser zugegeben und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 16 000 x g für 1 min.
- Anschließend wurde die Mini-Säule verworfen, und die DNA bei -20 °C gelagert.

4.5 Die Klonierung von DNA-Fragmenten

Als Klonierung wird die Integration eines Gens oder DNA-Fragments in einen Klonierungs- bzw. Expressionsvektor, sowie die nachfolgende Vermehrung und Expression der rekombinanten DNA in einem geeigneten Wirtssystem bezeichnet.

4.5.1 Ligation

Bei der Ligation kann ein DNA-Fragment oder PCR-Produkt mit einem Plasmidvektor enzymatisch mittels Ligase verknüpft werden. Plasmidvektoren besitzen einen Bereich, die sogenannte MCS (Multiple Cloning Site), in dem sich Sequenzen, die von verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten werden können, befinden. In diesem Bereich kann ein DNA-Fragment einkloniert werden. Damit die Ligation erfolgen kann, muss das DNA-Fragment und der Plasmidvektor mit dem selben Restriktionsenzym geschnitten werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die TA-Klonierung mittels eines TOPO TA Cloning Kits verwendet. Der Vorteil bei dieser Art von Klonierung ist, dass das DNA-Fragment, das verknüpft werden soll, nicht geschnitten werden muss. In diesem Fall erfolgte eine direkte Ligation zwischen einem PCR-Produkt mit einzelnen A-Überhängen, die mittels *Taq*-Polymerase erzeugt wurden, und einem T-Vektor, der am 5' Ende Thymidin-Reste enthält.

4.5.1.1 Ligationsreaktion mit einem pYES2.1/V5-His-TOPO Vektor

Es wurde das gewünschte PCR-Produkt in den pYES2.1/V5-His-TOPO Vektor ligiert. Das PCR-Produkt wurde auf 2 ng/ μ L verdünnt. Nachfolgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung des Ligationsansatzes. Das Gesamtvolumen betrug 3 μ L.

<i>Komponente</i>	<i>Volumen [μL]</i>
<i>PCR-Produkt</i>	2 μ L
<i>Salt Solution</i>	0,5 μ L
<i>pYES2.1/V5-His-TOPO</i>	0,5 μ L

Der Ligationsansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und gleich danach in *E.coli* transformiert. Mittels Colony-PCR wurde danach ein richtiger Klon ausgewählt, der für die Plasmidpräparation verwendet wurde. Mit dem isolierten Plasmid wurde dann die Transformation in *S. cerevisiae* durchgeführt.

4.6 Transformation

Transformation ist ein Verfahren, bei der die Fremd-DNA, welche in einem Vektor integriert wurde, in einen geeigneten Wirtsorganismus eingebracht wird.

4.6.1 Transformation in *E.coli* Top10 kompetente Zellen

25 µL *E.coli* Top10 kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 3 µL Ligationsansatz (4.5.1.1) versetzt und 25 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation erfolgt im Wasserbad bei 42 °C ein Hitzeschock für 30 s. Danach wurde der Ansatz 5 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 250 µL SOC-Medium (37 °C) wurde der Ansatz im Thermoschüttler 60 min bei 37 °C und 300 rpm horizontal geschüttelt. Aliquote von 50 µL bzw. 200 µL wurden auf LB_{Amp}-Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert und danach eine Auswahl der gewachsenen Kolonien weiterverwendet.

Die Überprüfung, ob das Plasmid das Insert in der richtigen Orientierung enthält, erfolgt mittels Colony-PCR, indem ein genspezifischer und ein vektorspezifischer Primer verwendet wurden. Aus den positiven Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert (4.7), die danach für die Transformation in Hefezellen herangezogen wurden.

4.6.2 Transformation in *S. cerevisiae* kompetente Zellen INVSc1

Die Transformation in *S. cerevisiae* erfolgte mit dem S. c. EasyComp Transformation Kit. Plasmid-DNA, die aus positiven *E.coli*-Kolonien isoliert wurde, wurde in kompetente Hefezellen transformiert.

Zuerst wurden Lösung III und SGI-Platten auf Raumtemperatur gebracht. Danach wurden 5 µL kompetente Hefezellen INVSc1 auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 80 µL Lösung III und 1 µL Plasmid-DNA vermischt. Der Ansatz wurde 1 min gevortext und 60 min bei 30 °C inkubiert. Während der Inkubation wurde alle 15 min das Reaktionsgefäß 15 s gevortext. Anschließend wurde der ganze Reaktionsansatz auf eine SGI-Platte ausplattiert und bei 28 °C 2 - 4 Tage inkubiert, bis die Kolonien ausreichend gewachsen sind. Die Kolonien wurden mittels Colony-PCR auf Anwesenheit des Inserts überprüft.

4.7 DNA-Plasmid Isolierung

Eine Übernachtskultur der Bakterien wurde am Vortag der Plasmidisolierung angesetzt. Dazu wurde eine positive Kolonie von der Agarplatte mit *E.coli* Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher entnommen und mit 5 mL LB_{Amp}-Medium in ein Reagenzglas überführt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Tag erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E.coli* mit dem Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System.

Die Übernachtskultur wurde 5 min bei 12 000 x g zentrifugiert und die Pellets mit 200 µL Resuspension Solution resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 200 µL Lysis Solution versetzt, ein paar Mal vorsichtig invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde 350 µL Neutralization Solution (S3) zugegeben, 4- bis 6-mal invertiert und 10 min bei 12 000 x g zentrifugiert. Eine Spin-Säule wurde in ein Auffanggefäß gesteckt, mit 500 µL Column Preparation Solution versetzt und anschließend 1 min bei

12 000 x g zentrifugiert. Das klare Zelllysate wurde in die Spin-Säule überführt, 1 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die Spin-Säule mit 750 µL gewaschen und 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Spin-Säule erneut 2 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Spin-Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Eluieren wurden 50 - 100 µL Elution Solution verwendet und eine Minute bei 12 000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde entfernt und das eluierte Plasmid wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.8 Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA

Die Konzentration sowie die Reinheit von Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkten kann mit einem Nanodrop Gerät bestimmt werden. 2 µL der jeweiligen DNA (Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkt) werden auf die vorher mit einem Tuch gereinigte Messoberfläche des Geräts aufgetragen und nach dem Verschließen des Deckels die Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm, 280 nm und 230 nm bestimmt.

Die Konzentration der Plasmid-DNA bzw. des PCR-Produkts kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$[\mu\text{g}/\text{mL}] = A_{260} * V * F$$

c = Konzentration der DNA,

V = Verdünnungsfaktor,

F = Multiplikationsfaktor (= 50 bei doppelsträngiger DNA), A₂₆₀ = Extinktion bei 260 nm

Die Reinheit der Plasmid-DNA bzw. des PCR-Produkts wurde über das Verhältnis A₂₆₀/A₂₈₀ und Verhältnis A₂₆₀/A₂₃₀ bestimmt. Die DNA absorbiert bei einer Wellenlänge von 260 nm, Proteine bei 280 nm und Polysaccharide bzw. Polyphenole bei 230 nm. Bei reiner DNA liegt der Wert des Verhältnisses zwischen 1,8 und 2.

4.9 Heterologe Expression in *S. cerevisiae*

Zuerst erfolgte die Anzucht und Vermehrung des Hefestammes. Am 1. Tag wurden 5 mL SGI-Medium in einer Epprouvette mit einer Kolonie transformierter Hefezellen angeimpft und für 24 h bei 28 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Am 2. Tag wurden 2 x 5 mL SGI-Medium mit je 500 µL der inkubierten Hefekultur überimpft und erneut für 24 h bei 28 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

Von der so erhaltenen Hefekultur wurden am 3. Tag 5 mL in einen 250 mL Erlenmeyerkolben, welcher 50 mL SGI-Medium enthielt, überführt und erneut für 24 h bei 28 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

Am 4. Tag wurde die optische Dichte der Hefekultur mittels Absorption bei 600 nm am Photometer gemessen (OD₆₀₀), die Kultur diente als Starterkultur für die Expression.

250 mL YPGE-Medium wurden in einem 1L Erlenmeyerkolben mit der entsprechenden Menge an Starter-Hefekultur angeimpft (Tab. 7) und so lange bei 28 °C und 200 rpm inkubiert, bis die Lösung eine OD₆₀₀ zwischen 0,8 und 1,2 erreicht hatte.

OD600 der Hefekultur	Zugabe zum YPGE-Medium in mL
2	25
1,7	30
1,4	35
1,25	40
1,1	45
≤ 1	50

Tabelle 7: Zugabe an SGI-Medium in Abhängigkeit der OD₆₀₀

Dann wurden zur Induktion der Proteinbildung 27 mL einer sterilfiltrierten 20%igen D(+)-Galaktoselösung zugegeben und für weitere 12-15 h bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Die OD₆₀₀ der 1:10 verdünnten Hauptkultur sollte dann zwischen 0,8 und 1,2 liegen. Anschließend wurde die Lösung auf 50 mL Falcon-Röhrchen aufgeteilt und für 10 min bei 5.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen.

Die dabei entstandenen Pellets wurden in 27 mL TEK-Puffer resuspendiert, die Suspensionen in einem Falcon-Röhrchen vereinigt und anschließend für 5 min bei 4 °C und bei 4.000 rpm zentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets in 2,5 mL eisgekühltem TES-B*-Puffer resuspendiert und 7,5 g Glasperlen zugegeben.

Dann wurden die Zellwände für 20 min durch heftiges Schütteln mechanisch aufgebrochen, wobei die Probe immer abwechselnd 30 sec geschüttelt und 30 sec auf Eis inkubiert wurde. Anschließend wurden 5 mL eisgekühlter TES-B*-Puffer zugegeben, gemischt und die Probe für 10 min bei 4 °C und bei 16.000 rpm zentrifugiert.

Der klare Überstand wurde in 100 µL Portionen aufgeteilt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

4.10 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Protein-Bestimmung nach Lowry basiert auf der Biuret- und der Folin-Ciocalteu Reaktion. Im ersten Schritt bilden sich bei der Biuret-Reaktion in alkalischer Lösung blau-violette Komplexe zwischen den Peptid-Bindungen des Proteins und den Kupfer(II)-Ionen, wobei durch Oxidation der aromatischen Aminosäuren das Kupfer(II) zu Kupfer(I) reduziert wird. Im zweiten Schritt wird das gelbgefärbte Folin-Ciocalteu Reagens zu Molybdänblau durch den bei der Biuret-Reaktion gebildeten Komplex reduziert. Das Folin-Ciocalteu-Reagenz enthält sechswertiges Molybdän und Wolfram als Heteropolysäuren. Molybdat bzw. das Wolfram wird durch den Biuret-Komplex zu vierwertigem Molybdän bzw. Wolfram reduziert.

Die Extinktion des resultierenden Molybdenblaus kann bei einer Wellenlänge von 750 nm photometrisch bestimmt werden.

Reagenzien

Lösung A (2% Na_2CO_3 in 0,1% NaOH + 0,5% SDS)

Lösung B (1% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$)

Lösung C (2% Trinatriumcitrat)

Folin-Ciocalteu-Reagenz

BSA – Stammlösung (1 μg Bovine-Serum-Albumin/ μL)

Herstellung von Lösung 1

30 μL Lösung A

300 μL Lösung B

300 μL Lösung C

Durchführung:

Erstellung der Kalibrationsgerade:

- Als Standard wurde eine BSA Lösung (1 $\text{mg}/\mu\text{L}$) verwendet
- Die Proben für die Kalibrationsgerade werden nach folgendem Pipettierschema in 1 mL Plastikkuvetten angesetzt.

μg BSA in der Küvette	0	10	20	30	40	50
μl BSA-Lösung	0	10	20	30	40	50
μl Lösung 1	1000	990	980	970	960	950

- Von der Probe wurde jeweils 5 und 10 μL im Doppelansatz eingesetzt, und danach mit Lösung 1 auf 1 mL aufgefüllt.
- Alle Proben wurden mit 100 μL Folin-Ciocalteu-Reagenz (1:1 verdünnt) versetzt.
- Nach erfolgtem Homogenisieren wurde 45 min im Dunklen inkubiert.
- Danach wurde die Extinktion der Proben sowie der Proben der Kalibrationsgerade bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen.
- Anschließend wurde die Protein-Konzentration unter Zuhilfenahme der Kalibrationsgerade berechnet.

4.11 Enzymtests

Die Flavonol 6-Hydroxylase (F6H)-cDNA wurde exprimiert und mit dem rekombinanten Enzym wurde die Substratspezifität untersucht. Als Substrate wurden folgende (^{14}C)-markierte Substrate verwendet:

Substrat	Radioaktivität [dpm]
(^{14}C)-Kämpferol	6000 dpm
(^{14}C)-Quercetin	6000 dpm
(^{14}C)-Naringenin	6000 dpm
(^{14}C)-Dihydroquercetin	6000 dpm
(^{14}C)-Apigenin	6000 dpm
(^{14}C)-Eriodyctiol	6000 dpm

Tabelle 8: Getestete (^{14}C) radioaktiv markierte Flavonoid-Substrate

Es wurde 6 000 dpm (0.036 nmol) von jedem der in Methanol gelösten Substrate in ein separates Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und im Vakuum bis zur vollständigen Trockne eingedampft. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße mit den darin enthaltenen (^{14}C)-markierten Flavonoiden wurden für die Enzymtests verwendet.

Das Gesamtvolumen des Enzymtests betrug 100 μL :

6 000 dpm (^{14}C)-markiertes Substrat
30 μL rekombinante F6H
65 μL 0,1 M KPi (0,4 % Ascorbat) pH 7,0
5 μL NADPH (2,33 mg / 100 μL)

Der Reaktionsansatz wurde im Wasserbad bei 30 $^{\circ}\text{C}$ für 30 min inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 10 μL 100 %iger Essigsäure und 70 μL Ethylacetat gestoppt. Nach erfolgreicher Homogenisation wurde 3 min bei 13 000 rpm zentrifugiert, um die organische von der wässrigen Phase zu trennen. Die organische Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und danach mit einer Glaskapillare auf eine Cellulose-Dünnschichtplatte aufgetragen. Die Entwicklung der Cellulose-DC-Platte erfolgte mit dem Laufmittel CAW (50 Chloroform : 45 Eisessig : 5 H_2O). Danach wurde die DC-Platte getrocknet und die trockene Dünnschichtplatte mit dem TLC-Linear Analyzer ausgewertet.

4.12 Charakterisierung der F6H von *Rudbeckia hirta*

Die Charakterisierung der rekombinanten Flavonol 6-Hydroxylase erfolgte unter Verwendung der Substrate Quercetin und Kämpferol durch Variation der Konzentration der Substrate, des pH-Werts, der Temperatur, der Reaktionszeit und der Enzymkonzentration. Die Umsatzraten des rekombinanten Enzyms sollten bei der Bestimmung dieser Parameter zwischen 30 % und 50 % liegen.

4.12.1 Bestimmung des pH-Optimums

Die Feinbestimmung des pH-Optimums unter Verwendung der rekombinanten Flavonol 6-Hydroxylase (F6H) erfolgte in einem pH-Bereich von pH 6,5 und pH 7,5. Als Puffer wurde ein 0,2 M KPi (0,4 % Ascorbat) Puffer verwendet.

Substrat (^{14}C)-Quercetin:

Gesamtvolumen: 100 μL

6 000 dpm (^{14}C)-Quercetin

94 μL 0,2 M KPi (0,4 % Ascorbat) pH 6,5 bis 7,5

1 μL Enzym

5 μL NADPH (2,33 mg / 100 μL)

Temperatur: 30 $^{\circ}\text{C}$

Inkubationszeit: 30 min

Substrat (^{14}C)-Kämpferol:

Gesamtvolumen 100 μL

6 000 dpm (^{14}C)-Kämpferol

93,7 μL 0,2 M KPi (0,4 % Ascorbat) pH 6,5 bis 7,5

1,3 μL Enzym

5 μL NADPH (2,33 mg / 100 μL)

Temperatur: 30 $^{\circ}\text{C}$

Inkubationszeit: 30 min

Das in Methanol gelöste (^{14}C)-Kämpferol bzw. (^{14}C)-Quercetin wurde im Vakuum bis zur vollständigen Trockne eingedampft. Anschließend wurde der Puffer, das Enzym und NADPH zugegeben.

4.12.2 Bestimmung des Temperaturoptimums

Die Bestimmung des Temperaturoptimums erfolgte, indem die Enzymaktivität beim pH-Optimum in Abhängigkeit von der Temperatur (0 bis 60 °C) bestimmt wurde.

Substrat (^{14}C)-Quercetin:

Gesamtvolumen: 100 μL

6 000 dpm (^{14}C)-Quercetin

94 μL 0,2 M KPi (0,4 % Ascorbat) pH 7,0

1 μL Enzym

5 μL NADPH (2,33 mg / 100 μL)

Temperaturbereich: 0 - 60 °C

Inkubationszeit: 30 min

Substrat (^{14}C)-Kämpferol:

Gesamtvolumen: 100 μL

6 000 dpm (^{14}C)-Kämpferol

93,7 μL 0,2 M KPi (0,4 % Ascorbat) pH 6,75

1,3 μL Enzym

5 μL NADPH (2,33 mg / 100 μL)

Temperaturbereich: 0 - 60 °C

Inkubationszeit: 30 min

4.12.3 Bestimmung der Zeitlinearität

Die Abhängigkeit der Produktbildung in Abhängigkeit von der Zeit (Zeitlinearität) wurde bei konstanter Enzymkonzentration, Temperatur und pH-Wert über einen Zeitraum von 0 bis 60 min bestimmt.

Substrat (^{14}C)-Quercetin:

Gesamtvolumen: 100 μL

6 000 dpm (^{14}C)-Quercetin

94 μL 0,2 M KPi (0,4 % Ascorbat) pH 7,0

1 μL Enzym

5 μL NADPH (2,33 mg / 100 μL)

Temperatur: 25 $^{\circ}\text{C}$

Zeit: 0 - 60 min

Substrat (^{14}C)-Kämpferol:

Gesamtvolumen: 100 μL

6 000 dpm (^{14}C)-Kämpferol

94 μL 0,2 M KPi (0,4 % Ascorbat) pH 6,75

1,3 μL Enzym

5 μL NADPH (2,33 mg / 100 μL)

Temperatur: 25 $^{\circ}\text{C}$

Zeitintervall: 0-60 min

4.12.4 Bestimmung der Proteinlinearität

Die Abhängigkeit der Produktbildung in Abhängigkeit von der Enzymmenge (Proteinlinearität) wurde bei 25 °C, pH 7,0 und einer Inkubationszeit von 15 Minuten für Quercetin bzw. bei 25 °C, pH 6,75 und einer Inkubationszeit von 10 Minuten für Kämpferol bestimmt, während die Proteinmenge (0 bis 2,5 µL) variiert wurde.

Substrat (¹⁴C)-Quercetin:

Gesamtvolumen: 100 µL

6 000 dpm (¹⁴C)-Quercetin

92,5 - 95 µL 0,2 M KPi (0,4 % Ascorbat) pH 7,0

0 - 2,5 µL Enzym

5 µL NADPH (2,33 mg / 100 µL)

Temperatur: 25 °C

Zeitintervall: 15 min

Substrat (¹⁴C)-Kämpferol:

Gesamtvolumen: 100 µL

6 000 dpm (¹⁴C)-Kämpferol

92,5 - 95 µL 0,2 M KPi (0,4 % Ascorbat) pH 6,75

0 - 2,5 µL Enzym

5 µL NADPH (2,33 mg / 100 µL)

Temperatur: 25 °C

Zeitintervall: 10 min

4.12.5 Substratspezifität

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten K_m , V_{max} , k_{cat} und k_{cat}/K_m wurden radiochromatographische Aktivitäts-Messungen mit Quercetin und Kämpferol durchgeführt. Dazu wurde die Enzymaktivität bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen bestimmt.

Substrat (^{14}C)-Quercetin:

Gesamtvolumen: 100 μ L

2000-10 000 dpm (^{14}C)-Quercetin

94,15 μ L 0,2 M KP_i (0,4 % Ascorbat) pH 7,0

0,85 μ L Enzym

5 μ L NADPH (2,33 mg / 100 μ L)

Temperatur: 25 °C

Zeitintervall: 15 min

Substrat (^{14}C)-Kämpferol:

Gesamtvolumen: 100 μ L

2000-10 000 dpm (^{14}C)-Kämpferol

93,6 μ L 0,2 M KP_i (0,4 % Ascorbat) pH 6,75

1,4 μ L Enzym

5 μ L NADPH (2,33 mg / 100 μ L)

Temperatur: 25 °C

Zeitintervall: 10 min

4.13 Präparation des Rohextraktes

In einer mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Reibschale wurden Knospen bzw. Petalen von *R. hirta* mit Quarzsand, Polyclar AT und Puffer in folgenden Mengenverhältnissen homogenisiert:

- 0,5 g Pflanzenmaterial
- 0,25 g Polyclar AT
- 0,25 g Quarzsand
- 3 mL Homogenisations-Puffer (Tris-HCl pH 7,5 [0,4 % Na-Ascorbat])

Das Homogenat wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 10 min bei 10 000 x g und 4°C zentrifugiert.

Der erhaltene Überstand (Rohextrakt) wurde über ein Sephadex G 25 Medium-Säulchen filtriert um die phenolischen Pflanzeninhaltsstoffe und andere niedermolekulare Substanzen zu entfernen. Als Säulchen wurden Pasteur-Pipetten verwendet, die 1 mL Sephadex G 25-Medium enthielten (400 µL Bettvolumen). Vor Verwendung wurden sie mit 5 mL Puffer equilibriert. 400 µL des zuvor gewonnenen Überstandes (Rohextrakt) wurden auf die Säulchen aufgetragen und anschließend mit weiteren 400 µL Puffer eluiert.

Der Elutionspuffer entsprach dem Puffer, der für die nachfolgenden Enzymtests verwendet wurde:

- 0,1 M KP_i (0,4 % Na-Ascorbat) pH 7,5 für die Bestimmung der **Phenylalaninammoniumlyase-** (PAL), **Chalkonsynthase-** (CHS) und **Dihydroflavonol 4-Reduktase-** (DFR) Enzymaktivität
- 0,1 M Tris-HCl (0,4 % Na-Ascorbat) pH 7,5 für die Bestimmung der **Flavanon 3-Hydroxylase-** (FHT) und **Flavonolsynthase-** (FLS) Enzymaktivität

Der umgepufferte Enzymextrakt wurde für weitere Enzymtest verwendet oder mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.14 Standardenzymtest

4.14.1 Phenylalaninammoniumlyase (PAL)-Bestimmung

Gesamtvolumen: 100 µL

40 µL umgepufferter Rohextrakt

5 µL (^{14}C)-Phenylalanin (0,0238 nmol, 25 700 dpm)

55 µL 0,1 M KP_i (0,4 % Na-Ascorbat) pH 8,5

wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, 30 min bei 30°C in einem Wasserbad inkubiert. Nach Beendigung des Enzymtests wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µL 100 %iger Essigsäure (HOAc) und 200 µL Ethylacetat (EtOAc) gestoppt. Der Inhalt des Eppendorf-Reaktionsgefäßes wurde gevortext, 3 min bei 13 000 rpm zentrifugiert, um die organische von wässrigen Phase zu trennen. 100 µL der organischen Phase wurde entnom-

men, in ein Szintillationsröhrchen überführt und mit Szintillationscocktail versetzt. Die Radioaktivität (dpm) der bei der Enzymreaktion gebildeten (^{14}C)-Zimtsäure wurde mit dem Szintillationszähler bestimmt. Da ein sehr kleine Mengen des (^{14}C)-Phenylalanins ebenfalls mit Ethylacetat extrahiert werden, wurde ein Blindwert mitbestimmt und die Messergebnisse entsprechend korrigiert.

4.14.2 Chalkonsynthase (CHS)-Bestimmung

Gesamtvolumen: 100 μL

40 μL umgepufferter Rohextrakt
5 μL (^{14}C)-Malonyl-CoA (1,5 nmol, 156 000 dpm)
5 μL *p*-Cumaroyl-CoA (1 nmol)
50 μL 0,1 M KPi (0,4 % Na-Ascorbat) pH 7,5

wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, 30 min bei 30°C in einem Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μL 100 %iger Essigsäure (HOAc) und 200 μL Ethylacetat (EtOAc) gestoppt. Der Inhalt des Eppendorf-Reaktionsgefäßes wurde gevortext, 3 min bei 13 000 rpm zentrifugiert, um die organische von wässrige Phase zu trennen. Bei dem CHS-Test ist eine nachfolgende Trennung von Produkt und Substrat mittels Dünnschichtchromatographie nicht nötig, da das gebildete radioaktiv markierte Produkt nach Ausschütteln des Reaktionsansatzes mit Ethylacetat komplett in die organischen Phase extrahiert wird, hingegen das Substrat (^{14}C)-Malonyl-CoA vollständig in der wässrigen Phase verbleibt. Ein Aliquot von 100 μL der organischen Phase wird in ein Szintillationsröhrchen überführt und mit Szintillationscocktail vermischt. Die Radioaktivität (dpm) des bei der Reaktion gebildeten Naringenchalkons bzw. Naringenins wird mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt.

4.14.3 Flavanon 3-Hydroxylase (FHT)-Bestimmung

Gesamtvolumen: 100 μL

6 000 dpm (^{14}C)-Naringenin
40 μL umgepufferter Enzymextrakt
5 μL α -Ketoglutarat (1,46 mg/mL H_2O)
5 μL $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,56 mg/mL H_2O)
50 μL 0,1 M Tris-HCl (0,4 % Na-Ascorbat) pH 7,5

6 000 dpm des in Methanol gelösten (^{14}C)-Naringenin werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und im Vakuum bis zur vollständigen Trockne eingedampft. Anschließend werden der Puffer, der Enzymextrakt sowie α -Ketoglutarat zugegeben. Durch Zugabe der FeSO_4 -Lösung wird die Enzymreaktion gestartet.

Der Reaktionsansatz wurde im Wasserbad bei 30 °C für 30 min inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von 10 μL 100 %iger Essigsäure, 70 μL Ethylacetat und 10 μL einer wässrigen EDTA-Lösung gestoppt. Der Inhalt des Eppendorf-Reaktionsgefäßes wurde gevortext und 3 min bei

13 000 rpm zentrifugiert, um die organische von der wässrigen Phase zu trennen. Die organische Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert und danach mit einer Glaskapillare auf eine Cellulose-Dünnschichtplatte aufgetragen. Als Referenzsubstanz wurde (^{14}C)-Naringenin auf die Cellulose-Dünnschichtplatte mitaufgetragen. Nach Chromatographie mit dem Laufmittel CAW (50 Chloroform : 45 Eisessig : 5 H_2O) wurde die trockene DC-Platte mit einem TLC-Linearanalyser gescannt und die Umsatzraten berechnet, indem die Peaks des Substrats [^{14}C]-Naringenin] und des gebildeten Produkts [^{14}C]-Dihydrokämpferol] integriert wurden.

4.14.4 Flavonolsynthase (FLS)-Bestimmung

Gesamtvolumen: 100 μL

6 000 dpm (^{14}C)-Dihydrokämpferol
40 μL umgepufferter Enzymextrakt
5 μL α -Ketoglutarat (1,46 mg/mL H_2O)
5 μL $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,56 mg/mL H_2O)
50 μL 0,1 M Tris-HCl (0,4 % Na-Ascorbat) pH 7,5

6 000 dpm des in Methanol gelösten (^{14}C)-Dihydrokämpferol wurden in eine Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und im Vakuum bis zur Trockne eingedampft. Nach Zugabe des Puffers, des Enzymextrakts sowie des α -Ketoglutarats wurde der Enzymtest durch Zugabe der FeSO_4 -Lösung gestartet.

Der Reaktionsansatz wurde im Wasserbad bei 30 °C für 30 min inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von 10 μL 100 %iger Essigsäure, 70 μL Ethylacetat und 10 μL wässriger EDTA-Lösung gestoppt. Der Inhalt der Eppendorf-Reaktionsgefäße wurde gevortex und 3 min bei 13 000 rpm zentrifugiert, um die organische von wässrigen Phase zu trennen. Die organische Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß übergeführt und anschließend mit einer Glaskapillare auf eine Cellulose-Dünnschichtplatte aufgetragen. Als Referenzsubstanz wurde (^{14}C)-Dihydrokämpferol auch auf diese Cellulose-Dünnschichtplatte mitaufgetragen.

Nach erfolgter Chromatographie der DC-Platte mit dem Laufmittel CAW (50 Chloroform : 45 Eisessig : 5 H_2O) wurden die getrockneten Cellulose-DC-Platten mit einem TLC-Linearanalyser gescannt und die Umsatzraten berechnet, indem die Peaks des Substrats [^{14}C]-Dihydrokämpferol] und des gebildeten Produkts [^{14}C]-Kämpferol] integriert wurden.

4.14.5 Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR)-Bestimmung

Gesamtvolumen: 50 µL Gesamtvolumen: 100 µL

Substrate: 6 000 dpm (^{14}C)-Dihydrokämpferol bzw. 6 000 dpm (^{14}C)-Dihydroquercetin

20 µL umgepufferter Enzymextrakt

5 µL NADPH (1,46 mg/mL H_2O)

25 µL 0,1 M KPi (0,4 % Na-Ascorbat) pH 6,0

6 000 dpm des in Methanol gelösten (^{14}C)-Dihydrokämpferols bzw. des (^{14}C)-Dihydroquercetins wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und im Vakuum bis zur vollständigen Trockne eingedampft. Nach Zugabe des Puffers und des Enzymextrakts wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe der NADPH-Lösung gestartet.

Der Reaktionsansatz wurde im Wasserbad bei 30 °C für 30 min inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 10 µL 100 %iger Essigsäure und 70 µL Ethylacetat gestoppt. Der Inhalt der Eppendorf-Reaktionsgefäße wurde gevortext und 3 min bei 13 000 rpm zentrifugiert, um die organische von der wässrigen Phase zu trennen. Die organische Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit einer Glaskapillare auf eine Cellulose-Dünnschichtplatte aufgetragen. Als Referenzsubstanz wurde (^{14}C)-Dihydrokämpferol bzw. (^{14}C)-Dihydroquercetin auch auf die Cellulose-Dünnschichtplatte mitaufgetragen.

Nach Entwicklung der DC-Platte mit dem Laufmittel CAW (50 Chloroform : 45 Eisessig : 5 H_2O) wurde die trockene DC-Platte mit einem TLC-Linearanalyzer gescannt und die Umsatzraten berechnet, indem die Peaks der Substrate [(^{14}C)-Dihydrokämpferol bzw. [(^{14}C)-Dihydroquercetin] und der gebildeten Produkte [(^{14}C)-Leucopelargonidin bzw. (^{14}C)-Leucocyanidin] integriert wurden.

Abbildung 23 zeigt ein Alignment zwischen der experimentell ermittelten *F6H*-Nukleotidsequenz und der aus dem Transkriptom abgeleiteten Sequenz. Da die hohe Übereinstimmung der Sequenzen zeigt, dass die Klonierung erfolgreich war, wurde das Plasmid in Hefe (*S. cerevisiae*) transformiert und das F6H-Enzym exprimiert.

5.1.2 Nachweis der F6H-Aktivität (Nachweis der Enzymaktivität der rekombinanten F6H)

Um die F6H-Aktivität nachzuweisen, wurden die Enzymtests mit (^{14}C)-markiertem Naringenin, Kämpferol, Quercetin, Dihydroquercetin, Apigenin und Eriodictyol als Substrate in Gegenwart von NADPH durchgeführt. Qu und Km konnten durch die F6H direkt zum Quercetagetin bzw. 6-Hydroxy-Kämpferol umgesetzt werden. Bislang konnte jedoch keine F6H-Aktivität mit den Substraten Naringenin, Dihydroquercetin, Apigenin und Eriodictyol nachgewiesen werden.

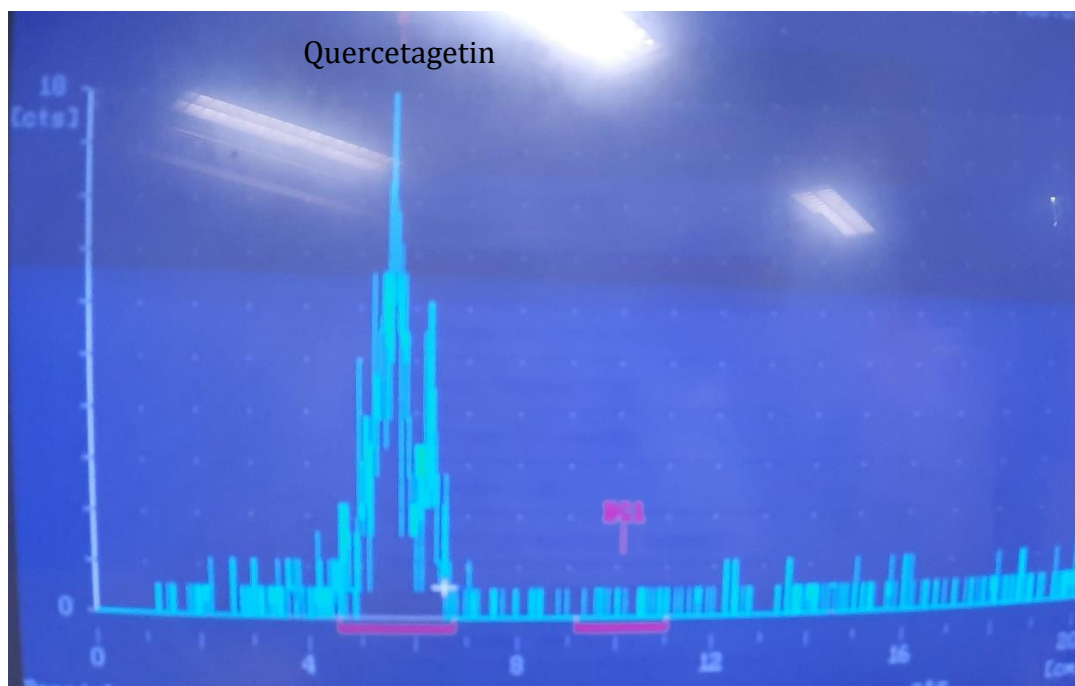


Abbildung 24: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von Quercetagetin aus Quercetin in Anwesenheit von NADPH durch die rekombinante F6H aus *R.hirta* nach Chromatographie in CAW

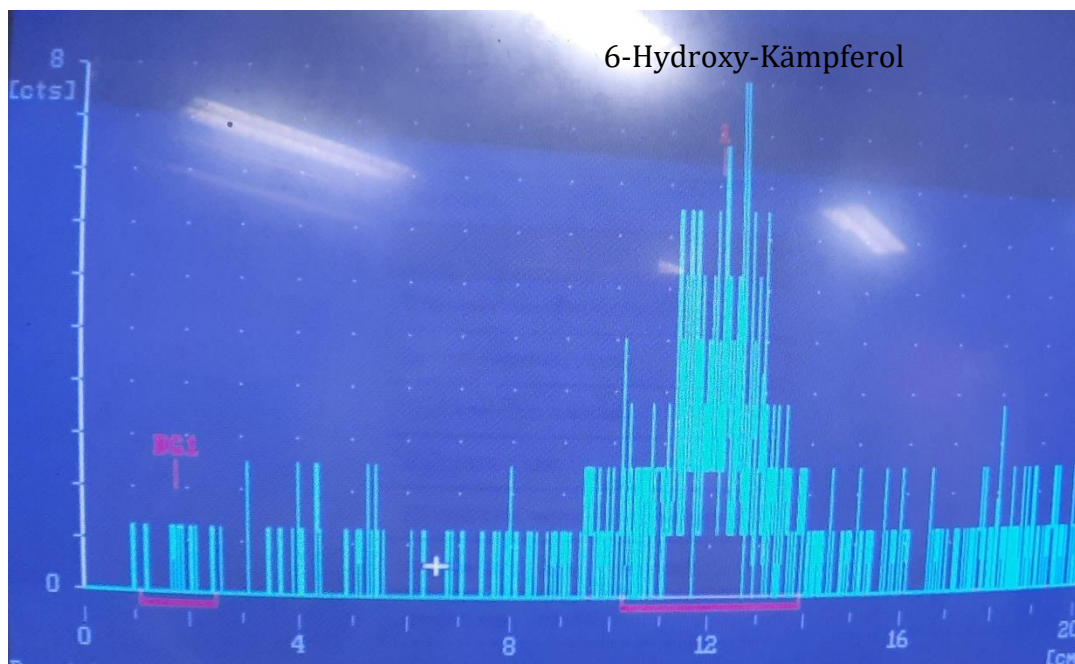


Abbildung 25: Radiochromatogramm der enzymatischen Bildung von 6-Hydroxy-Kämpferol aus Kämpferol in Anwesenheit von NADPH durch die rekombinante F6H aus *R.hirta* nach Chromatographie in CAW

5.1.3 Charakterisierung der F6H

Die Optimierung der Enzymassays wurde mit (^{14}C)-Quercetin und (^{14}C)-Kämpferol durchgeführt, da die Untersuchungen mit Pflanzenextrakten (Schlangen et al.) mit diesen Substraten hohe Enzymaktivitäten aufwiesen. Für diese Charakterisierung sollte die Aktivität des rekombinanten Enzyms bei einem 30-50 %igen Umsatz des Flavonoid-Substrats liegen.

5.1.3.1 Charakterisierung der F6H mit radioaktiv markiertem Quercetin

Die Umsetzung von Quercetin wurde bei 30 °C und einer 30-minütigen Inkubationszeit in 0,2 M KPI + 0,4 % Ascorbat-Puffer bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Mit Quercetin als Substrat wurde bei pH 7,0 ein Maximum beobachtet (Abb. 26A). Danach wurde die Umsetzung von Quercetin bei pH 7 (0,2 M KPI + 0,4 % Ascorbat-Puffer) und einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei verschiedenen Temperaturen gemessen. Das Temperaturoptimum betrug 25 °C (Abb. 26B). Die Abhängigkeit der Reaktion von der Zeit wurde am optimalen pH 7 und bei der optimalen Temperatur von 25 °C bei verschiedenen Zeitintervallen gemessen. Unter diesen Bedingungen war die Produktzunahme für mindestens 15 Minuten linear. Die Abhängigkeit der Reaktion von der Proteinmenge wurde mit Quercetin als Substrat bei 25 °C, pH 7 und einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei verschiedenen Proteinmengen gemessen. Die F6H-Reaktion war bis ca. 0,85 µg Protein beobachtet. (Abb. 26D)

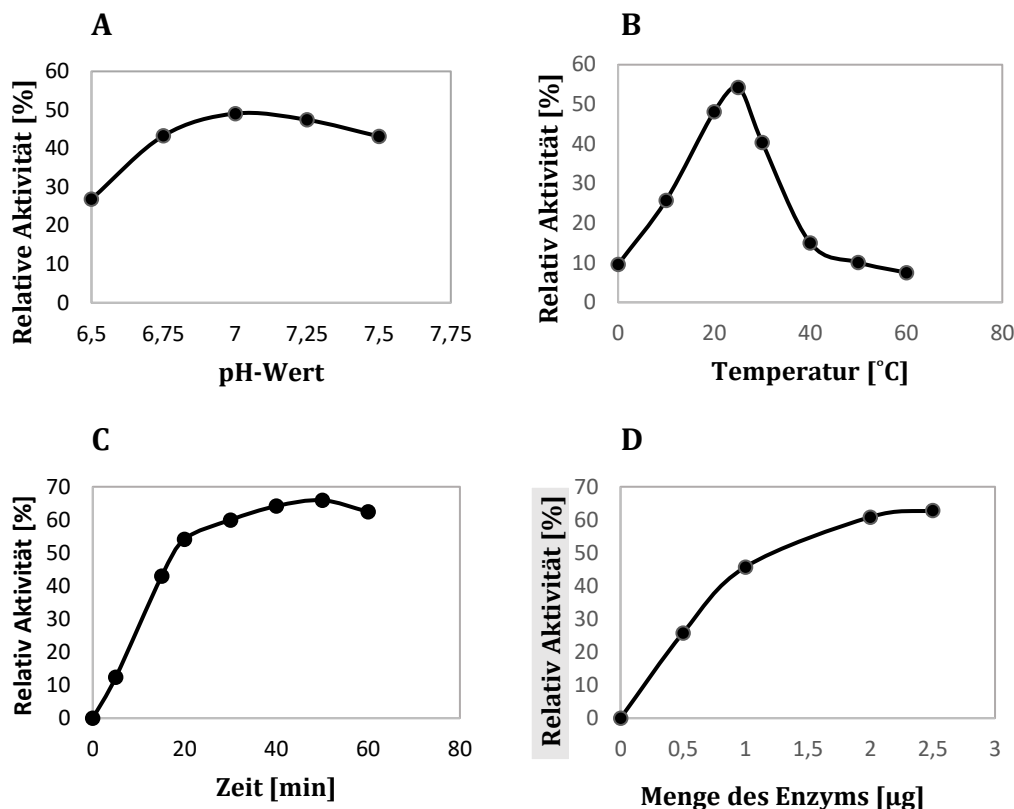


Abbildung 26: Optimierung der Reaktionsbedingungen der F6H. A) Einfluss des pH-Wertes B) Einfluss der Inkubationstemperatur. C) Einfluss der Inkubationszeit. D) Einfluss der Proteinmenge auf d

5.1.3.2 Charakterisierung der F6H mit radioaktiv markiertem Kämpferol

Die Umsetzung von Kämpferol wurde bei 30 °C und einer 30-minütigen Inkubationszeit in 0,2 M KPI + 0,4 % Ascorbat-Puffer bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Mit Kämpferol als Substrat wurde bei pH 6,75 ein Maximum beobachtet (Abb. 27A). Danach wurde die Umsetzung von Kämpferol bei pH 6,75 (0,2 M KPI + 0,4 % Ascorbat-Puffer) und einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei verschiedenen Temperaturen gemessen. Das Temperaturoptimum betrug 25 °C (Abb. 27B). Die Abhängigkeit der Reaktion von der Zeit wurde am optimalen pH 6,75 und bei der optimalen Temperatur von 25 °C bei verschiedenen Zeitintervallen gemessen. Unter diesen Bedingungen war die Produktzunahme für mindestens 10 Minuten linear. Die Abhängigkeit der Reaktion von der Proteinmenge wurde mit Kämpferol als Substrat bei 25 °C, pH 6,75 und einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei verschiedenen Proteinmengen gemessen. Die F6H-Reaktion war bis ca. 1,4 μg Protein beobachtet. (Abb. 27D)

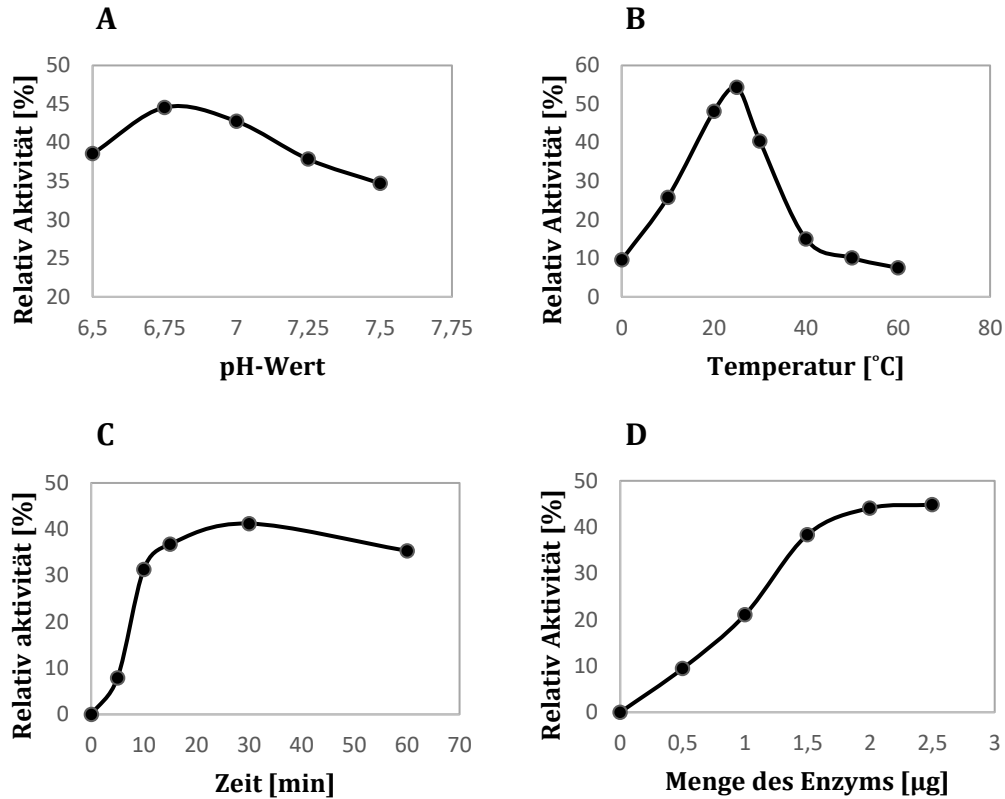


Abbildung 27: Optimierung der Reaktionsbedingungen der F6H. A) Einfluss des pH-Wertes B) Einfluss der Inkubationstemperatur. C) Einfluss der Inkubationszeit. D) Einfluss der Proteinmenge auf die Reaktion.

5.1.3.3 Ermittlung der kinetischen Parameter

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten K_m , V_{max} , k_{cat} und k_{cat}/K_m der F6H gegenüber Quercetin und Kämpferol wurden Aktivitäts-Messungen durchgeführt (4.12.5). Dazu wurde die Enzymaktivität bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen bestimmt. Als Ergebnis entstand die typische Sättigungskurve (Michaelis-Menten-Diagramm) und die kinetischen Konstanten wurden über die Michaelis-Menten-Kinetik ermittelt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} und die Konzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit (Michaelis-Menten-Konstante, K_m) wurden mittels Lineare Regression ermittelt. Für die Berechnung der kinetischen Konstante (k_{cat}) und der katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_m) wurden die ermittelten K_m - sowie V_{max} -Werte und die eingesetzte Enzymkonzentration verwendet.

Die Michaelis-Menten-Konstante K_m (in mM) ist definiert als die Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit und ist ein Maß für die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat. Dies bedeutet je kleiner K_m ist, desto höher ist die Enzym-Substrat-Affinität. Es wurde auch die katalytische Konstante (k_{cat}) berechnet, die angibt, wie viele Substrat-Moleküle pro Sekunde von einem Enzym-Molekül in ein Produkt umgewandelt werden.

Die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Konzentration an Quercetin bzw. Kämpferol ist in Abbildung 4 als Michaelis-Menten-Diagramm dargestellt. In Tabelle 9 sind die aus den Sättigungskurven (Abb.28) ermittelten kinetischen Parameter abgebildet.

Enzym	Substrat	K_m [μM]	$V_{\max}$ [nM/s]	k_{cat}/K_m [L/mol*s]
F6H	Quercetin	0,4	0,25	1250
	Kämpferol	0,14	0,16	2781

Tabelle 9: Kinetische Parameter für Quercetin bzw. Kämpferol der Flavonol 6-Hydroxylase F6H, die aus den Sättigungskurven in der Abb. 24 ermittelt wurden.

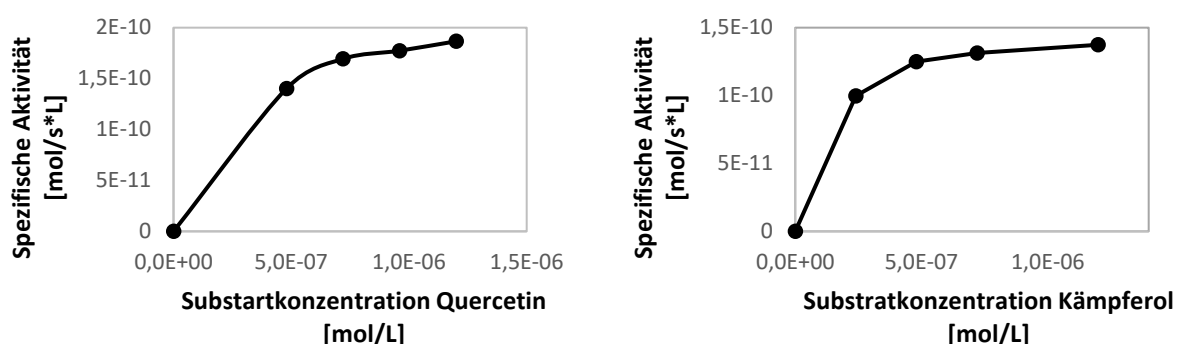


Abbildung 28: Michaelis-Menten-Diagramme der Flavonol 6-Hydroxylase F6H. Als Substrate wurden Quercetin (links) und Kämpferol (rechts) eingesetzt.

Laut Tabelle 9 zeigt die F6H den kleineren K_m -Wert von 0,14 μM für Kämpferol im Vergleich zu Quercetin, wo der K_m -Wert bei 0,4 μM liegt. Die F6H weist also eine höhere Affinität zu Kämpferol im Vergleich zu Quercetin auf. Da auch der k_{cat}/K_m für Kämpferol deutlich höher ist als der für Quercetin kann festgestellt werden, dass Kämpferol das bevorzugte Substrat für die F6H ist.

5.2 Nachweis von Enzymaktivitäten der Flavonoidbiosynthese in *Rudbeckia hirta*

Zum Nachweis der spezifischen Aktivität der an der Flavonoidbiosynthese beteiligten Enzyme in *R. hirta* wurden Enzymextrakte aus zwei Blütenstadien (junge Knospen und voll entwickelte Blüten) hergestellt. Dabei wurden von jedem Stadium zwei Proben genommen, die erste aus dem äußeren Abschnitt der Blüte und die zweite aus dem inneren Abschnitt. Für die Enzymtests wurden Substrate eingesetzt, die mit radioaktivem ^{14}C markiert sind. Die folgenden Enzyme wurden untersucht: PAL, CHS, FHT, DFR und FLS.

5.2.1 Spezifische Aktivität von PAL

Die PAL ist verantwortlich für die Umwandlung von Phenylalanin durch Abspaltung der Aminogruppe in die *trans*-Zimtsäure, die eine Vorstufe für die Biosynthese von *p*-Cumaroyl-CoA ist. Abb.29 zeigt einen Vergleich der spezifischen PAL-Aktivität in verschiedenen Stadien und Blütenabschnitten. Der Umsatz von Phenylalanin zu *trans*-Zimtsäure durch die PAL und ihre spezifische Aktivität sind in Tabelle 10 dargestellt.

	<i>Rudbeckia</i> voll entwickelte Blüten außen	<i>Rudbeckia</i> voll entwickelte Blüten innen	<i>Rudbeckia</i> junge Knospen außen	<i>Rudbeckia</i> junge Knospen innen
Umsatz %	14,27	41,93	5,07	18,80
Spezifische Aktivität [nmol/s*kg]	64,09	164,44	4,04	16,85

Tabelle 10: Der Umsatz von Phenylalanin zur *trans*-Zimtsäure durch die PAL und die spezifische PAL-Aktivität in *R. hirta* aus den äußeren und inneren Abschnitten in zwei Blütenstadien.

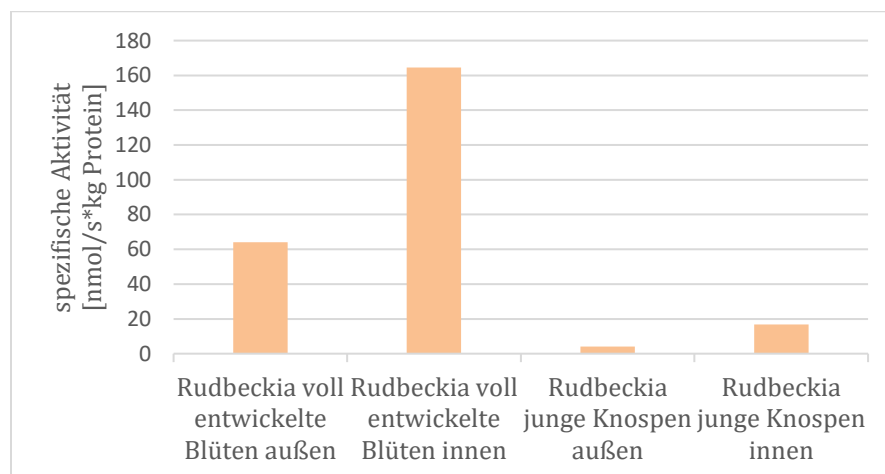


Abbildung 29: Vergleich der spezifischen PAL-Aktivität aus den äußeren und inneren Abschnitten in zwei Blütenstadien

Die spezifische Aktivität der PAL war in allen Stadien nachweisbar. Bei den Enzymextrakten aus den jungen Knospen und den voll entwickelten Blüten konnten im inneren Bereich deutlich höhere PAL-Aktivitäten gemessen werden als im äußeren Bereich.

5.2.2 Spezifische Aktivität von CHS

Die Chalkonsynthese (CHS) nutzt *p*-Cumaroyl-CoA als Startersubstrat und kondensiert es mit drei Molekülen Malonyl-CoA zum gelbfarbenen Naringeninchalkon. Abb.30 zeigt einen Vergleich der spezifischen CHS-Aktivität in verschiedenen Stadien und Blütenabschnitten.

Der Umsatz durch die CHS und ihre spezifische Aktivität sind in Tabelle 11 dargestellt.

	<i>Rudbeckia</i> voll entwickelte Blüten außen	<i>Rudbeckia</i> voll entwickelte Blüten innen	<i>Rudbeckia</i> junge Knospen außen	<i>Rudbeckia</i> junge Knospen innen
Umsatz %	91,38	99,85	94,64	96,23
Spezifische Aktivität [nmol/s*kg]	1807,43	1782,27	336,97	548,95

Tabelle 11: Der Umsatz durch die CHS und die spezifische CHS-Aktivität in *R.hirta* in den äußeren und inneren Abschnitten in zwei Blütenstadien.

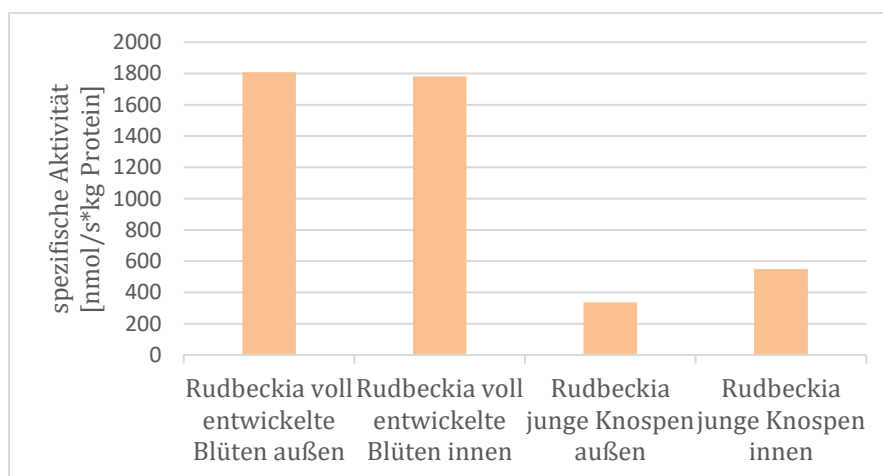


Abbildung 30: Vergleich der spezifischen CHS-Aktivität in den äußeren und inneren Abschnitten in zwei Blütenstadien

Die spezifische Aktivität der CHS war in allen Stadien nachweisbar und relativ hoch. Es konnte beobachtet werden, dass die spezifische Aktivität der CHS bei den Enzymextrakten aus den voll entwickelten Blüten höher war als bei den jungen Knospen. Die spezifische Aktivität war im äußeren sowie im inneren Teil gleich hoch.

5.2.3 Spezifische Aktivität von FHT

Die FHT katalysiert die Hydroxylierung der Flavanone zu den entsprechenden Dihydroflavonolen. Die spezifische Aktivität der FHT wurde mit Naringenin gemessen. Abb. 31 zeigt einen Vergleich der spezifischen Aktivität von FHT in verschiedenen Stadien und Blütenabschnitten. Der Umsatz von Naringenin zu Dihydrokämpferol durch die FHT und ihre spezifische Aktivität sind in Tabelle 12 dargestellt.

	<i>Rudbeckia</i> voll entwickelte Blüten außen	<i>Rudbeckia</i> voll entwickelte Blüten innen	<i>Rudbeckia</i> junge Knospen außen	<i>Rudbeckia</i> junge Knospen innen
Umsatz %	0	0	78,86	0
Spezifische Aktivität [nmol/s*kg]	0	0	190,51	0

Tabelle 12: Der Umsatz von Naringenin zu Dihydrokämpferol durch die FHT und die spezifische FHT-Aktivität in R.hirta in den äußeren und inneren Abschnitten in zwei Blütenstadien.

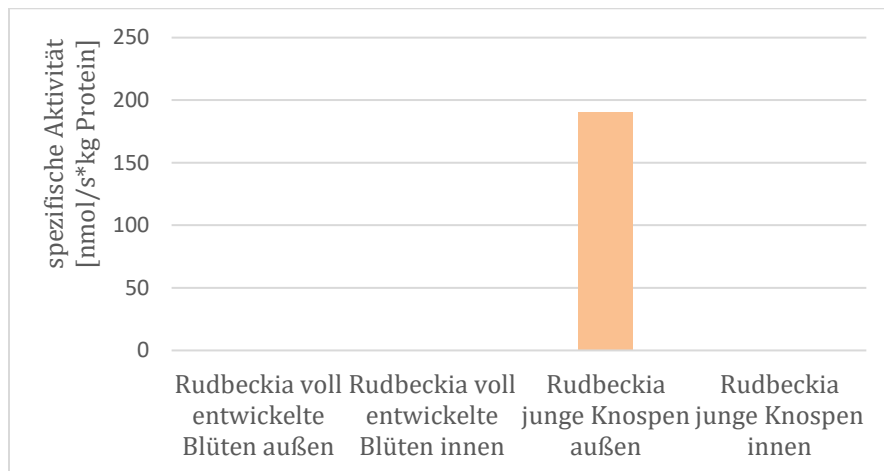


Abbildung 31: Vergleich der spezifischen FHT Aktivität in den äußeren und inneren Abschnitten in zwei Blütenstadien

Die spezifische Aktivität von FHT wurde nur im äußeren Bereich bei den Enzymextrakten aus jungen Knospen nachgewiesen.

5.2.4 Spezifische Aktivität von DFR/F3'H

Die DFR katalysiert die Reduktion von Dihydroflavonolen zu den farblosen, instabilen Leucoanthocyanidinen (Flavan-3,4-diole) als unmittelbare Vorstufen für die Bildung von Anthocyanen. Die spezifische Aktivität der DFR wurde mit DHK und DHQ gemessen. Die Aktivität der DFR mit DHK und DHQ war in beiden Blütenstadien nicht nachweisbar. In den Enzymtests mit DHK konnte allerdings Produktbildung beobachtet werden, die auf die Hydroxylierung von DHK durch die in den Enzymextrakten ebenfalls vorhandene Flavonoid 3'-hydroxylase zurückzuführen war.

Der Umsatz von DHK zu DHQ durch die F3'H und ihre spezifische Aktivität sind in Tabelle 13 dargestellt.

	<i>Rudbeckia</i> voll entwickelte Blüten außen	<i>Rudbeckia</i> voll entwickelte Blüten innen	<i>Rudbeckia</i> junge Knospen außen	<i>Rudbeckia</i> junge Knospen innen
Umsatz %	5,80	5,59	10,1	78,83
Spezifische Aktivität [nmol/s*kg]	50,56	56,24	19,19	205,81

Tabelle 13: Der Umsatz von DHK zu DHQ durch die F3'H und die spezifische F3'H Aktivität in R.hirta in den äußeren und inneren Abschnitten in zwei Blütenstadien.

Abb. 32 zeigt einen Vergleich der spezifischen Aktivität der F3'H mit DHK in verschiedenen Stadien und Blütenabschnitten.

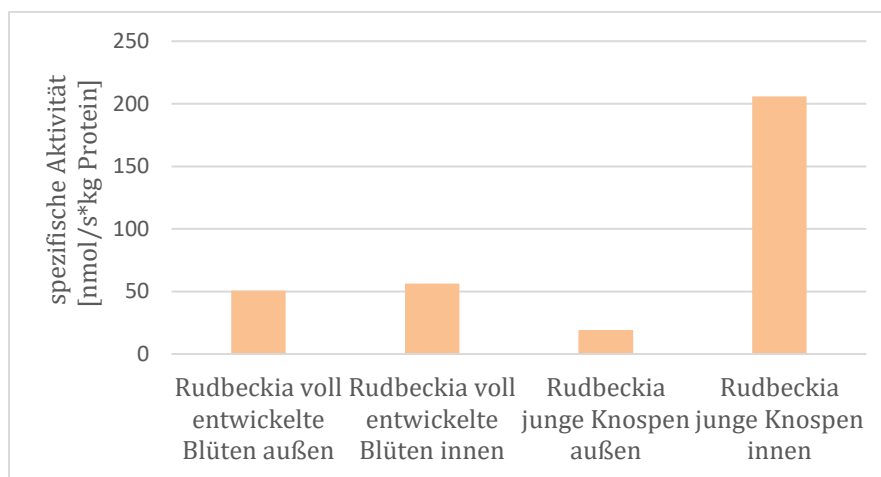


Abbildung 32: Vergleich der spezifischen F3'H-Aktivität in den äußeren und inneren Abschnitten in zwei Blütenstadien

Die höchste Aktivität der F3'H wurde im inneren Bereich bei den Enzymextrakten aus jungen Knospen nachgewiesen. Dagegen war die spezifische Aktivität im äußeren Bereich desselben

Blütenstadiums deutlich niedriger. Bei den Enzymextrakten aus den voll entwickelten Blüten war die spezifische Aktivität im äußeren als auch im inneren Bereich relativ niedrig.

5.2.5 Spezifische Aktivität von FLS

Die FLS katalysiert die Umwandlung der Dihydroflavonole zu den entsprechenden Flavonolen. Die spezifische Aktivität der FLS wurde mit DHK als Substrat gemessen. DFR, F3'H und FLS weil sie dasselbe Substrat verwenden stehen miteinander in Konkurrenz.

Abb. 33 zeigt einen Vergleich der spezifischen Aktivität von FLS mit DHK in verschiedenen Stadien und Blütenabschnitten. Der Umsatz von DHK zu Kämpferol durch die FLS und ihre spezifische Aktivität sind in Tabelle 14 dargestellt.

	<i>Rudbeckia</i> voll entwickelte Blüten außen	<i>Rudbeckia</i> voll entwickelte Blüten innen	<i>Rudbeckia</i> junge Knospen außen	<i>Rudbeckia</i> junge Knospen innen
Umsatz %	0	0	0	11,86
Spezifische Aktivität [nmol/s*kg]	0	0	0	31,06

Tabelle 14: Der Umsatz von DHK zu Kämpferol durch die FLS und die spezifische FLS-Aktivität in *R.hirta* in den äußeren und inneren Abschnitten in zwei Blütenstadien.

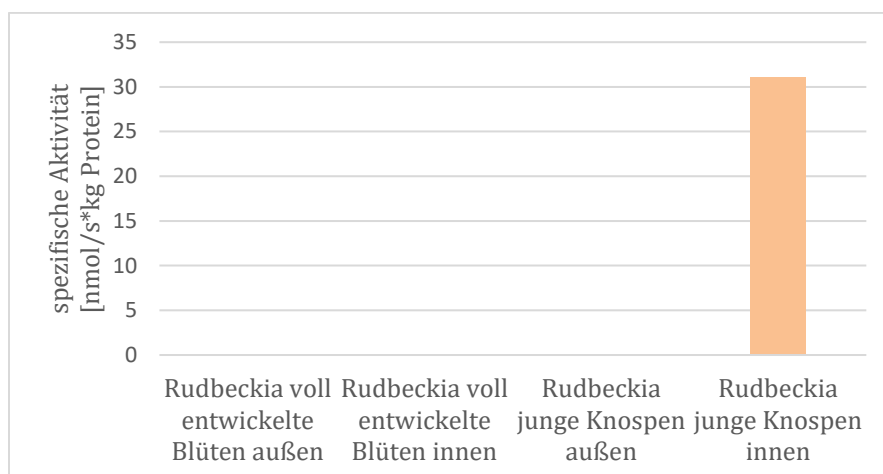


Abbildung 33: Vergleich der spezifischen FLS-Aktivität in den äußeren und inneren Abschnitten in zwei Blütenstadien

Die spezifische Aktivität von FLS wurde nur im inneren Bereich bei den Enzymextrakten aus jungen Knospen nachgewiesen.

5.3 Expressionsanalyse von Flavonoidgenen mittels qPCR in *Rudbeckia hirta*

Die quantitative Expression der ausgewählten Gene des Flavonoidstoffwechsels (*F6H*, *PAL*, *CHS*, *F3'H*, *FLS*, *GT* und *RT*) wurde in zwei Blütenstadien von *R.hirta* mittels qPCR untersucht. Von jedem Stadium wurden zwei Proben genommen, die erste aus dem äußeren Abschnitt der Blüte und die zweite aus dem inneren Abschnitt.

5.3.1 Relative *F6H*-Expression

Die relativen Expressionswerte waren im inneren Bereich bei den voll entwickelten Blüten wie auch bei den jungen Knospen desselben Bereichs am höchsten. Im äußeren Bereich bei den voll entwickelten Blüten wie auch bei den jungen Knospen desselben Bereichs war die Expression hingegen sehr schwach.

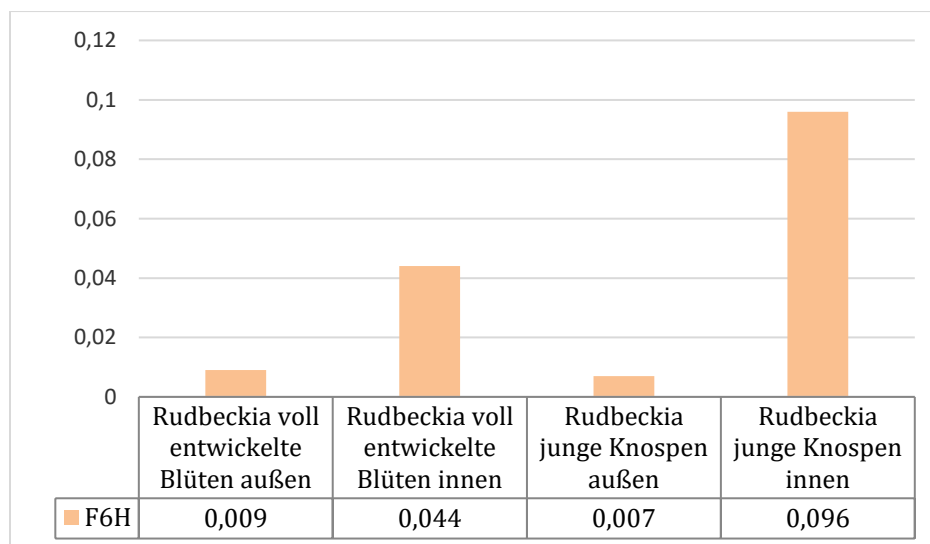


Abbildung 34: Relative Expression der *F6H* normalisiert auf *rps18* in *R.hirta* in den äußeren und inneren Bereichen in zwei Blütenstadien.

5.3.2 Relative *PAL*-Expression

Die relative Expression war im inneren Bereich bei den voll entwickelten Blüten wie auch im äußeren Bereich bei den jungen Knospen praktisch identisch und hier konnten die höchsten Werte der relativen *PAL*-Expression beobachtet werden. Im Vergleich dazu lag die relative *PAL*-Expression im äußeren Bereich bei den voll entwickelten Blüten wie auch im inneren Bereich bei den jungen Knospen in der Nähe des Detektionslimits, das Gen war dort also nicht exprimiert.

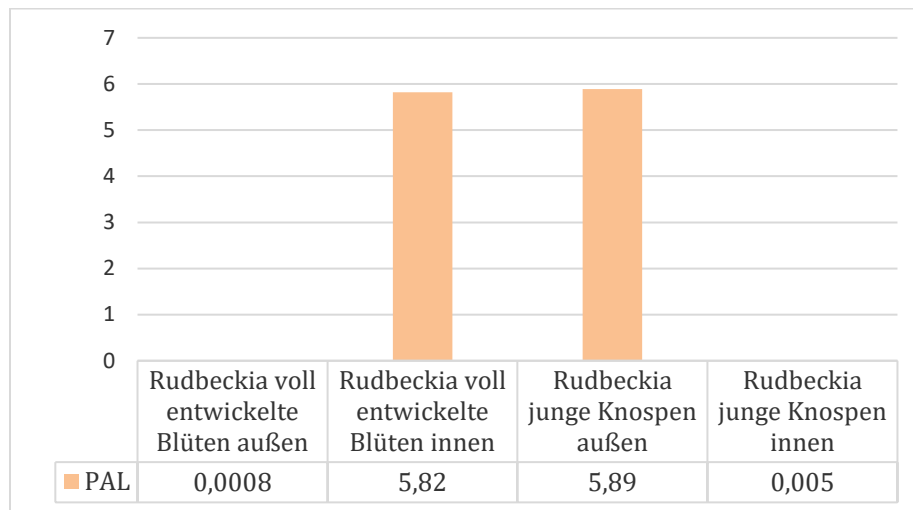


Abbildung 35: Relative Expression der PAL normalisiert auf *rps18* in *R. hirta* in den äußeren und inneren Bereichen in zwei Blütenstadien.

5.3.3 Relative CHS-Expression

Die relative Expression des *CHS*-Gens war im inneren Bereich bei den voll entwickelten Blüten am stärksten, aber auch im äußeren Bereich bei den jungen Knospen konnte eine signifikante *CHS*-Expression festgestellt werden. Im Vergleich dazu war die relative *CHS*-Expression im äußeren Bereich bei den voll entwickelten Blüten im inneren Bereich bei den jungen Knospen kaum nachweisbar, dort war das Gen praktisch nicht exprimiert.

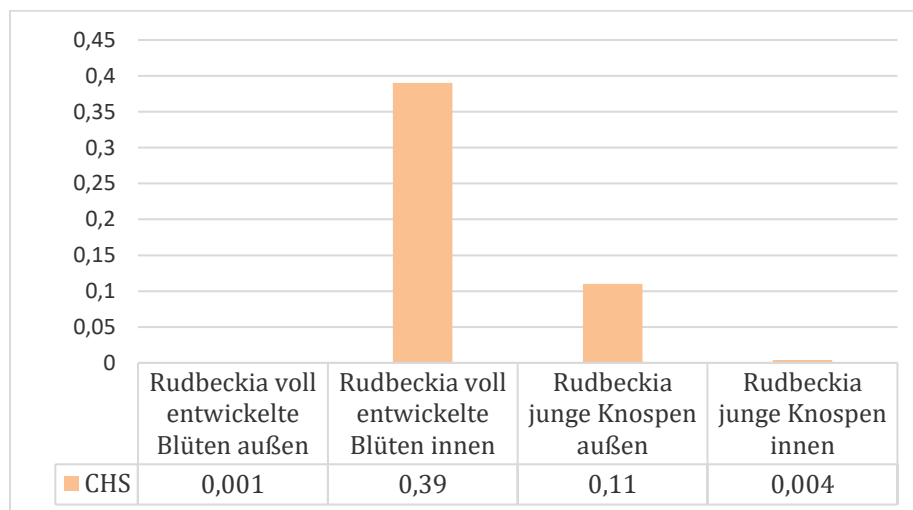


Abbildung 36: Relative Expression der CHS normalisiert auf *rps18* in *R. hirta* in den äußeren und inneren Bereichen in zwei Blütenstadien.

5.3.4 Relative *FLS*-Expression

Die relative Expression des *FLS*-Gens konnte nur im inneren Bereich bei den voll entwickelten Blüten nachgewiesen werden. Bei den jungen Knospen war die relative *FLS*-Expression in den beiden Bereichen kaum nachweisbar.

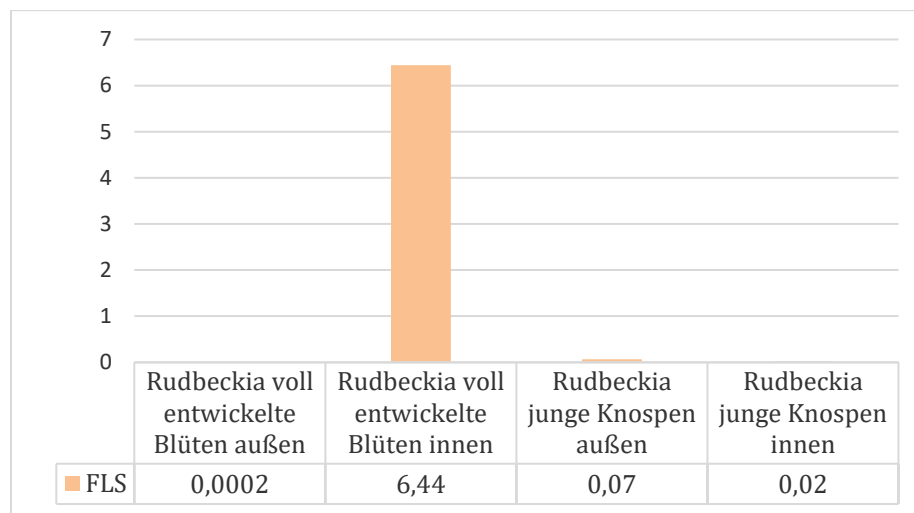


Abbildung 37: Relative Expression der *FLS* normalisiert auf *rps18* in *R.hirta* in den äußeren und inneren Bereichen in zwei Blütenstadien.

5.3.5 Relative *F3'H*-Expression

Die relative Expression war im inneren Bereich bei den voll entwickelten Blüten und im äußeren Bereich bei den jungen Knospen praktisch identisch und hier konnten die höchsten Werte der relativen *F3'H*-Expression beobachtet werden. Im inneren Bereich bei den jungen Knospen war die relative Expression hingegen sehr schwach. Im äußeren Bereich bei den voll entwickelten Blüten lag die *F3'H*-Expression in der Nähe des Detektionslimits, das Gen war dort praktisch nicht exprimiert.

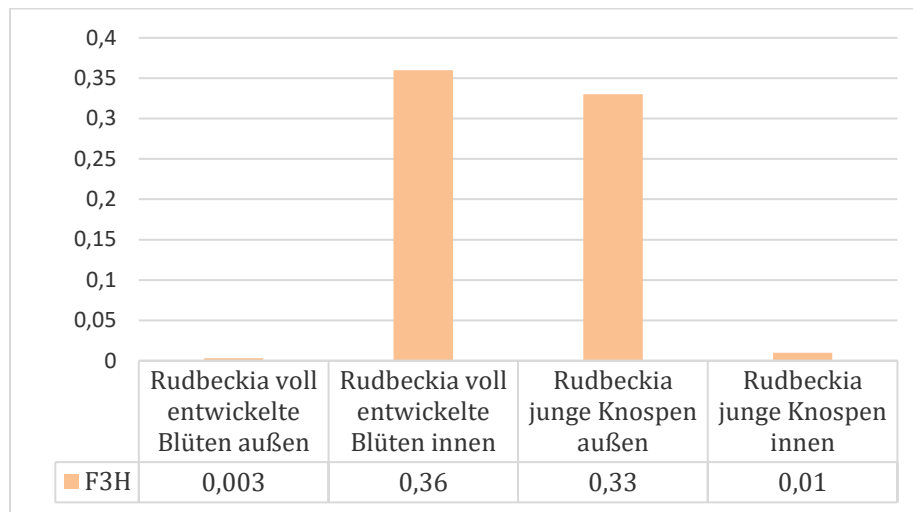


Abbildung 38: Relative Expression der F3'H normalisiert auf rps18 in R.hirta in den äußeren und inneren Bereichen in zwei Blütenstadien.

5.3.6 Relative GT-Expression

Die stärkste Expression konnte im inneren Bereich bei den jungen Knospen festgestellt werden. Dagegen war die relative Expression im äußeren Bereich desselben Blütenstadiums deutlich niedriger. Bei den voll entwickelten Blüten war die relative GT-Expression in den beiden Bereichen annähernd identisch und lag nur wenig über dem vorgefundenen Niveau im äußeren Bereich bei den jungen Knospen.

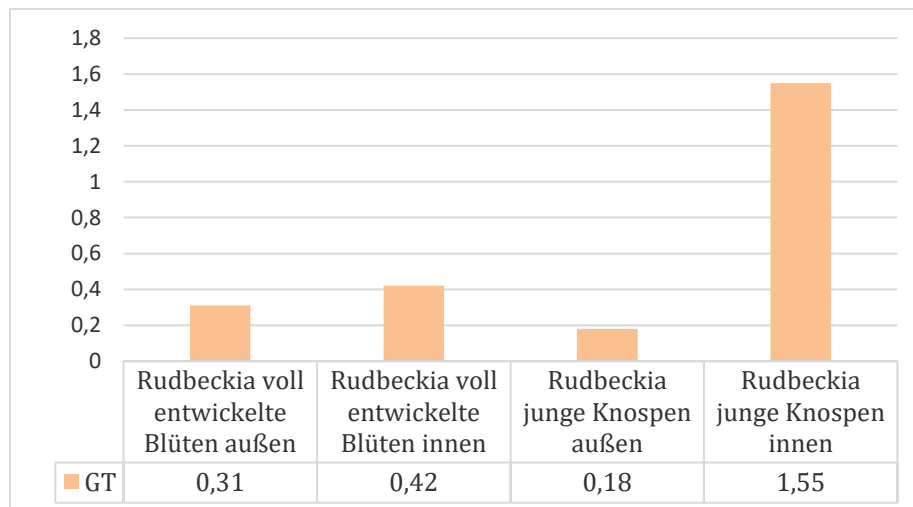


Abbildung 39: Relative Expression der GT normalisiert auf rps18 in R.hirta in den äußeren und inneren Bereichen in zwei Blütenstadien.

5.3.7 Relative RT-Expression

Die stärkste Expression konnte im inneren Bereich bei den voll entwickelten Blüten festgestellt werden, aber auch im äußeren Bereich bei den jungen Knospen konnte eine relativ hohe RT-Expression beobachtet werden. Im Vergleich dazu war die relative RT-Expression im äußeren Bereich bei den voll entwickelten Blüten wie auch in innerem Bereich bei den jungen Knospen nicht nachweisbar.

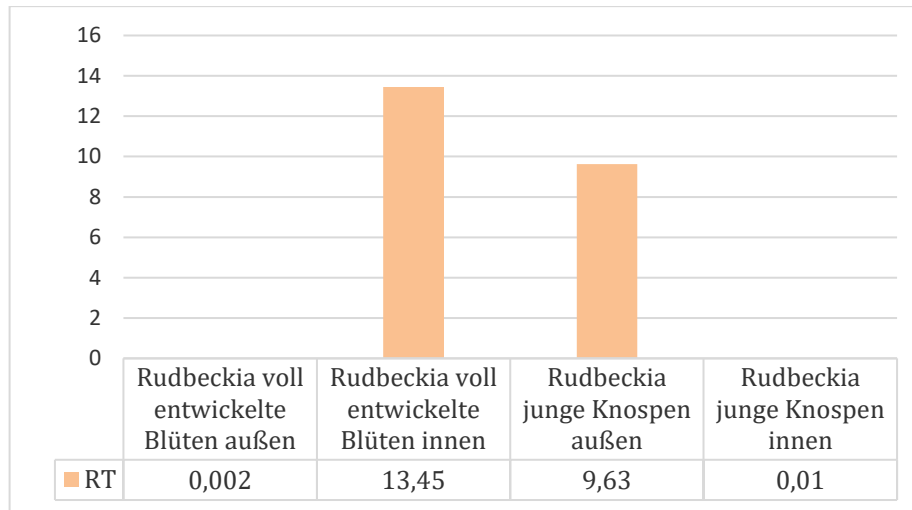


Abbildung 40: Relative Expression der RT normalisiert auf *rps18* in *R. hirta* in den äußeren und inneren Bereichen in zwei Blütenstadien.

5.4 Flavonol 6-Hydroxylase aus *Tagetes erecta* (TagF6H)

5.4.1 Klonierung und Heterologe Expression der Flavonol 6-Hydroxylase

Öffentlich zugängliche Transkriptomrohdaten von *Tagetes* wurden mit Hilfe der F6H-Aminosäuresequenz aus *Erigeron breviscapus* [47] gefiltert und die erhaltenen homologen Short-Sequence-Reads (SSRs) mit Hilfe von Trinity zusammengesetzt [26]. Ausgehend von den erhaltenen homologen Sequenzen wurden full-size Primer entworfen.

Um der *Tagetes-F6H* cDNA-Klon in Hefe zu exprimieren und weiter zu untersuchen, wurde aus *T. erecta*-Blüten Gesamt-RNA isoliert, und die mRNA zu cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe des Primerpaares Tag_F6H_1_for und Tag_F6H_1_rev wurde eine Proof-reading-PCR durchgeführt und damit ein Stück der Flavonol 6-Hydroxylase mit der Größe von 1245 bp amplifiziert. Das Fragment wurde anschließend mittels TA-Klonierung mit dem linearisierten pYES2.1/V5-His-TOPO-Vektor ligiert und in *E. coli* Top 10 transformiert. Positive Klone, die das Insert enthalten wurden mittels Colony-PCR selektiert, dann isoliert und sequenziert.

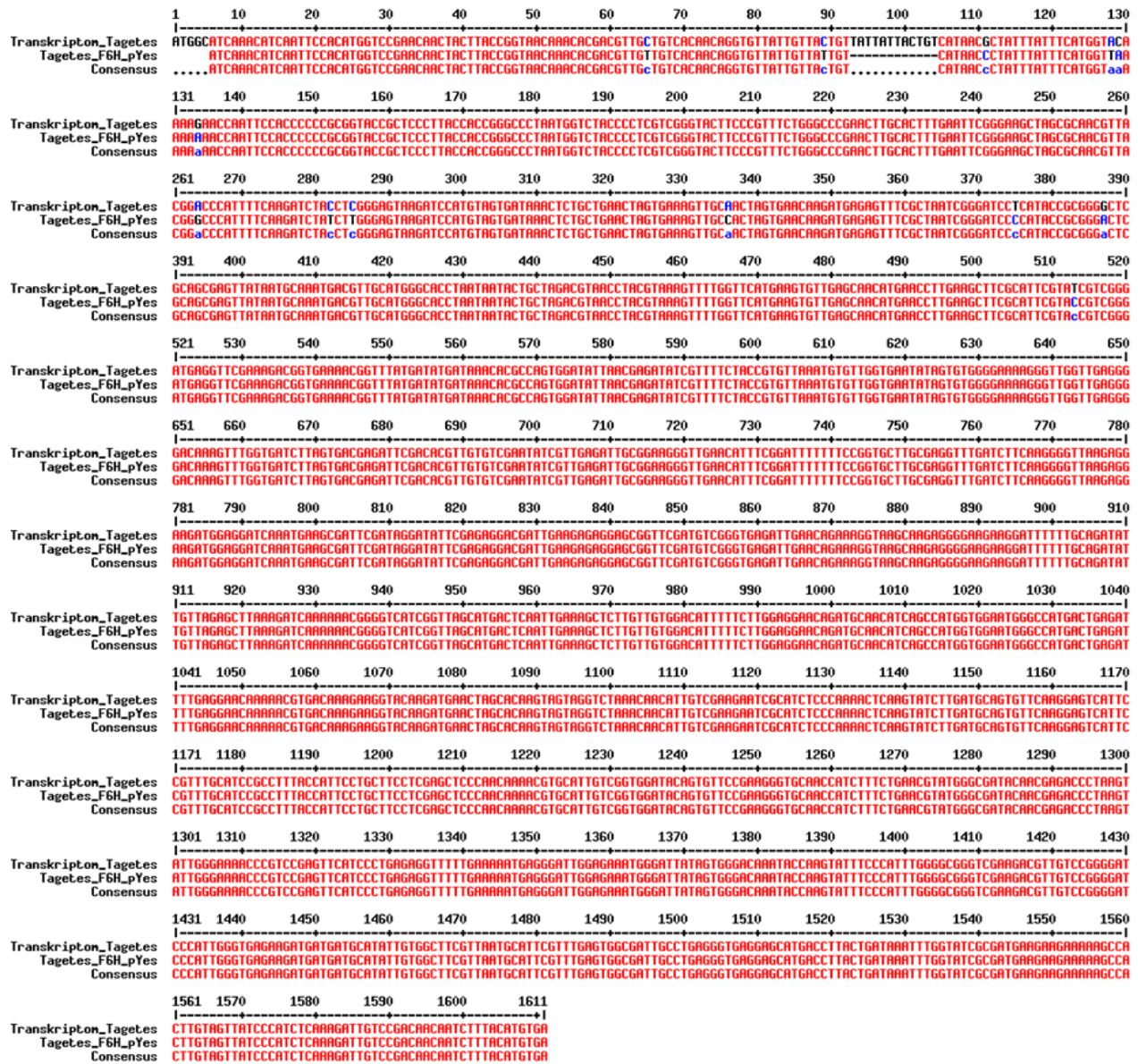


Abbildung 41: Nukleotidsequenz-Vergleich der klonierten F6H aus *T. erecta* mit der Sequenz, die aus dem Transkriptom abgeleitet wurde.

Abb. 41 zeigt das die Klonierung der F6H aus *T. erecta* erfolgreich war und das pYES-Plasmid wurde anschließend in Hefezellen transformiert und das F6H-Enzym exprimiert.

6. Diskussion

Blütenmale sind sehr wichtig, da sie die Bestäuber ins Innere der Blüte lenken, wo sich Nektar und Fortpflanzungsorgane befinden. Typische Blütenmale erscheinen in Form von farbigen Flecken, Linien oder Punkten auf der Blüte.

So erscheinen Blütenmale auf blauen Blütenblättern von *Cymbalaria muralis* (Plantaginaceae) in Form von gelben Punkten. Das Auftreten von Blütenmalen auf der Blüte ist die Folge einer lokalen Ansammlung von Pigmenten auf bestimmten Teilen der Blüte [32].

Neben sichtbaren Blütenmalen gibt es oft für das menschliche Auge unsichtbare Blütenmale. Diese sind auf die Ansammlung von UV-absorbierenden Pigmenten zurückzuführen, sodass sie z.B. von Bienen erkannt werden, die im ultravioletten Bereich sehen.

Der Raue Sonnenhut (*R.hirta*) ist ein typisches Beispiel für UV-honey guides. Bereits 1972 bemerkte Thomson, als er die gelb gefärbten Blüten von *R.hirta* mit UV-Licht beleuchtete, zwei dunkle konzentrische Kreise im Inneren der Blüte, deren Intensität nach außen hin abnahm. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass das Auftreten von dunklen Ringen im Inneren der Blüte mit der Ansammlung von UV-absorbierenden Pigmenten in diesem Teil zusammenhängt, was zur Absorption von UV-Licht führt. Im Gegensatz zum inneren Teil der Blüte befinden sich im äußeren Teil nur Carotinoide, die ansonsten gleichmäßig über die gesamte Oberfläche der Blüte verteilt sind, daher kommt es in diesem Teil zu einer Reflexion des UV-Lichts [68].

Aus diesem Grund sieht das menschliche Auge eine einheitlich gelb gefärbte Blume, während diese Blume für z.B. Bienen als zweifärbig erscheint. UV-absorbierende Pigmente wurden als 6-Hydroxyflavonol-Derivate identifiziert. Dies sind Flavonole, die neben dem typischen Hydroxylierungen an der Position 5 und 7 zusätzlich eine Hydroxylgruppe in Position 6 enthalten. Während Flavonole mit einer Hydroxylgruppe in Position 5 und 7 sehr verbreitet sind, kommen zusätzliche Hydroxylgruppen an der Position 6 von Flavonolen nur bei bestimmten Pflanzenarten vor. Die in *R.hirta* gefundenen Pigmente sind: Quercetagitrin (Quercetagetin 7-*O*-Glucosid), Eupatolitin (6,7-Dimethoxyquercetin), Patulitrin (6-Methoxyquercetin 7-*O*-Glucosid = Patuletin 7-*O*-Glucosid) und Eupatolitin 3-*O*-glucosid [14, 68].

Da die biochemische oder molekularbiologische Ursache der Entstehung von Blütenmalen noch weitgehend unbekannt ist, ist die Erforschung der Enzyme, die die Bildung der höher hydroxylierten Flavonole katalysieren, sowie der Gene, die sie kodieren, sehr wichtig.

In den letzten Jahren sind die höher hydroxylierten Flavonole immer stärker in den Fokus gerückt. So haben Anzellotti, D. und Ibrahim, R. K. (2000) die Bildung von 6-Hydroxyflavonolen in *Chrysosplenium americanum* erforscht, einer Pflanze, die überwiegend Feuchtgebiete bewohnt und in ihren Blättern teilweise methoxylierten Flavonolglykosiden anreichert. Sie konnten das Enzym isolieren und charakterisieren, das den Einbau der Hydroxylgruppe an Position 6 katalysiert [8].

Das von ihnen isolierte Enzym ist in die Klasse der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen eingeordnet und akzeptiert methoxylierte Flavonole als Substrate. Durch Untersuchung der Substratspezifität fanden sie heraus, dass 3,7,4'-Trimethylquercetin besser akzeptiert wird als 3,7-Dimethylquercetin. Aber auch 3-Methylquercetin sowie einige nicht-methylierte Flavonole wurden von diesem Enzym akzeptiert.

Im Gegensatz zur aus *Chrysosplenium americanum* isolierten Flavonol 6-Hydroxylase gehört die von Halbwirth et al., (2004) aus *Tagetes patula* isolierte Flavonol 6-Hydroxylase zur

Klasse der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen eingeordnet, die nur Flavonole als Substrate akzeptiert. Dieses Enzym wurde auch in den Blüten von *R. hirta* gefunden, die ebenfalls, obwohl sie methoxylierte Flavonole in ihren Blütenblättern wie *Chrysosplenium americanum* anreichert, nur Flavonolaglyka als Substrate akzeptiert. Daraus kann geschlossen werden, dass die Hydroxylierung an Position 6 im Flavonoid-Syntheseweg unter Verwendung von zwei verschiedenen Enzymklassen durchgeführt werden kann [27].

Durch Isolierung von mRNA aus Elicitor-behandelten Sojabohnen wurde eine P450-abhängige Monooxygenase kloniert und exprimiert, die an der Biosynthese von 6-Hydroxyisoflavonen beteiligt ist. Für dieses Enzym der Sojabohne sind Flavanone die bevorzugten Substrate, obwohl es auch Flavonole an Position 6 hydroxyliert [9, 60].

Das Ziel dieser Masterarbeit war es, die cDNA Klone der *F6Hs* von *R. hirta* und *T. erecta* zu isolieren, die zur Familie der Korbblütler gehören.

Nach der Klonierung erfolgte die heterologe Expression der *F6H* cDNA-Klone in Hefe (*S. cerevisiae*), wodurch die rekombinanten Enzyme für die Untersuchung der Substratspezifität gewonnen wurden. In dieser Arbeit wurde die Funktionalität der rekombinanten *F6H* von *R. hirta* und *T. erecta* nachgewiesen werden. Eine detaillierte Enzymcharakterisierung konnte aus zeitlichen Gründen aber nur für die *F6H* der *R. hirta* durchgeführt werden, während die Charakterisierung der rekombinanten *F6H* aus *T. erecta* in einer weiteren Masterarbeit durchgeführt wurde.

Außerdem wurde untersucht, welche Flavonole in den Blüten von *R. hirta* vorkommen. Die Blütenblätter wurden in innere (dunklere) und äußere (hellere) Teile der Blüte unterteilt und die Aktivitäten der Enzyme PAL, CHS, DFR, FLS FHT, die am Flavonoid-Biosyntheseweg beteiligt sind, isoliert und auf ihre Enzymaktivität untersucht. Neben der enzymatischen Aktivität wurde eine Genexpressionsanalyse von ausgewählten Genen der Flavonoid-Biosynthese durchgeführt, um zu sehen, in welchem Teil der Blüte sie stärker oder schwächer exprimiert werden.

6.1 Charakterisierung der rekombinanten *F6Hs* aus *Rudbeckia hirta*

Nach Isolierung des *F6H*-cDNA-Klons aus der *R. hirta* mit Hilfe entsprechender Primer, die auf Basis von Transkriptomdaten in der NCBI Datenbank für die Familie der Asteraceae erstellt wurden, wurde die Expression in Hefe durchgeführt und anschließend die Aktivität des Enzyms selbst verifiziert.

Zur Überprüfung der Aktivität des Enzyms wurden folgende Substrate verwendet: Kämpferol, Quercetin, Naringenin, Dihydroquercetin, Apigenin und Eriodictyol. Kämpferol und Quercetin sind die einzigen der oben genannten Substrate, die von den *F6H*-Enzymen akzeptiert wurden, und daher wurde die weitere Charakterisierung von *F6H*-Enzymen mit diesen Substraten durchgeführt.

Die Charakterisierung des Enzyms mit Kämpferol ergab, dass die optimale Temperatur bei 25 °C, der optimale pH-Wert bei 6,75 und die optimale Reaktionszeit bei 10 min lag. Mit Quercetin war die optimale Temperatur die gleiche wie bei Kämpferol, während der optimale pH-Wert und die Reaktionszeit unterschiedlich waren. Der lineare Bereich der Reaktion von Quercetin betrug 15 min, während der optimale pH-Wert 7 betrug.

Mittels Michaelis-Menten-Kinetik wurden Werte für k_{cat} / K_m ermittelt. Für Kämpferol lag dieser Wert bei 2780,67 L / (mol * s), während er für Quercetin niedriger war und 1250 L / (mol * s) betrug.

Aus diesen Werten für k_{cat}/K_m kann geschlossen werden, dass für die F6H der *R. hirta* Kämpferol ein stärker bevorzugtes Substrat als Quercetin ist.

Basierend auf den Ergebnissen für F6H von *T. erecta*, die mein Kollege Mustafa Abouelnasr in seiner Masterarbeit erhalten hat, können wir sehen, dass es einen Unterschied in der Substratpräferenz von F6H verschiedener Arten derselben Familie gibt. Denn bei der F6H aus *T. erecta* war Quercetin und nicht Kämpferol das bevorzugtere Substrat [16].

6.2 Flavonolbildung in *Rudbeckia hirta*

Um zu untersuchen, wie die Bildung der höher hydroxylierten Flavonole auf molekularer Ebene während der Blütenentwicklung von *R. hirta* gesteuert wird, wurde die Expression ausgewählter Gene des Flavonoidbiosynthesewegs mittels quantitativer Real-time PCR untersucht.

Die Messungen wurden in zwei Entwicklungsstadien der Blüte durchgeführt, und zwar an jungen Knospen und an voll entwickelten Blüten. Dafür wurden die Blütenblätter des jeweiligen Stadiums in hellere äußere Teile und dunklere innere Teile unterteilt. Rubisco und rps18 wurden als Housekeeping-Gene verwendet. In dieser Arbeit wurde die Genexpression auf rps18 normalisiert, da rps18 in allen Stadien stabil exprimiert wurde, während Rubisco weniger gut geeignet war, was nicht verwunderlich ist, da Rubisco ein Photosyntheseprotein ist und daher eher für grünes Gewebe geeignet ist.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression der *PAL*- und *F3'H*-Gene in voll entwickelten Blüten im inneren Teil und in jungen Knospen im äußeren Teil fast identisch war, während bei *CHS*, *FLS* und *RT* die Genexpression bei voll entwickelten Blüten stärker ausgeprägt war. Die *F6H*- und *GT*-Genexpression war in jungen Knospen im inneren Teil der Blüte am höchsten.

Die *F6H*- und *GT*-Genexpression erfolgte in einem frühen Stadium der Blütenentwicklung, d.h. in jungen Knospen im inneren Teil der Blütenblätter, was die Hypothesen aus der Arbeit [57] bestätigt, dass bereits in einem früheren Blütestadium eine Anhäufung von UV-absorbierenden Pigmenten auf den inneren Teilen der Blütenblätter vorliegt.

Es ist anzumerken, dass die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse für andere Gene kein klares Bild zeigen und dass ihre Expression möglicherweise zu einem früheren Blütestadium erfolgt.

Bezüglich der enzymatischen Aktivitäten bestimmter Enzyme, die an *R. hirta*-Blüten untersucht wurden, ist ersichtlich, dass die spezifische Aktivität der *CHS*- und *PAL*-Enzyme in voll entwickelten Blüten signifikant höher war als in Knospen, wobei die *PAL*-spezifische Aktivität in inneren Teil höher und bei *CHS* in beiden Blütenregionen fast gleich war.

Die spezifische Aktivität der DFR mit DHK und DHQ war in beiden Blütenstadien nicht nachweisbar. In den Enzymtests mit DHK konnte allerdings Produktbildung beobachtet werden, die auf die Hydroxylierung von DHK durch die in den Enzymextrakten ebenfalls vorhandene *F3'H* zurückzuführen war. Die spezifische Aktivität der *F3'H* mit DHK war in beiden Stadien vorhanden, wobei die höchste Aktivität in den Knospen im inneren Teil des Blütenblatts lag.

Das FLS-Enzym zeigte Aktivität nur in den Knospen im inneren Teil des Blütenblatts, während das FHT-Enzym Aktivität sowohl im äußeren als auch im inneren Teil des Blütenblatts, auch in den Knospen, zeigte.

Generell muss festgehalten werden, dass die gemessenen Enzymaktivitäten und die Genexpressionsdaten besonders bei den Knospen in den meisten Fällen nicht übereinstimmen. Besonders unerklärlich ist auch die Tatsache, dass in den offenen Blüten im inneren Bereich höhere Genexpressionen beobachtet werden als in den äußeren, während bei den Knospen das Verhältnis genau umgekehrt war. Um auszuschließen dass die inneren und äußeren Bereiche bei einer der Messserien vertauscht wurden, sollten diese Untersuchungen nochmals wiederholt werden.

Für *Dahlia variabilis* [28] ist beschrieben, dass bei einigen gelben Sorten zusätzlich zur DFR- und FHT-Aktivität eine verminderte Aktivität der ANS zum Fehlen von Anthocyanen führt. Da die Aktivität der ANS nicht untersucht werden konnte, da es weltweit noch keinen brauchbaren Enzymtest für den Nachweis mit pflanzlichen Enzymextrakten gibt, es kann vermutet werden, dass das Fehlen oder die verminderte Aktivität dieses Enzyms auch hier die Ursache für das Fehlen von Anthocyanen in *R. hirta* ist. Um diese Hypothese zu bestätigen, sollte die ANS der *R. hirta* in zukünftigen Forschungen kloniert werden, um dies zumindest auf Genexpressionebene untersuchen zu können.

Abgesehen von der CHS und PAL, bei denen die Aktivität in der entwickelten Blüte höher ist als in der Knospe, nimmt bei den anderen getesteten Enzymen DFR, FLS und FHT die Enzymaktivität mit der Blütenentwicklung ab, was bedeutet, dass die Synthese bestimmter Flavonoide im frühesten Stadium der Knospe stattfindet. Bei den meisten dieser Enzyme wurde die höchste Aktivität im inneren Teil des Blütenblatts festgestellt, was mit früheren Studien übereinstimmt, welche zeigten, dass die Bildung von Flavonoiden hauptsächlich im inneren oder dunkleren Teil des Blütenblatts stattfindet [57]. Das einzige Enzym, bei dem die Aktivität im äußeren Teil des Blütenblattes höher war, ist die FHT. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es dafür keine Erklärung, im Rahmen meiner Arbeit konnte dies aufgrund von Material- und Zeitmangel nicht mehr geklärt werden.

Die spezifische Aktivität der DFR mit DHK und DHQ war in beiden Blütenstadien nicht nachweisbar. In den Enzymtests mit DHK konnte allerdings Produktbildung beobachtet werden, die auf die Hydroxylierung von DHK durch die in den Enzymextrakten ebenfalls vorhandene F3'H zurückzuführen war. Die spezifische Aktivität der F3'H mit DHK war in beiden Stadien vorhanden, wobei die höchste Aktivität in den Knospen im inneren Teil des Blütenblatts lag.

7. Literaturverzeichnis

1. *Foxglove (Digitalis purpurea)*. Available from: <https://www.dearplants.com/how-to-plant-foxglove-digitalis-purpurea/>.
2. *RUDBECKIA hirta 'Indian Summer'*. Available from: <https://www.emerisa.com/plant/rudins4-h-37/rudbeckia-hirta-indian-summer>.
3. *Rudbeckia hirta 'Sunbeckia Mia'*. Available from: <https://www.shootgardening.co.uk/plant/rudbeckia-hirta-sunbeckia-mia-sunbeckia-series>.
4. *Tagetes erecta (African Marigold)*. Available from: <https://www.gardenia.net/plant/tagetes-erecta>.
5. *Tagetes patula (French Marigold)*. Available from: <https://www.gardenia.net/plant/tagetes-patula>.
6. Abrahamson, W. and K. McCrea, *Ultraviolet light reflection and absorption patterns of Rudbeckia (Compositae)*. Rhodora, 1977. **79**: p. 269-277.
7. Anand David, A.V., R. Arulmoli, and S. Parasuraman, *Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid*. Pharmacognosy reviews, 2016. **10**(20): p. 84-89.
8. Anzellotti, D. and R.K. Ibrahim, *Novel flavonol 2-oxoglutarate dependent dioxygenase: affinity purification, characterization, and kinetic properties*. Arch Biochem Biophys, 2000. **382**(2): p. 161-72.
9. Artigot, M.P., et al., *Expression of flavonoid 6-hydroxylase candidate genes in normal and mutant soybean genotypes for glycitein content*. Mol Biol Rep, 2013. **40**(7): p. 4361-9.
10. Bohm B.A., S.T.F., *Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae)* Springer Verlag, Wien, (2001).
11. Britsch, L. and H. Grisebach, *Purification and characterization of (2S)-flavanone 3-hydroxylase from Petunia hybrida*. European journal of biochemistry, 1986. **156**(3): p. 569-577.
12. Britsch, L., W. Heller, and H.J.Z.f.N.C. Grisebach, *Conversion of Flavanone to Flavone, Dihydroflavonol and Flavonol with an Enzyme System from Cell Cultures of Parsley*. 1981. **36**: p. 742 - 750.
13. Brownson, D.M., et al., *Flavonoid effects relevant to cancer*. J Nutr, 2002. **132**(11 Suppl): p. 3482s-3489s.
14. Cisowski, W., W. Dembińska-Migas, and M.J.P.J.o.C. Luczkiewicz, *FLAVONOIDS FROM THE RUDBECKIA HIRTA L. HERB*. 1993. **67**: p. 829-836.
15. Di Carlo, G., et al., *Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs*. Life Sci, 1999. **65**(4): p. 337-53.
16. Dipl.-Ing. Dr.techn. Heidi Halbwirth, M.M.A., *Masterarbeit-(Bio)chemische und molekularbiologische Untersuchungen zur Bildung von 6-Hydroxyflavonolen in den Asteraceae*. 2020.
17. Ebel J., H.K., *Biosynthesis of Flavonoids, The Flavonoids: Advances in Research* Harborne, J.B., Mabry T.J. ed. Chapman and Hall, London, 666-670 .(1982)

18. Falcone Ferreyra, M.L., S. Rius, and P. Casati, *Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications*. 2012. **3**(222).
19. Forkmann, G. and B. Dangelmayr, *Genetic control of chalcone isomerase activity in flowers of Dianthus caryophyllus*. *Biochem Genet*, 1980. **18**(5-6): p. 519-27.
20. Forkmann, G., W. Heller, and H.J.Z.f.N.C. Grisebach, *Anthocyanin Biosynthesis in Flowers of Matthiola incana Flavanone 3-and Flavonoid 32-Hydroxylases*. 1980. **35**: p. 691 - 695.
21. Forkmann, G. and G.J.Z.f.N.C. Stotz, *Genetic Control of Flavanone 3-Hydroxylase Activity and Flavonoid S2-Hydroxylase Activity in Antirrhinum majus (Snapdragon)*. 1981. **36**: p. 411 - 416.
22. G., R., *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen*. 5. überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1988.
23. Gartenjournal. *Hortensie blau färben*. Available from: <https://www.gartenjournal.net/hortensien-blau-faerben>.
24. Gauthier, A., P.J. Gulick, and R.K. Ibrahim, *Characterization of two cDNA clones which encode O-methyltransferases for the methylation of both flavonoid and phenylpropanoid compounds*. *Arch Biochem Biophys*, 1998. **351**(2): p. 243-9.
25. Gledhill, D., *The Names of Plants*. 2002, Cambridge.
26. Haas, B.J., et al., *De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis*. *Nat Protoc*, 2013. **8**(8): p. 1494-512.
27. Halbwirth, H., G. Forkmann, and K. Stich, *The A-ring specific hydroxylation of flavonols in position 6 in Tagetes sp. is catalyzed by a cytochrome P450 dependent monooxygenase*. *Plant Science*, 2004. **167**(1): p. 129-135.
28. Halbwirth, H., G. Muster, and K. Stich, *Unraveling the Biochemical Base of Dahlia Flower Coloration*. *Natural Product Communications*, 2008. **3**(8): p. 1934578X0800300807.
29. Halbwirth, H. and K. Stich, *An NADPH and FAD dependent enzyme catalyzes hydroxylation of flavonoids in position 8*. *Phytochemistry*, 2006. **67**(11): p. 1080-7.
30. Harborne J.B., B.H., *The Handbook of Natural Flavonoids*. Verlag John Wiley & Sons (1999).
31. Harborne, J.B., *Comparative biochemistry of the flavonoids-VI: Flavonoid patterns in the bignoniaceae and the gesneriaceae*. *Phytochemistry*, 1967. **6**(12): p. 1643-1651.
32. Harborne, J.B., *Ökologische Biochemie : eine Einführung*. 2013. 1995, Heidelberg [u.a.]: Spektrum Akad. Verl. XIV, 383 S., Ill., graph. Darst.
33. Harborne, J.B. and D.M. Smith, *Anthochlors and other flavonoids as honey guides in the compositae*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1978. **6**(4): p. 287-291.
34. Harborne, J.B. and C.A. Williams, *Flavonoid patterns in leaves of the gramineae*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1976. **4**(4): p. 267-280.
35. Heller, W., et al., *Leucoanthocyanidins as intermediates in anthocyanidin biosynthesis in flowers of Matthiola incana R. Br.* *Planta*, 1985. **163**(2): p. 191-6.
36. Heller W., F.G., *Biosynthesis of Flavonoids, The Flavonoids: Advances in Research Since 1980* Harborne J.B., ed. Chapman and Hall, London 399-425. (1988).
37. Heller W., F.G., *Biosynthesis of Flavonoids, The Flavonoids: Advances in Research Since 1986* Harborne J.B., ed. Chapman and Hall, London, 499-535.(1994)

38. Heller W., F.G., *Biosynthesis of flavonoids*. In: Harborne J. B. (Ed.), *The Flavonoids: Advances in Research since 1986* Chapman & Hall, London, 499-535 (1999)
39. Holton, T.A. and E.C. Cornish, *Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis*. *The Plant cell*, 1995. **7**(7): p. 1071-1083.
40. Hopp, W. and H.U. Seitz, *The uptake of acylated anthocyanin into isolated vacuoles from a cell suspension culture of Daucus carota*. *Planta*, 1987. **170**(1): p. 74-85.
41. Joe, E.J., et al., *Engineering of flavonoid O-methyltransferase for a novel regioselectivity*. *Mol Cells*, 2010. **30**(2): p. 137-41.
42. Kim, H., et al., *Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of beta-amyloid*. *J Agric Food Chem*, 2005. **53**(22): p. 8537-41.
43. Kochankov, V.G.a.M.K.C., *Rudbeckia*. In: *CRC Handbook of Flowering*, Vol. V., A.H. Halvey (ed.), CRC Press, Boca Raton, Fla. pp. 295-320. 1986.
44. Kreuzaler, F. and K. Hahlbrock, *Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants: formation of naringenin (5,7,4'-trihydroxyflavanone) from p-coumaroyl coenzyme A and malonyl coenzyme A*. *FEBS Lett*, 1972. **28**(1): p. 69-72.
45. Kuhn, B., G. Forkmann, and W. Seyffert, *Genetic control of chalcone-flavanone isomerase activity in Callistephus chinensis*. *Planta*, 1978. **138**(3): p. 199-203.
46. L., S., *Biochemie Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, (1994)
47. Liu, X., et al., *Engineering yeast for the production of breviscapine by genomic analysis and synthetic biology approaches*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 448.
48. Martens, S. and G. Forkmann, *Genetic control of flavone synthase II activity in flowers of Gerbera hybrids*. *Phytochemistry*, 1998. **49**(7): p. 1953-1958.
49. McCrea, K.D. and M. Levy, *PHOTOGRAPHIC VISUALIZATION OF FLORAL COLORS AS PERCEIVED BY HONEYBEE POLLINATORS*. 1983. **70**(3): p. 369-375.
50. Mehdy, M.C. and C.J. Lamb, *Chalcone isomerase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding and infection*. *Embo j*, 1987. **6**(6): p. 1527-33.
51. Meyer, T., *Flora-de: Flora von Deutschland*.
52. Middleton, E., Jr., C. Kandaswami, and T.C. Theoharides, *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer*. *Pharmacol Rev*, 2000. **52**(4): p. 673-751.
53. Mitchell, R.S., *NYFA Newsletter Vol 13 No.1*. March 2002.
54. Moustafa, E. and E. Wong, *Purification and properties of chalcone-flavanone isomerase from soya bean seed*. *Phytochemistry*, 1967. **6**(5): p. 625-632.
55. Moustafa E., W.E., *Phytochemistry*. 1967; 6: 625-632.
56. Saito, K., et al., *Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: molecular cloning and functional expression of cDNA from a red forma of Perilla frutescens*. *Plant J*, 1999. **17**(2): p. 181-9.
57. Schlangen, K., et al., *Formation of UV-honey guides in Rudbeckia hirta*. *Phytochemistry*, 2009. **70**(7): p. 889-98.
58. Schlangen, K., S. Miosic, and H. Halbwirth, *Allelic variants from Dahlia variabilis encode flavonoid 3'-hydroxylases with functional differences in chalcone 3-hydroxylase activity*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2009. **494**: p. 40-5.
59. Schlangen, K., et al., *Chalcone 3-hydroxylation is not a general property of flavonoid 3'-hydroxylase*. *Plant Science*, 2009. **177**(2): p. 97-102.

60. Schopfer, C.R. and J. Ebel, *Identification of elicitor-induced cytochrome P450s of soybean (Glycine max L.) using differential display of mRNA*. Mol Gen Genet, 1998. **258**(4): p. 315-22.
61. Seitz, C., et al., *Multiple evolution of flavonoid 3',5'-hydroxylase*. Planta, 2015. **242**(3): p. 561-73.
62. Spribille, R. and G. Forkmann, *Chalcone synthesis and hydroxylation of flavonoids in 3'-position with enzyme preparations from flowers of Dianthus caryophyllus L. (carnation)*. Planta, 1982. **155**(2): p. 176-82.
63. Spribille, R. and G. Forkmann, *Conversion of dihydroflavonols to flavonols with enzyme extracts from flower buds of Matthiola incana R. Z. Naturforsch.*, 1984. **39**: p. 714-719.
64. Stafford, H.A. and H.H. Lester, *Enzymic and nonenzymic reduction of (+)-dihydroquercetin to its 3,4-diol*. Plant physiology, 1982. **70**(3): p. 695-698.
65. Sutter, A. and H. Grisebach, *Free reversibility of the UDP-glucose: flavonol 3-O-glucosyltransferase reaction*. Arch Biochem Biophys, 1975. **167**(2): p. 444-7.
66. Takamura, T., T. Tomihama, and I.J.S.H. Miyajima, *Inheritance of yellow-flowered characteristic and yellow pigments in diploid cyclamen (Cyclamen persicum Mill.) cultivars*. 1995. **64**: p. 55-63.
67. Teeri, T. and P. Elomaa, *GENETIC MODIFICATION, APPLICATIONS / Flower Color*. 2003. p. 406-413.
68. Thompson, W.R., et al., *Flavonols: pigments responsible for ultraviolet absorption in nectar guide of flower*. Science, 1972. **177**(4048): p. 528-30.
69. W., S., *Die Biophysik des Farbsehens* Edition Farbe Band 5, 1999.