

**Klonierung und Charakterisierung von Flavonoidglucosyltransferasen
aus *Beta vulgaris* L.**



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Judith Hans, geb. Stolberg

geb. am 12.12.1974 in Düren

Gutachter:

1. Prof. Dr. G. J. Krauß
2. Prof. Dr. D. Strack
3. Prof. Dr. J. Stöckigt

Halle (Saale), den 23.06.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000006915

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006915>]

Teile dieser Arbeit sind in folgende Veröffentlichung, Vorträge und Poster eingegangen:

Zeitschriftenartikel:

Hans J., Brandt W., Vogt T. (2004) Site-directed mutagenesis and protein 3D-homology modelling suggest a catalytic mechanism for UDP-glucose dependent betanidin 5-*O*-glucosyltransferase from *Dorotheanthus bellidiformis*. Plant Journal, in press.

Vorträge:

Hans, Judith „Does a *cyclo*-Dopa glucosyltransferase exist ?“, Symposium der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Sektion Pflanzliche Naturstoffe, 6.-8. Juli 2001, Wittenberg

Hans, Judith „Cloning, heterologous expression and characterization of two new glucosyltransferases from *Beta vulgaris*“, 4. Kurt-Mothes Doktorandenworkshop, 3.-5. Oktober 2002, Jena

Hans, Judith „Cloning, heterologous expression and characterization of two new glucosyltransferases from *Beta vulgaris*“, Institutstagung des Leibniz-Institutes für Pflanzenbiochemie, 28.-29. Oktober 2002, Wittenberg

Hans, Judith „Tools to investigate plant natural product glucosyltransferases“, Vorstellungsvortrag in der Abteilung physikalische Biotechnologie von Prof. M. Stubbs, FB Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle, 2. Dezember 2003.

Hans, Judith „Two new flavonoid glucosyltransferases from *Beta vulgaris* and their role in betanin biosynthesis“ Vorstellungsvortrag in der Abteilung von Prof. D. J. Bowles, Biologische Fakultät (CNAP) der Universität York (UK), 19. Dezember 2003

Hans, Judith „Site-directed mutagenesis and protein 3D-homology modelling suggest a catalytic mechanism for UDP-glucose dependent betanidin 5-*O*-glucosyltransferase from *Dorotheanthus bellidiformis*“, 1st Nové Hradý Winter Symposium on Structure and Function of Proteins, 22.-24. Januar 2004, Nové Hradý, Tschechien.

Poster:

Hans, Judith, Strack, Dieter, Vogt, Thomas “Cloning, heterologous expression and characterization of two new glucosyltransferases from *Beta vulgaris*“ Botanikertagung, 22.-25. September 2002, Freiburg

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in der Abteilung Sekundärstoffwechsel unter der Anleitung von Herrn **Prof. Dr. Dieter Strack** angefertigt, dem ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die Anleitung zu selbständigem und eigenverantwortlichem Arbeiten und viele Diskussionen danke.

Herrn **Dr. Thomas Vogt** danke ich für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung meiner Arbeit, die gründliche Einarbeitung in Techniken der Proteinreinigung und Molekularbiologie sowie die stete Diskussionsbereitschaft und das immerwährende Interesse am Fortgang dieser Arbeit. Ferner möchte ich ihm herzlich danken, dass er mich stets ermutigt hat, neue Methoden auszuprobieren und mir bei der Planung der Experimente viel Freiheit gelassen hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau **Dagmar Knöfel** für die Durchführung der Metabolitenisolierung aus *Beta vulgaris*. Darüberhinaus sorgte sie stets für ein hervorragendes Arbeitsklima und hat mich in allen Lebenslagen tatkräftig unterstützt.

Herrn **Dr. habil. Willibald Schliemann** danke ich für die Einarbeitung in die Biochemie der Betalaine und die Synthese des *cyclo*-Dopas. Weiterhin bin ich ihm für viele kritische Diskussionen dankbar.

Herrn **Dr. Alfred Baumert** und **Dr. Carsten Milkowski** möchte ich meinen Dank für die Hilfe bei technischen Fragen, sowie viele interessante und anregende Diskussionen aussprechen.

Herrn **PD Dr. Wolfgang Brandt** sowie den Mitarbeitern der Gruppe Strukturanalytik und Computerchemie der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie des IPB danke ich für die Einarbeitung in die Homologie-Modellierung sowie die engagierte Betreuung dieses Teilprojektes meiner Arbeit.

Frau **Barbara Kolbe** danke ich für die Einarbeitung in die Handhabung der *Beta vulgaris*-Zellkulturen.

Herrn **PD Dr. Hauke Lilie**, Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der MLU Halle, danke ich für die Durchführung und Auswertung der analytischen Ultrazentrifugationsstudien.

Herrn **Dr. Jürgen Schmidt** und **Dr. Udo Roth** danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen am Institut für Pflanzenbiochemie. Herrn **Dr. Viktor Wray** und **Dr. Manfred Nimt** sowie C. Kakoschke, B. Jaschok-Kentner und U. Felgenträger (GBF, Braunschweig) danke ich für die aufwendige massenspektrometrische- und NMR-spektroskopische Analyse der *Beta vulgaris*-Metabolite.

Mein Dank gilt Frau **Dr. Susanne Frick** für die Einweisung in die Handhabung der Insektenzellkulturen.

Dr. Joachim Hans und **Dr. Carola Tretn**er danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit, ihre große Hilfsbereitschaft, ihr stetes Interesse an dieser Arbeit und zahlreiche konstruktive Diskussionen.

Bei allen **Mitarbeitern der Abteilung Sekundärstoffwechsel** bedanke ich mich ganz herzlich für das gute Arbeitsklima, die stete Hilfsbereitschaft und die aufrichtige Unterstützung, die ich insbesondere in schwierigen Phasen erfahren habe.

Bei den **Mitarbeitern der Gärtnerei** bedanke ich mich für die Anzucht und Pflege der Versuchspflanzen.

Dr. Peter Ian Mackenzie, Flinders University School of Medicine, Australien, danke ich für die Annotation der Glucosyltransferasen gemäß der Nomenklatur für die UDP-Glucosyltransferase (UGT)-Superfamilie (Mackenzie et al., 1997).

Die vorliegende Arbeit wurde von der **Deutschen Forschungsgemeinschaft** finanziell unterstützt.

„Erfolg scheint weithin mit der Frage verbunden, ob man dort weitermacht, wo andere aufgegeben haben.“ (W. Feather)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	III
1. EINLEITUNG	1
1.1 Sekundärmetabolite	1
1.2 Die Bedeutung von Glycosyltransferasen im Sekundärstoffwechsel	1
1.2.1 Strategien zur Untersuchung von Glycosyltransferasen des Sekundärstoffwechsels	3
1.2.2 Tertiärstruktur und katalytischer Mechanismus pflanzlicher Glycosyltransferasen	4
1.3 Glucosyltransferasen aus <i>Beta vulgaris</i> L.	6
1.3.1 <i>B. vulgaris</i> (Rote Beete)	6
1.3.2 Betalaine	6
1.4 Zielstellung der Arbeit	10
2. MATERIAL & METHODEN	11
2.1 Material	11
2.1.1 Pflanzen	11
2.1.2 Zellsuspensionskulturen	11
2.1.3 Hefestämme	11
2.1.4 Insektenzellen	11
2.1.5 Bakterienstämme	12
2.1.6 Vektoren	13
2.1.7 Oligonukleotide	13
2.1.8 Chemikalien und Enzyme	14
2.1.9 Geräte	15
2.2 Molekularbiologische Methoden	16
2.2.1 Isolierung und Auftrennung von Nukleinsäuren	16
2.2.2 Herstellung und Screening einer λ -ZAP cDNA-Bank	16
2.3 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	17
2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	17
2.3.3 Elektrophorese von Nukleinsäuren	18
2.3.4 Blotten und Hybridisieren von Nukleinsäuren	18
2.3.5 Sequenzierung von DNA und Sequenzanalysen	19
2.3.6 Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	19
2.3.7 Herstellung und Transformation kompetenter <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	19
2.3.8 Transfektion von <i>S. frugiperda</i> -Zellen	19
2.4 Heterologe Proteinexpression in Bakterien	19
2.4.2 Klonierung und Expression in Hefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	20
2.4.3 Klonierung und Expression in Insektenzellen (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	21

2.5	Biochemische Methoden & Analytik	21
2.5.1	Darstellung und Derivatisierung von <i>cyclo</i> -Dopa	21
2.5.2	Isolierung von Flavonoid-Konjugaten aus <i>B. vulgaris</i>	22
2.5.3	Proteinreinigung aus pflanzlichen bzw. bakteriellen Rohextrakten	22
2.5.4	Chromatographische Methoden	23
2.5.5	Konzentrierung von Proteinlösungen	24
2.5.6	SDS-PAGE	24
2.5.7	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	24
2.5.8	Blotten und Detektion von Proteinen	25
2.5.9	Glucosyltransferase-Standard-Enzymtest	25
2.5.10	Analytische HPLC	26
2.5.11	Präparative HPLC für die Metabolitenanalyse aus <i>B. vulgaris</i>	26
2.5.12	Radio-HPLC	26
2.5.13	Massenspektrometrie	27
2.5.14	NMR-Spektroskopie	27
2.5.15	Analytische Ultrazentrifugation	27
2.6	Komparative Modellierung der UGT73A4 und UGT73A5	28
3.	ERGEBNISSE	30
3.1	Untersuchung von Proteinrohextrakten verschiedener betacyanhaltiger Pflanzen und Zellkulturen auf eine <i>cyclo</i>-Dopa-Glucosyltransferaseaktivität	30
3.2	Klonierung zweier cDNAs aus einer Zellsuspensionskultur aus <i>B. vulgaris</i>	33
3.3	Funktionelle Charakterisierung der UGT73A4 und UGT71F1	38
3.3.1	Expression in einem prokaryontischen System	38
3.3.2	Expression in eukaryontischen Systemen	40
3.3.3	Reinigung der rekombinanten UGT73A4 aus <i>E. coli</i>	42
3.3.4	Partielle Reinigung der UGT71F1 aus <i>E. coli</i>	45
3.3.5	Stabilität der gereinigten Proteine	46
3.4	Biochemische Charakterisierung der UGT73A4 und UGT71F1	47
3.4.1	Ermittlung der Substratspezifität	47
3.4.2	Protein- und Zeitlinearität der Glucosyltransferase-Reaktion	50
3.4.3	Bestimmung des Temperaturmaximums und der Aktivierungsenergie	51
3.4.4	Bestimmung der pH-Optima	51
3.4.5	Inhibitionsstudien mit spezifischen Aminosäure-modifizierenden Reagenzien	52
3.4.6	Einfluss von Kationen und EDTA auf die Enzymaktivität der UGT73A4	52
3.4.7	Bestimmung kinetischer Konstanten	53
3.4.8	Molekulargewichtsbestimmung: MALDI/TOF-MS	55
3.4.9	Analytische Ultrazentrifugation der UGT73A4	55
3.5	Expressionsanalyse in <i>B. vulgaris</i>-Pflanzen und -Zellkultur	56
3.6	Untersuchung einer Flavonol-4'-<i>O</i>-glucosyltransferase aus <i>Allium cepa</i> auf Umsetzung von Betanidin	57
3.7	Analyse von Flavonoidglycosiden aus <i>B. vulgaris</i>-Pflanzen und der Zellkultur	58

3.8	Modellierung der 3D-Strukturen der UGT73A4 und der UGT73A5	60
3.8.1	Entwicklung zweier Modellstrukturen	60
3.8.2	Vergleich der modellierten aktiven Zentren beider Enzyme	63
3.8.3	Liganden-Docking-Studien mit <i>in vitro</i> getesteten Substraten	67
3.8.4	Semiempirische Kalkulationen zur Untersuchung des Mechanismus des Zuckertransfers unter Inversion der Konfiguration	68
4.	DISKUSSION	72
4.1	Methoden zur Erforschung pflanzlicher UGTs: Möglichkeiten und Grenzen	72
4.2	Glucosyltransferasen aus <i>B. vulgaris</i>	73
4.2.1	Expressionsanalyse der UGT73A4 und UGT71F1	74
4.2.2	Überprüfung der Funktionalität <i>in vitro</i> – heterologe Expression	75
4.2.3	Charakterisierung der UGTs aus <i>B. vulgaris</i>	77
4.2.4	Substratspezifitäten: Vergleichbarkeit <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> ?	78
4.3	Komparative Modellierung der UGT73A4 und UGT73A5	80
4.4	Zwei alternative Wege der Glucosidierung in der Betalainbiosynthese – ein speziesspezifisches Problem ?	82
4.5	Weiterführende Arbeiten	84
5.	ZUSAMMENFASSUNG	86
6.	SUMMARY	88
7.	LITERATUR	89
8.	APPENDIX	105

Abkürzungen:

AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzylsulfonylfluorid
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
BV	<i>Beta vulgaris</i>
CBB	Coomassie Brilliantblau
cDNA	komplementäre DNA
CD	Circular-Dichroismus
CH ₃ CN	Acetonitril
Cm ^r	Chloramphenicol-Resistenz
COSY	<u>C</u> orrelated <u>S</u> pectroscopy
1D-Spektroskopie	Eindimensionale Spektroskopie
2D-Spektroskopie	Zweidimensionale Spektroskopie
Db	<i>Dorotheanthus bellidiformis</i>
DTT	Dithiothreitol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPT	<u>D</u> istortionless <u>E</u> nhancement of <u>P</u> olarization <u>T</u> ransfer
DIDS	4,4'-diisothiocyano-2,2'-disulfonsäure
DIMBOA	2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-on
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMAZA	4-Dimethylaminozimtaldehyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-MS	Elektronenspray Ionisations Massenspektrometrie
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm
GST	Glutathion-S-transferase
GT	Glycosyltransferase
h	Stunde
H-Brücke	Wasserstoffbrückenbindung
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IAA	Indol-3-Essigsäure
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-galactopyranosid
Kan ^r	Kanamycin-Resistenz
Kat	Katal (Enzymmenge, die 1 Mol Substrat pro Sekunde umsetzt)
kb	Kilobasenpaare
kcal	Kilokalorie (1 kcal entspricht 4,14 Joule)
k _{cat}	Katalytische Konstante (Wechselzahl)
kDa	Kilodalton
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
KPi	Kaliumphosphatpuffer
l	Liter
LB	Luria-Bertani Medium

LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
L-Dopa	L-Dihydroxyphenylalanin
MALDI-TOF	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation Time-of-flight
MeOH	Methanol
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
NaPi	Natriumphosphatpuffer
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCMBS	p-Chloro-mercuribenzo-sulfonsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDA	Photodioden-Array
PEG	Polyethylenglykol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
RP	Reverse-Phase
pK _D	neg. dekadischer Logarithmus der Dissoziationskonstante
pK _i -Wert	neg. dekadischer Logarithmus der Inhibitionskonstante
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSPG-Box	<u>Plant Secondary Product Glucosyltransferase-Konsensus-Sequenz</u>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
Que	Quercetin
RNA	Ribonukleinsäure
ROESY	<u>Rotating Overhauser Effect Spectroscopy</u>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Citrat-gepufferte Kochsalzlösung
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet ^f	Tetracyclin-Resistenz
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit 0,05 % (v/v) Tween-20
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UDP-Glucose	Uridin-5'-diphosphoglucose
UGTs	Uridin-5'-diphosphoglucose-abhängige Glucosyltransferasen
μ	mikro
v/v	Volumen pro Volumen
V	Volt
Vol	Volumeneinheiten
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	Einheit der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indol-β-D-galactopyranosid

Verwendeter Einbuchstaben-Aminosäurecode:**Neutrale** Aminosäuren :

Alanin	A
Glycin	G
Isoleucin	I
Leucin	L
Phenylalanin	F
Prolin	P
Tryptophan	W
Valin	V

Polare Aminosäuren:

Asparagin	N
Cystein	C
Glutamin	Q
Methionin	M
Serin	S
Threonin	T
Tyrosin	Y

Basische Aminosäuren:

Arginin	R
Histidin	H
Lysin	K

Saure Aminosäuren :

Aspartat	D
Glutamat	E

Nomenklatur der in der Arbeit verglichenen Glucosyltransferasen:

Die Benennung der Glucosyltransferasen erfolgte durch Dr. P. I. Mackenzie, Flinders University School of Medicine, Australien, gemäss der Nomenklatur für die UGT-Superfamilie (Mackenzie et al., 1997).

Beta vulgaris Flavonoid-7,4'-O-UGT: UGT73A4

Dorotheanthus bellidiformis Betanidin-5-O-GT: UGT73A5

Beta vulgaris Flavonoid-3-O-UGT: UGT71F1

Dorotheanthus bellidiformis Betanidin-6-O-GT: UGT71F2

Die Abkürzung UGT bezeichnet die Superfamilie UDP-Glycosyltransferase, die Zahlen 71 bzw. 73 bezeichnen eine Gruppe pflanzlicher Glycosyltransferasen mit einer Sequenzhomologie $\geq 40\%$, der Buchstabe A bzw. F verweist auf Glycosyltransferasen mit einer Sequenzhomologie $\geq 60\%$ und die folgende Nummer bezeichnet das individuelle Gen.

1. Einleitung

1.1 Sekundärmetabolite

Pflanzen sind als sessile Organismen vielfältigen abiotischen und biotischen Stressfaktoren ausgesetzt. Um den Selektionsdruck zu überwinden, der durch die Interaktion der Pflanzen mit ihrer Umwelt ausgeübt wird, haben sie effektive Strategien entwickelt. Hierbei spielen die sogenannten sekundären Pflanzenstoffe (Harborne, 1995) eine bedeutende Rolle. Aufgrund vielfältiger Funktionen, die nachhaltig das Überleben der Pflanze in ihrer Umwelt sichern, werden diese Metabolite nicht länger als „Abfallprodukte“ pflanzlicher Zellen betrachtet. Sie gehören chemisch verschiedenen Substanzklassen an (Terpenoide, Alkaloide, Phenylpropane, Polyketide) und treten in allen taxonomischen Gruppen des Pflanzenreiches auf (Croteau et al., 2000). Ihre biologischen Funktionen sind vielfältig. Anthocyane wirken in Pflanzen als Locksubstanzen (Dixon & Steele, 1999), während Flavonoide und Cumarine unter anderem Schutz vor UV-Strahlung vermitteln (Hahlbrock & Scheel, 1989; Stafford, 1991). Die Ausbildung von Symbiosen im Pflanzenreich wird ebenfalls durch Sekundärmetabolite beeinflusst bzw. reguliert. Die Flavonoide Apigenin und Luteolin spielen z. B. eine wichtige Rolle als Signalmoleküle in der Interaktion von Leguminosen und Bakterien der Gattung *Rhizobium*. Sie induzieren die Expression der *Nod*-Faktoren und erleichtern die Bildung der Stickstoff-fixierenden Wurzelknöllchen. Isoflavonoide, wie z. B. das Phytoalexin Medicarpin in *Medicago sativa*, sind für induzierbare Stressantworten nach Pilzbefall von Bedeutung (Croteau et al., 2000). Sekundärmetabolite können aber auch als strukturelle Bausteine, in Form von Ligninen oder Tanninen, fungieren (Herms & Mattson, 1992). Ferner haben sie eine wichtige Funktion in der Pathogenabwehr, wobei sie als Fraßhemmer, Toxine oder Signalmoleküle dienen oder antimikrobielle Wirkung haben können (Dixon & Paiva, 1995). Für Hydroxyzimtsäuren und Hydroxycumarine als phenolische Verbindungen ist die Beteiligung an regulatorischen Prozessen des Pflanzenwachstums durch Inhibierung von Samenkeimung und Wurzelwachstum erwiesen (Burghardt et al., 1994). Sekundäre Pflanzenstoffe nehmen aber nicht nur im Hinblick auf ökologische Interaktionen innerhalb des Pflanzenreichs eine besondere Stellung ein. Aufgrund ihrer antioxidativen und potentiell antikanzerogenen Eigenschaften haben insbesondere Flavonoide Verwendung in der Medizin gefunden und sind Bestandteil von Nahrungsmittelzusätzen („Functional Food“) geworden (Rice-Evans, 1996, 2001; Setchell et al., 1999; Acquaviva et al., 2003).

1.2 Die Bedeutung von Glycosyltransferasen im Sekundärstoffwechsel

Im Rahmen der Biosynthese pflanzlicher Sekundärstoffe sind als letzte Schritte häufig Glycosidierungsreaktionen beschrieben worden (z. B. Heller & Forkmann, 1994). Diese stellen neben Hydroxylierungen, Acylierungen oder Methylierungen eine weitere Modifikationsmöglichkeit zur Bildung komplexer sekundärer Metabolite dar (Vogt & Jones, 2000). Katalysiert wird die Bildung von Glycokonjugaten durch Glycosyltransferasen, die Nukleotiddiphosphat-aktivierte Zuckereinheiten auf niedermolekulare Akzeptormoleküle übertragen. Der Zuckerttransfer kann dabei unter Retention ($\alpha \rightarrow \alpha$) oder Inversion ($\alpha \rightarrow \beta$) der Konfiguration des anomeren C_α-Atoms erfolgen (Kapitonov & Yu, 1999). So werden Glycosyltransferasen in eine α - und eine β -Gruppe eingeteilt. Sekundärmetabolite können an O-, N-, S- und C-Atomen glycosidiert werden, wobei hydroxylierte Moleküle die häufigsten Akzeptoren darstellen (Abbildung 1.1). Es besteht eine grosse Variabilität bezüglich der übertragenen Zuckermoleküle, die unter Bildung von Mono-, Di- oder Triglycosiden auf die jeweiligen Akzeptormoleküle transferiert werden können, wobei UDP-Glucose den am häufigsten auftretenden Zucker-Donor repräsentiert (Vogt & Jones, 2000). Folglich besteht für jedes Aglycon

die Möglichkeit, eine Vielzahl unterschiedlicher Glycokonjugate zu bilden. Für das Flavonol Quercetin wurden zum Beispiel über 350 verschiedene Glycoside identifiziert (Harborne & Baxter, 1999). Die meisten der ca. 6000 bekannten Flavonoidstrukturen akkumulieren in Form ihrer Glycoside in der pflanzlichen Vakuole (Harborne & Baxter, 1999).

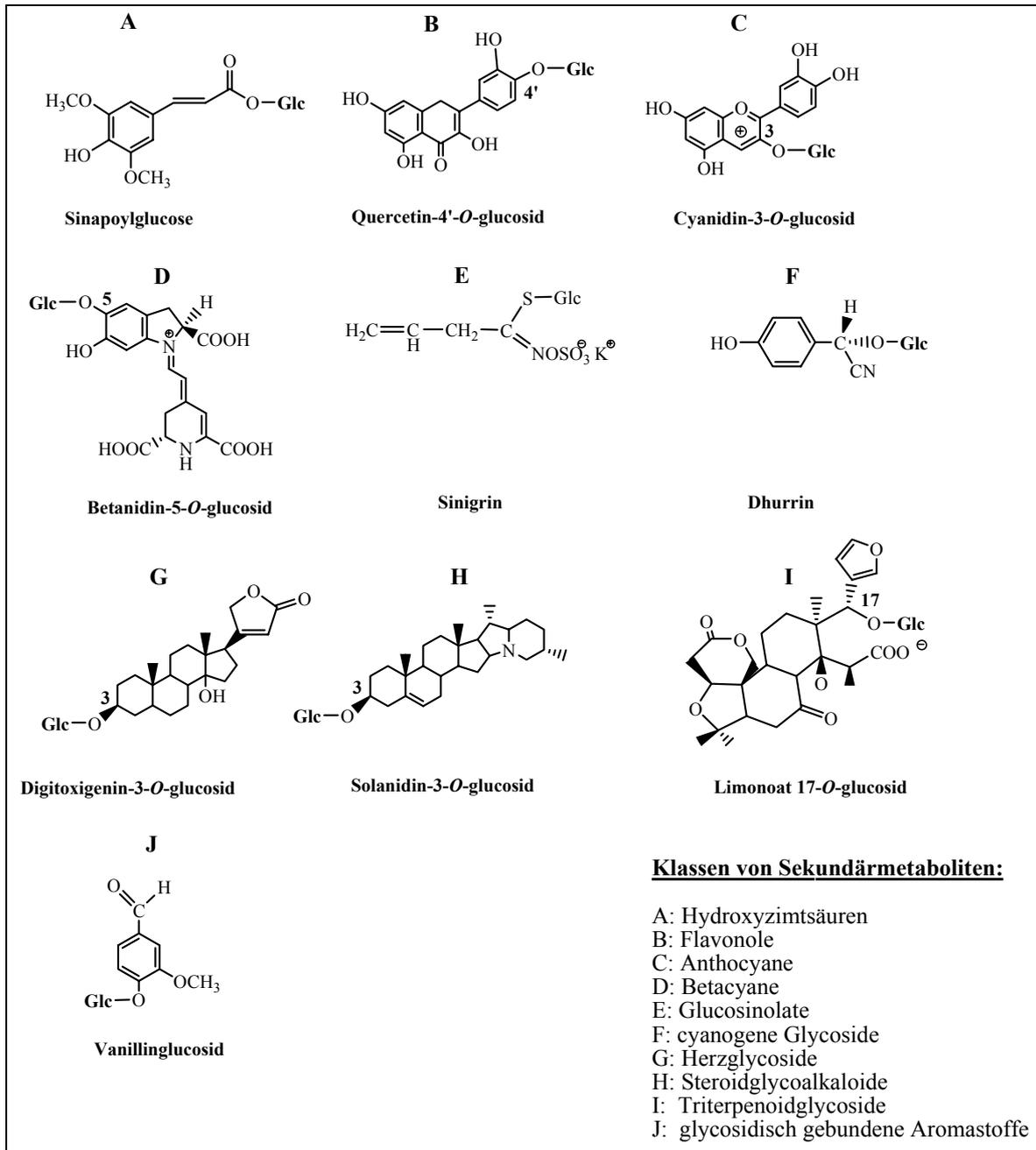


Abbildung 1.1 Beispiele für glycosidierte pflanzliche Sekundärstoffe. Abbildung aus: Vogt & Jones, 2000.

Die Bildung glycosidierter Metabolite erhöht nicht nur deren Wasserlöslichkeit (Hrazdina, 1988) und ermöglicht damit die Kompartimentierung und Akkumulation in der Vakuole (Werner & Matile, 1985; Taguchi et al., 2000a), sondern trägt auch wesentlich zur Stabilisierung labiler oder flüchtiger Verbindungen, wie z. B. Terpenoide oder Phenole, bei (Crouzet & Chassagne, 1999). Die Reduktion chemischer Reaktivität wird insbesondere am Beispiel der cyanogenen Glycoside deutlich, deren spontaner Zerfall unter Freisetzung toxischen Cyanwasserstoffs durch Glucosidierung verhindert wird (Jones et al., 1999). Ein weiteres Beispiel ist die verminderte Toxizität der glycosidierten Form des Alkaloids Solanidin aus *Solanum tuberosum* (Moehs et al., 1997). Somit wird es der Pflanze ermöglicht, potentiell toxische

Komponenten in hohen Konzentrationen zu akkumulieren. Bei Bedarf können diese Verbindungen durch Dekompartimentierung und Aktivität spezifischer Glycosidasen freigesetzt werden und vermitteln Schutz gegen Pathogen- oder Herbivoren-befall (Chong et al., 2002). Aromatische Verbindungen, wie zum Beispiel Vanillin, werden in Form ihrer bitteren Glucoside in der Vakuole gespeichert und durch endogene Glucosidasen im Verlauf des Reifungsprozesses freigesetzt (Prince & Gunson, 1994). Die potentielle Regulation von Phytohormonen durch Glucosidierung ist ebenfalls beschrieben worden (Dixon et al., 1989; Szerszen et al., 1994). Im Falle der Indol-3-essigsäure (IAA)-GT aus *Zea mays* konnte das korrespondierende *iaglu*-Gen identifiziert werden. Die Reinigung und biochemische Charakterisierung der zugehörigen Glucosyltransferase steht jedoch noch aus. Erste Untersuchungen zu IAA-Glucosyltransferasen aus *Arabidopsis thaliana* L. wurden kürzlich publiziert (Jackson et al., 2001; Bowles et al., 2002). Durch UGTs katalysierte Konjugationsreaktionen können für die Regulation bestimmter Signalmoleküle, z. B. Salicylsäure, eine wichtige Rolle spielen (Henning et al., 1993). Schon seit längerem ist die Bedeutung von Glucosyltransferasen für die Detoxifikation sogenannter Xenobiotika (synthetische Chemikalien, Herbizide) neben der Entgiftung über Glutathion bekannt (Kreuz et al., 1996; Coleman et al., 1997; Pflugmacher & Sandermann, 1998; Cole & Edwards, 2000). In Analogie zu den aus der Säugerleber bekannten Glucuronosyltransferasen wurde das Konzept der „grünen Leber“ vorgeschlagen (Sanderman, 1994). Aufgrund dieser Eigenschaften und der Tatsache, dass Glucosyltransferasen regio- und positionsspezifisch Zuckermoleküle auf diverse Akzeptoren übertragen können, ist eine biotechnologische Nutzung dieser Enzyme von grosser Bedeutung, da chemische Glucosidierungen aufwendige und kostspielige Reaktionen darstellen (Flitsch, 2000; Arend et al., 2001; Lim et al., 2003b)

1.2.1 Strategien zur Untersuchung von Glucosyltransferasen des Sekundärstoffwechsels

Einzelne Pflanzen sind in der Lage, eine Vielzahl verschiedener Glycoside zu akkumulieren. Beispielsweise sind in Früchten von *Vitis vinifera* mehr als 200 unterschiedliche Aglyca identifiziert worden (Sefton et al., 1993; 1994). Angesichts der Diversität glycosidierter Sekundärmetabolite stellt sich die Frage, wie viele verschiedene Enzyme notwendig sind, um diese große Anzahl von Metaboliten zu synthetisieren, oder ob einzelne Glucosyltransferasen in der Lage sind, unterschiedliche endogene und nicht-physiologische Substrate umzusetzen. Die Identifizierung und Charakterisierung pflanzlicher Glucosyltransferasen, insbesondere im Hinblick auf Substratspezifitäten, wird unter anderem dadurch erschwert, dass diese Enzyme meist nur in geringen Mengen in der Zelle vorkommen, ihre Reinigung sehr aufwendig ist und häufig nur geringe Ausbeuten erzielt werden (Vogt & Jones, 2000; Lim et al., 2003a). Nur wenige pflanzliche Glucosyltransferasen des Sekundärstoffwechsels sind mit Hilfe biochemischer Methoden gereinigt und charakterisiert worden, so dass im folgenden die Klonierung der korrespondierenden Gene möglich wurde und beobachtete Substratspezifitäten durch heterologe Expression bestätigt werden konnten. Es handelt sich dabei meist um lösliche Enzyme mit einem Molekulargewicht zwischen 45 und 60 kDa. Beispiele hierfür sind die *p*-Hydroxymandelonitril-UGT aus *Sorghum bicolor* (Jones et al., 1999), die Limonoid-UGT aus *Citrus* (Kita et al., 2000), die pathogen-induzierbare Salicylsäure-UGT aus *Nicotiana tabacum* (Lee & Raskin, 1999), die Betanidin-5-UGT (UGT73A5) aus *Dorotheanthus bellidiformis* (Heuer et al., 1996; Vogt et al., 1997) sowie die Arbutinsynthase aus *Rauvolfia serpentina* (Arend et al., 2001; Hefner et al., 2002). Die fortschreitende Entwicklung molekulargenetischer Techniken und Genomsequenzierungsprojekte haben es in den letzten Jahren ermöglicht, verschiedene Glucosyltransferasesequenzen mit Hilfe der Durchmusterung von cDNA-Bibliotheken aus diversen Pflanzen zu identifizieren und in heterologen Systemen zu exprimieren. Die erste verfügbare cDNA-Sequenz einer Glucosyltransferase des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels war das *bronze-1*-Gen aus Mais (Fedoroff et al., 1984). Diese Sequenz

diente als Basis zur Klonierung homologer putativer GT-Sequenzen in den darauffolgenden Jahren. Die Klonierung und Expression der Flavonol-3-UGT aus *Antirrhinum majus* (Schwinn et al., 1997), der Flavonoid-3-UGT aus *Vitis vinifera* (Ford et al., 1998) oder der Anthocyanidin-5-UGT aus *Perilla frutescens* (Yamazaki et al., 1999) seien als repräsentative Beispiele für die erfolgreiche Anwendung dieses molekularbiologischen Ansatzes genannt. 1991 wurde, basierend auf Sequenzdaten für tierische Glucuronosyltransferasen, eine Konsensussequenz für alle UGTs vorgeschlagen (Bairoch, 1991). Mit steigender Verfügbarkeit putativer Glycosyltransferasesequenzen in den Datenbanken, wurde im Jahr 1994 eine Konsensussequenz für pflanzliche Glycosyltransferasen des Sekundärstoffwechsels, die sogenannte PSPG-Box, publiziert (Hughes & Hughes, 1994). Dieses Motiv umfasst einen Bereich von ca. 45 AS in der Nähe des C-Terminus und zeichnet sich durch eine Sequenzidentität von 60-80 % aus (Abbildung 1.2). Zwei charakteristische Peptidsequenzen, WAPQV und HCGWNS, können in 95 % aller Glycosyltransferasen der β -Gruppe identifiziert werden, wobei die unterstrichenen Aminosäuren vollständig konserviert sind. In der Literatur wird postuliert, dass die PSPG-Box die Nukleotiddiphosphat-Zucker-Bindestelle repräsentiert, da die übrige Sequenzidentität mit ca. 10-30 % vergleichsweise gering ist.

PSPG-Box-Konsensussequenz:

N-Term.-**WAPQVVEVLAHPAVGCFVTHCGWNSTLESISAGVPMVAW**PFADQ-C-Term.

Konservierte Aminosäuren sind farbig dargestellt: Identität > 50 % bzw. > 80 %

Abbildung 1.2 Konsensus-Motiv pflanzlicher Glycosyltransferasen der β -Gruppe. Abbildung aus Vogt & Jones, 2000.

Datenbanksuchen mit Hilfe der PSPG-Box-Konsensussequenz haben zur Identifizierung einer Vielzahl putativer pflanzlicher Glucosyltransferasen geführt, allein 118 dieser Sequenzen stammen aus *A. thaliana* (Messner et al., 2003). Allerdings steht die funktionelle Charakterisierung der meisten dieser Enzyme noch aus.

1.2.2 Tertiärstruktur und katalytischer Mechanismus pflanzlicher Glycosyltransferasen

Die biochemische Funktion eines Proteins wird entscheidend durch seine Struktur bestimmt. Bei der Untersuchung eines neuen Proteins kann die Aminosäuresequenz nur einen Hinweis auf eine mögliche Funktion des Proteins geben. Zum genauen Verständnis des Katalysemechanismus ist die Kenntnis der Struktur unerlässlich. Obwohl die Identifizierung und Charakterisierung neuer Glycosyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels rapide vorschreitet (z. B. Lim et al., 2003a; Jones et al., 2003), sind bisher keine Kristallstrukturen pflanzlicher UGTs in den Datenbanken verfügbar. Dementsprechend stützen sich Vorstellungen zum Mechanismus des Zuckertransfers auf Sequenzvergleiche, die Identifizierung konservierter Aminosäuren, die eine Rolle für die Katalyse spielen könnten, und auf analoge Untersuchungen an Glycosidasen (Sinnott, 1991). Diese Befunde lieferten erste Anhaltspunkte für ein Klassifikationssystem (Campbell et al., 1997; Kapitonov & Yu, 1999). In den letzten Jahren sind verschiedene Übersichtsartikel erschienen, die, basierend auf den ersten Kristallstrukturdaten bakterieller Glycosyltransferasen (Moréra et al., 1999; Larivière et al., 2003), eine Klassifikation dieser Enzyme auf der Basis ähnlicher Topologien vornehmen, katalytische Domänen identifizieren und Vorschläge bezüglich des katalytischen Mechanismus machen (Breton & Imberty, 1999; Ünligil & Rini, 2000; Breton et al., 2001; Bourne & Henrissat, 2001; Hu & Walker, 2002; Coutinho et al., 2003).

Erste Erkenntnisse bezüglich katalytisch wichtiger Aminosäuren konnten z. B. durch Experimente mit spezifischen Aminosäure-modifizierenden Reagenzien (DEPC, PCMBMS, DIDS etc.) gewonnen werden. Nawloka und Mitarbeiter untersuchten die Auswirkungen solcher Reagenzien auf die Aktivität einer Solasodin-UGT aus *Solanum melongena* (Nawloka et al., 2003). Die Resultate lassen auf die Beteiligung von Histidin- sowie Aspartat- bzw. Glutamatresten an Substratbindung und Katalyse schliessen. Vergleichbare Hinweise wurden auch im Rahmen der Charakterisierung der UGT73A5 und UGT71F2 aus *D. bellidiformis* erhalten (Vogt et al., 1997). Die gezielte Mutagenese einzelner Aminosäuren stellt eine weitere Möglichkeit dar, katalytisch wichtige Aminosäuren zu identifizieren. Dies wurde zunächst am Beispiel UDP-Glucuronsäure-abhängiger Enzyme aus bakteriellen und tierischen Systemen gezeigt (Busch et al., 2000; Ouzzine et al., 2002). Erst kürzlich sind entsprechende Daten für eine pflanzliche Glucosyltransferase, die Arbutinsynthase aus *Rauvolfia serpentina*, publiziert worden (Hefner et al., 2003). Mutationsstudien an der UGT73A5 aus *D. bellidiformis* bestätigen die aus den Inhibitorstudien erhaltenen Resultate (Vogt et al., 1997) und belegen, dass die Aminosäuren His²² und Glu³⁷⁸ für die katalytische Aktivität des Enzyms essentiell sind (Hans et al., in press).

1.2.2.1 Komparative- und Homologie-Modellierung von Proteinstrukturen

Steigendes Interesse in den Bereichen der Medizin, Molekularbiologie, Pharmazie und Biotechnologie an Proteinstrukturen unterstreicht die Bedeutung der Bestimmung bzw. Vorhersage von 3D-Strukturen von Proteinen. Insbesondere für das Wirkstoffdesign spielt die Modellierung von Proteinstrukturen eine wichtige Rolle. In den Sequenzdatenbanken sind wesentlich mehr Sequenzen (Swissprot: 153.017 Einträge; TrEMBL: 1.062416 Einträge) als Kristallstrukturen (PDB: 25.882 Einträge) vorhanden. Stehen auch keine NMR-Daten für ein Protein zur Verfügung, kann die Methode der Homologie-Modellierung von Proteinen ein geeignetes Werkzeug sein, um Aufschlüsse über die Tertiärstruktur eines Proteins aus seiner Aminosäuresequenz zu erhalten. Voraussetzung ist die Existenz einer Kristallstruktur in der Datenbank mit ausreichender Homologie (> 30 %) zur zu untersuchenden Proteinsequenz. Die Methode basiert auf der Annahme, dass Proteine mit ähnlichen Sequenzen auch ähnliche 3D-Strukturen besitzen. Am Anfang der Modellierung steht demnach die Identifizierung einer geeigneten Vorlagestruktur (Template) durch Sequenzvergleiche mit der Datenbank, der sich die Entwicklung des Modells und dessen Optimierung anschließt. Die Qualität des Modells kann danach mit Hilfe verschiedener Bewertungskriterien abgeschätzt werden. Steht kein Template mit einer Homologie > 30 % zur Verfügung, so können mit Hilfe eines komparativen Modellierungsansatzes strukturell ähnliche Regionen, z. B. das Peptidrückgrat der Templatesequenz, kopiert und Loop-Bereiche sowie Aminosäureseitenketten schrittweise optimiert werden. In der Literatur sind die Übergänge zwischen den beiden genannten Methoden jedoch fließend.

Protein-Liganden-Bindungsstudien und der Vergleich mit experimentellen Daten ermöglichen es, die Genauigkeit der Struktur der Substratbindungsregion zu untersuchen. Die Berechnung von Bindungsaffinitäten in Form der Wechselwirkungsenergie verschiedener Liganden im Enzym-Substrat-Komplex liefert erste Informationen über das Wechselwirkungsverhalten dieser Liganden mit dem Enzym. Allerdings bleiben Solvatations- und Desolvatations- sowie Entropieeffekte bei diesem Verfahren unberücksichtigt. Diese Aspekte sind hingegen im Programm SCORE (Wang et al., 1998) beinhaltet, so dass für einen gegebenen Enzym-Substrat-Komplex die Dissoziationskonstante K_D abgeschätzt werden kann. Während Homologie-Modellierung von 3D-Strukturen bereits zur Untersuchung von tierischen Galactosyltransferasen (Heissigerová et al., 2003) benutzt wurde, ist über eine entsprechende Anwendung auf pflanzliche Glycosyltransferasen in der Literatur nichts bekannt.

1.3 Glucosyltransferasen aus *Beta vulgaris* L.

1.3.1 *B. vulgaris* (Rote Beete)

Das Untersuchungsobjekt *B. vulgaris* (Abbildung 1.3), auch als Futter- oder Runkelrübe bekannt, stammt als Zuchtform von der wilden Form *Beta maritima* ab und gehört zur Ordnung der Caryophyllales. *B. vulgaris* gehört zur Familie der Chenopodiaceae und innerhalb der verschiedenen Kulturformen zur Gruppe der „Garten-Beeten“ (Lange et al., 1999). Neuere phylogenetische Studien schliessen die Chenopodiaceae in die Familie der Amaranthaceae mit ein (Cuénod et al., 2002).

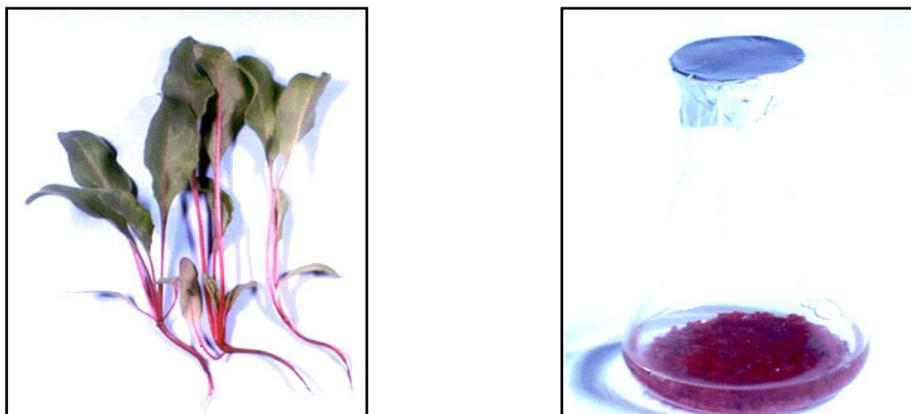


Abbildung 1.3 *B. vulgaris*, links: junge Pflanzen, rechts: Zellsuspensionskultur.

B. vulgaris wurde schon zu Zeiten der Römer als Nahrungsbeilage verwendet und ist auch heute aufgrund ihres hohen Gehaltes an Folsäure und Eisen sowie verschiedener Vitamine und Mineralien ein geschätztes Lebensmittel. Die Zuckerrübe stellt eine Kulturvarietät mit einem Saccharosegehalt von 18-22 % dar. Die industrielle Zuckerproduktion aus Rüben wurde 1801 von Karl Achard etabliert. Lyophilisiertes Rote Beete-Pulver findet als „natürliches“ Färbemittel in der Lebensmittelindustrie Verwendung (von Elbe, 1977). Die rote Färbung beruht auf der Akkumulation wasserlöslicher, stickstoffhaltiger Pigmente in der Vakuole, den sogenannten Betalainen (Mabry & Dreiding, 1968). Der dominierende Farbstoff in der Rote Beete ist das Betanin (Betanidin-5-*O*- β -glucosid), das ein Absorptionsmaximum bei 540 nm aufweist (Abbildung 1.4). Darüberhinaus besitzen Betalaine antioxidative Eigenschaften, die unter medizinischen Gesichtspunkten von Interesse sind (Escribano et al., 1998; Pedreno & Escribano, 2000; Kanner et al., 2001). In jüngster Zeit wird intensive Genomforschung an Zuckerrüben betrieben. Im Rahmen der GABI-Initiative ist *B. vulgaris*, neben den beiden Modellpflanzen *Arabidopsis thaliana* und *Hordeum vulgare*, ein weiteres Forschungsobjekt (<http://www.mips.biochem.mpg.de/proj/gabi/projects/gabibeet.htm>).

1.3.2 Betalaine

Betalaine repräsentieren neben den hydrophilen Anthocyanen und den lipophilen Carotenoiden die dritte Gruppe pflanzlicher Pigmente. Betalaine umfassen rot-violette Betacyane und gelbe Betaxanthine. Es handelt sich um wasserlösliche Immoniumkonjugate von Betalaminsäure und *cyclo*-Dopa (Betacyane) sowie Betalaminsäure und Aminosäuren bzw. Amininen (Betaxanthine). Während Anthocyane und Carotenoide im Pflanzenreich weit verbreitet sind, ist das Vorkommen der Betalaine auf die Ordnung Caryophyllales und auf höhere Pilze der Ordnung Agaricales, wie zum Beispiel den Fliegenpilz *Amanita muscaria*, beschränkt (Steglich & Strack, 1990). Anthocyane und Betalaine schliessen sich in ihrem Vorkommen gegenseitig aus (Kimler et al., 1970; Stafford, 1994). Betalain-produzierende Pflanzen sind nicht in der Lage, Flavan-3,4-diole in Anthocyanidine umzuwandeln. Flavonoide bis zur Stufe

der Leucoanthocyanidine kommen jedoch in betalainführenden Pflanzen vor (Bate-Smith, 1962; Bittrich & Amaral, 1991). Chemotaxonomisch wird die Ordnung Caryophyllales in eine Betalain-(Chenopodiineae) und eine Anthocyan-führende (Caryophyllineae) Unterordnung gegliedert (Clement & Mabry, 1996), wie aus der folgenden Tabelle 1.1 ersichtlich ist:

Tabelle 1.1 Gliederung der Ordnung Caryophyllales nach Clement und Mabry, 1996.

Chenopdiineae (Betalaine vorhanden)	Aizoaceae, Amaranthaceae, Archatocarpaceae, Basellaceae, Cactaceae, Chenopodiaceae, Didieraceae, Halophytaceae, Hectorellaceae, Nyctaginaceae, Phytolaccaceae, Portulacaceae, Stegnospermaceae
Caryophyllineae (keine Betalaine)	Caryophyllaceae, Molluginaceae

Die Strukturaufklärung der Betacyane begann im Jahre 1957 in zwei unabhängigen Arbeitsgruppen mit der Kristallisierung von Betanin, dem Hauptpigment in *B. vulgaris* (Wyler & Dreiding, 1957; Schmidt & Schönleben, 1957). Im Jahre 1963 gelang die Strukturaufklärung des Betandins (Wyler et al., 1963), der im Jahre 1964 die Identifizierung des ersten Betaxanthins, Indicaxanthin, folgte (Piattelli et al., 1964a). Mit Hilfe einer Basenaustauschreaktion konnte gezeigt werden, dass sowohl Betacyane als auch Betaxanthine Betalaminsäure als gemeinsamen Baustein enthalten und ineinander umwandelbar sind (Wyler et al., 1965). Die Strukturen von Betanidin, Indicaxanthin und des Grundbausteins Betalaminsäure, gehen aus der folgenden Abbildung 1.4 hervor.

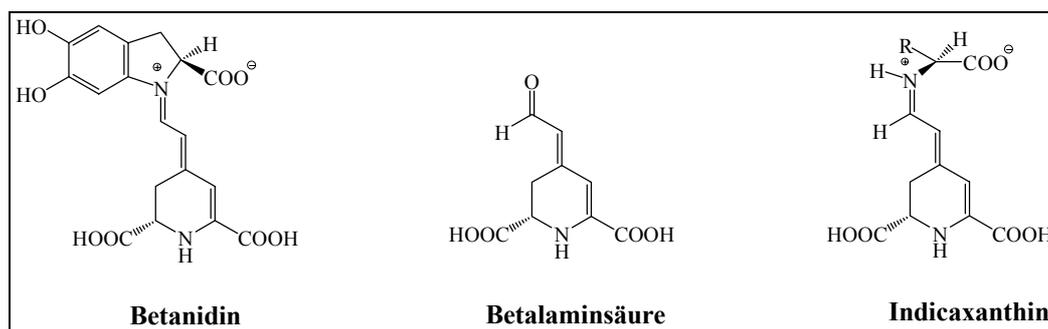


Abbildung 1.4 Strukturen von Betanidin, Betalaminsäure und Indicaxanthin.

Die Biosynthese der Betalaine ist kürzlich in einem Übersichtsartikel (Strack et al., 2003) ausführlich dargestellt worden und soll deshalb im folgenden nur kurz erläutert werden (Abbildung 1.5). Der einleitende Schritt besteht in einer Hydroxylierung von L-Tyrosin zu L-Dopa, wobei bereits im Jahre 1969 von Liebisch und Mitarbeitern durch Fütterungsexperimente mit doppelt markiertem Tyrosin gezeigt wurde, dass die C₆-C₃-N-Einheit vollständig in *cyclo*-Dopa und Betalaminsäure eingeht. Das entsprechende Enzym, Tyrosinase, wurde sowohl aus *Portulacca grandiflora* als auch *B. vulgaris* beschrieben (Steiner et al., 1996; 1999). Der Biosyntheseweg verzweigt sich nach der Bildung des Dopas. Eine extradiolische Spaltung von L-Dopa in 4,5-Position führt zur Bildung von 4,5-*seco*-Dopa, das nicht-enzymatisch zur Betalaminsäure zyklisiert. Die beteiligte Dopa-4,5-Dioxygenase, bisher nur aus dem Fliegenpilz isoliert und charakterisiert (Girod & Zryd, 1991a), wurde kürzlich aus *P. grandiflora* kloniert. Das Enzym konnte noch nicht heterolog exprimiert werden. Die Funktionalität konnte aber durch Komplementation der Betacyanbiosynthese in einer nicht-pigmentierten *Portulacca grandiflora*-Varietät mit der Dopa-4,5-Dioxygenase cDNA gezeigt werden (Christinet et al., 2004). Die Kondensation von Betalaminsäure mit Aminosäuren oder Aminen unter Bildung der gelben Betaxanthine verläuft wahrscheinlich spontan (Schliemann et al., 1999). Auf dem zweiten von L-Dopa abzweigenden Biosyntheseweg entsteht durch die Oxidaseaktivität

des Enzyms Tyrosinase Dopachinon, das zyklisiert und *cyclo*-Dopa bildet. Durch Kondensation mit Betalaminsäure wird Betanidin, das Aglycon der Betacyane, gebildet.

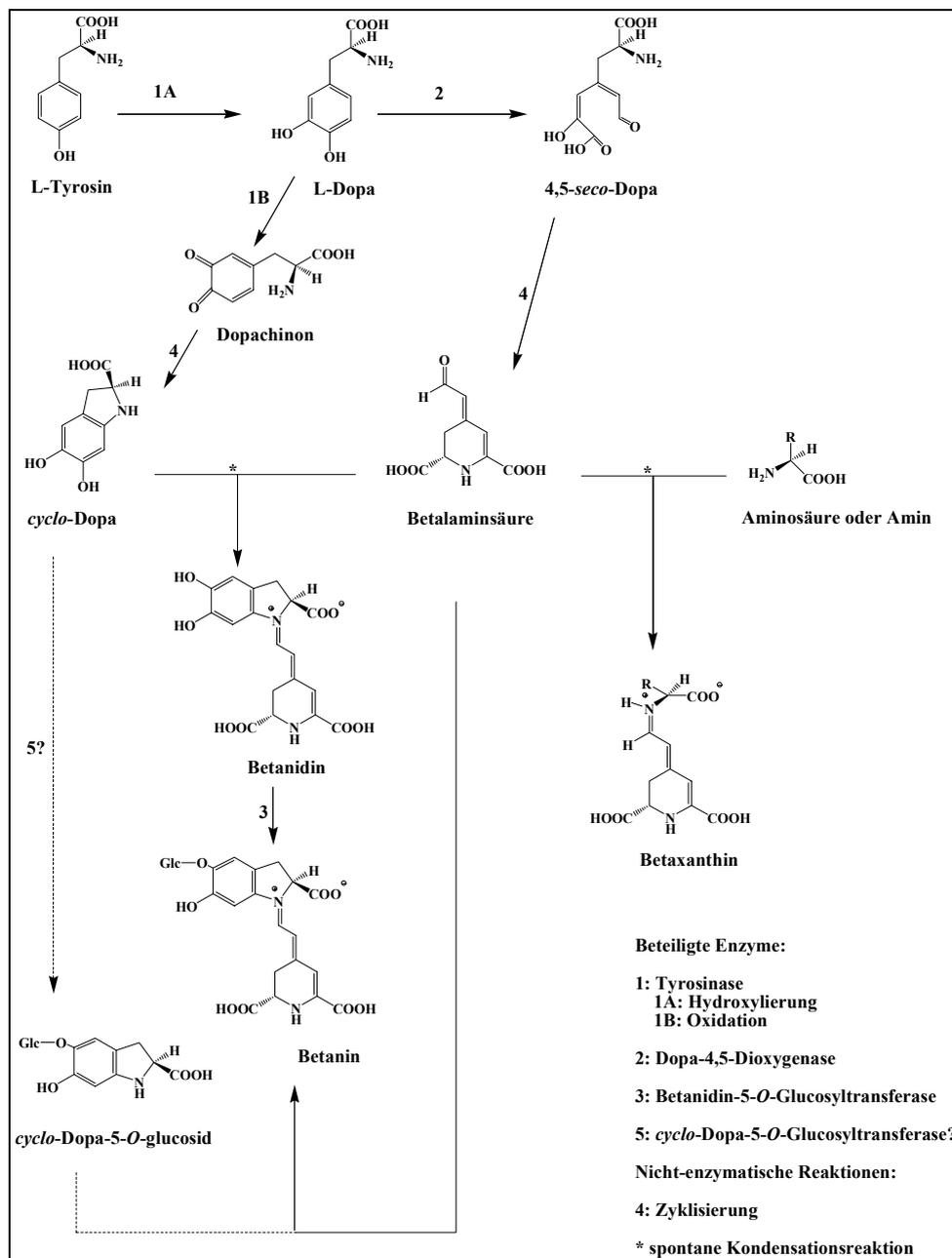


Abbildung 1.5 Biosyntheschema der Betalaine.

1.3.2.1 Zwei alternative Glucosidierungswege in der Biosynthese des Betanins

Die grosse Vielfalt der Betacyane (z. B. Strack et al., 2003) beruht auf der Glucosidierung des Betanidins in C-5- oder C-6-Position und nachfolgender Acylierung der Zucker. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist die Glucosidierung auf der Stufe des Betanidins lediglich für *D. bellidiformis* (Aizoaceae) nachgewiesen worden (Heuer et al., 1996; Vogt et al., 1997). Die korrespondierenden Enzyme wurden aus der Zellkultur gereinigt und charakterisiert. Beide cDNAs wurden kloniert und im Falle der UGT73A5 auch heterolog in *E. coli* exprimiert (Vogt et al., 1999a). Obwohl die Akkumulation von Betanidin in einigen Aizoaceen, Cactaceen und Portulacaceen beschrieben wurde (Piattelli & Minale, 1964b; Piattelli & Imperato, 1969; Sciuto et al., 1972), konnten entsprechende Betanidin-Glucosyltransferasen bisher nicht

identifiziert werden. Kurzzeit-Fütterungsexperimente mit Dopamin an Hypokotylen der Futterrübe zeigten, dass zunächst 2-Descarboxybetanidin und nachfolgend 2-Descarboxybetanin und Malonyl-2-descarboxybetanin als Metabolite auftraten, wohingegen kein Descarboxy-*cyclo*-Dopa-Glucosid detektiert wurde (Kobayashi et al., 2001).

Für eine Glucosidierung auf der Stufe des *cyclo*-Dopas sprechen aber Untersuchungen von Wyler und Mitarbeitern aus dem Jahre 1984, die eine Akkumulation von *cyclo*-Dopa-Glucosid in jungen *B. vulgaris*-Pflanzen zeigten. Diese Befunde werden im Rahmen einer Dissertationsschrift (Bauer, 2001) anhand von Fütterungsexperimenten mit radioaktiv markiertem L-Tyrosin und L-Dopa, basierend auf experimentellen Daten der Jahre 1980-1985, erneut diskutiert. Der Nachweis einer *cyclo*-Dopa-Glucosyltransferase aus *B. vulgaris* oder entsprechender Betanidin-UGTs ist in der Literatur bisher nicht beschrieben.

1.3.2.2 Flavonoidglycoside aus *B. vulgaris*

Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits erläutert, kommen Flavonoide bis zur Stufe der Leucoanthocyanidine in betalainführenden Pflanzen vor. Die Charakterisierung der Betanidin-UGTs aus *D. bellidiformis* (Heuer et al., 1996; Vogt et al., 1997, 1999) zeigte, dass diese Enzyme auch Flavonoide, z. B. das Flavonol Quercetin, als Substrate akzeptieren. In der Zellkultur von *D. bellidiformis* wurden keine Flavonoide nachgewiesen, aber in den Blüten der Pflanzen (Heuer, 1995). Im Rahmen der Untersuchung von Glucosyltransferasen aus *B. vulgaris* sollte dieser Aspekt nicht unberücksichtigt bleiben und die mögliche Akkumulation von Flavonoidglycosiden in jungen *B. vulgaris*-Pflanzen und der Zellsuspensionskultur analysiert werden.

Flavonoide sind Phenylpropanderivate, die über den Polyketidweg (A-Ring) und den Hydroxymizsäureweg (B-Ring) synthetisiert werden. Das Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese, die Chalkonsynthase, katalysiert in Analogie zur Fettsäurebiosynthese die Bildung des A-Ringes aus drei Molekülen Malonyl-CoA. Die Chalkon-Isomerase katalysiert den Ringschluss des Chalkons zum heterozyklischen Flavanon. Durch Oxidations-, Reduktions- und Hydroxylierungsreaktionen entstehen aus der Flavanongrundstruktur zahlreiche Flavone, Isoflavone, Flavonole und Anthocyane (Heller & Forkmann, 1994; Forkmann & Martens, 2001). Die Biosynthese der Anthocyane verläuft ausgehend vom Flavanon über das Flavanonol und das Flavan-3,4-diol (= Leucoanthocyanidin) (Saito et al., 1999), wie in Abbildung 1.6 dargestellt.

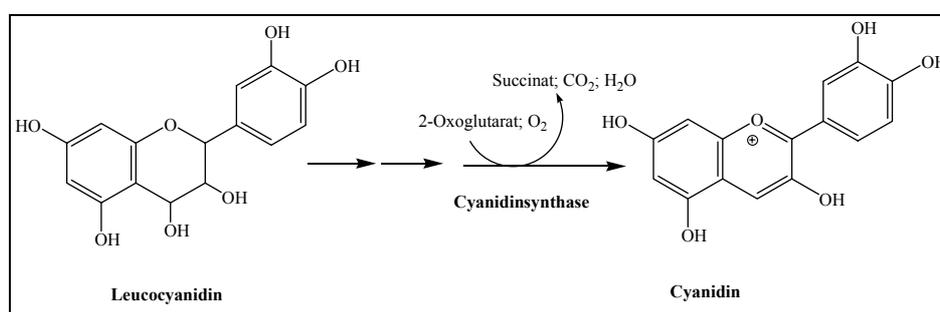


Abbildung 1.6 Der letzte Schritt der Cyanidinbiosynthese.

Untersuchungen zu Flavonoiden und glycosidischen Derivaten aus *B. vulgaris* sind aus der Literatur nur wenige bekannt. Von Gardner und Mitarbeitern (1967) wurde die Isolation und Identifizierung von Vitexin (C-Glucosid des Apigenins) sowie eines Quercetinglucosids aus Blättern von *B. vulgaris* beschrieben. In einem Übersichtsartikel von Richardson (1978) zur Verbreitung von Flavonolen und C-Glycosylflavonoiden innerhalb der Caryophyllales, sowie in einer Publikation von Eloesser & Hermann aus dem Jahre 1975, werden Quercetin, Kämpferol, Orientin und Isoorientin als Metabolite aus Blättern von *B. vulgaris* erwähnt. De

Pascual et al. (1998) detektierten mit einer HPLC-DAD-MS-Analyse Quercetinglycoside in *B. vulgaris*-Extrakten. Kujala und Mitarbeiter publizierten 2002 die Analyse phenolischer Inhaltsstoffe in vier Kulturformen von *B. vulgaris* und identifizierten die Phytoalexine Cochliophilin A, Betagarin, Betavulgarin sowie Dihydroisorhamnetin. Es ist bekannt, dass diese Verbindungen nach Pathogenbefall der Blätter bzw. der Wurzel auftreten (Elliger & Halloin, 1994). Des Weiteren existieren verschiedene Studien zum Auftreten von Hydroxyzimtsäure-Derivaten in *B. vulgaris*-Pflanzen und der Zellkultur (Winter & Hermann, 1986; Bokern et al., 1991)

1.4 Zielstellung der Arbeit

Über den phylogenetischen Ursprung der Betalaine und die korrespondierenden Enzyme, insbesondere die an der Biosynthese des Betanins beteiligten Glucosyltransferasen, ist immer noch wenig bekannt (Stafford, 1994; Clement & Mabry, 1996; Strack et al., 2003). Nur für die Aizoacee *D. bellidiformis* konnte bisher eine Glucosidierung auf der Stufe des Betanidins nachgewiesen werden. Für keine Pflanze aus einer der 12 anderen Betalain-führenden Familien sind entsprechende Glucosyltransferaseaktivitäten gezeigt worden. Somit stellt sich die Frage, ob einer der beiden alternativen Glucosidierungswege im Rahmen der Betaninbiosynthese generalisiert werden kann oder ob die Glycosidierung als artspezifisch anzusehen ist. Da von Wyler et al. 1984 die Akkumulation von *cyclo*-Dopa-Glucosid in jungen *B. vulgaris*-Pflanzen beschrieben wurde, sollte die Existenz einer putativen *cyclo*-Dopa- bzw. Betanidin-Glucosyltransferase in dieser Spezies untersucht werden. Ziel der Arbeit war der Nachweis, die Reinigung und/oder Klonierung entsprechender Glucosyltransferasen aus *B. vulgaris*-Pflanzen bzw. einer roten Zellsuspensionskultur.

Durch die biochemische Charakterisierung der Enzyme, sollten insbesondere im Vergleich zu den bekannten Betanidin-UGTs aus *D. bellidiformis*, weitere Erkenntnisse zur möglichen Rekrutierung dieser Enzyme aus dem Flavonoidstoffwechsel gewonnen werden (Vogt et al., 1997). Die Untersuchung dieser phylogenetischen Fragestellung sollte durch eine Analyse der in *B. vulgaris* auftretenden Flavonoidglycoside unterstützt werden.

Der Vergleich mit den Betanidin-UGTs aus *D. bellidiformis* sollte darüberhinaus auch die Basis für die Anwendung des Verfahrens der Homologiemodellierung bilden. Aufgrund der Tatsache, dass die Tertiärstruktur eines Proteins seine Funktion unmittelbar beeinflusst, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine erste Vorstellung einer 3D-Struktur der entsprechenden pflanzlichen Glucosyltransferasen entwickelt werden, die möglicherweise Aussagen über den katalytischen Mechanismus erlaubt und dazu beiträgt, die beobachteten Unterschiede zwischen den UGTs aus *D. bellidiformis* und *B. vulgaris* zu interpretieren.

2. Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzen

Alle verwendeten Pflanzen wurden aus Samen im Gewächshaus unter natürlichen Lichtbedingungen angezogen. Das Samenmaterial für *Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris* „Cylindra“ (Garden Beet Group) sowie für *Amaranthus cruentus* L. subsp. *paniculatus* wurde von der Saat-zucht Quedlinburg GmbH, Quedlinburg bezogen. Samen von *Beta vulgaris*, subsp. *maritima* wurden vom Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, zur Verfügung gestellt. Es wurden hierbei Samen der Ökotypen 296 (Thessaloniki), 307 (Wales) und 310 (Camargue) verwendet. *Allium cepa* L. wurde in einem lokalen Supermarkt gekauft.

2.1.2 Zellsuspensionskulturen

Rote Zellkulturen von *B. vulgaris* L., *Portulacca grandiflora* Hook und *Chenopodium rubrum* L. wurden bei einer Temperatur von 23 °C in einem Hell/Dunkelrhythmus von 16/8 h bei einer Lichtintensität von 160 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ auf einem Rotationschüttler (100 rpm) angezogen. Die Kultivierung erfolgte in 250 ml Erlenmeyerkolben in 50 ml MS-Medium (Murashige & Skoog, 1962), das folgende Zusätze enthielt: 30g/l Saccharose, 440 mg/l $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg/l *myo*-Inosit, 21,71 mg/l Na_2EDTA , 15,7 mg/l $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mg/l Glycin, 0,1 mg/l Vitamin B₁, 0,5 mg/l Nikotinsäure und 0,5 mg/l Vitamin B₆. Die Passagedauer der Suspensionskulturen betrug 14 Tage.

2.1.3 Hefestämmen

Zur heterologen Expression in *Saccharomyces cerevisiae* wurde der Stamm INVSc1 der Firma Invitrogen verwendet. Der Genotyp ist im folgenden aufgelistet: MATa, his3 Δ l, leu2, trp1-289, ura3-52/MAT α , his3 Δ l, leu2, trp1-289, ura3-52. Es handelt sich um einen diploiden, für die Aminosäuren Histidin, Leucin, Tryptophan sowie für die Pyrimidinbase Uracil, auxotrophen Stamm. Die Anzucht erfolgte in SC-U-Medium (Invitrogen) mit 2 % (w/v) Glucose. Als Induktionsmedium wurde SC-U-Medium mit 2 % (w/v) Galactose verwendet.

2.1.4 Insektenzellen

Alle für die Handhabung der Insektenzellen verwendeten Materialien stammten, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Life Technologies. Die Kultivierung der *Spodoptera frugiperda* Sf9 Insektenzellkulturen erfolgte in T25-Zellkulturflaschen (Nunc) mit 5 ml TC-100 Medium unter Zusatz von fötalem Kälberserum bei 28 °C. Zur Subkultivierung wurden die Zellkulturen alle 3 Tage in frisches Medium transferiert, wobei die Anzahl der Zellen halbiert wurde. Die Insektenzellsuspensionskulturen für die Transformation wurden in 250 ml Erlenmeyerkolben in 50 ml serumfreies SF 900-II-Medium unter Zusatz von 0,1 % (v/v) Pluronic[®] F-68 (Life Technologies) bei 28 °C und 140 rpm kultiviert. Zum Animpfen einer 50 ml Kultur wurden zwei dichtbewachsene T25-Kulturen benötigt. Nach 3 bis 4 Tagen hatten die Suspensionskulturen eine Zelldichte von ungefähr $2\cdot 10^6$ Zellen pro ml erreicht und wurden dann für die Transfektionsversuche verwendet.

2.1.5 Bakterienstämme

Tabelle 2.1 listet die verwendeten Bakterienstämme auf. Die Anzucht der Bakterien erfolgte entweder auf Agarplatten oder als Suspensionsschüttelkultur (180-200 rpm) in Luria-Bertani-Medium (Sambrook et al., 1989) bei 37 °C, sofern nicht anders angegeben. Selektion auf resistenzvermittelnde Plasmide erfolgte durch Zusatz des entsprechenden Antibiotikums mit folgenden Endkonzentrationen, sofern nicht anders angegeben: Ampicillin (50 bzw. 100 µg/ml), Carbenicillin (50 µg/ml), Chloramphenicol (50 µg/ml), Kanamycin (25 µg/ml), Spectinomycin (100 µg/ml) und Tetracyclin (12,5 µg/ml).

Tabelle 2.1 Bakterienstämme, die zu Klonierungs- bzw. Expressionsarbeiten eingesetzt wurden.

Stamm	Genotyp	Verwendung
<i>E. coli</i> DH5α (Clontech)	F ⁻ , <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> , (<i>r_k⁻m_k⁺</i>), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Φ80lacZΔM15, <i>thi-1</i> , Δ(<i>lacZYA-argFV169</i>)	Allgemeine Klonierungsarbeiten
<i>E. coli</i> XL1 Blue (Stratagene)	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacI^q</i> ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Allgemeine Klonierungsarbeiten
<i>E. coli</i> M15p[Rep4] (Qiagen)	Nal ^s , Str ^s , Rif ^s , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺	Expressionsstamm für die pQE-Vektorserie (Qiagen)
<i>E. coli</i> XL-1 Blue MRF' (Stratagene)	Δ(<i>mcrA</i>), 183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>), 173 <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB lacI^q</i> ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Bestandteil des λ-Zap cDNA Synthesis Kit (Stratagene)
<i>E. coli</i> SOLR (Stratagene)	<i>e14⁻</i> , (McrA ⁻), Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>), 171 <i>sbcC</i> , <i>recB</i> , <i>recJ</i> , <i>uvrC</i> , <i>umuC::Tn5</i> (Kan ^r), <i>lac</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>endA1</i> , λ ^R [F' <i>pro AB lacI^q</i> ZΔM15] Su ⁻	Bestandteil des λ-Zap cDNA Synthesis Kit (Stratagene)
<i>E. coli</i> BL21-AI TM (Invitrogen)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> , (<i>r_B⁻m_B⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>araB::T7RNAP-tetA</i>	Expressionsstamm Gateway- Technologie-System
<i>E. coli</i> DB3.1 (Invitrogen)	F ⁻ , <i>gyrA462</i> , <i>end A1</i> , Δ(<i>sr1-recA</i>) <i>mcrB</i> , <i>mrr</i> , <i>hsdS20</i> (<i>r_B⁻, m_B⁻</i>), <i>supE44</i> , <i>ara14</i> , <i>galK2</i> , <i>lacY1</i> , <i>proA2</i> , <i>rpsL20</i> (Sm ^r), <i>xy15</i> Δ <i>leu</i> , <i>mtl1</i>	Gateway-Technologie-System zur Erhaltung von Plasmiden mit <i>ccdB</i> - Gen
<i>E. coli</i> BL21- CodonPlus(DE3)-RIL (Invitrogen)	B F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r₈⁻ m₈</i>), <i>dcm</i> ⁺ , Tet ^r , <i>gal</i> λ(DE3), <i>endA</i> , Hte [argU ileY leuW Cam ^r]	Expressionsstamm Gateway- Technologie-System, der zusätzliche Genkopien für tRNAs, die Codone für Arginin, Isoleucin und Leucin erkennen, trägt
<i>E. coli</i> BL21- CodonPlus(DE3)-RP (Invitrogen)	B F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r₈⁻ m₈</i>), <i>dcm</i> ⁺ , Tet ^r , <i>gal</i> λ(DE3), <i>endA</i> , Hte [argU proL Cam ^r]	Expressionsstamm Gateway- Technologie-System, der zusätzliche Genkopien für tRNAs, die Codone für Arginin und Prolin erkennen, trägt

2.1.6 Vektoren

Tabelle 2.2 Vektoren, die zu Klonierungs- bzw. Expressionsarbeiten eingesetzt wurden.

Bezeichnung	Hersteller	Grösse [kb]	Resistenzgen	Tag-Sequenzen	Verwendung	Besonderheiten
pBlueScript® S/K (+/-)	Stratagene, LaJolla CA, USA	2,9	Amp ^r	keine	Klonierungs-phagemid	Entsteht bei „in vivo Excision“ der λ-ZAP-Phagen einer cDNA-Bank
pGEM® T Easy	Promega, Madison WI, USA	3,0	Amp ^r	keine	T/A-Klonierung von PCR-Produkten	3'-T-Überhänge: lacZ-Gen
pQE30-32	Qiagen, Hilden	3,5	Amp ^r	6xHis-Tag, N-terminal	Expressionsplasmid	Einzelne Vektoren unterscheiden sich um eine Base; Klonierung in korrektem Lese-rahmen möglich
pQETri-System	Qiagen	5,8	Amp ^r	6x His C-terminal	Expressionsplasmid für <i>E. coli</i> , Säuger- und Insektzellen	CAG-, T5- und p10-Promotorsequenzen
pDONR™ 221	Invitrogen, Karlsruhe	4,8	<i>ccdB</i> -Gen + Cm ^r	keine	Klonierung von <i>attB</i> -flankierten PCR-Produkten im Gateway-System	<i>attP</i> -Sequenzen, Klonierung beruht auf Rekombination des λ-Phagen
pDEST™24	Invitrogen	7,0	<i>ccdB</i> -Gen + Amp ^r	6x GST, C-terminal	Expressionsplasmid im Gateway-System	
pYES2	Invitrogen	5,9	Amp ^r	keine	Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>URA3</i> -Gen ermöglicht Selektion auf <i>ura3</i> -Phänotyp
pIB/V5-His	Invitrogen	3,5	Blasticidin ^r	6xHis C-terminal	Expression in <i>S. frugiperda</i> im InsectSelect™ BSD-System	OpIE1/OpIE2-Promotorsequenzen benötigen keine viralen Aktivierungsfaktoren

2.1.7 Oligonukleotide

Für Sequenzierungsreaktionen bzw. PCR-Amplifikationen benötigte Oligonukleotide wurden von TopLab (Martinsried), Medigenomix (Martinsried), bzw. MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Die Sequenz und die jeweilige Verwendung der Oligonukleotide sind der Tabelle 2.3 bzw. Tabelle 2.4 zu entnehmen.

Tabelle 2.3 Degenerierte Oligonukleotidsequenzen, die vom Konsensus-Motiv THCGWN abgeleitet wurden, sowie spezifische Kontroll-Primer für Actin aus *B. vulgaris*. (+) oder (-) zeigen an, ob der Primer als Sense- oder Antisenseprimer eingesetzt wurde. Die PSPG-Primer wurden in Kombination mit T7-2 eingesetzt.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'-3')	Orientierung
PSPG-2a	AC(AGCT)CA(CT)TG(CT)GG(GC)TGGAAC	+
PSPG-2b neu	AC(AGCT)CA(CT)TG(CT)GG(AT)TGGAAC	+
PSPG-2c	AC(AGCT)CA(CT)TG(CT)GG(AGCT)TGGAAT	+
T7-2	GTAATACGACTCACTATAGGGC	-
BV Actin1f	CATATGTTGGAGATGAAGC	+
BV Actin1 rev	GTCAAGCGCAACGTATGC	-

Tabelle 2.4 Genspezifische PCR-Primer und jeweilige Verwendung. (+) oder (-) zeigen an, ob der Primer als Sense- oder Antisenseprimer eingesetzt wurde. Fettdruck bezeichnet Adaptersequenzen aus dem Gateway-System.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'-3')	Klonierung in:	Orientierung
BV-GT- <i>SphI</i>	ACATGCATGCATGGATGATAAATC	pQE30-Vektor/ pYes2-Vektor	+
BV-GT- <i>SmaI</i>	TCCCCCGGGGGTTGATAAACC	pQE30-Vektor	-
BV-GT- <i>KpnI</i>	GGGGTACCGGTTGATAAACCTCTC	pYes2-Vektor / pIB/V5-His-Vektor	-
BV-GT- <i>SacII</i> - rev	TCCCCGCGGGGAGGTTGATC	pIB/V5-His-Vektor	+
BV-5f1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TTCGAAGGAGATAGAACC	pDONR221-Vektor (attB -Stellen)	+
BV-5rev1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CGGTTGATAAACCTCT	pDONR221-Vektor (attB -Stellen)	-
5F-GT- <i>SmaI</i> -f	TCCCCCGGGGGAATGGATGATAAATC	pBlueSfiBA	+
5F-GT- <i>Clal</i> - rev	CCATCGATGGTTGATAAACCTC	pBlueSfiBA	-
5F-GT-Nterm	ATGGATGATAAATCACAACAG	genspezifischer Primer	+
5FGT-10/3rev2	GAAATGGTTCCTCGTCAGATG	interner Sequenzierprimer	-
BV6FGT- <i>EcoRI</i>	CCGGAATTCATGAGCAGCAGTACAGCAAG	pQETri-19/pYes2	+
BV6FGT- <i>XhoI</i>	CCGCTCGAGCGGCTCAAAGTC	pQETri-19/pYes2/ pIB/V5-His	-
BV6FGT- <i>BamHI</i> -f	CGCGGATCCGCGATGAGCAGCAG	pIB/V5-His	+
BV-6f1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TCGAAGGAGATAGAACC	pDONR221-Vektor (attB -Stellen)	+
BV6rev1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CCTCAAAAGTCAAAAC	pDONR221-Vektor (attB -Stellen)	-

2.1.8 Chemikalien und Enzyme

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Fluka (Buchs SG, Schweiz), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (München), Baker (Niederlande) und Merck (Darmstadt) bezogen. Enzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden, wenn nicht anders angegeben, von New England Biolabs (Frankfurt), Invitrogen (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Promega (Mannheim) oder Stratagene (Amsterdam) bezogen. Alle Lösungen und Medien wurden mit doppelt destilliertem Wasser aus einer Milli-Q-Anlage (Millipore, Schwalbach) angesetzt.

Enzymtests:

UDP-Glucose, L-Dopa, Tyrosinase, Hydroxycumarine, Hydroxyzimtsäuren und Salicylsäure wurden von Sigma bezogen. 4-Dimethylaminobenzaldehyd, Quercetin und Myricetin stammten von Merck. Kaempferol lieferte Roth, Eriodictiol stammte von der Firma Extrasynthese (Genay, Frankreich). Natriumascorbat lieferte Serva. Alle übrigen Flavonoidsubstrate stammten aus der Kollektion von T. Vogt (IPB, Halle). Betanidin wurde aus lyophilisiertem Rote Beete-Pulver der Firma Roth nach enzymatischer Glucoseabspaltung aus Betanin (Betanidin 5-O- β -glucosid) gemäß der Vorschrift von Heuer et al. (1996) gewonnen.

Spezielle Chemikalien :

Cellfectin, fötales Kälberserum, TC-100 und SF900 II Medium wurden von Life Technologies bezogen. Blasticidin und SC-U-Medium lieferte Invitrogen. Igepal CA-630, BCIP und NBT sowie der pflanzliche Protease-Inhibitorcocktail stammten von Sigma. IPTG und X-Gal lieferte Peqlab.

Radiochemikalien (ICN):

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$, 3000 Ci/mmol	ICN (Eschwege)
D-[U- ^{14}C]-UDP-Glucose, 250 mCi/mmol	ICN

Säulenchromatographie:

Folgende Materialien stammten von der Firma Amersham Pharmacia Biotech: Sephadex G-25, Sephadex LH-20, Phenyl-Sepharose 4L-CB, Phenylsuperose HP, Reactive-Yellow-3 und Mono-Q 10/10. Nickel-Agarose wurde von Qiagen verwendet, die TALON Metall-Chelat-Affinitätsmatrix und Glutathion-Agarose wurden von BD Biosciences Clontech bezogen.

DNA Längenstandards und Nukleotide:

Smart Ladder	Eurogentec (Belgien)
0,24-9,5 kb RNA-Leiter	Invitrogen
dNTPs	Invitrogen

Protein-Molekulargewichtsmarker und Western-Blot Standards:

Prestained SDS-PAGE broad range marker	Biorad (München)
BenchMark TM prestained protein ladder	Invitrogen
MagicMark TM western protein standard	Invitrogen

2.1.9 Geräte

Sofern nicht gesondert aufgeführt, kamen folgende Geräte zum Einsatz:

Bead Beater	Biospec. Products, Bartelsville, OK, USA
FPLC	Amersham, Pharmacia Biotech
HPLC	Waters TM Millipore System (Eschborn)
Mini-PROTEAN II	BioRAD (München)
XCell <i>SureLock</i> TM Mini-Cell	Invitrogen
GelPrint 2000i	MWG-Biotech (Ebersberg)
Präparative HPLC	Beckmann
pH-Meter	inoLab pH Level 1 (WTW)
Spannungsgerät	Amersham Pharmacia Biotech
Spektralphotometer	Beckman DU 640
Thermocycler	Eppendorf MasterCycler [®] Gradient
Ultraschall	UW 2070 (Bandelin, Berlin)
Zentrifugen	Eppendorf 5417R-Tischzentrifuge
	Sorvall RC-28S (Du Pont)
	Hettich Universal 30 RF bzw. Mikro 20

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung und Auftrennung von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenteilen oder Zellsuspensionskulturen erfolgte mit dem RNeasy Mini bzw. Midi-Kit der Firma Qiagen. Dazu wurden zwischen 300 mg und 1 g Pflanzenmaterial bzw. Zellen der Suspensionskultur, die durch Vakuumfiltration vom Nährmedium getrennt wurden, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, mit wenig Seesand gemörsert und anschließend in den Guadiniumthiocyanat-Extraktionspuffer überführt. Es wurde 1/5 Gewebevolumen Zirconiumbeads (Biospec. Products, Bartelsvielle, OK, USA) zugegeben und 1 min im Bead-Beater bei voller Drehzahl aufgeschlossen. Anschließend wurde der Extrakt im Wasserbad bei 60 °C für 5 min inkubiert. Die weiteren Schritte entsprachen den Herstellerangaben der verwendeten Kits. Nach photometrischer Quantifizierung und Qualitätskontrolle auf einem 1%igen (w/v) Agarosegel wurde die isolierte RNA bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.1.2 Isolierung von Poly (A)⁺-RNA

Messenger-RNA wurde aus der unter Punkt 2.2.1.1 isolierten Gesamt-RNA unter Verwendung des Oligotex[®] mRNA Midi Kits (Qiagen) und den darin enthaltenen Puffern isoliert. Oligotex-dTTM ist eine Affinitätsmatrix, die aus Cellulose besteht. An diese Matrix sind (dT₃₀)-Oligonukleotide gebunden, so dass selektiv Poly(A)⁺-mRNA aus Ribonukleinsäuregemischen isoliert werden kann. Nach Abtrennung ribosomaler RNA mit Hilfe von Oligotex-Spin-Säulen und mehreren Waschschritten mit Hochsalzpuffern kann die Poly(A)⁺-mRNA mit sterilem Wasser von der Affinitätsmatrix eluiert werden.

2.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde unter Verwendung von QIAprep[®]-Säulen der Firma Qiagen nach den Herstellerprotokollen im Mini- oder Midimaßstab aus Bakterien-Übernachtskulturen isoliert. Es wurden ausschließlich die in den genannten Kits vorhandenen Puffer verwendet.

2.2.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Elektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde auf einem UV-Leuchttisch bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm detektiert. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des QiaExII-Gelextraktionskits (Qiagen) nach Herstellerangaben aus der Gelmatrix eluiert. Die Quantifizierung der eluierten DNA erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung und Vergleich der Bandenintensität mit dem mitgeführten Größenmarker (SmartLadder, Eurogentec).

2.2.2 Herstellung und Screening einer λ -ZAP cDNA-Bank

Eine λ -ZAP cDNA-Bank (Stratagene, LaJolla CA, USA) wurde aus einer *B. vulgaris*-Zellsuspensionskultur nach Herstellerangaben hergestellt. Die Isolierung von mRNA ist unter 2.2.1.2 beschrieben. Zur Konstruktion der cDNA-Bank wurden 5,8 μ g mRNA eingesetzt. Für den Primärscreen wurden ca. 300.000 Klone dieser Bank nach Herstellerangaben ausplattiert und auf Amersham Hybond-Nylonrundfilter (Durchmesser 100 mm) übertragen. Die Filter wurden nach Standardmethoden (Sambrook et al., 1989) weiterbehandelt und die DNA durch UV-vermittelte kovalente Vernetzung (UV StratalinkerTM 1800 (Stratagene), 120 mJ Energieleistung) fixiert. Nach Hybridisierung mit einer radioaktiven DNA-Sonde (2.3.1.3) wurde unspezifisch gebundene Radioaktivität durch zwei Waschschriffe mit 2x SSC [150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat, pH 7,0, 0,1 % (w/v) SDS] bei 58 °C entfernt, anschließend wurden die Filter mit Röntgenfilm (Amersham) bei -80 °C in einer lichtdichten Kassette mit Verstärkerfolie

exponiert. Nach der Filmentwicklung konnten die Phagen mit positivem Signal (Primärklone) identifiziert und isoliert werden. Phagenkolonien wurden aus den Platten isoliert, in 1 ml SM-Puffer [50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 0,01 % (w/v) Gelatine] suspendiert und erneut ausplattiert. Der zweite Isolierungsschritt verlief analog zum ersten, jedoch wurden hier kleine Petrischalen (82 mm) und die entsprechend kleineren Nylonfilter verwendet. Zwanzig auf diese Weise isolierte Sekundärklone wurden gemäß der Stratagene-Anleitung durch *in vivo Excision* in pBlueScript-Phagemide überführt. Durch Restriktionsanalysen mit *EcoRI* und *XhoI* und Teilsequenzierungen mit Standardprimern erfolgte eine erste Charakterisierung der Klone. Zusätzlich wurden Restriktionsanalysen mit *BamHI/KpnI* sowie *XhoI/PstI* durchgeführt, um die Grösse der klonierten cDNAs besser abschätzen zu können.

2.3 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

2.3.1.1 Restriktionsanalysen

Für Restriktionsanalysen wurden 0,5-1 µg DNA mit 10 U des jeweiligen Restriktionsenzym in einem Endvolumen von 20 µl eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 60 min bei der angegebenen, optimalen Arbeitstemperatur des entsprechenden Enzyms. Bei präparativen Verdaus wurden entsprechend größere Mengen DNA eingesetzt (2-5 µg).

2.3.1.2 Ligationen

Ligationen wurden mit der im pGEM[®] T Easy-Kit (Promega) enthaltenen T4 Ligase durchgeführt. Ein typischer Ligationsansatz in einem Endvolumen von 10 µl mit 2-10 U Ligase (je nach verwendetem Enzym) wurde über Nacht bei 14 °C angesetzt und enthielt 100 ng des Vektorfragmentes und die dreifache molare Menge des zu klonierenden DNA-Fragmentes.

2.3.1.3 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Molekülen, die als Sonden in Hybridisierungsexperimenten verwendet wurden, erfolgte mit dem MegaPrime[™]-Kit der Firma Amersham. 20 ng des DNA-Fragments wurden dabei nach Anlagerung von Hexanukleotiden als Zufallsprimer durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I mit α-³²P-dATP (3000 Ci/mmol, ICN) markiert. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 10 min. Die radioaktive Sonde wurde vor Zugabe zum Hybridisierungsansatz für 5 min bei 95 °C denaturiert.

2.3.1.4 Anhängen von 3'-Poly-A-Überhängen

Um DNA-Fragmente mit glatten Enden (z. B. nach Amplifikation mit *Pfu*-DNA-Polymerase) in den pGEM[®] TEasy-Vektor ligieren zu können, müssen diese Fragmenten zunächst mit 3'-A-Überhängen versehen werden, die komplementär zu den 3'-T-Überhängen des Vektors sind. Dazu wurden Aliquots der entsprechenden Fragmente mit 0,2 mM dATP und 5 U *Taq* DNA-Polymerase (Qbiogene, Heidelberg) für 30 min bei 70 °C inkubiert. Danach konnten die Fragmente für die unter 2.3.1.2 beschriebenen Ligationsreaktionen verwendet werden.

2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Technik zur gezielten Amplifikation eines DNA-Fragmentes mittels zweier spezifischer Oligonukleotide (Primer) und einer hitzebeständigen DNA-Polymerase (Mullis & Faloona, 1987). Ein Prozess bestehend aus Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation und wird 25-30mal zyklisch durchlaufen. Im Standardansatz (Endvolumen: 50 µl) wurden 0,1-50 ng DNA-Template mit jeweils 100 pg der spezifischen Primer im entsprechenden Reaktionspuffer eingesetzt. Ein typisches PCR-Programm ist in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.3 Generelles Schema für PCR-Programme. Die Annealingtemperatur in Schritt 3 liegt 3-4 °C unterhalb der spezifischen Schmelztemperatur der verwendeten Primer.

1	Initiale Denaturierung	1-5 min	95 °C
2	Denaturierung	30-45 s	95 °C
3	Annealing	45-60 s	Annealingtemperatur
4	Elongation	1-3 min	72 °C
5	20-35 Zyklen der Schritte 2 bis 4		
6	Elongation	5-15 min	72 °C
7	Abkühlen		4 °C

Als DNA-Polymerase wurde standardmäßig eine *Taq*-DNA Polymerase (Qbiogene) eingesetzt. Für Anwendungen, bei denen eine besonders geringe Fehlerrate der Amplifikation erforderlich war, kam eine *Proof-Start*-DNA Polymerase (Qiagen) mit *proofreading*-Aktivität zum Einsatz.

2.3.3 Elektrophorese von Nukleinsäuren

2.3.3.1 Trennung von DNA und RNA über Agarose-Gele

Die Auftrennung von DNA und RNA erfolgte zu analytischen Zwecken, sofern nicht anders angegeben, in 1%igen (w/v) Agarosegelen in TBE-Puffer [0,45 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,45 M Borsäure, 10 mM EDTA]. Der aufgeschmolzenen Gellösung wurde vor dem Gießen 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zur Visualisierung der DNA zugesetzt. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 10x Probenpuffer [20 % (v/v) Glycerin, 0,1 M EDTA, 1 % (w/v) SDS, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 0,2 % (w/v) Xylencyanol FF] versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 80-120 V in TBE-Puffer. Es wurden auch Fertigele E-Gel® single comb (Invitrogen) verwendet, wobei die Auftrennung bei 70 V innerhalb von 20 min erfolgte. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit dem Geldokumentationssystem unter UV-Anregung fotografiert.

2.3.3.2 Trennung von RNA über Formaldehydgele

Zur Auftrennung von RNA kamen denaturierende Agarosegele zum Einsatz: [1 % (w/v) Agarose in 20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 0,74 % (v/v) Formaldehyd, pH 7,0]. Die RNA-Proben wurden vor der Beladung in 5x RNA-Ladepuffer [80 mM MOPS, 20 mM Natriumacetat, 8 mM EDTA, 2,6 % (v/v) Formaldehyd, 30 % (v/v) Formamid, 20 % (v/v) Glycerin, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, pH 7,0] überführt, mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und 5 min bei 65 °C denaturiert.

2.3.4 Blotten und Hybridisieren von Nukleinsäuren

Der Transfer von DNA auf Nylonmembranen (Amersham Hybond N) erfolgte nach einem Semi-Dry-Verfahren. Das Agarosegel wurde vor dem Blotten für 15 min mit 0,25 M HCl behandelt, mit Wasser gewaschen und anschließend denaturiert (15 min in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), neutralisiert (15 min in 0,5 M Tris/HCl, pH 8,0, 1,5 M NaCl) und abschließend kurz in 2 x SSC gewaschen. Das Blotten auf die Nylonmembran erfolgte über Nacht mit 2 x SSC als Transferpuffer. RNA wurde mit Hilfe eines inversen alkalischen Kapillarblots auf Hybond N-Membranen transferiert. Nach der Elektrophorese wurde das Gel ohne weitere Vorbehandlung in die Blotapparatur überführt. Der RNA-Transfer erfolgte für ca. 2 h mit 10 mM NaOH in 5x SSC als Puffer. Nach Abbau der Blots wurden die Nukleinsäuren durch UV-vermittelte kovalente Vernetzung (UV Stratalinker™ 1800 (Stratagene) mit 120 mJ Energieleistung auf den Membranen fixiert. Die Vorhybridisierung erfolgte für mindestens 2 h bei 58 °C in Hybridisierungspuffer [7 % (w/v) SDS, 250 mM NaPi, pH 7,0, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA]. Anschließend wurde die radioaktiv markierte Sonde zugegeben und bei 58 °C über

Nacht hybridisiert. Unspezifisch gebundene Radioaktivität wurde durch mehrfaches Waschen der Membran mit absteigender SSC-Konzentration bei 60 °C entfernt. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms.

2.3.5 Sequenzierung von DNA und Sequenzanalysen

Die Sequenzierung von DNA erfolgte als externe Auftragsarbeit durch die Firmen TopLab (Martinsried) bzw. Medigenomix (Martinsried). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den Programmen DNASTar LaserGene (DNASTar Inc., Madison WI, USA) und BioEdit (Hall, 1999) analysiert. Datenbankabfragen mit BLAST (Altschul et al., 1997) erfolgten über die Internetseite der GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) mit den Standardeinstellungen des Programms.

2.3.6 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung der kompetenten *E. coli*-Stämme DH5 α , XL1-Blue und M15p[Rep4] basierte auf der Calciumchlorid-Methode (Mandel & Higa, 1970) und wurde nach den Protokollen von Hanahan (1983) und Hanahan et al. (1991) durchgeführt. Bis zur Verwendung wurden die kompetenten Zellen bei -80°C gelagert. Alle übrigen in Tabelle 2.1 genannten Bakterienstämme waren Bestandteil der jeweils genannten Kits und wurden gemäß den Herstellerprotokollen transformiert.

2.3.7 Herstellung und Transformation kompetenter *S. cerevisiae*-Zellen

Kompetente Hefe-Zellen (2.1.3) wurden mit Hilfe des EasyCompTM Transformation Kits der Firma Invitrogen gemäß Anleitung hergestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen aliquotiert und ohne vorheriges Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

2.3.8 Transfektion von *S. frugiperda*-Zellen

Die Transfektion der Insektenzellen (2.1.4) erfolgte gemäß der Anleitung des InsectSelectTM BSD Systems der Firma Invitrogen. Dazu wurden die Zellen bei 1500 x g 5 min pelletiert und in 1 ml serumfreien SF 900 II-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in kleine, sterile Petrischalen überführt. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde der Transfektionsmix [1 ml SF 99 II-Medium, 10 μ l DNA-Lösung, 20 μ l Cellfectin] zu den Insektenzellen pipettiert. Es erfolgte eine Inkubation bei 27 °C und 25 x rpm für 5 h. Dann wurden 2 ml SF 900 II-Medium zugesetzt und 4 Tage bei der gleichen Temperatur inkubiert.

2.4 Heterologe Proteinexpression in Bakterien

2.4.1.1 Klonierung in pQE30 bzw. pQETri

Zur bakteriellen Expression von UGT73A4 wurde das pQE30-Vektorsystem (Qiagen) verwendet, welches die Sequenz für einen N-terminalen 6x Histidin-Tag (His-Tag) enthält. Der kodierende Teil der UGT73A4-cDNA wurde mit der Primerkombination BV-GT-*SpHI*/*SmaI* (Tabelle 2.4) mit Hilfe einer *Pfu*-DNA-Polymerase amplifiziert, so dass am 5'-Ende der Sequenz eine neue *SpHI*- und am 3'-Ende eine neue *SmaI*-Schnittstelle angefügt wurden. Das resultierende Amplikon wurde nach Anhängen eines 3'-A-Überhangs (2.3.1.4) in den Klonierungsvektor pGEM[®] TEasy (Promega) kloniert. Die ligierten Vektoren wurden in *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert. Der Erfolg der Ligation wurde durch Restriktionsanalyse mit *SpHI* und *SmaI* überprüft. Die ausgeschnittenen Fragmente wurden aus dem Agarosegel isoliert (2.2.1.4) und anschließend in den ebenfalls mit *SphI* und *SmaI* linearisierten Expressionsvektor pQE30 ligiert. Die Klonierung in den korrekten Leserahmen hinter den N-terminalen His-Tag des Vektors wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Anschließend wurden die Expressionskonstrukte in M15p[Rep4]-Zellen (Qiagen) transformiert. Aufgrund der Tatsache, dass der kodierende Teil der UGT71F1-Sequenz keine *EcoRI* bzw. *XhoI*-Schnittstellen enthielt, konnte dieser direkt durch *EcoRI/XhoI*-Verdau aus dem pBluescript-Phagemid in den pQETri-Vektor kloniert werden. Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft.

2.4.1.2 Klonierung in pDest 24 (Gateway-System)

Dieses Expressionssystem basiert auf der spezifischen Rekombination des Bakteriophagen λ . Sowohl die UGT73A4- als auch die UGT71F1-cDNA wurden durch PCR mit sogenannten *attB*-Überhängen versehen (Tabelle 2.4) und zunächst in das pDONRTM-Plasmid subkloniert. Die erfolgreiche Klonierung wurde mittels PCR und den *attB*-genspezifischen Primern überprüft. Anschließend erfolgte die Klonierung mittels Rekombination in den pDest24-Vektor, wobei der Klonierungserfolg ebenfalls durch PCR mit genspezifischen Primern verifiziert wurde. Das Gateway-System ermöglicht eine Selektion der positiven Klone bevor das eigentliche Expressionskonstrukt hergestellt wird. In die multiple Klonierungsstelle des Vektors ist ein *ccdB*-Gen („Killergen“) integriert, dessen Genprodukt mit der *E. coli*-DNA-Gyrase interferiert (Bernard et al., 1992). Bei der Insertion der interessierenden Gensequenz in den pDest24-Vektor wird das *ccdB*-Gen substituiert. Bakterien, die das Expressionskonstrukt nach der Transformation nicht aufgenommen haben, sind auf Selektionsmedium nicht lebensfähig.

2.4.1.3 Expression der rekombinanten UGT73A4 und UGT71F1 in *E. coli*

In Kombination mit der pQE30- bzw. pQETri-Vektor-Serie wurde der M15p[Rep4]-Stamm als Expressionsstamm verwendet. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG, einem nicht metabolisierbaren Analogon zu Galactose, das den *lac*-Repressor bindet und somit die *lac*-Operatorsequenzen auf dem Expressionsplasmid freigibt, induziert. Theoretisch sollte nur bei Zugabe einer bestimmten Menge Galactose bzw. IPTG eine heterologe Proteinexpression erfolgen. Dennoch ist im pQE-System stets eine gewisse Basalexpression zu detektieren, so dass als Kontrollen immer eine mit leerem Vektor transformierte M15p[Rep4] Bakterienkultur sowie eine nicht-transformierte M15p[Rep4]-Kultur mitgeführt wurden. Standardmässig wurden 12-16 Liter einer Kultur von *E. coli* M15p[Rep4] pQE30-UGT73A4 bzw. pQETri UGT71F1 bei 37 °C und 150 rpm geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von ca. 0,6 erreicht war. Nach Induktion der Expression durch 0,2 mM IPTG wurde die Kultur weitere 16 Stunden bei 16 °C geschüttelt. Nach der Ernte der Bakterien (15 min Zentrifugation bei 5000 x g und 4 °C) wurden die Zellpellets in 60 ml Extraktionspuffer (2.5.3.2) resuspendiert und die löslichen Proteine extrahiert. Der so gewonnene lösliche Proteinextrakt wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Zur Expression im Gateway-System wurden die Expressionsstämme *E. coli* BL21-AITM, *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL- und *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RP eingesetzt. Hier wurden die Bakterien vor jedem Experiment neu mit dem jeweiligen Expressionskonstrukt transformiert und dann die Expression wie oben beschrieben induziert. Im Falle der *E. coli* BL21-AITM-Zellen erfolgte die Induktion mit variierenden Konzentrationen [0,2 %, 0,1 %, 0,02 %, 0,01 % (v/v)] an L-Arabinose.

2.4.2 Klonierung und Expression in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*)

Sowohl der kodierende Bereich der UGT73A4-cDNA als auch der kodierende Bereich der UGT71F1-cDNA wurde mit Hilfe spez. Primer (Tabelle 2.4) unter Insertion von Restriktionschnittstellen [*SpHI/KpnI* (UGT73A4) und *EcoRI/XhoI* (UGT71F1)] in die multiple Klonierungsstelle des pYes2-Vektors inseriert. Die korrekte Klonierung wurde mittels PCR und Sequenzierung bestätigt. 30 ml ÜN-Kulturen (30 °C, 200 x rpm) der jeweiligen Expressionskonstrukte in SC-U-Medium mit 2 % (w/v) Glucose wurden bei 1500 x g für 5 min zentrifugiert. Mit Induktionsmedium [SC-Uracil + 2 % (w/v) Galactose] wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,4 ein-

gestellt und bei 30 °C für 8 h geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen bei 1500 x g für 5 min pelletiert und die Pellets mit sterilem Wasser gewaschen. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte eine Lagerung bei -80 °C. Zur Analyse der Proteinexpression wurden die Pellets gemäß dem Invitrogen pYes2-Protokoll in 500 µl Lysispuffer [50 mM NaPi, pH 7,0, 1 mM EDTA, 5 % (v/v) Glycerin, 1 mM PMSF] resuspendiert und 5 min bei 1500 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach erneuter Resuspension in Lysispuffer wurden säurebehandelte Glaskugeln (Durchmesser 2mm) dazugegeben und 4 x 30 s geschüttelt, wobei zwischendurch auf Eis abgekühlt wurde. Abschließend wurde 10 min bei 20.000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand auf Enzymaktivität (2.5.9) getestet.

2.4.3 Klonierung und Expression in Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*)

Sowohl der kodierende Bereich der UGT73A4-cDNA als auch der kodierende Bereich der UGT71F1-cDNA wurde mit Hilfe spez. Primer (Tabelle 2.4) und Insertion von Restriktionschnittstellen [*SacII/KpnI* (UGT73A4) und *BamHI/XhoI* (UGT71F1)] in die multiple Klonierungsstelle des pIB/V5-His-Vektors inseriert. Die korrekte Klonierung wurde mittels entsprechender Restriktionsanalysen und Sequenzierung bestätigt. Nach Transfektion der Insektenzellen (2.3.8) wurde die Expression über 4 Tage verfolgt, wobei täglich ein Aliquot Zellen aufgearbeitet wurde. Dazu wurde das SF-900 II-Medium entfernt, 200 µl Lysispuffer [50 mM Tris, pH 7,8, 150 mM NaCl, 1 % Igepal CA-630 (Sigma)] auf die Zellen gegeben und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach 3 min Zentrifugation bei 20.000 x g wurde der Überstand auf Proteinkonzentration (2.5.7) und Enzymaktivität (2.5.9) getestet.

2.5 Biochemische Methoden & Analytik

2.5.1 Darstellung und Derivatisierung von *cyclo*-Dopa

Die enzymatische Synthese von *cyclo*-Dopa wurde wie von Schliemann und Mitarbeitern (1998) beschrieben durchgeführt und ist in der folgenden Abbildung veranschaulicht:

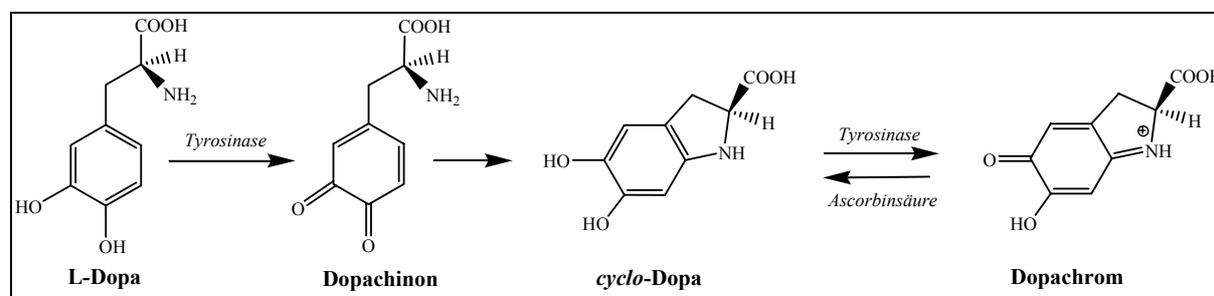


Abbildung 2.1 Enzymatische *cyclo*-Dopa-Synthese. Abbildung aus: Schliemann et al., 1998.

Im Gegensatz zur Originalvorschrift wurde kommerziell verfügbare Tyrosinase (Sigma) in einer Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt. Enzymatisch gebildetes *cyclo*-Dopa wurde von nicht umgesetzten L-Dopa mittels präparativer HPLC (Beckmann) getrennt. Dazu wurde eine RCM 10 µm C₁₈-Säule (400 x 25 mm, i.D., Waters, Eschborn) eingesetzt. Die Trennung gelang mit einem isokratischen Lauf von 2 % (v/v) Methanol in 1,5 % (v/v) Essigsäure innerhalb von 60 Minuten, wobei bei 280 nm detektiert wurde. Die einzelnen Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer eingengt und mittels analytischer HPLC auf Reinheit und Ausbeute überprüft (15 min isokratischer Lauf mit 1,5 % (v/v) Phosphorsäure auf einer EC 250/4 Nucleosil 120-5 C₁₈-Säule, (Macherey & Nagel, Düren). In der analytischen HPLC kann *cyclo*-Dopa nur durch Fluoreszenzdetektion (Excitation: 280 nm, Emission: 305 nm) neben der ebenfalls bei 280 nm absorbierenden Ascorbinsäure detektiert werden, da sich beide Verbindungen in ihrer Retentionszeit um weniger als 0,5 min unterscheiden. Im Rahmen dieser Ar-

beit wurde eine Derivatisierungsreaktion etabliert, um die Nachweisbarkeit von *cyclo*-Dopa bzw. seines Glucosides zu verbessern. Dies ist im Ergebnisteil unter 3.1 beschrieben.

2.5.2 Isolierung von Flavonoid-Konjugaten aus *B. vulgaris*

Frisches Pflanzenmaterial acht Wochen alter *B. vulgaris*-Pflanzen bzw. der Zellsuspensionskultur wurde mit 80 % (v/v) Methanol unter Zusatz von 100 mM Natriumascorbat mit einem Ultraturrax homogenisiert und unter Rühren extrahiert. Anschließend erfolgte eine Vorfraktionierung über eine Polyamid-Säule (Winter & Hermann, 1984) mit steigender Methanolkonzentration 0-100 % (v/v) in Wasser sowie abschließend 1 % (v/v) Essigsäure in Methanol. Die erhaltenen Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer eingengt und mittels präparativer HPLC weiter gereinigt wie unter 2.5.11 beschrieben. Die Strukturaufklärung erfolgte mit einer Kombination aus massenspektrometrischen (2.5.13) und NMR-spektroskopischen Methoden (2.5.14). Die Molekulargewichte der isolierten Verbindungen wurden anhand der Molekülonen im positiven ESI-MS-Spektrum identifiziert. Methylierungsanalysen erlaubten die Identifizierung der Zuckersubstituenten.

2.5.3 Proteinreinigung aus pflanzlichen bzw. bakteriellen Rohextrakten

Alle Schritte der Proteinreinigung wurden bei 4 °C durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 20.000 x g für 10 bis 30 min.

2.5.3.1 Herstellung von Proteinrohextrakten aus Pflanzenmaterial

Als Material für die Herstellung von Proteinrohextrakten aus betacyanführenden Pflanzen dienten entweder Hypokotyle sechs Wochen alter *B. vulgaris*- bzw. *A. paniculatus*-Pflanzen oder die entsprechenden Zellsuspensionskulturen von *B. vulgaris*, *C. rubrum* und *P. grandiflora*. Das Material wurde in flüssigem Stickstoff homogenisiert und im 2,5-fachen Volumen Extraktionspuffer [100 mM KPi, pH 7,0, 14 mM 2-Mercaptoethanol, 0,4 % (w/v) Natriumascorbat, 10 % (v/v) Glycerin, 5 % (w/v) Polyclar AT] unter Zusatz eines Protease-Inhibitorcocktails [AEBSF, Bestatin, Pepstatin A, Leupeptin, 1,10-Phenantrolin (Sigma)] suspendiert. Je nach Volumen wurde 30 bis 60 min bei 4 °C gerührt, durch zwei Lagen Miracloth (Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden) filtriert und anschließend zentrifugiert.

2.5.3.2 Herstellung von löslichen Proteinrohextrakten aus *E. coli*

Frisch geerntete bzw. pelletierte (5000 x g für 10 min bei 4 °C) und bei -80 °C gelagerte Bakterienkulturen wurden in Extraktionspuffer [100 mM KPi, pH 7,0, 100 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 10 % (v/v) Glycerin] resuspendiert. Im Falle der GST-Fusionsproteine wurden die Bakterienpellets in 1 x GST-Binde-/Waschpuffer [140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,5] aufgenommen. Dabei wurde ein Volumenverhältnis von ca. 1:50 bzw. 1:100 (bezogen auf das Originalkulturvolumen vor der Ernte) eingehalten. Die resuspendierten Zellen wurden mit 100 µg/ml Lysozym für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend durch Ultraschallaufschluß (3 x 45 s, 60 % Duty, 65 % Power) auf Eis lysiert. Der durch Zentrifugation (23.000 x g bei 4 °C) gewonnene Überstand wurde als löslicher Proteinrohextrakt verwendet.

2.5.3.3 Extraktion unlöslicher Proteine aus *E. coli*

Zur Isolierung unlöslicher Proteine aus *E. coli*-Zellen wurde das Zellpellet bzw. der Rückstand nach der löslichen Proteinextraktion in einem denaturierenden Extraktionspuffer [8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 10 mM Imidazol, 0,2 % (v/v) Triton X-100, pH 8,0] resuspendiert. Nach Ultraschallbehandlung (3 x 45 sec 60 % Duty, 65 % Power) wurde die Suspension zentrifugiert (20 min 20.000 x g bei RT) und der Überstand als denaturierter Extrakt für SDS-PAGE (2.5.6) verwendet.

2.5.3.4 Protaminsulfatfällung

Zur Entfernung von Nukleinsäuren aus dem Proteinrohextrakt wurde dieser mit einer 4%igen Protaminsulfatlösung auf eine Endkonzentration von 0,05 % (v/v) Protaminsulfat eingestellt, 5 min im Eisbad gerührt und zentrifugiert. Durch diesen Fällungsschritt wurde die Viskosität des Proteinextraktes herabgesetzt.

2.5.3.5 Ammoniumsulfatfällung

Der Überstand der Protaminsulfatfällung wurde mit festem Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 30-85 % (w/v) versetzt, 30 min im Eisbad gerührt und anschließend 25 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in Resuspensionspuffer [10 mM KPi, pH 7,0, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 10 mM Natriumascorbat, 10 % (v/v) Glycerin] aufgenommen.

2.5.4 Chromatographische Methoden

2.5.4.1 Entsalzen und Umpuffern

10 ml Säulen Sephadex G-25 (Amersham, Pharmacia) wurden vor Gebrauch mit 10 mM KPi, pH 7,0 äquilibriert und die Proteinfraktionen aus der Ammoniumsulfatfällung gemäß den Angaben des Herstellers entsalzt.

2.5.4.2 Hydrophobe-Interaktionschromatographie (HIC)

Als Trennprinzip wird hier die unterschiedliche Hydrophobizität der Proteine ausgenutzt. Durch Einstellen der Proteinlösung auf eine Endkonzentration von 1,3 M Ammoniumsulfat wird die Bindung an die hydrophobe Säulenmatrix begünstigt. Das Phenylsepharose 4L-CB-Material besitzt eine Bindekapazität von 20 mg/ml und wurde im Batch-Verfahren eingesetzt, wobei eine Äquilibrierung mit 1,3 M Ammoniumsulfat in 100 mM KPi, pH 7,0 erfolgte. Der Proteinrohextrakt wurde auf die gleiche Ammoniumsulfatkonzentration eingestellt und mit absteigender Salzkonzentration (1,3, 0,8, 0,5, 0,3, 0,1 und 0 M) in 100 mM KPi-Puffer eluiert. Neben der HIC im Batch-Verfahren wurde auch eine Trennung über FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) verwendet. Hierzu wurde eine 1 ml Phenyl Superose High Performance-Säule (Amersham, Pharmacia) benutzt. Konzentrierte Proteinfraktionen wurden mit 0,5 ml/min geladen und mit einem absteigendem Salzgradienten eluiert, wobei das gereinigte Enzym konzentriert in 1-2 Fraktionen eluierte.

2.5.4.3 Farbstoff-Liganden-Chromatographie

Affinitätschromatographie ist in den letzten Jahren erfolgreich zur Reinigung einiger Glucosyltransferasen eingesetzt worden (Vogt et al., 1999a; Jones et al., 1999; von Rad et al., 2001). Reactive-Yellow-3 oder Cibacron 3GATM (Sigma) stellen biomimetische Farbstoffe dar, die mit der Substratbindetasche des Enzyms interagieren. Die spezifische Elution der gebundenen Proteine erfolgt durch Zugabe von UDP-Glucose oder salzhaltigen Puffern.

2.5.4.4 Ionenaustauschchromatographie an Mono Q

Eine Mono Q (HR10/10)-Säule der Firma Amersham wurde ebenfalls für FPLC-Trennungen eingesetzt. Die Auftragung der Proteinlösung erfolgte in 10 mM KPi-Puffer, pH 7,0. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten steigender Ionenstärke bis 800 mM KPi, pH 7,0 bei einer Geschwindigkeit von 2 ml/min.

2.5.4.5 Metallaffinitätschromatographie

Lösliche bakterielle Proteinextrakte der rekombinanten UGT73A4 (2.4) wurden mit 2-5 ml 50 % (v/v) Talon-Matrix in Extraktionspuffer [100 mM KPi, pH 7,0, 300 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 2,5 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerin] gemischt. Die Bindung des rekombinanten Proteins an die Matrix erfolgte bei 4 °C über Nacht. Nach mehrmaligem Spülen mit Extraktionspuffer wurde das Material in eine bzw. mehrere 2 ml-Einwegsäulen (Clontech) überführt. Unspezifisch gebundenes Protein wurde mit Waschpuffer [100 mM KPi, pH 7,0, 300 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 10 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerin] von der Säule entfernt. Anschließend wurde das gebundene Protein mit Elutionspuffer [100 mM KPi, pH 7,0, 300 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol, 150 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerin] von der Säule eluiert.

2.5.4.6 Chromatographie an Glutathion-Agarose

Lösliche bakterielle Proteinextrakte der rekombinanten UGT71F1 (2.4) wurden mit 2 ml GST Uniflow Resin (Clontech) in 1 x GST-Binde-/Waschpuffer [140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,5] gemischt. Die Bindung des rekombinanten Proteins an die Matrix erfolgte 2 h bei Raumtemperatur. Nach mehreren Waschsritten wurde das gebundene Protein mit frisch hergestelltem 10 mM Glutathion in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 eluiert.

2.5.5 Konzentrierung von Proteinlösungen

Verdünnte Proteinlösungen zwischen 3-50 ml wurden in Amicon-Rührzellen (Millipore) über YM-10 Membranen bei 4 °C konzentriert. Volumina kleiner als 2 ml wurden mit Centricon YM-10 Zentrifugationskonzentratoren der Firma Millipore bei 5.000 x g auf 20–500 µl konzentriert. Für SDS-PAGE wurden Proteinlösungen mittels StrataClean™ Resin (Strata-gene) konzentriert (Ziegler et al., 1997), wobei das Konzentrierungsprinzip auf der Bindung der Proteine an die Matrix beruht. Durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und Erhitzen auf 65 °C für 10 min wurden die gebundenen Proteine von der Matrix eluiert und konnten anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden.

2.5.6 SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte durch diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970). Die Herstellung der Gele erfolgte mit Hilfe der konzentrierten Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 30 (Roth), die 30 % (w/v) Acrylamid und 0,8 % (w/v) Bisacrylamid enthält. Sofern nicht anders angegeben, wurden 10%ige Gele verwendet. Die Proteinproben wurden vor dem Beladen mit Proteinprobenpuffer [0,125 M Tris/HCl, pH 6,8, 5 mM EDTA, 15 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol] im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte bei konstanter Stromstärke (25 mA). Darüber hinaus kamen NuPAGE® Novex® 10 % Bis-Tris-Fertiggele (Invitrogen) zum Einsatz, wobei die Auftrennung bei 200 V und 100 mA pro Gel erfolgte. Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder zum Blotten weiterverwendet (2.5.8) oder mit Coomassie-Lösung [0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol] durch Kochen für 2-3 min in der Mikrowelle gefärbt. Nach Entfärbung des Hintergrunds durch mehrmaliges Aufkochen in 7 % (v/v) Essigsäure wurden die Gele im Geldokumentationssystem unter Weißlicht fotografiert oder gescannt.

2.5.7 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

2,5-20 µl Proteinlösung wurden nach der Methode von Bradford (1976) mit 1 ml Bradford Reagenz [0,065 % (w/v) Coomassie G-250 in 5 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Phosphorsäure] versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm gegen einen entspre-

chenden Leerwert im Spektralphotometer gemessen. Die Proteinkonzentration wurde durch Vergleich mit einer BSA-Eichkurve ermittelt. Für die Ultrazentrifugation (2.5.15) wurde die Extinktion bei 280 nm gemessen. Unter Berücksichtigung des mit Hilfe des Programms Pro-tean [Bestandteil des Lasergene-Software-Pakets (DNASar Inc., Madison WI, USA)] ermittelten Extinktionskoeffizienten wurde auf der Grundlage des Lambert-Beerschen-Gesetzes die Proteinkonzentration errechnet.

2.5.8 Blotten und Detektion von Proteinen

Elektrophoretisch getrennte Proteine wurden nach einem Nass-Blotverfahren auf PVDF- bzw. Nitrocellulosemembranen übertragen. Dazu wurden die SDS-PAGE-Gele kurz in Transfer-Puffer [NuPAGE® 25 mM Bicine, 25mM Bis-Tris, pH 7,2, 1 mM EDTA, 0,05 mM Chlorbutanol, für PVDF mit 20 % (v/v) Methanol] gespült und anschließend zusammen mit der in Transferpuffer äquilibrierten Membran in die Blotkassette eingesetzt. Der Proteintransfer erfolgte für ca. 1 h bei konstant 30 V. Nach Ende des Transfers wurde das Gel zur Überprüfung der Bloteffizienz in Coomassie Brilliant Blue (CBB) gefärbt. Die Membran wurde kurz in TBS [100 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl] gespült und anschließend für 1 h bei RT mit 5 % (w/v) Trockenmilchpulver (BioRad) in TBS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation mit dem primären Antikörper, der in 5 % (w/v) Trockenmilchpulver in TBS verdünnt wurde, erfolgte über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln. Die verwendeten Antikörperverdünnungen sind in Tabelle 2.5 aufgelistet.

Tabelle 2.5 Für Western Blot-Analysen verwendete Antikörper und Angabe der Verdünnungen. Abweichungen sind im Text angegeben.

Primärantikörper	Verdünnung
Anti-His-Tag (monoklonal, aus Maus, Novagen)	1: 2000
Anti-GST-Tag (monoklonal, aus Maus, Novagen)	1: 5000
Sekundärantikörper (AP-Konjugat)	
Anti-Maus-IgG ₁ -AP (Novagen)	1: 5000-1:10.000

Unspezifisch gebundene Antikörper wurden anschließend durch dreimaliges Waschen (je 5 min) in TTBS [TBS, pH 7,5 mit 0,05 % (v/v) Tween-20] entfernt. Nach Waschen der Membran in TBS (3 x 5 min) wurde mit dem Sekundärantikörper in 5 % (w/v) Trockenmilchpulver inkubiert (2 h bei RT). Bei dem Sekundärantikörper handelte es sich um ein Anti-IgG₁-Konjugat mit alkalischer Phosphatase (AP) zur enzymatischen kolorimetrischen Detektion. Nach erneutem Waschen mit TTBS (3 x 5 min) wurde die Membran in TBS, pH 9,5 inkubiert (2 x 5 min) und mit AP-Substratpuffer [TBS, pH 9,5, 50 mM MgCl₂] äquilibriert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 0,16 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und 0,32 mg/ml *p*-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) gestartet. Nach ausreichender Farbentwicklung wurde die Reaktion durch Waschen der Membran in TE-Puffer [10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA] gestoppt. Die Membran wurde zur Dokumentation mit einem Scanner eingescannt.

2.5.9 Glucosyltransferase-Standard-Enzymtest

Die Enzymaktivität der pflanzlichen bzw. rekombinanten Glucosyltransferasen wurde in folgendem Standardassay gemessen, wobei das Volumen je nach eingesetzter Proteinmenge 50-80 µl betrug. Flavonoide wurden als 10 mM Stammlösungen in DMSO verwendet und unmittelbar vor einem Enzymtest in 10%iger DMSO-Lösung auf 200 µM eingestellt. Folgende Endkonzentrationen wurden im Enzymtest verwendet: [20 mM KPi, pH 7,0, 20 µM Substrat, 2 mM UDP-Glucose, 1 mM Na-Ascorbat (nur bei Betacyan-Tests)] sowie 1-80 µg Protein. Es wurde zwischen 2 und 60 Minuten bei 30 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von

10%iger (v/v) Trifluoressigsäure (10 µl) gestoppt. Nach Zentrifugation bei 23.000 x g wurden die enzymatisch gebildeten Produkte mittels RP-HPLC analysiert (2.5.10). Bei Verwendung von *cyclo*-Dopa (2.5.1) als Substrat wurde der Enzymtest nach Abstoppen der Reaktion mit 10 µl einer 1 mM 4-Dimethylaminozimtaldehyd-Lösung (DMAZA) versetzt und 10 min bei RT inkubiert.

2.5.10 Analytische HPLC

Zur HPLC-Analyse wurde ein System der Firma Waters Millipore verwendet. Die Umkehrphasen-Chromatographie (RP) erfolgte an EC 50/4 Nucleosil 120-5 C₁₈-Säulen (5 cm Länge) der Firma Macherey & Nagel (Düren), welche die Etablierung kurzer analytischer Läufe ermöglichten (5-10 min). Standardmässig wurde als Laufmittel A 1,5 % (v/v) Phosphorsäure und als Laufmittel B reines Acetonitril verwendet. Betacyane wurden mit folgendem Gradienten getrennt: innerhalb von 3,8 min von 5 % (v/v) B auf 25 % (v/v) B in A bei einer Flussrate von 1 ml/min (Detektion im PDA bei 540 nm).

Für die Analyse der *cyclo*-Dopa-DMAZA-Derivate wurde eine EC 250/4 Nucleosil 120-5 C₁₈-Säule verwendet. Auf eine 10 minütige isokratische Elution mit 100 % (v/v) A folgte ein linearer Gradient von 0 % auf 48 % (v/v) B in A innerhalb von 5 Minuten. Dabei unterschied sich die Retentionszeit des *cyclo*-Dopa-DMAZA-Derivates und des entsprechenden Glucosides um 2 min. Standardbedingung für die Trennung enzymatisch gebildeter Quercetinglucoside war ein Gradient von 10 % (v/v) B auf 48 % (v/v) B in A innerhalb von 4,5 min bei einer Flussrate von 1 ml/min.

Andere Flavonoidderivative und Rohextrakte wurden wie folgt getrennt: innerhalb von 6,5 min von 15 % (v/v) B auf 60 % (v/v) B in A. Die PDA-Detektion erfolgte bei: 540-565 nm (Betacyane; *cyclo*-Dopa-DMAZA-Derivat), 520 nm (Anthocyane), 330 nm (Apigenin), 350 nm (Luteolin), 364 nm (Flavonole und Flavonol-7- und -4'-Derivate) und 280 nm (L-Dopa, Kaffeesäure und die zugehörigen Glucoside sowie Naringenin und Eriodictyol).

2.5.11 Präparative HPLC für die Metabolitenanalyse aus *B. vulgaris*

Präparative RP-HPLC-Läufe wurden mit dem System Waters Delta 600 (Millipore) und einer 10 µm-Nucleosil 100-10 C₁₈ Säule (VarioPrep; 250 x 40 mm i. d., Macherey-Nagel) durchgeführt. Die Flussrate betrug 20 ml/min. Als Laufmittel wurden 1,5 % (v/v) Essigsäure in Wasser (A) und reines Acetonitril (B) verwendet. Nach 15 Minuten isokratischem Lauf mit 100 % (v/v) Laufmittel A wurde mit einem linearen Gradienten steigender Konzentration des Laufmittels B in A von 0 % (v/v) auf 80 % (v/v) in 75 Minuten eluiert.

2.5.12 Radio-HPLC

Die analytische Trennung ¹⁴C-markierter Produkte erfolgte mit einem Radio-HPLC-System der Firma Jasco (Gross-Umstadt) auf einer ET 250/8/4 120-5 C₁₈-Säule mit den Laufmitteln 1,5 % (v/v) Phosphorsäure (A) und 100 % (v/v) Acetonitril (B). Es wurde ein linearer Gradient von 2 % (v/v) B in A auf 40 % (v/v) B in A in 15 min verwendet. Zunächst wurden mit Betanin bzw. Betanidin sowie *cyclo*-Dopa-Glucosid-DMAZA und *cyclo*-Dopa-DMAZA entsprechende Standardchromatogramme aufgenommen, um die gewünschten Produktpeaks fraktioniert sammeln zu können.

2.5.12.1 Radioaktivitätsmessungen

Als Kontrolle für die enzymatische Bildung radioaktiv markierten Betanins diente ein Enzymtest mit der rekombinanten UGT73A5 aus *D. bellidiformis*, die von T. Vogt (IPB Halle) zur Verfügung gestellt wurde. Dazu wurden 10-20 µl Proteinextrakt im Mastermix [100mM

Tris/HCl, pH 7,5, 100 mM Na-Ascorbat, 20 μ M Betanidin] mit 0,2 μ Ci D-[U- 14 C]-UDP-Glucose zwischen 0 und 10 Minuten bei 30 °C inkubiert und mit 10 % (v/v) Trifluoressigsäure abgestoppt. Die markierte UDP-Glucose wurde dabei im Gemisch mit nicht-markierter UDP-Glucose auf die gewünschte Endkonzentration eingestellt. Die Isolierung des radioaktiv markierten Produktes aus dem löslichen Überstand erfolgte durch fraktioniertes Sammeln der in der Radio-HPLC bei einer Wellenlänge von 540 nm detektierten Peaks im Vergleich zur Retentionszeit des Standards Betanin. Analog wurde eine rote Zellsuspensionskultur von *B. vulgaris* im Vakuum vom Nährmedium abgetrennt und ca. 20 mg wie oben beschrieben im Mastermix mit 0,2 μ Ci D-[U- 14 C]-UDP-Glucose zwischen 0 und 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, da die Stabilität des Betanidins mit steigender Temperatur abnimmt (Huang & von Elbe, 1985). Analog wurde die Zellkultur mit 20 μ M *cyclo*-Dopa und 0,2 μ Ci D-[U- 14 C]-UDP-Glucose inkubiert und der lösliche Überstand anschließend mittels Radio-HPLC fraktioniert. Um die Permeabilität der Zellwände zu erhöhen wurde DMSO in einer Endkonzentration von 5 % eingesetzt. Radioaktive Lösungen (90-150 μ l) wurden mit 3 ml Scintillations-Cocktail (Ultima GoldTM MV, Packard, Niederlande) gemischt und für 3 min in einem Scintillations-Zähler (LS 6000 TA, Beckmann, USA) gemessen.

2.5.13 Massenspektrometrie

Generell wurden massenspektrometrische Analysen von Dr. J. Schmidt (IPB, Halle) mit einem Massenspektrometer Finnigan MAT TSQ 7000, gekoppelt mit einem Micro-Tech Ultra-Plus Micro LC System (4 μ m C₁₈-Säule, 100 x 1 mm i.D., Ultrasep) durchgeführt. Die Spannung betrug 4,5 kV, die Kapillartemperatur 220 °C und als Hüllgas diente Stickstoff. Im Falle der Flavonoidglycoside aus *B. vulgaris* wurden die positiven ESI-MS und hochauflösende ESI-MS-Spektren von Dr. M. Nimtz (GBF, Braunschweig) an einem Micromass QTOF2-Massenspektrometer mit einer nicht-sprühenden Ionenquelle aufgenommen. Die Identifizierung der Zucker erfolgte mit einer Standard-Mikromethylierungstechnik an einem Finnigan GCQ GC-MS-Spektrometer, wie von Nimtz und Mitarbeitern 1996 beschrieben. Die Molekulargewichtsbestimmung der rekombinanten Proteine mittels MALDI-TOF-MS wurde von U. Roth (IPB, Halle) mit einem Massenspektrometer Reflex 3 der Firma Bruker gemäß einem Protokoll der EMBL Bioanalytical Research Group (<http://www.narrador.embl-heidelberg.de>) durchgeführt. Dazu wurden die Proteine mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und einem In-Gel-Trypsin-Verdau unterzogen.

2.5.14 NMR-Spektroskopie

NMR-Messungen wurden von V. Wray (GBF, Braunschweig) durchgeführt und ausgewertet. Alle 1D-(1 H, 13 C und DEPT-135) sowie 2D-(COSY, HMQC und HMBC)-NMR-Spektren wurden in CD₃OD bei 300 K mit den NMR-Spektrometern Bruker AVANCE DMX-600, ARX-400 und DPX-300 aufgenommen. Die Auswertung erfolgte durch V. Wray unter Verwendung der Bruker Standardsoftware. Die einzelnen Molekülfragmente wurden durch 2D- 1 H-COSY-Korrelationen identifiziert. Heteronukleare 2D-Korrelationen ermöglichten die Zuordnung aller 1 H und 13 C-Signale und führten zur Identifizierung der Verknüpfungspositionen der einzelnen Fragmente. Räumliche 1 H- 1 H-Korrelationen wurden mit Hilfe von 2D-ROESY-Spektren bestimmt und bestätigten die Glucosidierung des Apigenin-grundkörpers an C-8-Position.

2.5.15 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation der gereinigten rekombinanten UGT73A4 wurde von H. Lilie (Institut für Biotechnologie MLU, Halle) in einer Beckmann Optima XL-A Zentrifuge mit einem 50Ti-Rotor durchgeführt. Diese Methode dient zur experimentellen Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten und des Molekulargewichtes und gibt Auskunft darüber, ob ein Molekül als Monomer oder Oligomer vorliegt. Die Sedimentationsgeschwindigkeit (v)

eines Moleküls ist der voreingestellten Zentrifugalbeschleunigung ($\omega^2 \cdot r$) proportional. Der Sedimentationskoeffizient ist der Quotient $v/\omega^2 \cdot r$ und für ein gegebenes Molekül mit bestimmter Masse und Form charakteristisch. Er besitzt für Biomoleküle die Grössenordnung 10^{-13} Sekunden, was einer Svedberg-Einheit (S) entspricht. In der Gleichgewichtssedimentation, d.h. die Verteilung der Konzentration wird am Sedimentationsgleichgewicht gemessen, kann das Molekulargewicht unabhängig von der Form des Moleküls bestimmt werden. Der experimentell gemessene Sedimentationskoeffizient ist von den Lösungsmiteleigenschaften und der Temperatur abhängig, so dass der experimentell ermittelte Wert anhand entsprechender Tabellen normalisiert werden muss. Die anfängliche Proteinkonzentration betrug 0,03-0,4 mg/ml [in 20 mM KPi, pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin]. Die Sedimentationsgleichgewichtsmessungen wurden in Zwei-Sektoren-Zellen bei 10.000 rpm und 20 °C durchgeführt, wobei die Absorption bei 230 und 280 nm gemessen wurde. Die Sedimentationsgeschwindigkeit wurde bei 40.000 rpm analysiert, wobei alle 10 min eine Messung erfolgte. Die Datenanalyse wurde mit der Beckmann-Software (Beckmann Instruments, Palo Alto, USA) von H. Lilie (MLU, Halle) durchgeführt. Alle Daten wurden unter Berücksichtigung der Pufferdichte und Pufferviskosität ausgewertet.

2.6 Komparative Modellierung der UGT73A4 und UGT73A5

Sämtliche Schritte der Strukturmodellierung wurden an Silicon-Graphics Workstations unter Verwendung der SYBYL[®] Software (SYBYL[®], Tripos Associates Inc., St. Louis, MO; U.S.A.) in Kooperation mit W. Brandt (IPB, Halle) durchgeführt. Um homologe Proteine mit bekannter 3D-Struktur (röntgenkristallographische oder NMR-Daten) zu finden, wurde zunächst in der Proteindatenbank eine BLAST-Suche durchgeführt, wobei Sequenzvergleiche mit Hilfe der Blosom30-Matrix (Henikoff et al., 1992, 1993) erfolgten. Da diese Suche ergebnislos verlief, wurde im nächsten Schritt das Programm 3D-pssm (Fischer et al., 1999; Kelley et al., 2000) verwendet, um auf der Basis von Strukturvorhersagen Proteine, die zur gleichen Faltungsfamilie gehören, zu identifizieren. Auf dieser Basis resultierte für die Kristallstruktur der Glucosyltransferase GtfB (pdb: 1IIR; <http://www.rcsb.org/pdb/>) aus *Amycolatopsis orientalis* (Mulichak et al., 2001) ein Identitätswert von 14 % und ein PSSM-Irrtumswert von 1.78×10^{-14} . Diese Struktur wurde mit 95%iger Sicherheit vom Programm als geeignetes Template für eine komparative Modellierung eingestuft. Zur Entwicklung einer Modellstruktur wurde MOE[®] (Molecular operating environment, Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canada), eine Datenbank-gestützte Methode, genutzt. Zunächst wird durch MOE[®] eine partielle Startgeometrie für die zu modellierende Sequenz spezifiziert, die von einem ausgewählten Template-Bereich kopiert wird. Von strukturell konservierten Regionen werden alle Koordinaten vom Programm kopiert, andernfalls nur die Koordinaten des Peptidrückgrates. Im nächsten Schritt erfolgt eine Boltzmann-Zufalls-Modellierungs-Prozedur, die von Levitt (1992) adaptiert wurde, an die sich die Erzeugung einer beliebig festlegbaren Anzahl unabhängiger Modelle der Zielproteinstruktur anschliesst. Jedes dieser Modelle wird hinsichtlich der Ausrichtung unpolarer Aminosäureseitenketten und der möglichen Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen evaluiert. Abschließend werden die Koordinaten des letztendlichen Modells erzeugt und dessen Energie minimiert. Es wurden 10 Modelle berechnet, welche mit Hilfe des AMBER94-Kraftfeldes optimiert wurden (Cornell et al., 1995). Kraftfeldmethoden ermöglichen die Vorhersage von Geometrie und Anordnung in grossen Molekülen. Des weiteren bieten sie die Möglichkeit, Konformations- und Wechselwirkungsenergien zu berechnen. Es ist zu beachten, dass das AMBER-Kraftfeld ausschließlich für Proteine und Nukleinsäuren parameterisiert worden ist, während TRIPOS (Clark et al., 1989) auf nahezu jede biologische oder chemische Komponente angewendet werden kann. Die Entwicklung der in dieser Arbeit vorgestellten Modelle beinhaltete zunächst eine Optimierung des Peptidrückgrats anhand des zugrunde gelegten Templates und der Sekundärstrukturvorhersa-

ge. Im nächsten Schritt wurde das optimierte Rückgrat fixiert und Loopbereiche sowie Seitenketten sukzessive optimiert, wobei das AMBER-Kraftfeld verwendet wurde. Die stereochemische Qualität der Modelle wurde fortlaufend mit Hilfe von PROCHECK (Laskowski et al., 1993) beurteilt. Dieses Programm gibt Auskunft darüber, ob Aminosäuren unzulässige Geometrien in Torsionswinkeln, Bindungslängen oder -winkeln aufweisen. Für die Bewertung der Qualität der optimierten Modelle wurde zusätzlich das Programm PROSA II (PROtein Structure Analysis) (Sippl, 1993) genutzt. Die Analyse experimentell bestimmter 3D-Proteinstrukturen, die in der Kristallstrukturdatenbank enthalten sind, lieferte grundlegende Erkenntnisse über die Kräfte, die zur Stabilisierung nativ gefalteter Proteine beitragen. PROSA berechnet die Konformationsenergie der verschiedenen Modellstrukturen mit Liganden und stellt diese als Energiegraph dar. Werte mit positiver Energie weisen auf nicht nativ gefaltete Bereiche im Protein hin, während negative Energien mit stabilen Bereichen korrelieren.

2.6.1.1 Docking-Studien und quantenmechanische Methoden

Die Vorhersage von Ligand-Protein-Interaktionen ist zum Beispiel mit Hilfe des Programms GOLD (Genetic Optimization Ligand Docking) möglich. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudien wurden die Liganden zunächst mit GOLD in der postulierten Bindungstasche der Modelle vorpositioniert und energetisch mit dem TRIPOS-Kraftfeld und Gasteiger-Ladungen optimiert. Im zweiten Schritt wurden dann Moleküldynamiksimulationen durchgeführt. Dabei wurde das Proteinerückgrat im Modell fixiert, eine Variation der Seitenkettenanordnungen und der Liganden jedoch zugelassen, so dass gewissermaßen ein „Induced-fit“-Mechanismus simuliert werden konnte. Zur Evaluierung lokaler Energieminima in den Modellen kam sogenanntes „Simulated Annealing“ zum Einsatz. Dabei wird in einem festgelegten Zeitraum die Temperatur eines Systems erhöht und abgesenkt, so dass sich seine kinetische Energie verändert. Die Beurteilung der Affinität der verschiedenen Liganden zum Enzym erfolgte über die Berechnung der Bindungsaffinität in Form der Wechselwirkungsenergie der Liganden im Protein. Allerdings werden hierbei keine Entropie-, Solvations- bzw. Desolvationseffekte berücksichtigt, so dass nur eine Abschätzung der realen Wechselwirkungsenergien erfolgen kann. Um diese Effekte bei der Beurteilung der Affinität eines Liganden zum Enzym zu berücksichtigen, wurde das Programm SCORE (Wang et al., 1998) benutzt. Dabei wird eine empirische Bewertungsfunktion verwendet, um die freie Bindungsenergie zu beschreiben. Diese Funktion enthält verschiedene Terme für Van-der-Waals-Kontakte, Metall-Ligand-Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Desolvationseffekte sowie Deformationen, die während des Bindungsprozesses auftreten können. Die berechneten Werte stellen die Bindungsaffinitäten eines Liganden zum Enzym dar, entsprechen also für Enzyminhibitoren dem pK_i -Wert. Die SCORE-Werte können nicht mit experimentell ermittelten Michaelis-Menten-Konstanten eines Enzym-Substrat-Komplexes gleichgesetzt werden, da diese nicht die reine Affinität eines Liganden zum Enzym widerspiegeln.

2.6.1.2 Semiempirische Berechnungen

Kalkulationen mit quantenmechanischen Methoden basieren auf der Lösung der Schrödinger-Gleichung: $\hat{H} \Psi = E \Psi$ (\hat{H} = Hamilton-Operator; Ψ = Eigenfunktion; E = Eigenwert), wobei eine Unterteilung in *ab initio* und *semiempirische* Methoden erfolgt. Letztere beinhalten die Ersetzung einiger Integrale der Schrödinger-Gleichung durch justierbare Parameter und sind bis ca. 2000 Atome anwendbar, wobei der Rechenaufwand ca. e^3 beträgt (e = Anzahl der äußeren Elektronen). Semiempirische Berechnungen wurden auf der Basis der PM3-Methode (Stewart, 1989), integriert in SPARTAN (I. Wavefunctions, Schrödinger, Inc., 1999) angestellt, um mögliche Reaktionsmechanismen zu untersuchen und Bildungs- bzw. Reaktionsenthalpien für eine UDP-Glucose-Transferreaktion zu berechnen (3.8.4).

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung von Proteinrohextrakten verschiedener betacyanhaltiger Pflanzen und Zellkulturen auf eine *cyclo*-Dopa-Glucosyltransferaseaktivität

Ausgangsmaterial für die biochemischen Untersuchungen an Betacyan-führenden Pflanzen waren sechs Wochen alte Pflanzen von *B. vulgaris* und *Amaranthus paniculatus* sowie Zellsuspensionskulturen von *Portulacca grandiflora* und *Chenopodium rubrum*. Es wurden zwischen 1 g und 100 g Frischmaterial im jeweiligen Extraktionspuffer aufgeschlossen. Jeder Proteinrohextrakt wurde einer Protaminsulfat- sowie einer stufenweisen Ammoniumsulfatfällung mit anschließender Entsalzung unterzogen (2.5.3.4, 2.5.3.5 und 2.5.4.1.) Diese entsalzten Rohextrakte wurden für den Standardenzymtest verwendet. Im Verlaufe der Untersuchungen wurden diese Rohextrakte auch durch Kombination unterschiedlicher chromatographischer Schritte wie Anionenaustausch-, hydrophobe Interaktions- und Farbstoffligandenchromatographie sowie Gelfiltration teilgereinigt und auf Glucosyltransferaseaktivität hin untersucht. Das Substrat *cyclo*-Dopa wurde nach der unter 2.5.1 erläuterten Methode enzymatisch synthetisiert. Die HPLC-Analyse der Enzymtests wurde durch die Überlagerung der Absorption des *cyclo*-Dopas und der Ascorbinsäure bei 280 nm erschwert, deren Retentionszeit sich nur geringfügig von der des *cyclo*-Dopas unterscheidet. Diese Beeinträchtigung konnte durch gleichzeitige Fluoreszenzdetektion aufgehoben werden (nicht dargestellt). Es war jedoch zu erwarten, dass das glucosidierte Produkt, *cyclo*-Dopa-5-*O*-glucosid, aufgrund seiner erhöhten Polarität, in der Umkehrphasen-Chromatographie eine kürzere Retentionszeit als das Aglycon *cyclo*-Dopa haben würde. Aufgrund der Überlagerung durch die im Enzymtest enthaltene Ascorbinsäure, wäre die Identifizierung enzymatisch gebildeten *cyclo*-Dopa-glucosids beeinträchtigt worden. Deshalb wurde eine Derivatisierungsreaktion etabliert, die auf der Kondensation des *cyclo*-Dopas mit dem synthetischen Reagenz 4-Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA) unter Bildung der Betanidin-analogen Struktur *cyclo*-Dopa-DMAZA beruhte (Abbildung 3.1).

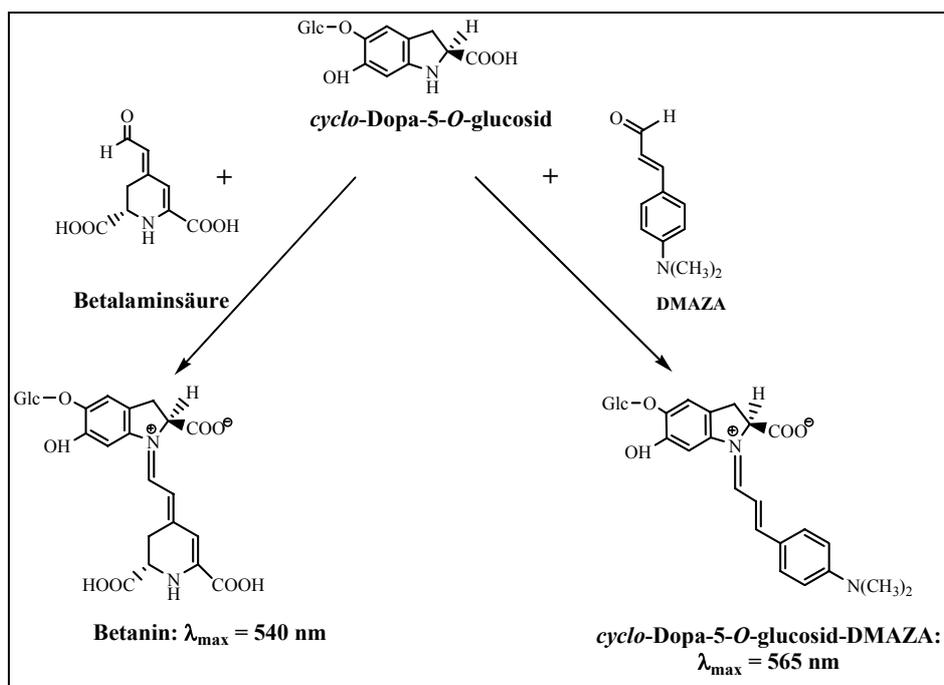


Abbildung 3.1 Darstellung möglicher Kondensationsreaktionen von *cyclo*-Dopa-5-*O*-glucosid mit Betalaminsäure bzw. 4-Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA).

Das durch die Derivatisierung mit DMAZA gebildete Chromophor ist strukturell mit Betanidin bzw. Betanin vergleichbar, die Extinktionskoeffizienten sollten für die Derivate in der gleichen Größenordnung liegen. Für Betanidin beträgt dieser Koeffizient $\varepsilon = 51 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ (542-546 nm) und für Betanin $\varepsilon = 62 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ (bei 536-538 nm) (Wyler & Dreiding, 1959). *Cyclo*-Dopa wurde durch die unter 2.5.1 beschriebene Synthese hergestellt und *cyclo*-Dopa-Glucosid durch alkalische Hydrolyse von Betanin mit nachfolgender Basenaustauschreaktion isoliert (Wyler et al., 1984). Mit Hilfe dieser beiden Substanzen konnte zunächst ein Standard-HPLC-Test etabliert werden (nicht dargestellt). Im folgenden wurden die zu Beginn beschriebenen pflanzlichen Rohextrakte auf die Aktivität eines *cyclo*-Dopa glucosidierenden Enzyms hin untersucht. In keinem Fall konnte Aktivität einer möglichen *cyclo*-Dopa-UGT unter den gewählten Bedingungen detektiert werden. Eine potentielle Degradation des Reaktionsproduktes durch in den getesteten Rohextrakten vorhandene Glucosidasen konnte durch Verwendung eines Glucosidaseinhibitors weitgehend ausgeschlossen werden. Deshalb wurden die unter 3.1 genannten Proteinrohextrakte im folgenden auch mit Betanidin als Substrat getestet. Es konnte jedoch auch keine Aktivität eines Betanidin-glucosidierenden Enzyms gemessen werden. Um die Sensitivität des Aktivitätsnachweises zu erhöhen, wurden Fütterungsexperimente mit der *B. vulgaris*-Zellkultur und D-[U- ^{14}C]-UDP-Glucose über einen Zeitraum von 2, 3 und 4 Stunden durchgeführt und die Produkte über Radio-HPLC getrennt wie unter 2.5.12.1 erläutert. Als Vergleich diente markiertes Betanin, das enzymatisch durch Umsetzung von Betanidin und D-[U- ^{14}C]-UDP-Glucose mit der rekombinanten UGT73A5 aus *D. bellidiformis* gewonnen wurde. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.2 und 3.3 dargestellt.

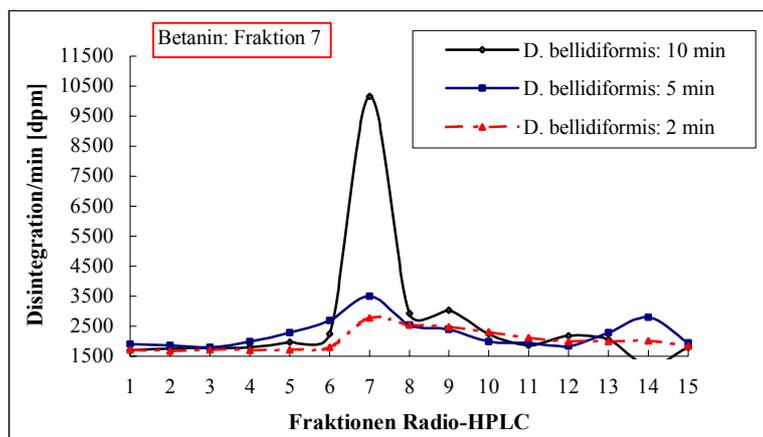


Abbildung 3.2 Auswertung der Scintillationszählung für die Umsetzung von Betanidin mit D-[U- ^{14}C]-UDP-Glucose und der rekombinanten UGT73A5. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

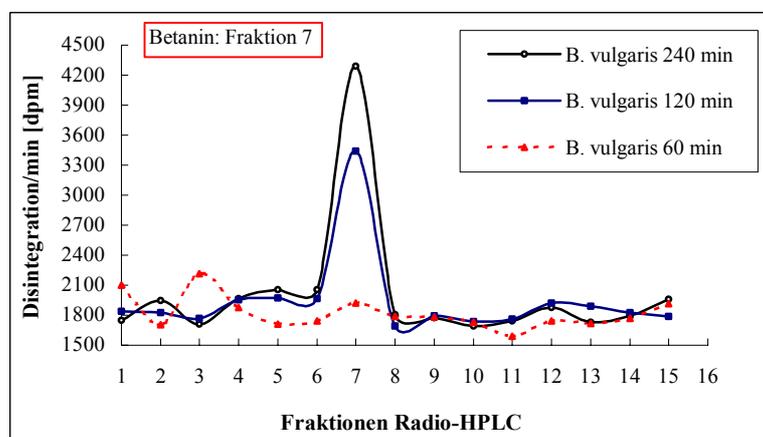


Abbildung 3.3 Auswertung der Scintillationszählung für die Fütterung der *B. vulgaris*-Zellkultur mit Betanidin und D-[U- ^{14}C]-UDP-Glucose. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Aus den beiden Abbildungen 3.2 und 3.3 geht hervor, dass nur in der HPLC-Fraktion, die Betanin enthält, eine zeitabhängige Zunahme der Radioaktivität zu verzeichnen ist. Diese ist im Falle der UGT73A5 im Vergleich zur Zellkultur ca. um das 2,5-fache höher, da eine konzentrierte Fraktion des rekombinanten Enzyms für die Versuche eingesetzt wurde. Tabelle 3.1 stellt die Verteilung der gemessenen Radioaktivität im löslichen Überstand bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Gesamtmenge an D-[U-¹⁴C]-UDP-Glucose dar. Der prozentuale Anteil der in Betanin gemessenen Radioaktivität ist auf die Gesamtradioaktivität in der löslichen Fraktion bezogen. Der Anteil der Radioaktivität im Zellpellet wurde nicht ermittelt.

Tabelle 3.1 Bestimmung des prozentualen Anteils der Radioaktivität im löslichen Überstand bezogen auf die eingesetzte Menge von 0,2 µCi D-[U-¹⁴C]-UDP-Glucose sowie des prozentualen Einbaus der Radioaktivität in Betanin bezogen auf die Gesamtradioaktivität in der löslichen Fraktion.

Radioaktivität	UGT73A5			<i>B. vulgaris</i> -Zellkultur		
	2 min	5 min	10 min	60 min	120 min	240 min
im löslichen Überstand	85 %	83 %	86 %	22 %	36 %	53 %
Einbau in Betanin	10 %	13 %	36 %	0,6 %	1,0 %	1,3 %

Zum Vergleich wurde die Zellkultur auch mit *cyclo*-Dopa und D-[U-¹⁴C]-UDP-Glucose inkubiert und anschließend zur Derivatisierung 4-Dimethylaminozimtaldehyd zugesetzt. Die Produkte wurden über Radio-HPLC entsprechend fraktioniert. In denjenigen Fraktionen, die nach Vergleich mit Standards das *cyclo*-Dopa-glucosid-DMAZA-Derivat enthalten sollten, wurde keine erhöhte Radioaktivität gemessen.

Aufgrund dieser Befunde wurde die alternative Möglichkeit einer Glucosidierung auf der Stufe des Betanidins in *B. vulgaris* in Betracht gezogen. Diese Annahme wurde durch eine weitere Beobachtung unterstützt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die aus *D. bellidiformis* beschriebenen Betanidin-UGTs nicht nur Betanidin, sondern auch Flavonole, Flavone und Anthocyanidine als Substrate akzeptieren. Insbesondere das Flavonol Quercetin wird unter Bildung des entsprechenden 3-, 7- und 4'-*O*-glucosides umgesetzt (Heuer et al., 1996; Vogt et al., 1997; Vogt et al., 1999a; Vogt, 2002). Wurden entsprechend Proteinrohextrakte aus der *B. vulgaris*-Zellkultur mit dem Flavonol Quercetin als Substrat getestet, so konnte die enzymatische Bildung von vier Produkten detektiert werden (Abbildung 3.4). Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit authentischen Standards und mit Hilfe der Absorptionsspektren.

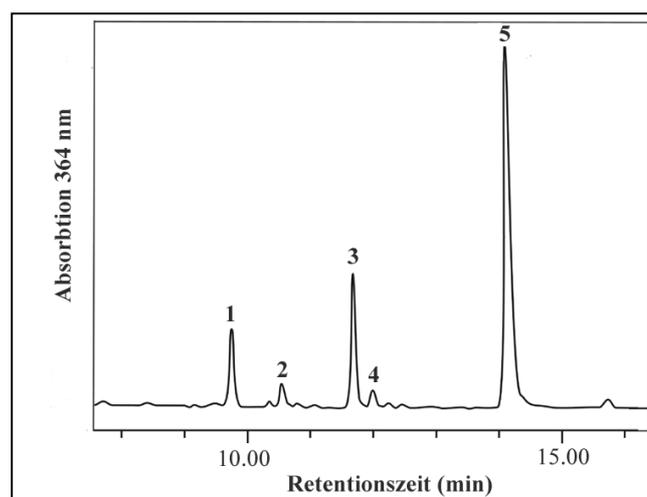


Abbildung 3.4 Repräsentatives RP-HPLC-Chromatogramm eines *B. vulgaris*-Proteinrohextraktes nach Inkubation mit Quercetin und UDP-Glucose bei 30°C für 30 min. Peakidentifizierung: 1: Quercetin-7,4'-*O*-diglucosid, 2: Quercetin-7-*O*-glucosid, 3: Quercetin-4'-*O*-glucosid, 4: Quercetin-3'-*O*-glucosid, 5: Quercetin. Detektion bei 364 nm.

Es wurden drei Quercetinmonoglucoside und ein Diglucosid detektiert. Zur Identifizierung des Diglucosides wurden die Enzymtests jeweils mit Quercetin-7-*O*-glucosid bzw. Quercetin-4'-*O*-glucosid als Substrat wiederholt. In beiden Fällen trat der in Abbildung 3.4 mit Nummer 1 bezeichnete Peak als Reaktionsprodukt auf.

Die Tatsache, dass in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten pflanzlichen Proteinrohextrakten keine *cyclo*-Dopa- oder Betanidin-Glucosyltransferaseaktivität detektiert werden konnte, ist möglicherweise auf eine Instabilität oder geringe Abundanz der betreffenden Enzyme zurückzuführen. Deshalb wurde für weiterführende Experimente ein molekularbiologischer Ansatz zur Identifizierung und Charakterisierung entsprechender Glucosyltransferasen aus *B. vulgaris* gewählt.

3.2 Klonierung zweier cDNAs aus einer Zellsuspensionskultur aus *B. vulgaris*

Ausgangspunkt für die Klonierungsarbeiten war die Herstellung einer λ -Zap-cDNA-Bank aus einer roten Zellsuspensionskultur von *B. vulgaris*, wie unter 2.2.2 näher erläutert. Ein Aliquot der Zellkultur-cDNA-Bank (ca. $2,4 \cdot 10^7$ Klone) wurde für eine PCR-Reaktion mit einem T7-Standardprimer und einem degenerierten Primer benutzt, der von der sogenannten Plant Secondary Product Glycosyltransferase-Konsensussequenz (PSPG-Box, Abbildung 1.2) abgeleitet wurde (Bairoch, 1991; Hughes & Hughes, 1994). Mit Hilfe der PCR-Reaktion wurde sowohl ein 600 bp (A7) als auch ein 1200 bp (A2) Fragment aus der cDNA-Bank amplifiziert. Subklonierung, Sequenzierung und Vergleich mit der Gendatenbank zeigte für das Fragment A7 eine 64%ige Identität auf Aminosäureebene mit der UGT73A5 aus *D. bellidiformis* und für das Fragment A2 eine 56%ige Identität zur UGT71F2 aus derselben Pflanze. Diese beiden Fragmente wurden im folgenden separat als homologe Sonden für die Hybridisierung und das Durchmusteren der cDNA-Bank eingesetzt (2.2.2). Diejenigen cDNA-Sequenzen, die ein Start-Codon und ein Poly-A-Signal aufwiesen („full-length“-Klone), wurden vollständig sequenziert und mit den in der Datenbank vorhandenen Glucosyltransferasesequenzen verglichen. Dabei ergab sich für die aus der Hybridisierung mit dem Fragment A7 erhaltenen Klone die höchste Sequenzhomologie zur UGT73A5 aus *D. bellidiformis* (56-64 %). Das als Sonde verwendete Fragment A2 führte zur Isolierung mehrerer cDNAs mit einer Sequenzidentität von 52-59 % zur UGT71F2 aus der gleichen Spezies. Der jeweils längste cDNA-Klon aus beiden Screens wurde für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Interessanterweise waren die isolierten cDNAs auf Nukleotidebene alle identisch, was für die Stringenz der Hybridisierung spricht. Die Eigenschaften der ausgewählten cDNA-Sequenzen sind in Tabelle 3.2 dargestellt, ihre vollständigen Nukleotidsequenzen sind aus Abbildung 3.5 und Abbildung 3.6 ersichtlich. Die Benennung der Klone erfolgte gemäß der Nomenklatur für die UDP-Glucosyltransferase (UGT)-Superfamilie (Mackenzie et al., 1997). Der Klon mit der höchsten Homologie zur UGT73A5 aus *D. bellidiformis* wurde als UGT73A4 annotiert, der zweite Klon entsprechend als UGT71F1.

Tabelle 3.2 Vergleich der für weitere Untersuchungen ausgewählten „full-length“-cDNA-Sequenzen aus *B. vulgaris* und abgeleitete Eigenschaften.

Bezeichnung	5'-untranslatiert [bp]	Offener Leserahmen [bp]	3'-untranslatiert [bp]	Berechnetes Molekulargewicht [kda]	Berechneter isoelektrischer Punkt
UGT73A4	76	1431	96	54,07	5,79
UGT71F1	70	1479	218	54,39	5,6

UGT73A4 ist unter der Genbanknummer AY526080, UGT71F1 unter der Nummer AY526081 in der Genbank[®] registriert, der öffentliche Zugang ist vorläufig noch gesperrt.

1	ATCTACTAACACATTTCCATCTAACTTGTTACCTCTTAAATTTACAAGTGAACAATTCATTGATCATATAAATTTGGATGATAAATCA M D D K S
91	CAACAGCTCCATATAGTCCTATTCCCATTATGGCTCATGGCCACATGATCCCACTCTTGACATCGCGAGGCTCTTTGCTGCTCGCGGT Q Q L H I V L F P F M A H G H M I P T L D I A R L F A A R G
181	GTC AAGACAACCCTCATCACCACCCTCGCAACGCACCCACCTTTCTCACCGCCATCGAAAAGGAAACAAATCTGGTGCCCAACAATC V K T T L I T T P R N A P T F L T A I E K G N K S G A P T I
271	AATGTCGAGGTATTC AATTTCCAAGCTCAATCATTGGTCTACCTGAAGGATGTGAGAATCTAGAGCAAGCACTAGGTCCTGGAATTAGG N V E V F N F Q A Q S F G L P E G C E N L E Q A L G P G I R
361	GACCGATTCTTTAAGGCTGCAGCAATGCTAAGAGATCAACTCGAGCACTTCTAGAGAAAACACGACCCAACTGTCTTGTAGCTGATATG D R F F K A A A M L R D Q L E H F L E K T R P N C L V A D M
451	TTCTTCCCTTGGGCTACTGATTCTGCAGCTAAGTTCAACATTCCTAGACTAGTTTTCCATGGACATTGCTTGTGTTGCACTTTGTGCTTTA F F P W A T D S A A K F N I P R L V F H G H C L F A L C A L
541	GAAATAATTAGACTACATGAGCCTTATAACAATGCATCATCTGACGAGGAACCATTTCTTCTTCTCATCTTCCGCACGAAATTGAGCTA E I I R L H E P Y N N A S S D E E P F L L P H L P H E I E L
631	ACAAGGTTACAGTTCTCAGAGGAATTATGGAAGAATGGCGGGGATAGTGACTACAAAGAAAGATCCAAAGCGATCAAAGAATCCGAGCTC T R L Q F S E E L W K N G G D S D Y K E R S K A I K E S E L
721	AAGTGTATGGTGTGCTTGTCAACAGCTTTTATGAGTTAGAACCAGATTATGCAGAATATTTTAGGAAAGATTTAGGAAGGAGGGCATGG K C Y G V L V N S F Y E L E P D Y A E Y F R K D L G R R A W
811	AATATTGGTCTCTTTCACTTTACAATAGAAGCAATGAAGAAAAAGCTCAGAGAGGGAAACAAGCTTCAATAGATGAACACGAATGCTTA N I G P V S L Y N R S N E E K A Q R G K Q A S I D E H E C L
901	AAATGGCTTA ACTCTAAGAGCCTAATCTGTGATTACATCTGTTTCGGAAGTACGATGCACATGATACCTTCTCAGCTTAATGAGATT K W L N S K K P N S V I Y I C F G S T M H M I P S Q L N E I
991	GCAATGGGTTTAGAAGCTTCTGGAAAAGACTTTATATGGGTAGTAAGGAATGAAGATGATCTTGGAGAATTCGAGCAAAGAATGGAAGGA A M G L E A S G K D F I W V V R N E D D L G E F E Q R M E G
1081	AAAGGTTTAAATATAAGAGGATGGGCTCCACAAGTGTGATCTTAGAGCATGAAGTCATAGGACCTTTGTGACTCATTGTGGGTGGAAC K G L I I R G W A P Q V L I L E H E V I G A F V T H C G W N
1171	TCGACAATAGAAGGGATCGCAGCAGGCGTGCCAAATGGTTACATGGCCTGTGTTTCGCCGAGCAATTCCTCAACGAAAAATTGATCACTCGG S T I E G I A A G V P M V T W P V F A E Q F L N E K L I T R
1261	GTTTGGAGGATTGGGATCCCTGTTGGAGCTAAGAAGTGGGATTGCAAACCTTCTGAGGAGTATGTTGTGAAAAAAATGACATAGAGAAA V L R I G I P V G A K K W D C K P S E E Y V V K K N D I E K
1351	GCTTTGAGGGAAGTAATGAGGGGAATGAAGCTGAGGAGAGGAGAACTAGAGCTAAAGAGTACAAGGAAATGGCATGGAAGGCTTTACAA A L R E V M E G N E A E E R R T R A K E Y K E M A W K A L Q
1441	GAAGGTGGTTCTTCATATTCAGATTTGAGTGCATTAATAGATGAGTTGAGAGGTTTATCAACCTAAACAAGATTTATGTTAGTGCATAAT E G G S S Y S D L S A L I D E L R G L S T *
1531	CATTTTGTGTCTTCTATCTATCTATGTTTTGCTTTCTTTGTTATTTGGATATGCAACATTTTAAATTTGTGGAAAAA
1621	A

Abbildung 3.5 Vollständige Nukleotidsequenz des cDNA-Klons UGT73A4 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Das PSPG-Box-Konsensus-Motiv ist durch roten Fettdruck markiert. Fettgedruckte Nukleotide kennzeichnen den durchgängigen offenen Leserahmen des Klons.

```

GCACGAGGAAAGTTTGTCTAGAAAAAACTCATAACACAGTACACAGTACACAGTACACACACCCAAAAATGAGCAGCAGTACAGCAAGT
M S S S T A S
CTAACAGTAACAGCAGATGCAGAGCTGGTGTGTTCCAGCTCCGGGTATGGGCCACCTTAAATCCGCGGTGGAAGTACGCCAACTCATC
L T V T A D A E L V F V P A P G M G H L K S A V E L A K L I
1 ATCCAACGCAACCACCGCATTTCAATCGTCATCCTCATCATCAACATCCCCACTACTTCCCTCATCAAGACTTCGTTCACTCCCAA
I Q R N H R I S I V I L I I N I P T T T S L I N D F V H S Q
1 TCACGTAAACACCCCTTACCCTACCCATCTAACTTTCATGACTCTACCACCTCTTTCAAACCCACCAGAACGTTCTCTCCGACTTCATG
S R N N P Y P T H L T F M T L P P L S N P P E R S S P D F M
1 CGCATTCTCATTGAGCTCCACGAGCCTCTCGTCAAACAGGCGTTCGAGGAACGAATCCGAGCCGGGTCTTCTAAGCTTCCGGTTCGTC
R I L I E L H E P L V K Q A V E E R I R A G S S K L A G F V
1 CTCGACATGTTTTGCACCAACATGATTGATATTGCCACTAATTTAAACGTTCCAGCCTACATCTTCTTTACTTTCAGGAGCTAACATGTTG
L D M F C T N M I D I A T N L N V P A Y I F F T S G A N M L
1 AGTCTGATGTTTCATTTTCAGTCAATGAATGATGAAGGTGTTTTGATCTTACTAAGGACCACATCAGCCCCAATGCTGAGTTTGATGTA
S L M F H F Q S M N D E G V F D L T K D H I S P N A E F D V
1 CCCGGGTTTGTGAACCGGTACCCGAGAAAGTCTCCCTGCAGTACTTATTGATAAGGAAAGTGGGGTCCCTATGCTTCTCAACCTTGTG
P G F V N R V P E K V L P A V L I D K E S G V P M L L N L V
1 AGGGGGTTAAGAAGATCCAAGGGTATTTAGTAAATTCATTTACAGAGCTTGAACCTTCCGGTGTACAAGCTTTGTTAGATCAAGCAACT
R G L R R S K G I L V N S F T E L E T S G V Q A L L D Q A T
1 GAAGGTGGTAGCATTCCCGCTATTTATCCAGTGGGTCCCATCTTAGAGCTTGACAGTGGGTCCCAAGGAGAGGACCACGTATCTATTTTA
E G G S I P A I Y P V G P I L E L D S G S Q G E D H V S I L
1 CAGTGGCTAGATAAGCAGCCTTCTTCATCAGTAGTGTTCCTCTGCTTTGGGAGCATGGGAAGTTTCGATGCGAATGAAGTGAAGGAGATA
Q W L D K Q P S S S V V F L C F G S M G S F D A N E V K E I
1 GCTAATGGTCTTGAAAAGTCCGGACACCGGTTTCTGTGGTCTCTACGGAAGCCGCCTTCCGCGGTACACGCAGCCTAGTCAAGACCAA
A N G L E K S G H R F L W S L R K P P S A G T T Q P S Q D Q
81 ACTTTTGTAGAAGCATTGCCCGAAGGCTTTGTGGATCGGACGGCTAAGATCGGAAAAATCATTAGTTGGGCACCACAAGTCTCCATCTTG
T F V E A L P E G F V D R T A K I G K I I S W A P Q V S I L
71 TCCCATCTTCCGTAGGTGGGTTCGTATCGCATTGTGGGTGGAACCTCGACACTGGAGAGTATGTGGTTCGGGGTTCCTGTAGCGACGTGG
S H P S V G G F V S H C G W N S T L E S M W F G V P V A T W
61 CCACTACATGCAGAGCAACAACCTGAATGCATTTGAATTAATCAAGGAGTTGGGACTAGCGGTTGAGATTAGGATGGACTATCGACATGAT
P L H A E Q Q L N A F E L I K E L G L A V E I R M D Y R H D
51 TGGAAAACAAGAAAAGCAAACCTTTGTAGTCACAGCTGAGGAGGTTGAGAATGGTGTACAGAAATGATGAGTTTGACGAGGAGACGAAA
W K T R K A N F V V T A E E V E N G V Q K L M S L D E E T K
41 AAGAGAGTGAAGCAATGAGAGATGAAGGTAGAAAAGCTTTGGAAGATGGTGGTCTTCTCATATGCTGTTGGCTCGTTTTATTCAAGAT
K R V R Q M R D E G R K A L E D G G S S H M S L A R F I Q D
31 GTTTTGACTTTTGAGTAAATTAGGTTGCTGAGAGTATTGTGGTCATATCAATTATCAAATGTCAATTTGTCATATACCTTAATGTGTTTCA
V L T F E *
21 AGTCCATGTTGTTTATGTATCCCTATTTACATGTGTGGGCGGTTTGGTGTGTTAATAAATGATTGTAATGGGAATGAATTTTAAGCATAA
11 TGTGGGAAGCACTTTTAAAGTGTGTATGGGGTAATGGTGAGATAATTTCAATTGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Abbildung 3.6 Vollständige Nukleotidsequenz des cDNA-Klons UGT71F1 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Das PSPG-Box-Konsensus-Motiv ist durch roten Fettdruck markiert. Fettdruckte Nukleotide kennzeichnen den durchgängigen offenen Leserahmen des Klons.

Die Homologie der *B. vulgaris*-Klone zu den Betanidin-UGTs aus *D. bellidiformis* ist im folgenden anhand eines Sequenzvergleichs der Aminosäuresequenzen in Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8 verdeutlicht. Werden nicht nur identische, sondern auch ähnliche Aminosäuren berücksichtigt, so liegt die Homologie für beide Enzyme bei über 75 %.

```

BV-UGT73A4 1 MDDKSSQQ--LHIVLFFPMAHGHIPTLDIARLFAARGVKTLLITTPRNAPTLTAIEKGNKSGAPTINVEVFNFQACSFGL
Dbs-UGT73A5 1 MGTHTSTAPDLHVVFPPFLAHGHMIPSLDIAKLFAARGVKTLLITTPRNAPTLTAIEKGNKSGAPTINVEVFNFQACSFGL

BV-UGT73A4 89 ALGPGIRDRFFKAAAMLRDQLEHFLKTRPNCLVADMFFPWATDSAAKFNIPLRVFHGHCLFALCALEITRLHEPYNNASS
Dbs-UGT73A5 91 AMAIGANNEFFNAANLLKEQLENFLVKTRPNCLVADMFFTWADSTAKFNIPLRVFHGHGSFFACCAKEVMWRYKPYKAVSS

BV-UGT73A4 179 LPHEIELTRLQFSSEELWKNCGSDYKERSKAIKESLELKYGVLVNSFYELEPDYAEYFRKDLGRRAWNIGPVSLYNRSNEE
Dbs-UGT73A5 181 LPHEVKMTRLQVPESEMRKCEETHETKRTERTIRELEKRSYGVIVNSFYELEPDYADFLRKELGRRAWHIGPVSLCNRSIED

BV-UGT73A4 269 IDEHEECLKWLNKPKNSVIYICFGSTMHMI PSQLEI AMGLEASGKDFIWVVRNEDDLG-----EFQRM
Dbs-UGT73A5 270 IDEDEECLKWLNKPKPSVIYICFGSTGHLIAPQLHEIATALEASGQDFIWAVRCDHGGCNSE-----EWLPPGYEHL

BV-UGT73A4 343 WAPQVLI LEHEVIGAFVTHCGWNSTIEGI AAGVPMVTWPVFAEQFLNEKLI TRVLRIGIPVGAKKWDCKPSEEVVYKNDI
Dbs-UGT73A5 362 WAPQVLI LEHEATCGFLTHCGWNSALEGI SAGVPMVTWPTFAEQFHNEQLLTQILKVGVAVGSKKWTLKPSIEDVKAEDI

BV-UGT73A4 433 GNEAEERRTRAKEYKEMAWKALQEGGSSYSDLSALI DELRGLST
Dbs-UGT73A5 442 GEEGEERRRRAKLLKEMAWRAIEEGGSSYSDLSALI EELKGYHTISEKE

```

Abbildung 3.7 Sequenzvergleich von UGT73A4 (AY526080) und UGT73A5 (Y18871). Identische AS (64 %) sind mit schwarzer Farbe, ähnliche AS mit grauer Farbe unterlegt.

```

BV-UGT71F1 1 MSSSTASLTVTADAELVFVAPGGMHLLKSAVELAKLIQRNHRISIVILINIPTTTSLLNDFVHSQSRNPYPHTLTFMTI
Dbs-UGT71F2 1 -----MSKIELVLVPTPGMGHLLSAVELSKLIIRRENRI SVLILILSFFDSDLVNAVYDFQSRP DNSSGSLTFITL

BV-UGT71F1 91 RSSPDMFRILIELHEPLVKQAVEERIRAGSSKLAGFVLDMFCTNMIDATNLNVPAYIFFTSGANMLSLMFFHQSNDEGV
Dbs-UGT71F2 81 CTSSTFFFTTVIELHKPNVKQVVEERVRSGPSKAGFVIDMLCPAMMDVAEELVPSYIFFTSGANLLNVVFHFLSLADNGV

BV-UGT71F1 181 PNAEFDVPGFVNRVPEKVLPAVLIKESGVPMLNLNVRGLRRSKGILVNSFTLETSVGCALLDQATEGGSIPA YPVGPI
Dbs-UGT71F2 170 PDKEVDVPGFRNRVPEKVLPLPFLEK-----FLVKRCRRFRRSNGILVNTSNELESYAIQTLLEQAKDNKIPPVYPVGPI

BV-UGT71F1 267 GSCCEDHVSILQWLDKQPSSSVVFICFGSMGSDFANEVKEIANGLEKSGHRFLWSLRKPPSAGTTCPSQEQTFVEALPEGF
Dbs-UGT71F2 265 GTKEDEEVSIMRWLDEQPVNSVLFVFCFGSMGTFDEEDQVKEIANGLEQSGYCFLWSLRQPPPEGKATPSEE-AFLDITLPEGF

BV-UGT71F1 357 IISWAPQVSI LSHPSVGGFVSHCGWNSTLESNWFVGPVATWPIHAEQQLNAFELIKELGLAVEIRMDYRFDWKRKANFVV
Dbs-UGT71F2 344 IISWAPQVSI LAHKAVGGFVSHCGWNSTLESNWFVGPVATWPIHAEQQLNAFELVKEFGMAVEIRMDYRFDWKRKANFVV

BV-UGT71F1 447 QKLMSLDEETKKRVQMRDEGRKALEDDGGSSHMSLARFIQDVLTFE--
Dbs-UGT71F2 434 KKLMSMDEEMVEKVKKMSDKSRKTLLEDGGSSHSLGRFINDLLENAGF

```

Abbildung 3.8 Sequenzvergleich von UGT71F1 (AY526081) und UGT71F2 (AF374004). Identische AS (59 %) sind mit schwarzer Farbe, ähnliche AS mit grauer Farbe unterlegt.

Die hohen Sequenzidentitäten der UGT73A4 und UGT73A5 sowie UGT71F1 und UGT71F2, lassen vermuten, dass es sich um homologe Proteine mit ähnlicher Funktion handeln könnte. Die Identität der *B. vulgaris*-Klone untereinander beträgt nur 24 %. Um die beiden Glucosyltransferase-Sequenzen aus *B. vulgaris* besser in die Superfamilie pflanzlicher Glucosyltransferasen der β -Gruppe einordnen zu können, wurde ein Cladogramm mit ausgewählten UGT-Sequenzen aus der Genbank erstellt. Dieses Cladogramm geht aus Abbildung 3.9 hervor und verdeutlicht die Einordnung der beiden aus klonierten UGTs in zwei nicht näher verwandte Gruppen (Cluster).

Die UGT73A4 befindet sich wie die UGT73A5 in einer Gruppe, die auch stress-induzierbare UGTs aus Tabak und Tomate beinhaltet (im Cladogramm grün eingerahmt). Die funktionell charakterisierten Enzyme dieser Subfamilie, neben der UGT73A5 aus *D. bellidiformis* nur die Flavonoid-7-O-UGT aus *Scutellaria baicalensis*, zeichnen sich durch eine breite Substrat- und hohe Regiospezifität aus. Die Sequenzidentität des UGT73A4-Klons zu den anderen UGTs innerhalb dieser Gruppe liegt zwischen 43 % und 64 %.

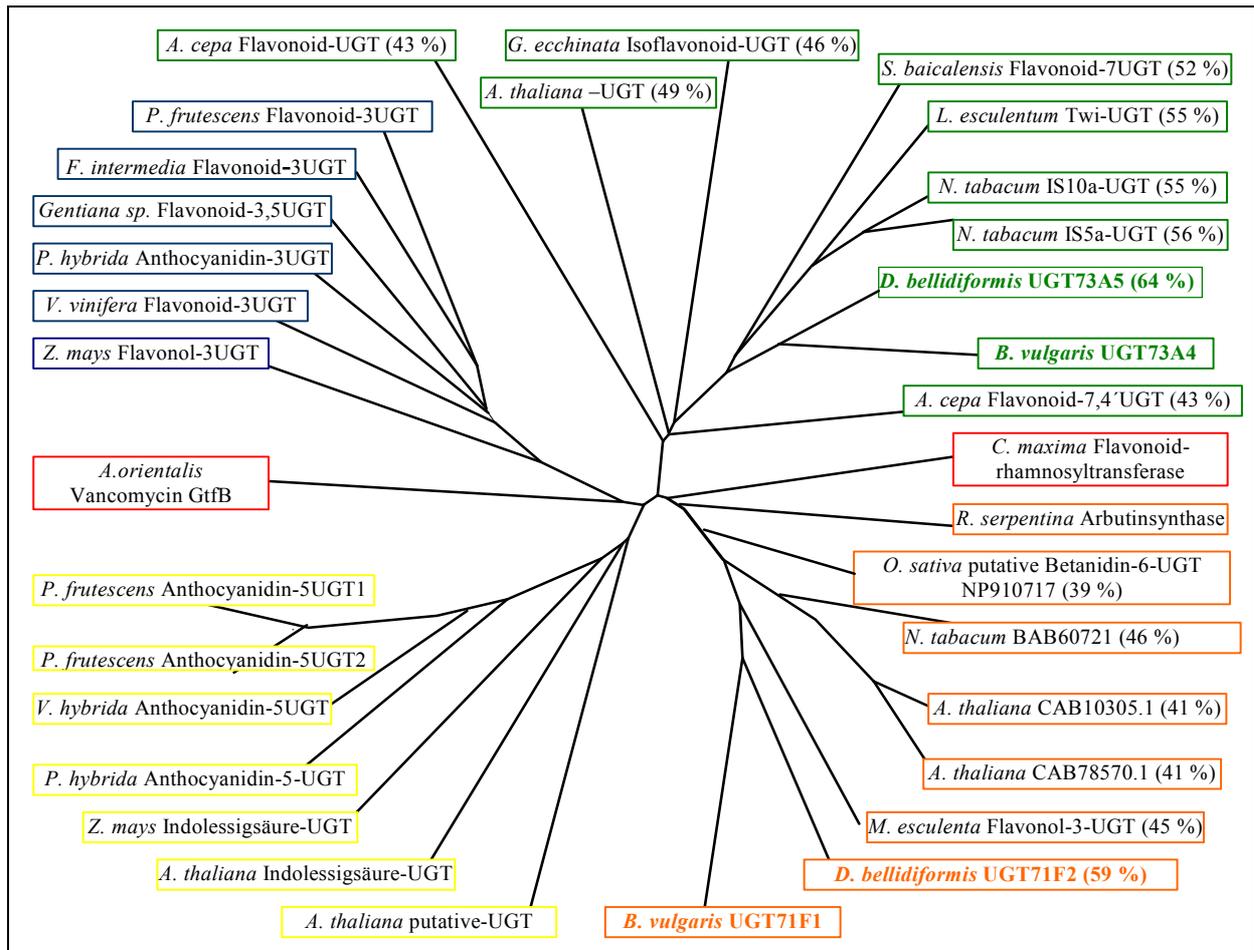


Abbildung 3.9 Cladogramm ausgewählter UGT-Sequenzen aus der Genbank. Die in Klammern aufgeführten Prozentzahlen geben die Sequenzidentität auf Aminosäureebene bezogen auf den UGT73A4-Klon innerhalb der grün markierten Gruppe bzw. auf den UGT71F1-Klon innerhalb der orange gekennzeichneten Gruppe an. Dargestellte Sequenzen mit zugehörigen Genbank-Nummern: *Citrus maxima* Flavonoid-rhamnosyl-GT (AY048882), *Rauvolfia serpentina* Arbutinsynthase (AJ310148), *Oriza sativa* putative Betanidin 6-UGT (NM185828), *Nicotiana tabacum*-UGT (BAB60721), *Arabidopsis thaliana* (*Ara*)-UGT (CAB10305.1), *Ara*-UGT (CAB78570.1), *Manihot esculenta* CGT1 (X77459), *Dorotheanthus bellidiformis* UGT71F2 (AF374004), *Beta vulgaris* UGT71F1 (AY526081), *Ara*-UGT (BT001160), *Ara*-Indolessigsäure (IAA)-UGT (U81293), *Zea mays* IAA-UGT (L34847), *Petunia hybrida* Anthocyanidin-5-UGT (AB027455), *Vitis hybrida* Anthocyanidin-5-UGT (BAA36423), *Perilla frutescens* 5-UGT2 (AB013597), *Perilla frutescens* 5-UGT1 (AB013596), *Amycolatopsis orientalis* GtfB (AAB49293), *Zea mays* Flavonoid-3-UGT (X13501), *Vitis vinifera* Flavonoid-3-UGT (AF000371), *Petunia hybrida* Anthocyanidin-3-UGT (AB027454), *Gentiana spec.* Flavonoid-3-UGT (E15917), *Forsythia x intermedia* 3-UGT (AAD21086), *Perilla frutescens* 3-UGT (AB002818), *Allium cepa* Flavonoid-UGT (AY262063), *Ara*-UGT-Familie (NP7955.1), *Glycyrrhiza echinata* Isoflavonoid-UGT (AB098614), *Scutellaria baicalensis* Flavonoid-7-UGT (BAA83484), *Lycopersicon esculentum* Twi1-UGT (X85138), *Nicotiana tabacum* IS10a-UGT (U32643), *Nicotiana tabacum* IS5a-UGT (U32644), *D. bellidiformis* UGT73A5 (Y18871), *B. vulgaris* UGT73A4 (AY526080), *Allium cepa* Flavonoid-7,4'-UGT (AY262062).

Die UGT71F1 zeigt Sequenzidentität zu einigen, nicht funktionell charakterisierten UGT-Sequenzen aus *Manihot esculenta* und *A. thaliana*. Sie lässt sich der gleichen Subfamilie wie die UGT71F2 aus *D. bellidiformis* zuordnen (Abbildung 3.9, orange eingerahmt). Die Sequenzidentitäten innerhalb dieses Clusters liegen zwischen 39 % und 59 %. Die deutliche Abgrenzung von der zuvor beschriebenen Gruppe, welche die UGT73A4 beinhaltet, spricht dafür, dass sich die beiden *B. vulgaris*-UGTs unabhängig voneinander entwickelt haben. Aus Abbildung 3.9 geht weiterhin hervor, dass zwei weitere Cluster pflanzlicher UGTs differenziert werden können. In der ersten Gruppe (Abbildung 3.9, blau eingerahmt) befinden sich funktionell charakterisierte Flavonoid- und Anthocyanidin 3-UGTs.

Die zweite Gruppe beinhaltet Anthocyanidin 5-UGTs, die sich von den weniger nahe verwandten Indolessigsäure-UGTs aus *Z. mays* und *A. thaliana* abgrenzen lassen.

Die individuelle Cluster-Analyse zeigt, dass nahe verwandte Enzyme mit vergleichbaren Substrat- bzw. Regiospezifitäten innerhalb einer Gruppe zu finden sind und hinsichtlich Donor- und Akzeptorspezifitäten deutlich von anderen Glucosyltransferasen abgegrenzt werden können. Beispiele hierfür sind die in das Cladogramm integrierten Sequenzen einer bakteriellen Glucosyltransferase aus *Amycolatopsis orientalis*, die in die Biosynthese des Antibiotikums Vancomycin involviert ist, und einer Flavonoid-Rhamnosyltransferase aus *Citrus maxima* (Abbildung 3.9, beide rot eingerahmt). Die Sequenzidentitäten der beiden letztgenannten Enzyme zur UGT73A4 betragen weniger als 15 %. Generell ist auf der Basis von Sequenzvergleichen nur eine vorläufige Vorhersage von Substrat- und Regiospezifitäten möglich, die in jedem Fall experimentell überprüft werden müssen. Zur funktionellen Charakterisierung der beiden UGTs aus *B. vulgaris* wurden beide Klone im nächsten Schritt in verschiedenen Systemen heterolog exprimiert.

3.3 Funktionelle Charakterisierung der UGT73A4 und UGT71F1

3.3.1 Expression in einem prokaryontischen System

Die funktionelle Expression beider Klone sollte zunächst in *Escherichia coli* erfolgen. Um eine spätere Reinigung der heterolog exprimierten Proteine mittels Metallaffinitätschromatographie zu ermöglichen, wurde im Falle des UGT73A4 Klon der pQE30 Vektor in Verbindung mit dem *E. coli* M15p[Rep4] Expressionsstamm verwendet. Die Analyse der UGT71F1-Sequenz zeigte, dass keine internen *EcoRI* bzw. *XhoI* Restriktionsschnittstellen vorhanden waren. Aus diesem Grunde wurde die cDNA in den pQETri Vektor kloniert (2.4.1.1), wobei die Expression ebenfalls in *E. coli* M15p[Rep4] Zellen erfolgte. Obwohl der UGT71F1-Klon funktionell als lösliches Protein in dem genannten Vektorsystem exprimiert werden konnte, gelang die Klonierung im Leserahmen des Histidin-Tags nicht. Dadurch wurde nicht nur die Enzymreinigung erschwert, sondern auch eine Detektion mittels Western-Blot unmöglich gemacht, da kein spezifischer Antikörper für das Protein zur Verfügung stand.

Die Glucosyltransferaseaktivität beider rekombinanter Enzyme wurde mit Hilfe des unter 2.5.9 beschriebenen Enzymtests untersucht und die Produkte durch analytische HPLC und Vergleich mit authentischen Standards identifiziert. Als bevorzugtes Substrat wurde das Flavonol Quercetin eingesetzt, da dieses kommerziell verfügbar ist und nicht wie das Betanidin erst isoliert und gereinigt werden muss (Heuer et al., 1996). Repräsentative Chromatogramme der Enzymtests mit bakteriellen Rohextrakten sind in Abbildung 3.10 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die UGT73A4 Quercetin unter Bildung von vier verschiedenen Glucosiden umsetzte. Die Bildung des Quercetin-7,4'-*O*-diglucosides stellte hierbei ein direktes Maß für die Anreicherung des rekombinanten Enzyms da. Dies konnte im Rahmen der unter 3.3.3 beschriebenen Reinigung des Enzyms genutzt werden. Bei der Erstellung der Elutions- und Aktivitätsprofile wurde deshalb die Bildung des Quercetin-7,4'-*O*-diglucosides zugrundegelegt. Die gleiche Beobachtung wurde auch für die UGT71F1 in Bezug auf die Bildung von Quercetin-3-*O*-glucosid gemacht.

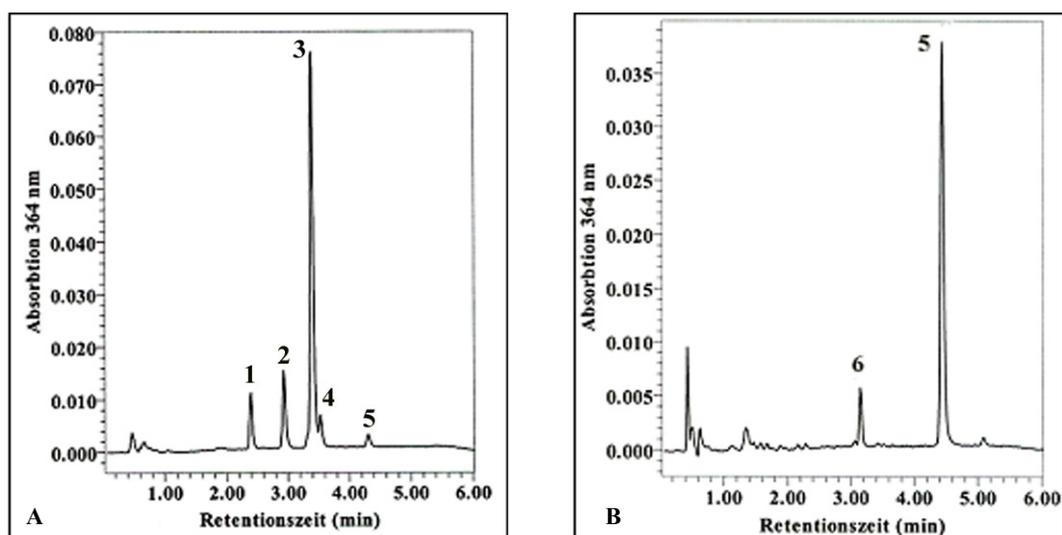


Abbildung 3.10 Repräsentative RP-HPLC-Chromatogramme der Umsetzung von Quercetin mit bakteriellen Rohextrakten der UGT73A4 (**A**) und UGT71F1 (**B**). Inkubation bei 30 °C für 15 min. Peakidentifizierung: 1: Quercetin-7,4'-*O*-diglucosid, 2: Quercetin-7-*O*-glucosid, 3: Quercetin-4'-*O*-glucosid, 4: Quercetin-3'-*O*-glucosid, 5: Quercetin, 6: Quercetin-3-*O*-glucosid. Detektion bei 364 nm.

Als Alternative zum pQE-Expressionssystem wurde eine Klonierung in den pDest24 Vektor des Gateway-Systems von Invitrogen gewählt (2.4.1.2). Beide cDNA-Sequenzen wurden erfolgreich in den Expressionsvektor inseriert und die rekombinanten *B. vulgaris*-Enzyme in diesem System als lösliche, C-terminale GST-Tag-Fusionsproteine exprimiert, wobei drei verschiedene Expressionsstämme getestet wurden. Einer der drei Stämme, *E. coli* BL21-AITM, ermöglicht eine kontrollierte Induktion der Genexpression durch L-Arabinose, während eine unerwünschte Basalexpression durch Glucosezugabe zum Medium reprimiert werden kann. Obwohl beide rekombinanten Proteine in diesem System funktionell exprimiert wurden, betrug die Proteinmenge etwa 1/10 der nach IPTG-Induktion erhaltenen Menge, so dass die Induktion mit L-Arabinose nicht standardmässig verwendet wurde. Des Weiteren wurden zwei verschiedene Bakterienstämme, *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL und *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RP, getestet. Beide Stämme zeichnen sich durch den Besitz zusätzlicher Genkopien aus, die für seltene tRNAs kodieren, die häufig den Translationsprozess rekombinanter Proteine in *E. coli* limitieren (Tabelle 2.1). Die Untersuchung unterschiedlicher Expressions- und Reinigungsbedingungen zeigte, dass die Expression der UGT73A4 als pQE30-His-Tag-Fusionsprotein günstiger war als das entsprechende GST-Tag-Konstrukt. Im Falle der UGT71F1 waren die Verhältnisse umgekehrt. Um auszuschließen, dass der N-terminale His-Tag bzw. der C-terminale GST-Tag einen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität ausübte, wurden beide Proteine auch in Expressionsvektoren ohne Tag-Sequenzen kloniert und erfolgreich exprimiert (nicht dargestellt). Es konnte im Vergleich zu den Fusionsproteinen kein Unterschied bezüglich der spezifischen Aktivität und Stabilität festgestellt werden. Alle weiteren Reinigungsschritte und Enzymcharakterisierungen wurden deshalb mit den beiden zuvor beschriebenen Fusionsproteinen durchgeführt. Die Expression und die nachfolgende Aufarbeitung der Bakterien erfolgte gemäß 2.4.1.3 und 2.5.3.2 bzw. 2.5.3.3. Obwohl beide Glucosyltransferasen als lösliche Proteine exprimiert wurden und keine Bildung von Einschlusskörpern in der unlöslichen Proteinfraction nach SDS-PAGE beobachtet wurde, war die Expressionsrate relativ gering und das rekombinante Protein im Rohextrakt mittels Western-Blot kaum detektierbar. Um ca. 1 mg teilgereinigtes Protein zu erhalten, mussten zwischen 6 und 12 Litern *E. coli*-Kultur aufgearbeitet werden. Die spezifischen Enzymaktivitäten beider rekombinanter Glucosyltransferasen im bakteriellen Rohextrakt waren sehr unterschiedlich. Für Quercetin als Substrat betrug sie im Falle der UGT73A4 6,9 pkat/mg Protein, für die UGT71F1 wurde ein Wert von 0,8 pkat/mg gemessen.

3.3.2 Expression in eukaryontischen Systemen

Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits erläutert, war die Expressionsrate beider Proteine in *E. coli* relativ gering, zudem erwies sich das Enzym UGT71F1 als äußerst instabil, da binnen 24 h die Aktivität um 50 % zurückging (3.3.5). Obwohl der Vergleich mit entsprechenden Datenbanken (<http://us.expasy.org/tools/>) keine Hinweise auf Glycosidierungs- oder Phosphorylierungsstellen für beide abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *B. vulgaris*-Klone ergab, war nicht auszuschliessen, dass die Expression in einem eukaryontischen System die Stabilität und eventuell die Expressionsrate verbessern würde. Aus diesem Grunde wurde parallel die Expression beider cDNAs in *Saccharomyces cerevisiae* und *Spodoptera frugiperda* versucht. Die Klonierungsstrategie und die verwendeten Expressionsvektoren sind unter 2.4.2 und 2.4.3 erläutert. Die jeweiligen Expressionsbedingungen orientierten sich an den Protokollen der Hersteller.

3.3.2.1 Expression in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*)

Für die heterologe Expression in Hefezellen wurde der pYes2-Vektor der Firma Invitrogen verwendet. Wiederum wurden beide cDNA-Klone über geeignete Restriktionsschnittstellen (Tabelle 2.4), in die multiple Klonierungsstelle des Vektors integriert und die Konstrukte mittels Sequenzierung verifiziert. Die Transformation und Expression erfolgte gemäß 2.3.7 und 2.4.2. Beide Klone wurden in diesem System als lösliche Proteine exprimiert, wobei die Expressionsrate im Vergleich zum bakteriellen System geringer war. Die Gesamtproteinmenge der rekombinanten Proteine im Rohextrakt betrug ca. 1/10 der Menge, die aus *E. coli* erhalten wurde. Die spezifische Aktivität der UGT73A4 im Rohextrakt betrug ca. 0,4 pkat/mg, die der UGT71F1 etwa 0,01 pkat/mg. Im Vergleich zu den in *E. coli* exprimierten Fusionsproteinen musste die Inkubationszeit für die Enzymtests auf 30 min verdoppelt werden. Das in Hefe exprimierte UGT73A4-Protein setzte Quercetin zu etwa 45 % um, die Bildung des Quercetin-7,4'-diglucosides wurde hier nicht detektiert (Abbildung 3.11A). Eine Verbesserung der Stabilität der UGT71F1 wurde nicht beobachtet, die Enzymaktivität war kaum nachweisbar (Abbildung 3.11B).

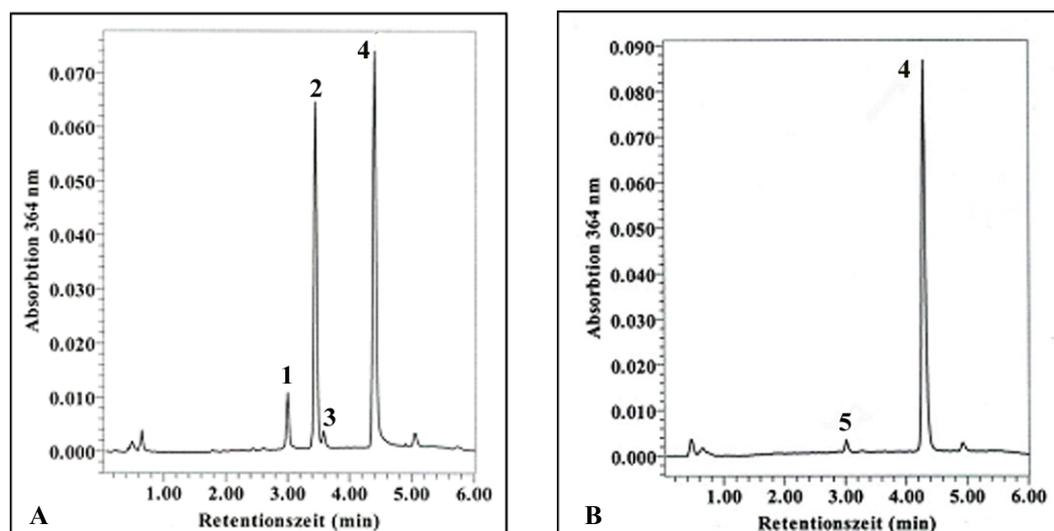


Abbildung 3.11 Repräsentative RP-HPLC-Chromatogramme der Umsetzung von Quercetin mit Rohextrakten aus *S. cerevisiae*. (A) UGT73A4 und (B) UGT71F1. Inkubation bei 30 °C für 30 min. Peakidentifizierung: 1: Quercetin-7-*O*-glucosid, 2: Quercetin-4'-*O*-glucosid, 3: Quercetin-3'-*O*-glucosid, 4: Quercetin, 5: Quercetin-3-*O*-glucosid. Detektion bei 364 nm.

SDS-PAGE-Analysen von Proteinrohextrakten aus nicht-transformierten Hefezellen sowie verschiedenen Induktionsansätzen der UGT73A4 und UGT71F1 liessen keinerlei Unterschiede zwischen Kontrolle und rekombinanten Proteinfractionen im Molekulargewichtsbereich von 50-60 kDa erkennen (Abbildung 3.12). Zudem wurden die beiden Enzyme im zur Verfügung stehenden pYes2-Vektorsystem nicht als His-Tag-Proteine exprimiert, so dass hier keine Detektion mittels Western-Blot möglich war.

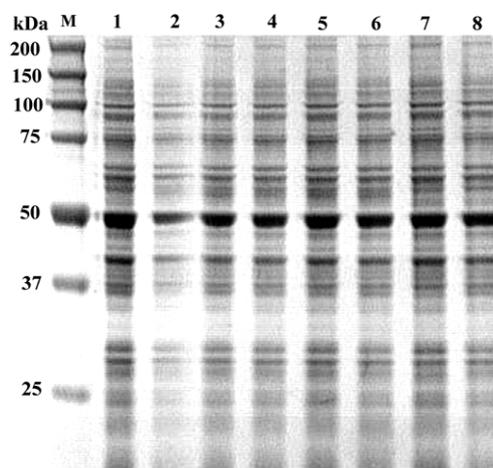


Abbildung 3.12 SDS-PAGE von Proteinrohextrakten aus *S. cerevisiae*. Auftragung: 1: *S. cerevisiae* mit leerem pYes2-Vektor transformiert. 2: pYes2-UGT73A4-1, 3: pYes2-UGT73A4-2, 4: pYes2-UGT73A4-3, 5: pYes2-UGT73A4-4, 6: pYes2-UGT71F1-1, 7: pYes2-UGT71F1-2, pYes2-UGT71F1-3.

3.3.2.2 Expression in Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*)

Zur heterologen Expression in Insektenzellen stand der pIB/V5-His-Vektor des Insect Select™ BSD-Systems (Invitrogen) zur Verfügung. Im Gegensatz zu dem herkömmlichen Protokoll des BAC-TO-BAC® Baculovirus Expression Systems (Life Technologies) sollte mit Hilfe dieses Vektors eine direkte Transfektion der Insektenzellen ohne vorhergehende Transfektion mit rekombinanten Viren erfolgen. Damit wurde der zeitliche Aufwand von der Transfektion bis zur Proteinexpression auf ca. 15 Tage reduziert. Klonierung, Transfektions- und Expressionsbedingungen sind unter 2.3.8 und 2.4.3 beschrieben. Obwohl beide cDNAs erfolgreich über entsprechende Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor kloniert wurden, konnte in diesem System für keines der beiden rekombinanten Enzyme Aktivität im Kulturmedium oder Zellysat detektiert werden. Nach SDS-PAGE-Auftrennung der erhaltenen Proteinrohextrakte waren im interessierenden Grössenbereich zwischen 50 und 60 kDa schwache Banden zu erkennen (nicht dargestellt). Die Western-Blot-Analyse mit einem Anti-His-Tag-Antikörper verlief negativ, was jedoch auf zu geringe Proteinmengen zurückzuführen sein kann. Es kann nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden, ob die nicht messbare Enzymaktivität eine Folge der Expression inaktiver Enzyme oder fehlende bzw. äußerst geringe Proteinexpression in diesem System ist. Möglich ist auch, dass die direkte Transfektion der Insektenzellen mit dem pIB/V5-His-Vektor nicht funktioniert hat.

Da die Expression der rekombinanten Enzyme in *S. cerevisiae* nicht besser war als in *E. coli* und die Kultivierung der Hefezellen insgesamt aufwendiger ist, erschien das prokaryontische System für die nachfolgende Reinigung und Charakterisierung der *B. vulgaris*-Enzyme am besten geeignet.

3.3.3 Reinigung der rekombinanten UGT73A4 aus *E. coli*

Ausgehend von 280-324 mg *E. coli*-Gesamtprotein wurde als erster Reinigungsschritt eine hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) an Phenylsepharose 4L-CB durchgeführt, die unter 2.5.4.2 näher erläutert ist. Der erfolgreiche Einsatz dieses Chromatographiematerials wurde zum Beispiel für die Reinigung einer Flavon-7-*O*-GT aus *Silene latifolia* beschrieben (Vellekoop et al., 1993). Ein charakteristisches Elutionsprofil dieses Reinigungsschrittes ist in der folgenden Abbildung 3.13A wiedergegeben. Die Enzymaktivität wurde anhand der Umsetzung von Quercetin (Que) zu Que-7,4'-*O*-diglucosid im Standard-Enzymtest (2.5.9) bestimmt, wie bereits erläutert (Abbildung 3.13B).

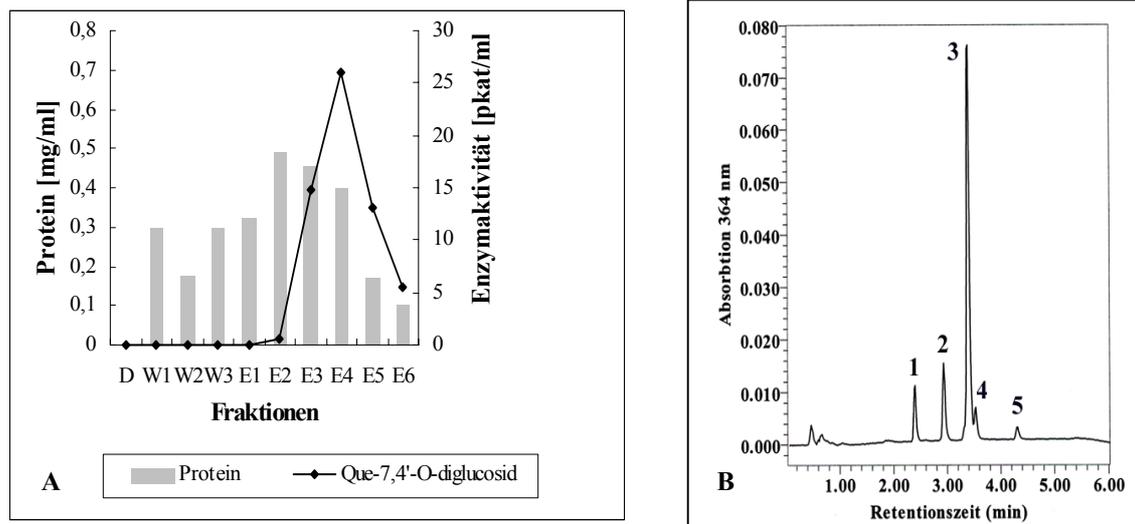


Abbildung 3.13A Elutions- und Aktivitätsprofil bezogen auf die Bildung von Quercetin-7,4'-*O*-diglucosid nach Chromatographie im Batchverfahren an Phenylsepharose 4L-CB. **B:** RP-HPLC-Chromatogramm der enzymatischen Umsetzung von Quercetin durch die rekombinante UGT73A4. Peakidentifizierung: 1: Quercetin-7,4'-*O*-diglucosid, 2: Quercetin-7-*O*-glucosid, 3: Quercetin-4'-*O*-glucosid, 4: Quercetin-3'-*O*-glucosid, 5: Quercetin. Detektion bei 364 nm.

Die UGT73A4-Aktivität eluierte zwischen einer Ammoniumsulfatkonzentration von 0,2 M (E2) bis 0 M (E3-E6) in 100 mM KPi-Puffer. Die aktivsten Fraktionen aus diesem Reinigungsschritt wurden vereinigt und im nächsten Schritt durch Metallaffinitätschromatographie (Talon-Matrix) weiter gereinigt. Das zugehörige Elutionsprofil geht aus Abbildung 3.14 hervor:

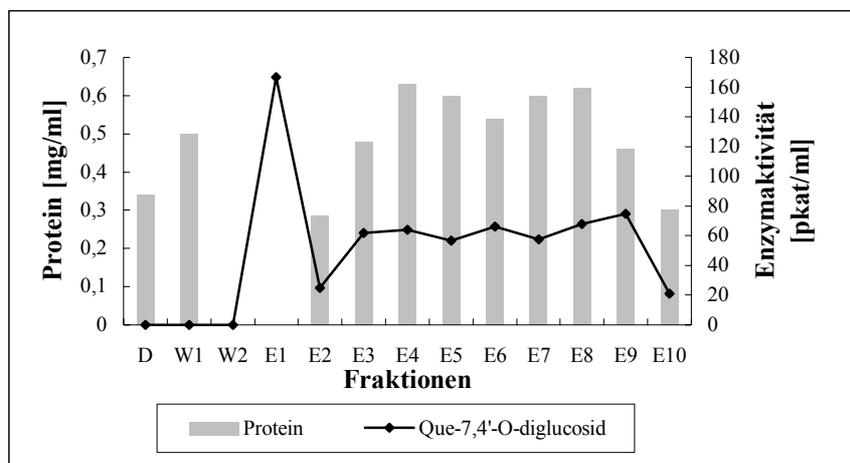


Abbildung 3.14 Elutions- und Aktivitätsprofil bezogen auf die Bildung von Quercetin-7,4'-*O*-diglucosid nach Metallaffinitätschromatographie.

Die spezifische Elution des rekombinanten 6x-His-Tag-UGT73A4-Proteins erfolgte hierbei durch Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 150-300 mM. Aus Abbildung 3.14 ist ersichtlich, dass das Protein über mehrere Fraktionen verteilt von der Säule eluierte. Die höchste spezifische Aktivität wurde in der ersten Elutionsfraktion gemessen, wobei die Proteinkonzentration unterhalb des Detektionsbereichs der Bradford-Bestimmung lag. Um eine weitere Anreicherung des rekombinanten Proteins und Abtrennung noch vorhandener Verunreinigungen zu erreichen, wurde als letzter Schritt erneut eine hydrophobe Interaktionschromatographie an einer 1 ml-Phenylsepharose HP-Säule durchgeführt. Dieser Reinigungsschritt erfolgte mit Hilfe eines FPLC-Systems der Firma Amersham Pharmacia. Dazu wurden die aktivsten Fraktionen aus der Metallaffinitätsreinigung vereinigt und durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat auf eine Endkonzentration von 1,3 M eingestellt. Das rekombinante Protein eluierte in zwei Fraktionen E8 und E9 bei einer Konzentration von 400 bis 300 mM Ammoniumsulfat, wie dem zugehörigen Elutionsprofil in Abbildung 3.15 entnommen werden kann:

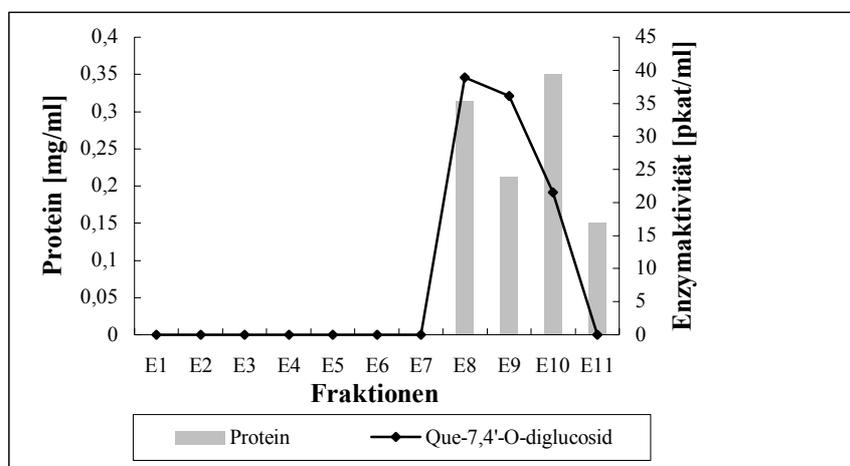


Abbildung 3.15 Elutions- und Aktivitätsprofil bezogen auf die Bildung von Quercetin-7,4'-O-diglucosid nach hydrophober Interaktionschromatographie an Phenylsepharose HP.

Eine weitere Aufreinigung der rekombinanten UGT73A4 mittels Ionenaustauschchromatographie an Mono Q oder Gelfiltration über eine HiLoadTM 16/60 Superdex 75 Säule gelang nicht. Eine Farbstoffliganden-Chromatographie an Reactive-Yellow-3 oder Cibacron Blue 3GATM (2.5.4.3) erwies sich ebenfalls als ungeeignet, da die rekombinante UGT73A4 unter den gewählten Bedingungen nicht an die Affinitätsmatrix gebunden wurde. Zur Überprüfung der Reinigungssequenz wurden repräsentative Fraktionen der einzelnen Reinigungsschritte nach Bestimmung der Enzymaktivität mittels SDS-PAGE und Western-Blot auf das Vorhandensein des rekombinanten UGT73A4-Fusionsproteins (berechnetes Molekulargewicht: 55,14 kDa inklusive 6x-His-Tag) untersucht. Im Molekulargewichtsbereich zwischen 60 und 75 kDa ist mit zunehmendem Reinigungsgrad die Anreicherung einer Bande erkennbar, wenn auch keine vollständige Abtrennung aller Verunreinigungen gelingt (Abbildung 3.16A). Die zugehörige Western-Blot-Analyse (Abbildung 3.16B) bestätigt die Anwesenheit eines 6x-His-Tag Fusionsproteins in den einzelnen aufgetragenen Fraktionen. Eine schwache Bande für das rekombinante Protein ist bereits im bakteriellen Proteinrohextrakt (Spur 1) erkennbar, während in den als Kontrollen mitgeführten Spuren 2 und 3 kein Signal detektierbar ist. Eine schwächere Bande tritt in den vereinigten Fraktionen nach dem ersten Chromatographieschritt auf. Die stärksten Signale in den Spuren 7 und 9 korrelieren mit den Fraktionen aus der Talon- bzw. der zweiten Phenylsepharosesäule mit der höchsten Enzymaktivität.

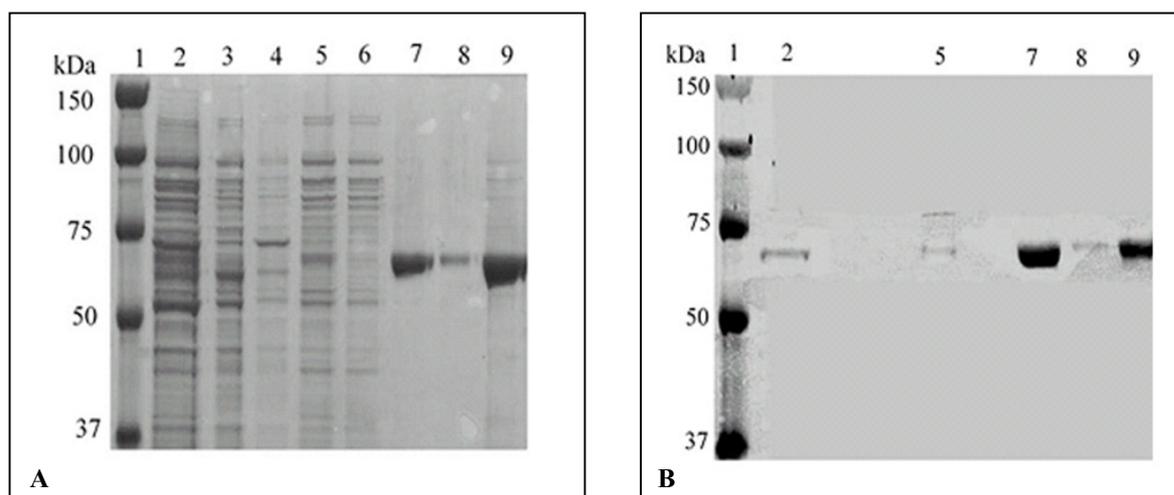


Abbildung 3.16A SDS-PAGE repräsentativer Fraktionen der Aufreinigung der rekombinanten UGT73A4 durch Kombination von hydrophober Interaktions- und Metallaffinitätschromatographie. 1: Molekulargewichtsmarker, 2: Proteinrohextrakt, 3: Proteinrohextrakt aus Bakterien, die mit leerem Vektor transformiert wurden, 4: Proteinrohextrakt aus nicht-transformierten M15p[Rep4]-Zellen, 5: aktivste Fraktionen nach Phenylsepharose 4L-CB, 6: Durchfluss der Talonsäule, 7+8: aktivste Fraktionen aus der Talonsäule (100 % bzw. 80 % Enzymaktivität), 9: aktivste Fraktion aus der Phenylsepharose-HP-Säule (100 % Aktivität). **B:** Western-Blot-Analyse der Aufreinigung des rekombinanten 6x His-Tag-UGT73A4-Fusionsproteins. Beladung wie in Abbildung 3.16A. Blot auf Nitrocellulose-Membran. Primärantikörper: Anti-His-Tag-AK (1:2000); Sekundär-AK: Anti-Maus-IgG₁-AP-Konjugat (1:5000).

Die Reinigungsstrategie ist in Tabelle 3.3 nochmals zusammengefasst. Durch Metallaffinitätschromatographie wurde eine 34-fache Anreicherung erreicht, während sich die spezifische Aktivität im Vergleich zum vorhergehenden Schritt auf 231,5 pkat/mg erhöhte. Obwohl durch den ersten Chromatographieschritt keine Anreicherung des Proteins erzielt wurde, war er dennoch zwingend notwendig, da das Protein ansonsten nicht an die Talon-Affinitätsmatrix absorbierte. Die abschliessende hydrophobe Interaktionschromatographie bewirkte keine weitere Abtrennung von Verunreinigungen, und führte zu einem Verlust an rekombinantem Protein.

Tabelle 3.3 Reinigungsschema für die UGT73A4 aus *B. vulgaris*.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Gesamtaktivität (pkat)	Spezifische Aktivität (pkat/mg)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor
Rohextrakt nach Ammoniumsulfatfällung	324	2240	6,9	100	1
Phenylsepharose 4L-CB	98	850	8,6	38	1
Talonsäule	2,7	625	231,5	28	34
Phenylsepharose HP	0,9	179	198,9	8	29

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die rekombinante UGT73A4 in *E. coli* löslich exprimiert und mit den gewählten Methoden fast bis zur Homogenität gereinigt werden kann. Bei einer Ausbeute von ca. 0,2 mg/l Bakterienkultur oder 0,06 % des bakteriellen Gesamtproteins ist die Ausbeute an rekombinantem Enzym jedoch gering, so dass nicht von einer Überexpression in diesem System gesprochen werden kann.

3.3.4 Partielle Reinigung der UGT71F1 aus *E. coli*

Der pDest24-UGT71F1-Klon wurde als C-terminales GST-Tag-Fusionsprotein im *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3)-RP-Stamm exprimiert und durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose teilgereinigt wie unter 2.4.1.3 und 2.5.4.6 erläutert. Nach Bindung des Proteins an GST-Agarose erfolgte die Elution mit 10 mM Glutathion, wobei sich das in Abbildung 3.17A dargestellte Elutionsprofil ergab. Die Enzymaktivität in den einzelnen Fraktionen wurde anhand der Umsetzung von Quercetin zu Quercetin-3-glucosid bestimmt (Abbildung 3.17B). Der Großteil des Proteins interagiert nicht mit dem Säulenmaterial, sondern wurde im Durchfluss detektiert. Die Hauptaktivität der UGT71F1 wurde hingegen in den Elutionsfraktionen E3 und E4 gemessen.

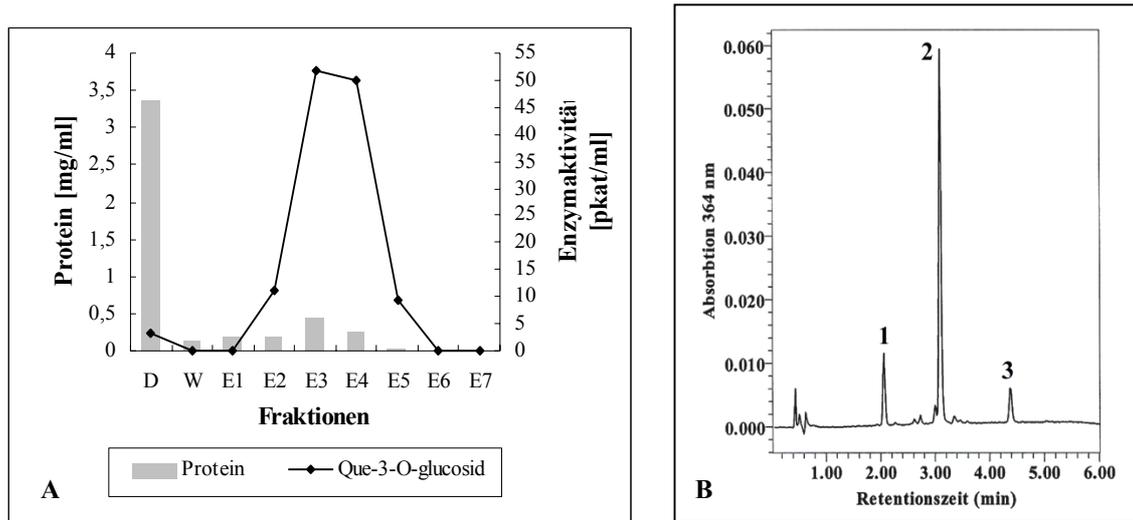


Abbildung 3.17A Elutions- und Aktivitätsprofil bezogen auf die Bildung von Quercetin-3-*O*-glucosid nach Affinitätsreinigung der UGT71F1 an Glutathion-Agarose. **B**: RP-HPLC-Chromatogramm der enzymatischen Umsetzung von Quercetin durch die rekombinante UGT71F1. Peakidentifizierung: 1: Quercetin-3,7-*O*-diglucosid, 2: Quercetin-3-*O*-glucosid, 3: Quercetin. Detektion bei 364 nm.

SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse repräsentativer Reinigungsfraktionen der UGT71F1 gehen aus der folgenden Abbildung 3.18A und B hervor:

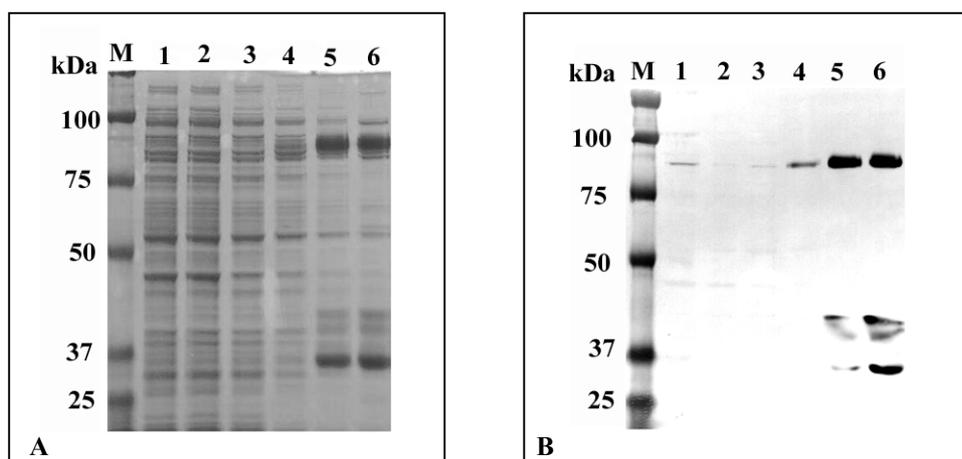


Abbildung 3.18A SDS-PAGE der partiellen Reinigung der rekombinanten UGT71F1 an GST-Agarose. M: Molekulargewichtsmarker, 1: bakterieller Proteinrohextrakt, 2: Durchfluss der GST-Säule, 3: Waschfraktion der GST-Säule, 4: Elutionsfraktion mit 20 % UGT71F1-Aktivität, 5+6: Elutionsfraktionen mit je 90 % UGT71F1-Aktivität. **B**: Western-Blot-Analyse der partiellen Reinigung der UGT71F1 an GST-Agarose. Auftragung der Fraktionen wie in Abbildung 3.18A. Blot auf Nitrocellulosemembran. Primärantikörper: Anti-GST-Tag-AK (1:5000); Sekundär-AK: Anti-Maus-IgG₁-AP-Konjugat (1:10.000).

Der Western-Blot bestätigte die Existenz eines GST-Tag Fusionsproteins (MG: ~78,8 kDa) in denjenigen Fraktionen, in denen UGT71F1-Enzymaktivität gemessen wurde. Aus der abgebildeten SDS-PAGE ist ersichtlich, dass durch die Affinitätschromatographie nur eine partielle Reinigung der UGT71F1 erzielt wurde. Die Anreicherung des GST-Tag-Fusionsproteins wird anhand der Immunfärbung deutlich, während im Rohextrakt (Spur 1) nur ein schwaches Signal detektierbar ist, nimmt die Intensität in den Spuren, welche die Fraktionen mit der höchsten Enzymaktivität repräsentieren (Spuren 5 und 6) zu. Die in Abbildung 3.18B erkennbare Bande bei ca. 30 kDa wurde mittels MALDI-TOF-MS (0) als GST-Tag-Protein identifiziert, so dass es sich wahrscheinlich um ein Degradationsprodukt handelt.

Tabelle 3.4 gibt das Reinigungsprotokoll für die UGT71F1 wieder. Die Anreinigung des rekombinanten Enzyms durch Chromatographie an GST-Agarose führte im Vergleich zum bakteriellen Rohextrakt zu einer 71-fachen Erhöhung der spezifischen Aktivität auf 57 pkat/mg Protein. Weitere chromatographische Schritte, z. B. Ionenaustausch- oder Farbstoffliganden-chromatographie, bewirkten keine Erhöhung des Reinigungsgrades. Stattdessen wurde ein vollständiger Aktivitätsverlust der UGT71F1 beobachtet.

Tabelle 3.4 Schema für die Teilreinigung der UGT71F1 aus *B. vulgaris*.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Gesamtaktivität (pkat)	Spezifische Aktivität (pkat/mg)	Ausbeute (%)	Reinigungsfaktor
Rohextrakt nach Protaminsulfatfällung	245	190	0,8	100	1
GST-Säule	1,8	102	57	54	71

3.3.5 Stabilität der gereinigten Proteine

Wie sich bereits anhand der partiellen Reinigungsdaten vermuten lässt, zeigten sich bezüglich der Stabilität beider Proteine gravierende Unterschiede. Die UGT73A4 liess sich sowohl im Kühlschrank als auch bei -20 °C bzw. -80 °C ohne Zusatz von Stabilisatoren wie BSA oder Glycerol mehr als 6 Monate lagern, ohne dass ein signifikanter Aktivitätsverlust zu beobachten gewesen wäre. Die Halbwertszeit der UGT71F1 bei 4 °C betrug ca. 24 h, ein Einfrieren des Proteins war selbst unter Zusatz von BSA oder Glycerol nicht möglich und hatte einen irreversiblen Aktivitätsverlust zur Folge. Diese Tatsache machte die weitere biochemische Charakterisierung des Enzyms und die Bestimmung enzymkinetischer Parameter schwierig. Die Sensitivität beider Enzyme gegenüber Verdünnung war ebenfalls unterschiedlich. Beide Enzyme zeigten rapide Aktivitätsverluste infolge einer Verringerung der Proteinkonzentration (< 0,3 mg/ml). Im Falle der UGT71F1 war dies irreversibel, die Aktivität der UGT73A4 konnte hingegen durch Konzentrierung wiederhergestellt werden. Dieses Verhalten könnte auf eine di- bzw. oligomere Struktur des Proteins zurückzuführen sein und wurde deshalb mit Hilfe einer analytischen Ultrazentrifugation genauer untersucht, die in Abschnitt 3.4.9 erläutert ist.

3.4 Biochemische Charakterisierung der UGT73A4 und UGT71F1

3.4.1 Ermittlung der Substratspezifität

Alle Studien zur weiteren Charakterisierung der Enzyme wurden mit teilgereinigten Proteinfractionen nach Affinitätschromatographie an Talonmatrix bzw. Glutathion-Agarose durchgeführt. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu den Betanidin-UGTs aus *D. bellidiformis* wurden beide *B. vulgaris*-Enzyme auch auf ihre katalytische Aktivität gegenüber Betanidin hin untersucht.

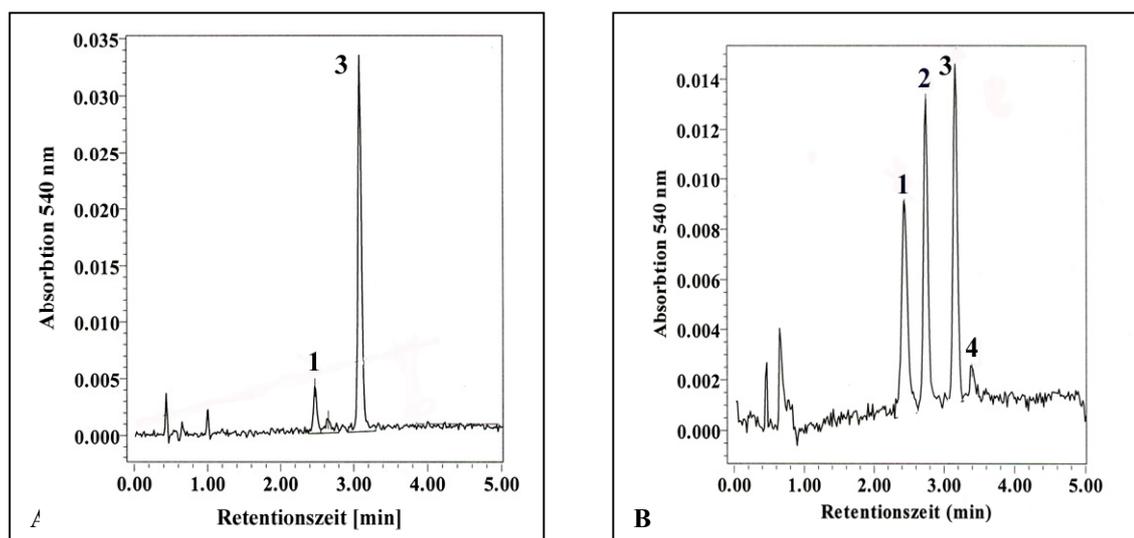


Abbildung 3.19 Repräsentatives RP-HPLC-Chromatogramm nach Enzymtest mit teilgereinigter UGT73A4 und Betanidin als Substrat **A**: unmittelbar nach der Reinigung; **B**: nach fünfmonatiger Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Peak-identifizierung: 1: Betanin, 2: Isobetandin, 3: Betanidin, 4: Isobetandin. Detektion bei 540 nm.

Die Analyse der Aktivitätstest mit der UGT73A4 ergab, dass Betanidin als Substrat akzeptiert (Abbildung 3.19A) wurde, obwohl der Umsatz *in vitro* im Vergleich zur UGT73A5 aus *D. bellidiformis* äußerst gering war. Ein unerwarteter Effekt wurde nach fünfmonatiger Lagerung des gereinigten Proteins bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ beobachtet als eine hochaktive Fraktion (Spur 9 in Abbildung 3.16) nochmals mit Betanidin als Substrat getestet wurde. Unter diesen Bedingungen war der Substratumsatz höher als beim Test unmittelbar nach der Reinigung (Abbildung 3.19B), wobei jedoch nicht nur Betanin (Betanidin-5-*O*- β -glucosid) sondern auch Isobetandin als Reaktionsprodukt identifiziert wurde. Hinsichtlich der Umsetzung des Quercetins wurden unter diesen Bedingungen keine Veränderungen beobachtet. Eine Erklärung für diese Beobachtungen gibt es zum jetzigen Zeitpunkt nicht.

Die rekombinante UGT71F1 katalysierte nicht nur die Bildung von Gomphrenin I (Betanidin-6-*O*- β -glucosid), sondern auch die Synthese von Betanin (Abbildung 3.20). Im Gegensatz zu den Betanidin-UGTs aus *D. bellidiformis* ist folglich für beide *B. vulgaris*-Enzyme *in vitro* eine signifikant geringere Affinität und Regiospezifität gegenüber Betanidin zu verzeichnen. Mögliche Erklärungsansätze werden im Ergebnisteil unter 3.8.2 in Zusammenhang mit den Modellierungsstudien erläutert.

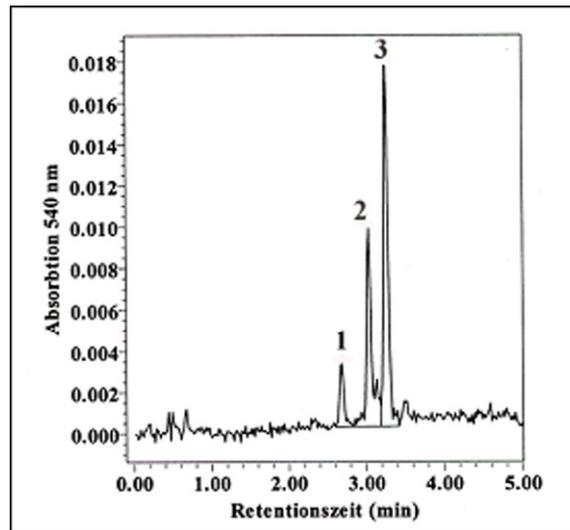


Abbildung 3.20 Repräsentatives RP-HPLC-Chromatogramm nach Enzymtest mit teilgereinigter UGT71F1 und Betanidin als Substrat. Peakidentifizierung: 1: Betanin, 2: Gomphrenin I, 3: Betanidin. Detektion bei 540 nm.

Die biochemische Charakterisierung der UGT73A5 und UGT71F2 aus *D. bellidiformis* zeigte, dass diese neben Betanidin und Quercetin auch spezifisch unterschiedliche Flavonoide glucosidieren (Vogt et al., 1997). Aus diesem Grunde wurden beide Enzyme aus *B. vulgaris* nicht nur, wie bereits beschrieben, mit Quercetin, sondern auch mit diversen anderen Flavonoiden getestet. Repräsentative RP-HPLC-Chromatogramme für die Umsetzung des Flavonols Quercetin durch beide Enzyme wurden bereits in den Abschnitten 3.3.3 und 3.3.4 abgebildet. Die Ergebnisse der Enzymaktivitätstests, die für beide Enzyme mit der jeweils gleichen Proteinpräparation durchgeführt wurden, sind in Abbildung 3.21 graphisch dargestellt. Die Strukturen aller getesteten Substrate, ausser Betanidin (Abbildung 1.4), sind in Abbildung 3.22 veranschaulicht. Die Produkte wurden durch Vergleich mit authentischen Standards und anhand ihrer Absorptionsspektren identifiziert. Die in Abbildung 3.21 angegebenen relativen Enzymaktivitäten dienen dazu festzustellen, welche Verbindungen überhaupt als Substrate akzeptiert wurden, lassen aber keine Rückschlüsse auf Substratspezifitäten bzw. kinetische Konstanten zu. Diese wurden für Quercetin, Apigenin und Betanidin genauer bestimmt (3.4.7).

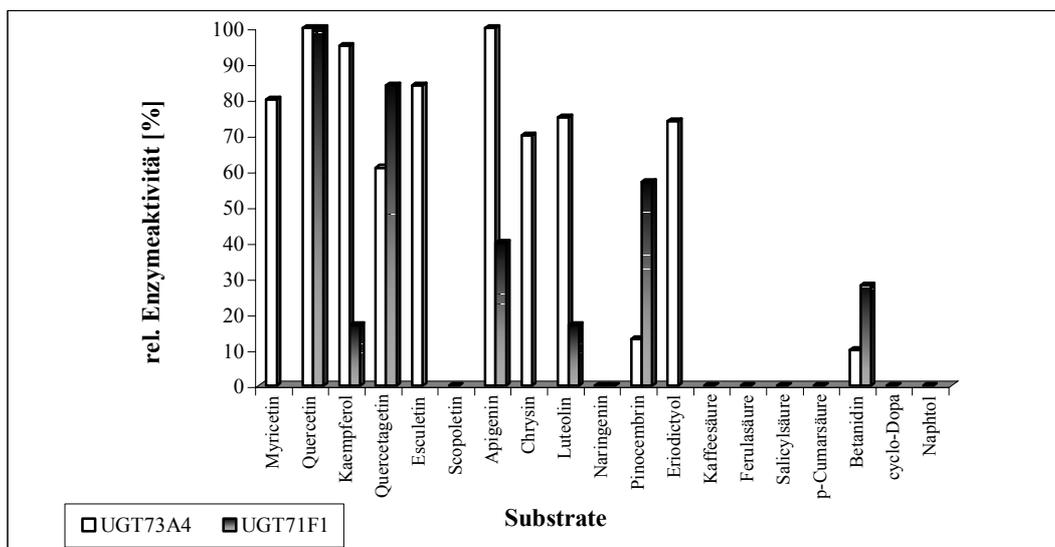


Abbildung 3.21 Rel. Enzymaktivitäten [%] der UGT73A4 und UGT71F1 gegenüber verschiedenen Substraten, die mit einer Endkonzentration von 20 μM eingesetzt wurden. Enzymtests: a) UGT73A4: 3,4 μg teilgereinigtes

Protein, 30 °C, 10 min. b) UGT71F1: 13,4 µg Protein; 30 °C, 20 min. 100 % entsprechen dem Umsatz von 1 nmol Substrat im gegebenen Inkubationszeitraum.

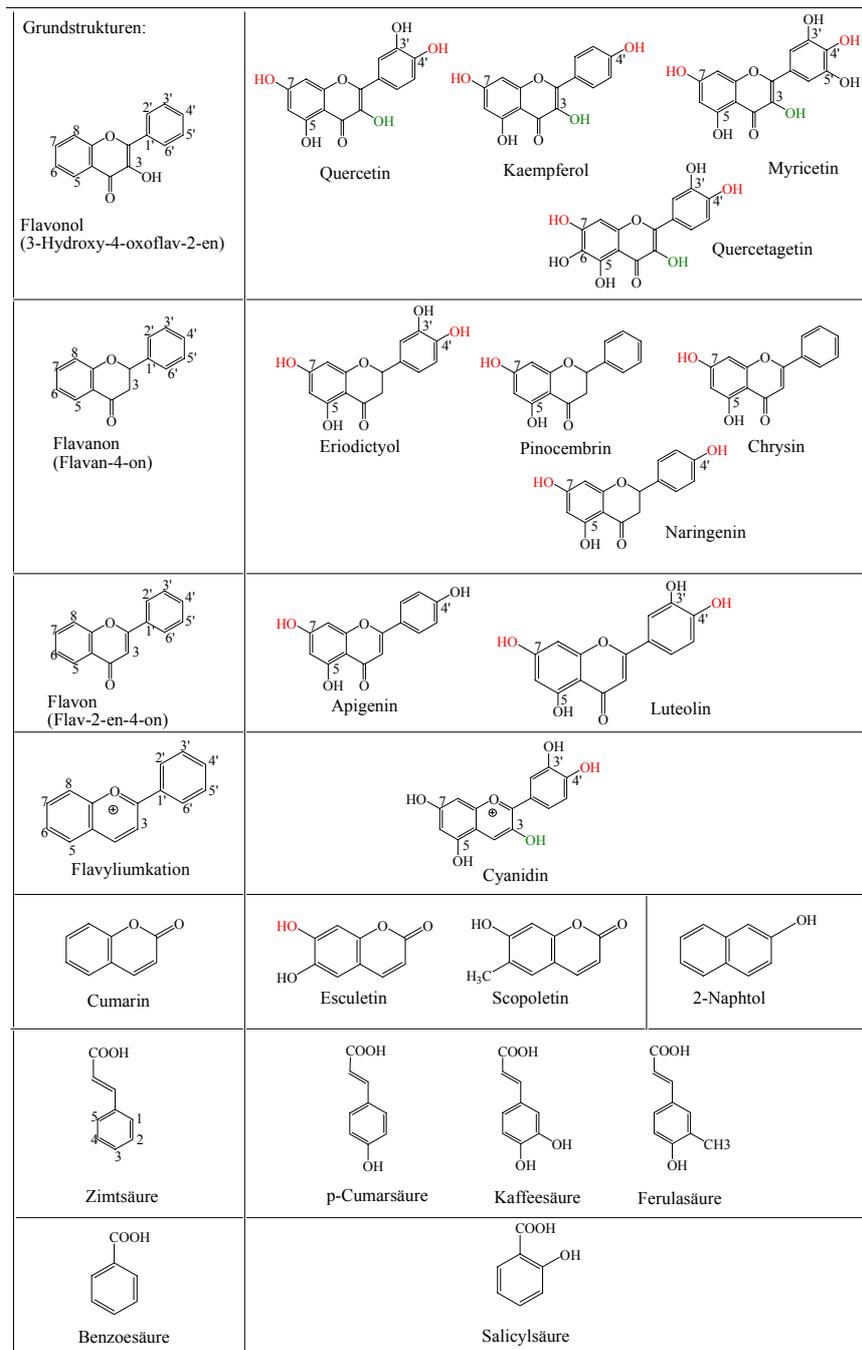


Abbildung 3.22 Strukturen der mit UGT73A4 bzw. UGT71F1 getesteten Substrate (ausser Betanidin). In den als Substrat akzeptierten Strukturen sind die bevorzugten Positionen der Glucosidierung für die UGT73A4 mit rot und für die UGT71F1 mit grün gekennzeichnet.

Die als Substrat akzeptierten Flavonoide wurden im Gegensatz zu Betanidin streng regiospezifisch glucosidiert. Die UGT73A4 übertrug Glucose ausschließlich auf die 3',4'- bzw. 7-OH-Gruppe, während die UGT71F1 den Zuckertransfer auf die 3-OH bzw. in geringerem Ausmass auch auf die 7-OH-Gruppe katalysierte. Das Cumarin Scopoletin sowie alle getesteten Zimtsäurederivate und Salicylsäure wurden nicht umgesetzt. Beide *B. vulgaris*-UGTs zeichneten sich durch eine ausgeprägte Spezifität für UDP-Glucose als Zucker-Donator aus. Weder ADP- und CDP-Glucose noch UDP-Galactose wurden akzeptiert. UDP-Rhamnose wurde im Rahmen dieser Untersuchungen nicht getestet, da diese enzymatisch hätte hergestellt werden müssen (Kamsteg et al., 1979; Bar-Peled et al., 1991; Jones et al., 2003).

3.4.2 Protein- und Zeitlinearität der Glucosyltransferase-Reaktion

Die Bestimmung der Protein- und Zeitlinearität der enzymatischen Aktivität der teilgereinigten Proteine erfolgte bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen bzw. variierenden Inkubationszeiten bei 30 °C. Die abgebildeten Daten repräsentieren Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen.

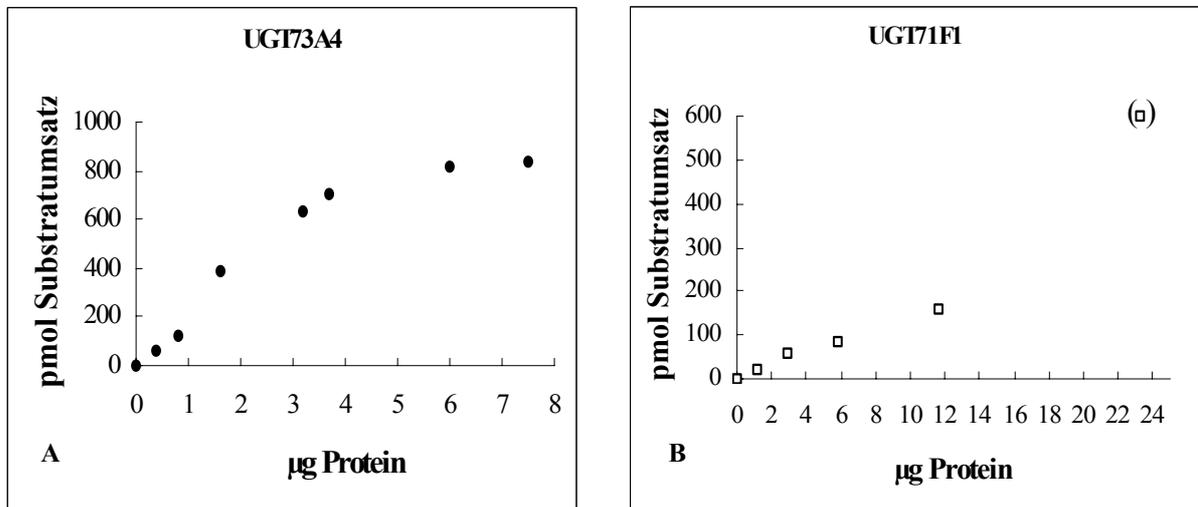


Abbildung 3.23 Abhängigkeit der Enzymaktivität der (A) UGT73A4 und (B) UGT71F1 von der Proteinkonzentration im Reaktionsansatz. Inkubation bei 30 °C für 2 min (A) und 10 min (B) mit 1 nmol Quercetin und 100 nmol UDP-Glucose.

Der Umsatz von Quercetin verlief für die UGT73A4 im untersuchten Bereich von 0,4-3,7 µg Protein linear, die entsprechende Reaktion für die UGT71F1 zwischen 1,2 und 12 µg Protein. Die Zeitlinearität wurde im Enzymtest bei konstanter Proteinkonzentration über einen Zeitraum von 0-30 min für die UGT73A4 und 0-60 min für die UGT71F1 bestimmt. Wie aus Abbildung 3.24 ersichtlich, war die Umsetzung von Quercetin im Falle der UGT73A4 (A) bis 20 min zeitlinear, während für die UGT71F1 (B) über den gesamten Messzeitraum Linearität beobachtet wurde.

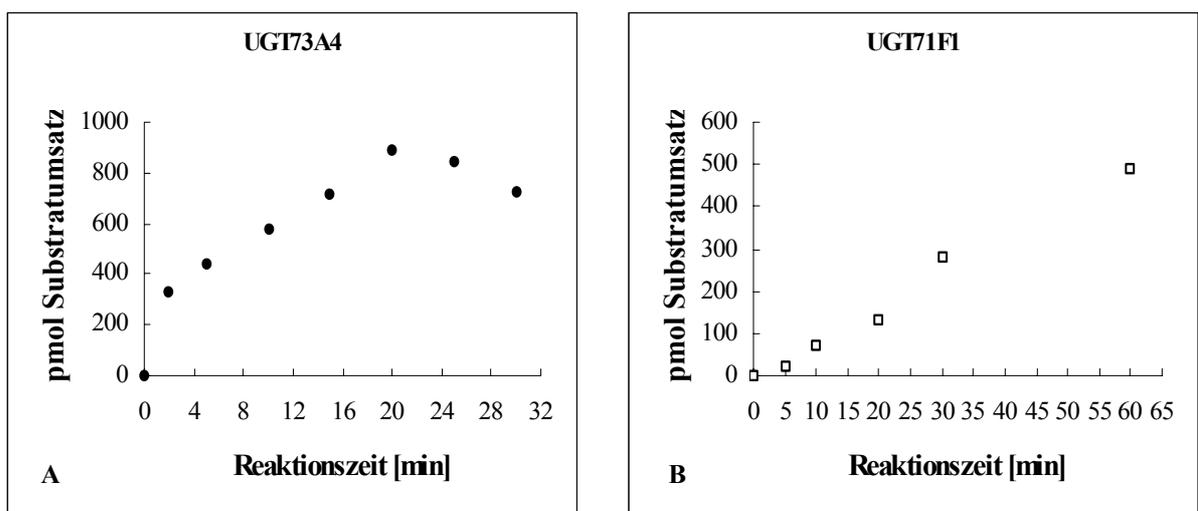


Abbildung 3.24 Abhängigkeit der Enzymaktivität der (A) UGT73A4 und (B) UGT71F1 von der Reaktionszeit. Inkubation bei 30 °C mit 1 nmol Quercetin und 100 nmol UDP-Glucose.

3.4.3 Bestimmung des Temperaturmaximums und der Aktivierungsenergie

Die Abhängigkeit der Aktivität beider Enzyme von der Temperatur wurde im Standard-Enzymtest durch Variation der Temperatur im Bereich von 0-50 °C ermittelt.

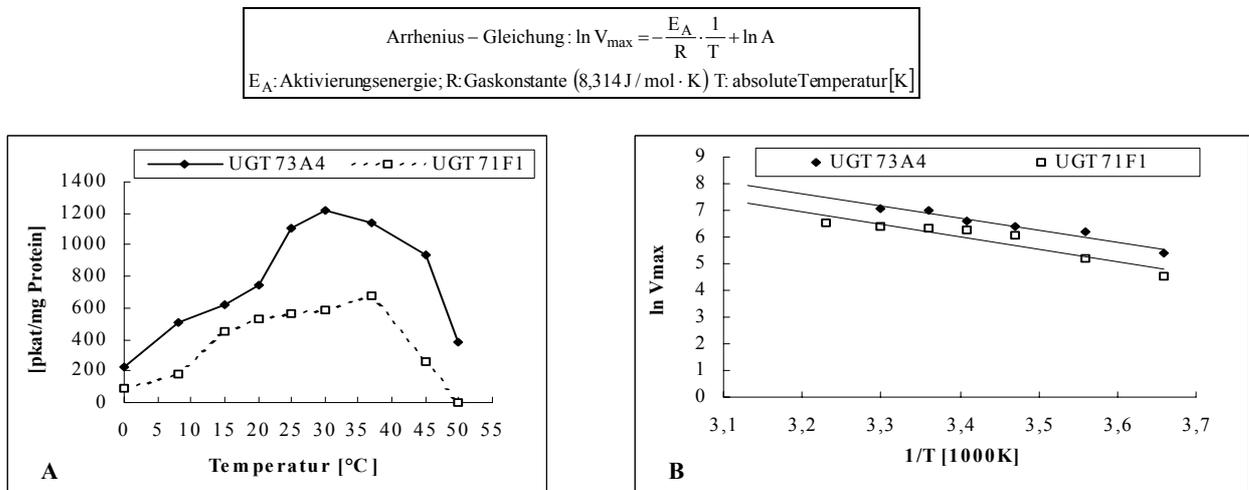


Abbildung 3.25 A: Enzymaktivität der *B. vulgaris*-UGTs in Abhängigkeit von der Temperatur. **B:** Arrhenius-Plots. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Für die rekombinante UGT73A4 konnte im gesamten untersuchten Temperaturbereich Aktivität gemessen werden, wobei das Temperaturmaximum bei 30 °C lag. Die rekombinante UGT71F1 zeigte einen ähnlich breiten Aktivitätsbereich, wurde allerdings bei 50 °C inaktiviert. Das zugehörige Temperaturmaximum lag bei 37 °C (Abbildung 3.25A). Mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung und den dargestellten Arrhenius-Plots (Abbildung 3.25B) wurde die Aktivierungsenergie für die Glucosyltransferasereaktion bestimmt. Die ermittelten Werte betragen für die UGT73A4 37,6 kJ/mol und für die UGT71F1 38,8 kJ/mol. Auf diesen Aspekt wird im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus der Homologie-Modellierung und den semiempirischen Berechnungen nochmals eingegangen.

3.4.4 Bestimmung der pH-Optima

Die Bestimmung der pH-Optima für beide Enzyme erfolgte bei 30 °C im Bereich von pH 4-9,5 (UGT73A4) und pH 4-10 (UGT71F1) unter Verwendung eines Drei-Komponenten-Puffersystems, das eine konstante Ionenstärke gewährleistet (Ellis & Morrison, 1982). Für die UGT73A4 konnte Enzymaktivität im pH-Bereich von 5,0-8,5 gemessen werden, die höchste Aktivität wurde bei pH 6,0 detektiert. Die UGT71F1 war ebenfalls in einem breiten pH-Bereich von 4,5-9,5 aktiv. Hier sollte im Rahmen zukünftiger Arbeiten noch eine Feinbestimmung durchgeführt werden.

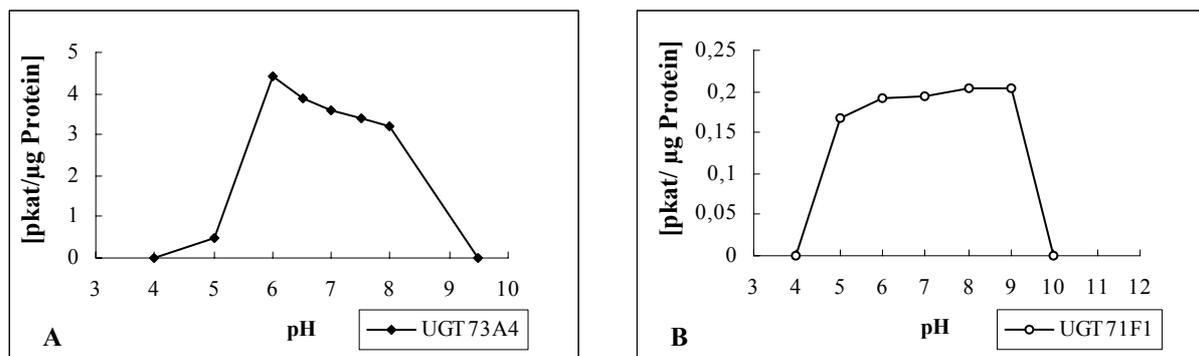


Abbildung 3.26 pH-Abhängigkeit der Glucosyltransferasereaktion.

3.4.5 Inhibitionsstudien mit spezifischen Aminosäure-modifizierenden Reagenzien

Beide rekombinanten Enzyme wurden mit variierenden Konzentrationen Aminosäure modifizierender Reagenzien getestet, um Hinweise auf katalytisch wichtige Aminosäuren zu erhalten: 4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonsäure (DIDS) interagiert mit ϵ -NH₂-Gruppen von Lysinresten, während *p*-Chlormercuribenzoehsulfonsäure (PCMBS) auf freie Thiolgruppen von Cysteinresten wirkt. Diethylpyrocarbonat (DEPC) bewirkt die chemische Modifizierung von Histidinresten, Phenylglyoxal (PG) modifiziert Argininreste. Die rekombinanten Enzyme wurden für 10 min mit dem jeweiligen Reagenz vorinkubiert und anschließend ein Glucosyltransferase-Standard-Enzymtest (2.5.9) durchgeführt. Tabelle 3.5 fasst die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammen.

Tabelle 3.5 Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen Aminosäure-modifizierender Reagenzien auf die Aktivität der UGT73A4 und UGT71F1. Die angegebenen Konzentrationen bewirkten eine 100%ige Hemmung. Die Daten repräsentieren Resultate aus drei unabhängigen Experimenten.

Reagenz	UGT73A4	UGT71F1
PCMBS	10 μ M	10 μ M
DIDS	10 μ M	20 μ M
DEPC	1000 μ M	10 μ M-1 mM kein Effekt
PG	10 μ M-1 mM kein Effekt	10 μ M-1 mM kein Effekt

Während beide Enzyme durch vergleichbare Konzentrationen von PCMBS bzw. DIDS vollständig gehemmt wurden (10 μ M bzw. 20 μ M), war die Sensitivität gegenüber DEPC signifikant verschieden. UGT73A4 wurde ab einer Konzentration von 1 mM DEPC inaktiviert, wohingegen im Bereich von 10 μ M-1mM DEPC keinerlei Effekt auf die UGT71F1 festgestellt wurde. Phenylglyoxal hatte auf beide Enzyme im getesteten Konzentrationsbereich keine inhibierende Wirkung. Diese Experimente deuten darauf hin, dass sowohl Cystein- und Lysin- als auch Histidinreste im Falle der UGT73A4 eine Rolle für die katalytische Aktivität spielen.

3.4.6 Einfluss von Kationen und EDTA auf die Enzymaktivität der UGT73A4

Zur Bestimmung des Effektes von EDTA und divalenten Kationen auf die Aktivität der UGT73A4 wurde der Standard-Enzymtest durch folgende Zusätze variiert:

Tabelle 3.6 Rel. Enzymaktivität [%] der UGT73A4 in Gegenwart von divalenten Kationen und EDTA.

Substanz	10 μ M	100 μ M	1 mM
Ca ²⁺	100 %	100 %	100 %
Mg ²⁺	100 %	100 %	100 %
Mn ²⁺	100 %	100 %	100 %
Zn ²⁺	100 %	0 %	0 %
Cu ²⁺	< 10 %	0 %	0 %
EDTA	100 %	100 %	100 %

Von den getesteten divalenten Kationen zeigten nur Kupfer- und Zinkionen einen inhibierenden Effekt auf die UGT73A4. Der inhibitorische Effekt dieser Kationen auf Glycosyltransferasen ist aus der Literatur bekannt (Heller & Forkmann, 1988) und auch bei den UGTs aus *D. bellidiformis* beobachtet worden. Die Enzymaktivität blieb durch EDTA in den getesteten Konzentrationen unbeeinflusst. Für die UGT71F1 konnte aufgrund zu geringer Proteinmengen lediglich die Wirkung von EDTA getestet werden, wobei keine Beeinflussung der Enzymaktivität erkennbar war.

3.4.7 Bestimmung kinetischer Konstanten

Die Affinitäten beider klonierter Enzyme gegenüber Betanidin, Quercetin und Apigenin wurde durch Variation der Substratkonzentration bei jeweils konstanter Konzentration an UDP-Glucose ermittelt. Tabelle 3.7 fasst die enzymkinetischen Parameter für beide Enzyme zusammen. Die Affinität gegenüber UDP-Glucose wurde nur für die UGT73A4 mit Hilfe des Florini-Vestling-Plots ermittelt. Diese Methode wird dann verwendet, wenn mit dem zweiten Substrat nicht im Sättigungsbereich gearbeitet werden kann. (Florini & Vestling, 1957; Schellenberger, 1989). Die Bestimmung der Initialgeschwindigkeit des Enzyms bei variierenden Konzentrationen des ersten Substrates für verschiedene, festliegende Konzentrationen des zweiten Substrates erlaubt in der linearisierten Darstellung des Lineweaver-Burk-Plots Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus. Für die UGT73A4 ergab sich eine Kurvenschar mit einem Schnittpunkt unterhalb der X-Achse (nicht dargestellt). Dies deutet auf einen sequentiellen Mechanismus und eine Abhängigkeit des K_M -Wertes von der Konzentration des zweiten Substrates hin: Mit steigender Konzentration des zweiten Substrates wird der K_M -Wert grösser, d.h. die Affinität des Enzyms nimmt ab (Bisswanger, 1979). Für UDP-Glucose mit Quercetin als zweitem Substrat wurde mit dieser Methode ein K_M -Wert von 99 μM bestimmt. Die eigentliche Sequenz der Enzymreaktion kann nicht abgeleitet werden, da hierzu Produkt-Inhibitions-Studien notwendig wären. Für die UGT71F1 wurde aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Proteinmengen und der Instabilität des Enzyms keine analoge Untersuchung durchgeführt.

Tabelle 3.7 Enzymkinetische Parameter der partiell gereinigten UGT73A4 und UGT71F1 für die Substrate Quercetin, Apigenin und Betanidin. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Zur Bestimmung der Effizienz wurde der V_{max}/K_M -Wert für Quercetin jeweils als 100 % gesetzt.

Substrat	K_M [μM]	V_{max} [pkat/ μg]	V_{max}/K_M [pkat/ $\mu\text{g}\cdot\mu\text{M}$]	Effizienz
UGT73A4:				
Quercetin	11,0	16,4	1,5	100 %
Apigenin	19,2	12,8	0,7	47 %
Betanidin	333	0,2	$6,0\cdot 10^{-4}$	0,04 %
UGT71F1:				
Quercetin	2,4	0,7	0,3	100 %
Apigenin	26,8	0,1	$3,4\cdot 10^{-3}$	1,1 %
Betanidin	29	0,03	$1,0\cdot 10^{-3}$	0,3 %

Die Konzentration der getesteten Flavonoide konnte nur im Bereich von 5-30 μM (Quercetin) und 5-40 μM (Apigenin) variiert werden. Oberhalb dieses Limits ist eine Inhibierung der Enzymaktivität zu beobachten. Von tierischen Systemen ist bekannt, dass Flavonoide aufgrund ihrer Affinität zu Proteinen starke Enzyminhibitoren sein können, so hemmt Quercetin z. B. die ATPase in verschiedenen tierischen Organismen, die mitochondriale Hexokinase und einige cAMP-abhängige Kinasen (Harborne & Grayer, 1993; Middleton & Kandaswami, 1993). Auf eine Bestimmung der katalytischen Konstanten (K_{cat}), respektive der Wechselzahl der Enzyme wurde verzichtet. Eine korrekte Erfassung des K_{cat} -Wertes, d.h. wieviele Moleküle Substrat pro Zeiteinheit vom aktiven Zentrum des Enzyms umgesetzt werden, erfordert die Verwendung hochreinen Proteins und war daher nicht möglich. In der nachfolgenden Abbildung 3.27 sind die jeweiligen Sättigungskurven, die Auftragungen nach Hanes (S [μM] gegen S/V [$\mu\text{M}\cdot\text{pkat}^{-1}\cdot\mu\text{g}$] und die daraus erhaltenen apparenten Michaelis-Menten-Konstanten dargestellt (nach Bisswanger, 1979).

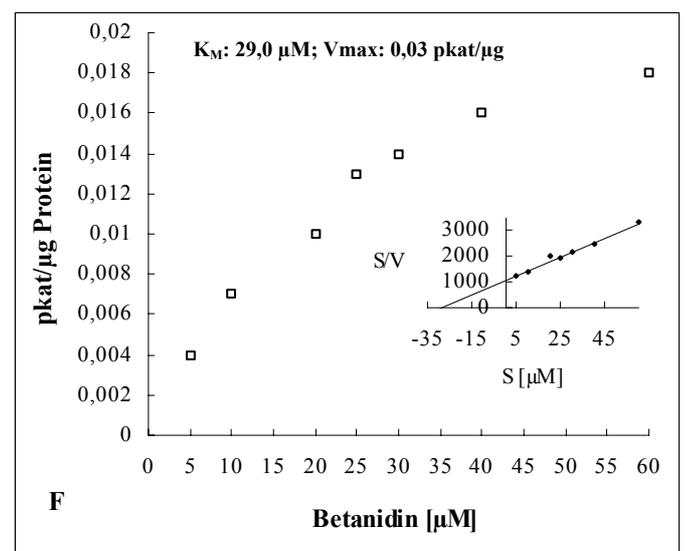
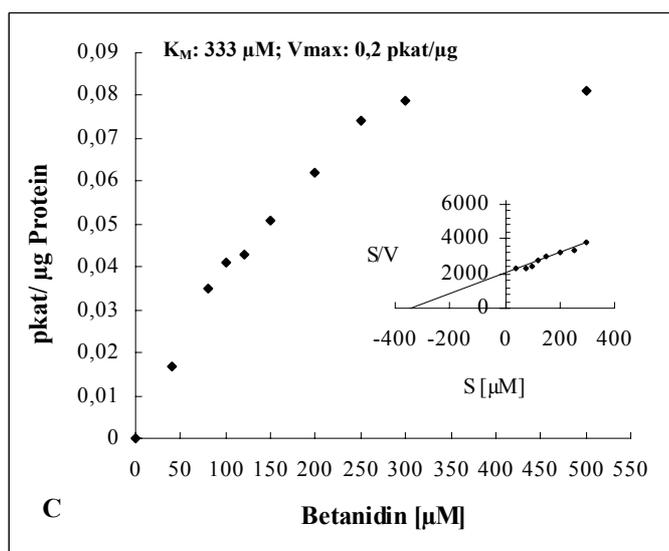
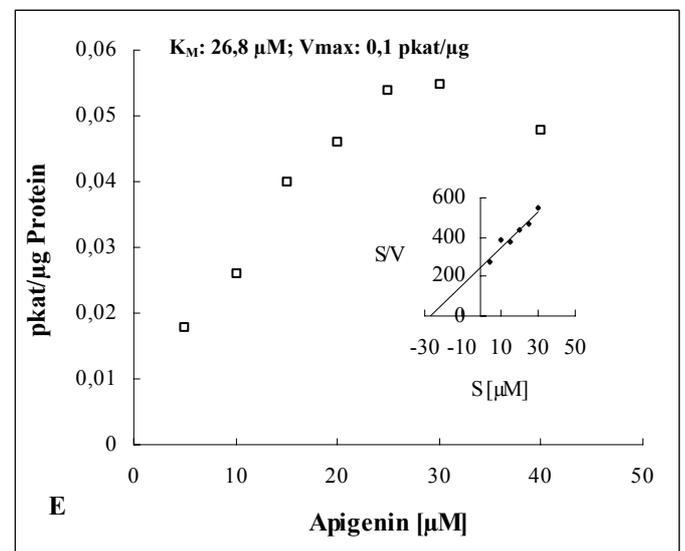
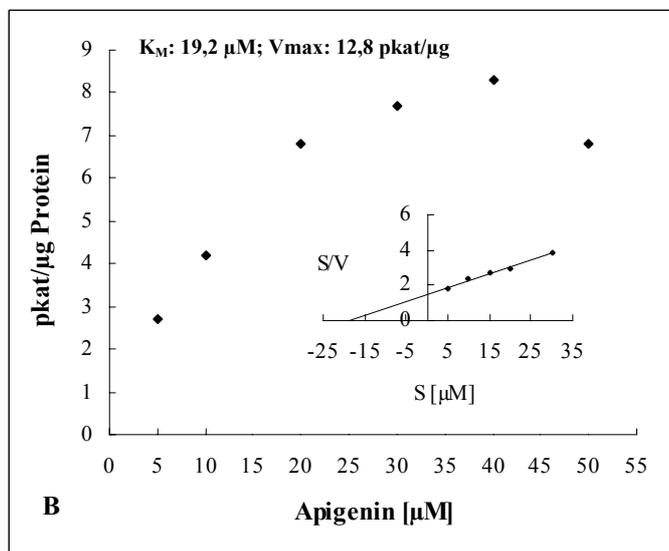
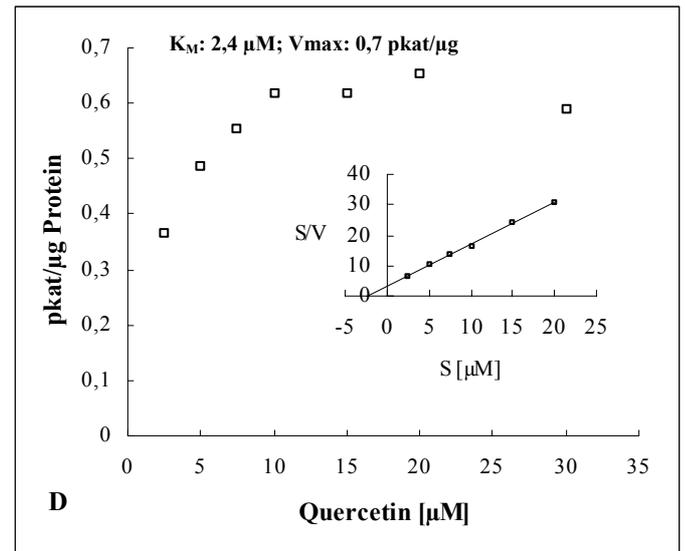
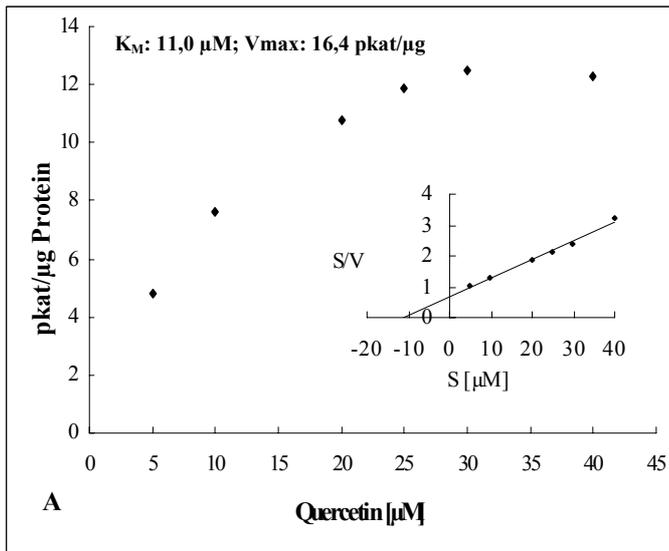


Abbildung 3.27 Bestimmung der apparenten K_M -Werte der rekombinanten UGT73A4 (A-C) und UGT71F1 (D-F) für Quercetin, Apigenin und Betanidin. In die jeweiligen Sättigungskurven sind die zugehörigen Hanes-Plots integriert (nach Bisswanger, 1979).

Beide Enzyme besitzen eine höhere Affinität zum Flavonol Quercetin als zum Flavon Apigenin. Betanidin wird von beiden Enzymen als Substrat akzeptiert, die Affinität ist im Vergleich zu den getesteten Flavonoiden jedoch signifikant geringer, was sich insbesondere für die UGT73A4 zeigt. Der K_M -Wert für Betanidin ist ca. 30-fach höher als der entsprechende Wert für Quercetin. Im Vergleich zur UGT71F1 wurde außerdem erst bei relativ hohen Betanidinkonzentrationen (50-500 μM) eine Sättigungskurve erhalten. Der Vergleich der Verhältnisse von Reaktionsgeschwindigkeit und Michaelis-Menten-Konstante macht dies ebenfalls deutlich. Die Effizienz, mit der UGT73A4 Betanidin umsetzt, beträgt im Vergleich zu Quercetin nur 0,04 %, während der entsprechende Wert für die UGT71F1 0,3 % beträgt.

3.4.8 Molekulargewichtsbestimmung: MALDI/TOF-MS

Zur massenspektrometrischen Analyse der teilgereinigten UGT73A4 und UGT71F1 wurden Gelstücke im Bereich von 55 kDa bzw. 80 kDa aus der SDS-PAGE ausgeschnitten (Abbildung 3.16 bzw. Abbildung 3.18) und tryptisch verdaut. Für die UGT71F1 wurde auch die Bande im Bereich von ca. 30 kDa ausgeschnitten, da diese im Western-Blot ebenfalls zu einem Signal führte. Die nach dem tryptischen Verdau dieser Bande im Chromatogramm aufgetretenen Peaks zeigten nach Datenbankanalyse eine 100%ige Übereinstimmung mit der 26 kDa GST-Transferase-Domäne von *Schistosoma japonicum*, es handelte sich somit bei dieser Bande um ein Degradationsprodukt, ein allgemein bekanntes Phänomen bei diesem Fusionsystem (Piers et al., 1993). Die mit Hilfe der MS ermittelten Peakmassen der UGT73A4- bzw. der UGT71F1-Bande zeigten im Vergleich eine 100%ige Übereinstimmung mit den von den jeweiligen Nukleotidsequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Somit liegt das Molekulargewicht für beide Proteine bei 54 kDa.

3.4.9 Analytische Ultrazentrifugation der UGT73A4

Im Abschnitt 3.3.5 wurde bereits auf den reversiblen Aktivitätsverlust des UGT73A4-Proteins infolge Verdünnung hingewiesen. Um auszuschliessen, dass das Protein als Di- bzw. Oligomer vorliegt, erschien eine analytische Ultrazentrifugation sinnvoll. Das Experiment und die Datenanalyse wurde von H. Lilie am Institut für Biotechnologie der MLU Halle durchgeführt, wie unter 2.5.15 erläutert. Die Zentrifugation erfolgte bei einer Proteinkonzentration von 0,4 mg/ml ($\text{OD}_{280\text{nm}}$) in einem Gleichgewichtslauf bei 10.000 rpm und 20 °C.

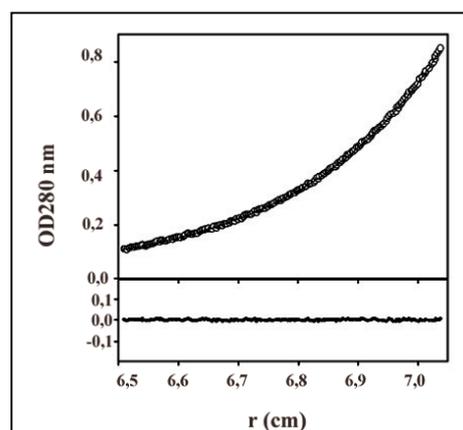


Abbildung 3.28 Darstellung des Gleichgewichtslaufs der Ultrazentrifugation für die rekombinante UGT73A4 bei 10.000 rpm, 20 °C und 280 nm. Abbildung zur Verfügung gestellt von H. Lilie, MLU Halle.

Der obere Teil der Abbildung 3.28 repräsentiert die experimentellen Daten, der untere Teil die Abweichung der experimentellen Daten von den theoretischen Werten, demzufolge ergibt sich eine gute Übereinstimmung. Das Protein im Bereich von 0,028-0,4 mg/ml monomer. Das Molekulargewicht liegt experimentell bei $55,52 \pm 4,41$ kDa. Die Sedimentationsgeschwindigkeit von $3,8 \cdot 10^{-13}$ entspricht einem globulären 50 kDa Protein.

3.5 Expressionsanalyse in *B. vulgaris*-Pflanzen und -Zellkultur

Durch Northern-Blot-Analyse sollte die UGT73A4-Transkriptakkumulation in *B. vulgaris* untersucht werden. Zunächst sollte die Frage beantwortet werden, ob das Transkript hauptsächlich in der *B. vulgaris*-Zellkultur akkumuliert oder auch in der Pflanze selbst bzw. in der Stammform *Beta maritima* nachweisbar ist. Zu diesem Zweck wurde Gesamt-RNA aus jeweils sechs Wochen alten Pflanzen dreier verschiedener Ökotypen von *Beta maritima* und der *B. vulgaris*-Zellkultur isoliert, geblottet und die Membran mit einem spezifischen 750 bp-Fragment der UGT73A4-cDNA hybridisiert. Die Auswertung des Northern-Blots bestätigte, dass die UGT73A4 mRNA in allen vier untersuchten Proben detektierbar war, wobei in der Zellkultur das stärkste Signal erhalten wurde (Abbildung 3.29A).

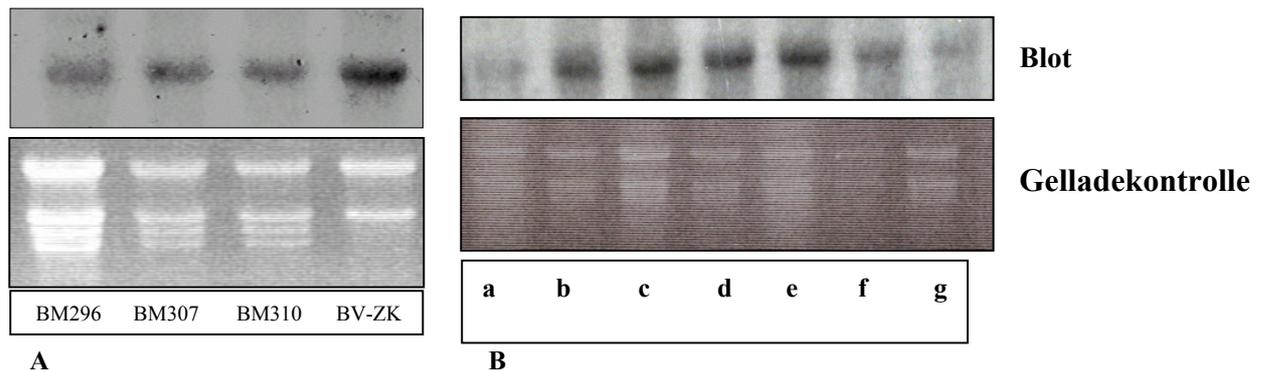


Abbildung 3.29 A: Genspezifische Transkriptakkumulation der UGT73A4 in der *B. vulgaris*-Zellkultur und drei Ökotypen von *B. maritima*. BM = *B. maritima*; BV-ZK = *B. vulgaris*-Zellkultur. **B:** Transkriptakkumulation der UGT73A4 in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der *B. vulgaris*-Pflanzen: (a) 1 Woche, (b) 2 Wochen und (c-g) 4-8 Wochen nach der Aussaat.

Des Weiteren sollte die Abhängigkeit der Expression vom Entwicklungsstadium der *B. vulgaris*-Pflanzen analysiert werden. Für die Northern-Blot-Analyse wurde Gesamt-RNA aus Pflanzen isoliert, die 1-2 und 4-8 Wochen nach der Aussaat geerntet wurden. Die Resultate des Northern-Blots gehen aus Abbildung 3.29B hervor. Die Akkumulation der UGT73A4 mRNA ist in allen untersuchten Stadien detektierbar, jedoch bei 2, 4, 5 und 6 Wochen alten Pflanzen am höchsten. Eine gewebespezifische Transkriptakkumulation in Blättern, Spross oder Hypokotylen von *B. vulgaris*-Pflanzen wurde für die UGT73A4 mittels RT-PCR untersucht (nicht dargestellt). Die stärkste Bande für die UGT73A4-cDNA wurde in Hypokotylen detektiert, war jedoch auch in Blättern und Spross nachweisbar. Eine gewebespezifische Verteilung der entsprechenden Enzymaktivität wurde aufgrund der schlechten Nachweisbarkeit der Enzymaktivität in der Pflanze nicht näher untersucht.

Die UGT71F1-Transkriptakkumulation wurde nur in der Zellkultur und in 1-8 Wochen alten *B. vulgaris*-Pflanzen aufgrund der höheren Sensitivität mittels RT-PCR (Abbildung 3.30) analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.30 dargestellt.

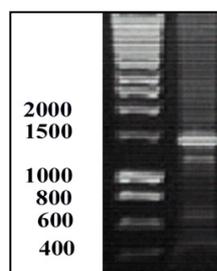


Abbildung 3.30 Nachweis des UGT71F1-Transkriptes in der *B. vulgaris*-Zellkultur mittels RT-PCR und genspezifischen UGT71F1-Primern.

Es wurde ein Fragment in der erwarteten Grösse von ~1500 bp erhalten. In allen untersuchten Pflanzenstadien wurden hingegen keine Fragmente detektiert (nicht dargestellt). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das UGT71F1-Transkript in der Zellkultur akkumuliert und in der Pflanze nur in äusserst geringen Mengen vorkommt.

3.6 Untersuchung einer Flavonol-4'-*O*-glucosyltransferase aus *Allium cepa* auf Umsetzung von Betanidin

Wie zuvor in 3.4.1 erläutert, katalysiert das rekombinante Enzym UGT73A4 den regiospezifischen Glucosyltransfer auf die 4'- und 7-OH-Gruppe des Quercetins, setzt das postulierte endogene Substrat Betanidin aber deutlich schlechter um, was auf eine Nebenaktivität des Enzyms hindeutet. Eine solche regiospezifische Glucosidierung von Quercetin in 4'- bzw. 7-Position ist aus der Literatur lediglich für eine Flavonoid-UGT aus *Allium cepa* bekannt (Lachinian-Sadek & Ibrahim, 1991a). Das entsprechende Enzym ist vor kurzem kloniert und funktionell charakterisiert worden (Kramer et al., 2003). Mit Hilfe dieses Experimentes sollte überprüft werden, ob die spezifische Quercetin-Glucosyltransferase aus der Zwiebel auch Betanidin als Substrat akzeptiert. Wie aus Abbildung 3.31A ersichtlich, waren die Quercetin-UGT-Aktivitäten in den hergestellten Zwiebelrohextrakten gut detektierbar, es konnte jedoch selbst nach mehrstündiger Inkubationszeit keine Glucosidierung des Betanidins beobachtet werden (Abbildung 3.31B).

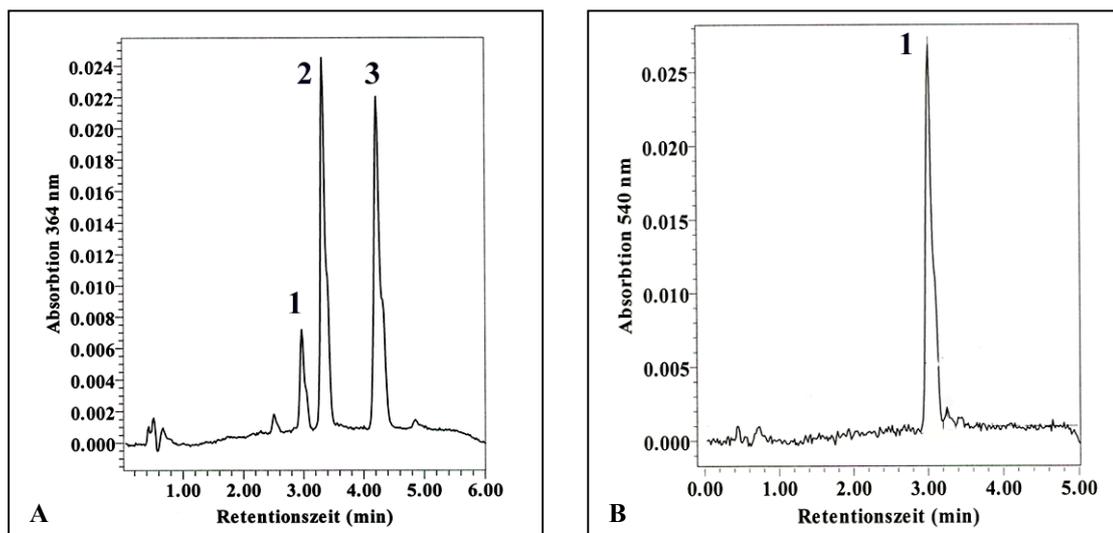


Abbildung 3.31 Repräsentatives RP-HPLC-Chromatogramm der Umsetzung von **(A)** Quercetin und **(B)** Betanidin nach Inkubation für 30 min bei 30 °C mit einem Rohextrakt aus *Allium cepa*. Produktidentifizierung **A**: 1: Quercetin-3-*O*-glucosid, 2: Quercetin-4'-*O*-glucosid, 3: Quercetin. Detektion bei 364 nm. **B**: 1: Betanidin. Detektion bei 540 nm.

3.7 Analyse von Flavonoidglycosiden aus *B. vulgaris*-Pflanzen und der Zellkultur

Um mögliche endogene Flavonoidsubstrate der UGT73A4 und UGT71F1 zu identifizieren, wurden methanolische Extrakte aus der roten *B. vulgaris*-Zellkultur bzw. acht Wochen alten Pflanzen auf ihren Flavonoidglycosidgehalt hin untersucht. In der Zellkultur wurde neben Feruloylglucose als Hauptkomponente Rutin (Quercetin-3-*O*-rutinosid) durch LC-MS-Analyse und Vergleich mit authentischen Standards identifiziert (nicht dargestellt). Der aus den Pflanzen hergestellte Rohextrakt wurde zunächst über eine Polyamidsäule vorfraktioniert (2.5.2) und anschließend mittels präparativer HPLC die Hauptkomponenten mit einem Absorptionsmaximum zwischen 330-370 nm isoliert (BV278-282). Die Strukturaufklärung der isolierten Verbindungen wurde von M. Nimtz und V. Wray (GBF, Braunschweig) durchgeführt. Abbildung 3.32 stellt die RP-HPLC-Analyse des methanolischen Rohextraktes der *B. vulgaris*-Pflanzen vor der Fraktionierung über Polyamid dar.

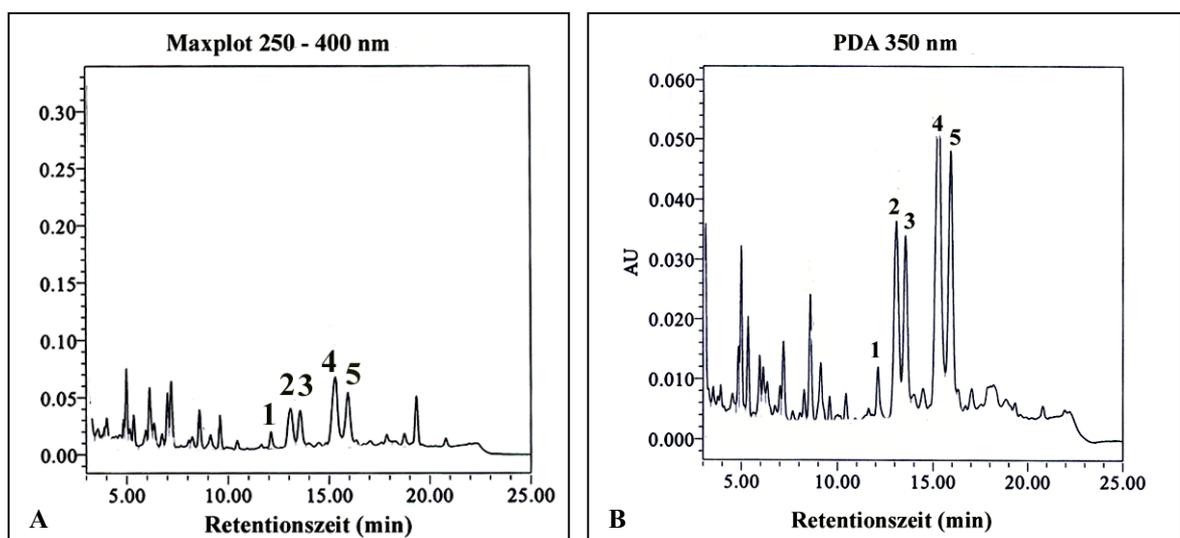


Abbildung 3.32 RP-HPLC-Chromatogramme des methanolischen Rohextraktes aus *B. vulgaris*-Pflanzen (**A**) Detektion bei 250-400 nm und (**B**) Detektion bei 350 nm. Die nummerierten Peaks wurden isoliert und die Struktur aufgeklärt.

Die Strukturaufklärung der in Abbildung 3.32 von 1-5 nummerierten Komponenten (BV 278-282) erfolgte mit einer Kombination NMR-spektroskopischer und MS-spektrometrischer Daten wie unter 2.5.13 und 2.5.14 erläutert. Bei den isolierten Verbindungen handelt es sich ausnahmslos um *O*-Glycosylderivate des Vitexins (C-8-glucosid des Apigenins), die Grundstruktur der Verbindungen geht aus Abbildung 3.33 hervor.

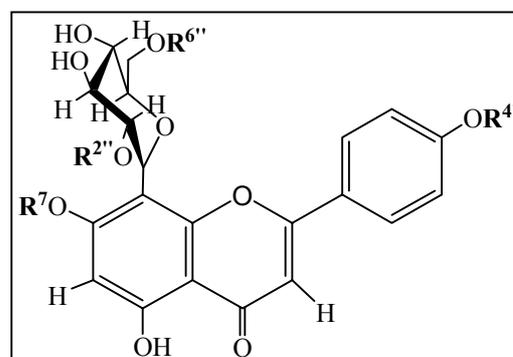


Abbildung 3.33 Grundstruktur der aus *B. vulgaris* isolierten Flavonoidkomponenten.

Es lassen sich drei Derivate mit Disaccharidsubstituenten und zwei Derivate mit Monosaccharidsubstituenten unterscheiden. Position und Art der verschiedenen Substituenten sind aus

Abbildung 3.33 und Tabelle 3.8 ersichtlich, die zugehörigen massenspektrometrischen Daten, einschließlich der durch Hydrolyse und GC-MS-Analyse identifizierten Zucker, sind in Tabelle 3.9 zusammengefasst.

Tabelle 3.8 Substitutionsmuster der aus *B. vulgaris* isolierten Apigeninderivate. Die Bezeichnung in Klammern entspricht der Nummerierung der Peaks in den in Abbildung 3.32 dargestellten RP-HPLC-Chromatogrammen.

Verbindung	R ⁷	R ^{4'}	R ^{2''}	R ^{6''}
BV-278 (1)	Glucose	H	H	H
BV-279 (2)	H	H	Glucose	H
BV-280 (4)	Glucose	CH ₃	H	H
BV-282 (3)	H	H	Xylose	H
BV-283 (5)	H	H	Glucose	COCH ₂ CO ₂ H

Tabelle 3.9 ESI-MS-Daten (positiver Ionenmodus) und Zuckeranalyse der isolierten Flavonoidglycoside aus *B. vulgaris*.

Verbindung	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	Summenformel	Struktur	Zuckeranalyse
BV-278 (1)	595,2	617,2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Glucose / Glucose	Glucose
BV-279 (2)	595,2	617,2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	Glucose / Glucose	Glucose
BV-280 (4)	609,2	631,2	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	Glucose / Glucose / OCH ₃	Glucose
BV-282 (3)	565,1	587,1	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	Xylose / Glucose	Xylose/Glucose
BV-283 (5)	681,2	703,1	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₈	Glucose / Glucose / Malonylrest	Glucose

Es wurde jeweils die Struktur eines Monsaccharidderivates (BV-278) und eines Disaccharidderivates (BV-279) zweifelsfrei durch 2D-homo- und heteronukleare ¹H- und ¹³C-NMR-spektroskopische Techniken aufgeklärt. Die Strukturen der anderen Verbindungen wurde anschließend durch Vergleich der ¹H-NMR-Daten ermittelt. Die ¹H- und ¹³C-NMR-Daten wurden von V. Wray (GBF, Braunschweig) tabellarisch zusammengestellt und sind im Anhang als Tabelle 8.1-8.3 aufgeführt. In allen Verbindungen wurden in den ¹H-Spektren zwei Gruppen von Signalen mit unterschiedlicher Intensität detektiert. Die grössten chemischen Verschiebungen wurden dabei für die H-2'/6' und bestimmte Zuckerprotonen beobachtet (Tabelle 8.1 und Tabelle 8.2). Dies weist auf eine langsame Konformationsänderung der Verbindung hin. Die Apigenin- und β-Glucopyranosyl-Fragmente der Verbindungen BV-278 und BV-279 wurden durch Korrelationen in den 2D-¹H-COSY-Spektren identifiziert. Die Präsenz einer C-glucosidisch gebundenen β-Glucopyranosyleinheit konnte anhand einer Kopplungskonstante von 10 Hz zwischen H-1'' und H-2'' zweifelsfrei abgeleitet werden. Die heteronuklearen 2D-Korrelationen erlaubten die Zuordnung aller ¹H- und ¹³C-Signale und ermöglichten die Ermittlung der Verknüpfungsstellen der verschiedenen Moleküluntereinheiten. Das Auftreten dreier ¹³C-¹H-Korrelationen vom H-1'' zum C-7, C-8 und C-9-Atom des A-Rings in den HMBC-Spektren bestätigte die C-glucosidische Substitution an C-8-Position. Die räumliche Korrelation des H-1''' über drei Bindungen zum C-2''-Atom in Verbindung BV-278 und zum C-7-Atom in Verbindung BV-279 führte zur Identifizierung der Verknüpfungsstellen der zweiten Zuckermoleküle.

Eine C-Glucosidierung des Flavonoidgrundkörpers an C-6-Position des A-Ringes konnte anhand der Zuordnung der ¹³C-Signale des A-Ringes ausgeschlossen werden. Dies wurde durch räumliche ¹H-¹H-Korrelationen in den 2D-ROESY-Spektren bestätigt. In diesen Spektren zeigten die H-2'/6'-Atome räumliche Korrelationen mit den Protonen des C-glucosidisch gebundenen Zuckers. Für die Verbindung BV-278 ergab sich eine starke Korrelation zwischen H-1'' und H-1''' und für Verbindung BV-279 zwischen H-1''' und H-6, wodurch die jeweilige Position des zweiten Zuckermoleküls bestätigt wurde. Darüberhinaus unterstützt das Auftreten von Austauschpeaks im letzteren Spektrum die Beobachtung, dass das Molekül in zwei Konformationen vorliegt, die von einer langsamen Rotation um die C-8-C-1-Zuckerbindung herrühren.

3.8 Modellierung der 3D-Strukturen der UGT73A4 und der UGT73A5

3.8.1 Entwicklung zweier Modellstrukturen

Die funktionelle Expression und Charakterisierung der UGT73A4 aus *B. vulgaris* zeigte wichtige Unterschiede in der Substratspezifität zur UGT73A5 aus *D. bellidiformis*. Insbesondere die unerwartet geringe Affinität gegenüber Betanidin im Vergleich zu Quercetin und anderen Flavonoidsubstraten könnte auf strukturelle Unterschiede zurückzuführen sein. Solche Unterschiede würden sich auch durch eine veränderte Bindungsaffinität der Substrate (Liganden) zum Enzym bemerkbar machen.

Bereits in der Einleitung wurde darauf hingewiesen, dass bis jetzt keine Kristallstrukturdaten pflanzlicher Glucosyltransferasen in der Proteindatenbank (pdb) vorliegen. Aufgrund der geringen Ausbeute an gereinigter UGT73A4 (0,2 mg/l Bakterienkultur) schied ein Kristallisationsversuch im Rahmen dieser Arbeit aus. Für das zweite Enzym, UGT71F1, kam eine Kristallisation aufgrund des begrenzten Reinigungserfolges und der geringen Stabilität ebenfalls nicht in Frage. Um dennoch erste Erkenntnisse bezüglich der 3D-Struktur einer pflanzlichen UGT zu gewinnen, wurde als Alternative eine komparative Modellierungsstrategie gewählt. Dazu sollten exemplarisch die 3D-Strukturen der UGT73A5 aus *D. bellidiformis* und die UGT73A4 aus *B. vulgaris* modelliert werden, um beide Modelle hinsichtlich der Struktur und des aktiven Zentrums vergleichen zu können und Erklärungsansätze für die beobachteten Unterschiede in der Substratspezifität zu finden. Die genaue Vorgehensweise zur Auswahl einer geeigneten Templatestruktur und die im Rahmen der Modellentwicklung verwendeten Programme und Methoden sind unter 2.6 erläutert. Aufgrund der geringen Sequenzhomologie der zu modellierenden Enzyme mit dem Template (14 %) gestaltete sich die Entwicklung der Modelle schwierig. Insbesondere die Verbesserung der stereochemischen Qualität, d.h. die sukzessive Optimierung von Aminosäuren, die unzulässige Geometrien in Torsionswinkeln (z. B. Φ , Ψ und ω), Bindungslängen oder Bindungswinkeln aufwiesen, war zeitaufwendig. Die Beurteilung der Qualität der Modelle erfolgte mit Hilfe des Programms PROCHECK (Laskowski et al., 1993), wobei die Ergebnisse in Form eines Diagramms, dem sogenannten Ramachandran-Plot (Abbildung 3.34A und B), aufgetragen wurden.

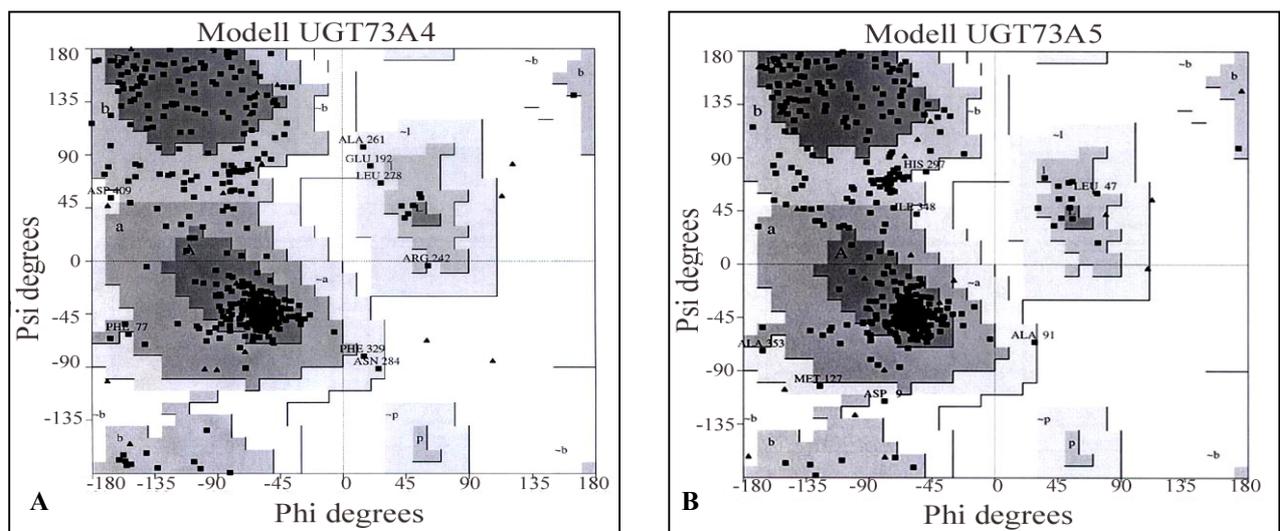


Abbildung 3.34 Ramachandran-Plots (A) des Modells UGT73A4 und (B) des Modells UGT73A5. Je dunkler der Bereich, desto häufiger finden sich die zugehörigen Torsionswinkel der Aminosäuren in bereits bekannten Kristallstrukturen wieder und repräsentieren eine nativ gefaltete Struktur. Glycinreste sind durch Dreiecke dargestellt.

Aus Abbildung 3.34 ist ersichtlich, dass sich in beiden Modellen alle Aminosäuren in sogenannten „erlaubten“ Regionen befinden. Die genaue Verteilung der Aminosäuren geht aus Tabelle 3.10 hervor.

Tabelle 3.10 Legende zu den in Abbildung 3.34 dargestellten Ramachandran-Plots. Glycin- und Prolinreste werden in die Auswertung nicht mit einbezogen.

Aminosäuren befinden sich in:	UGT73A4	UGT73A5
am meisten bevorzugten Regionen:	310 AS (74,9 %)	310 AS (73,8 %)
in zusätzlich erlaubten Regionen	96 AS (23,2 %)	103 AS (24,5 %)
in generell erlaubten Regionen	8 AS (1,9 %)	7 AS (1,7 %)
in unerlaubten Regionen	0 AS (0,0 %)	0 AS (0,0 %)

Zu Beginn der Modellentwicklung befanden sich ca. 20 % der Aminosäuren in unerlaubten Bereichen. Ein Vergleich mit den Werten in Tabelle 3.10 verdeutlicht, dass somit eine signifikante Verbesserung der stereochemischen Qualität beider Modellstrukturen erzielt wurde. Alle weiteren stereochemischen Parameter, wie Ω -Winkel, H-Brücken Bindungsenergien und sterische Kontakte der Aminosäuren befanden sich nach der Optimierung ebenfalls in erlaubten Bereichen, d.h. sie entsprachen nativ gefalteten Strukturen. Die weitere Validierung der Modelle erfolgte mit PROSA II (Sippl, 1993). Bezüglich des aktiven Zentrums der beiden modellierten Enzyme ergaben sich keine signifikanten energetischen Unterschiede im Vergleich zur verwendeten Template-Struktur GtfB. Die PROSA-Plot-Analyse zeigte jedoch, dass längere Loop-Bereiche in den Modellstrukturen noch einer Verbesserung bedürfen, d.h. sie noch keiner nativen Faltung entsprechen (nicht abgebildet). Als Resultat der Modellierungs-Studien wurden die nachfolgend dargestellten Tertiärstrukturen für die UGT73A4 (Abbildung 3.35A) und UGT73A5 (Abbildung 3.35B) erhalten.

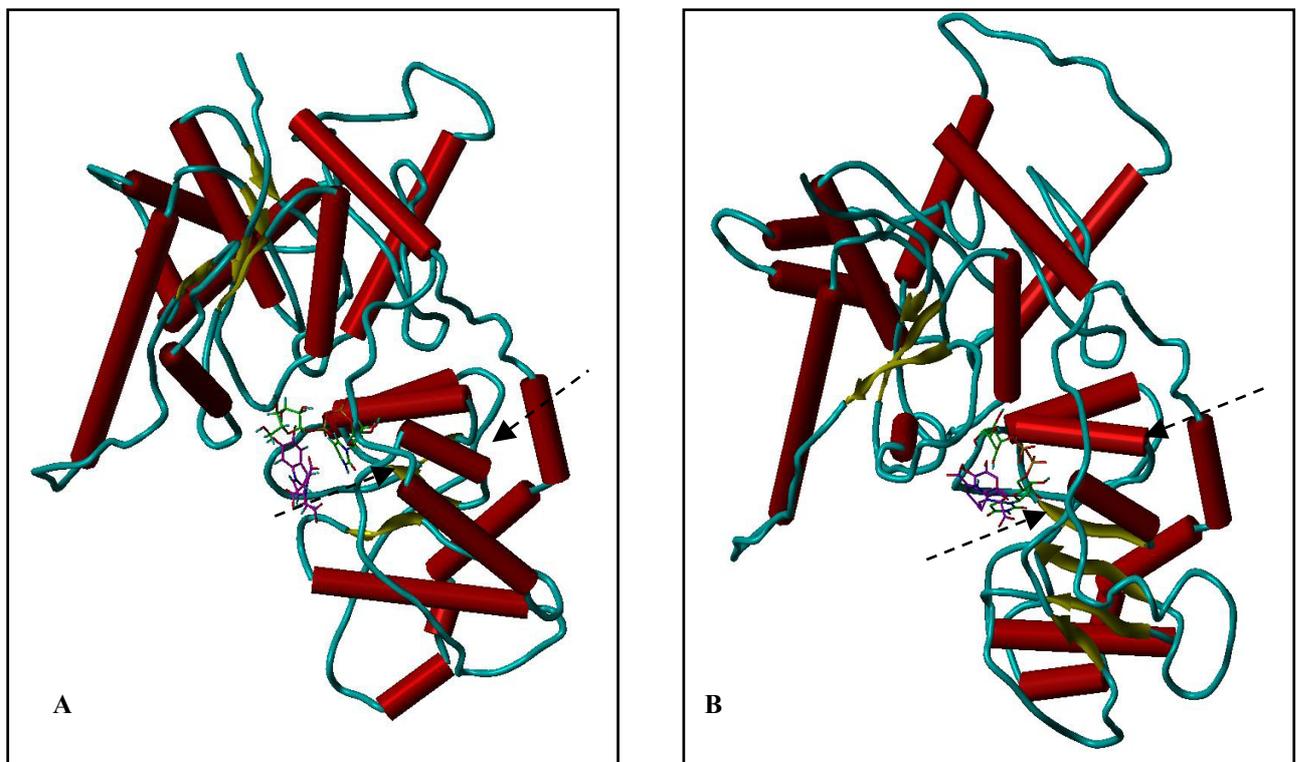


Abbildung 3.35 3D-Strukturmodelle (A) UGT73A4 und (B) des Modells UGT73A5 mit den gedockten Substraten Betanidin (magenta) und UDP-Glucose (grün). Rote, zylinderförmige Abschnitte stellen α -helicale Bereiche dar, β -Faltblätter sind gelb dargestellt. Loop- bzw. Coil-Regionen sind cyanfarben markiert. Schwarze Pfeile markieren die $\alpha/\beta/\alpha$ -Domäne.

Die Topologie der modellierten Strukturen ist für beide Enzyme aufgrund der Sequenzidentität von 64 % erwartungsgemäß sehr ähnlich. Signifikant ist die Existenz einer $\alpha/\beta/\alpha$ -Domäne in beiden Modellen. Ein solches Motiv ist in der Literatur als sogenannter Rossmann-Fold bekannt und wird als charakteristisch für Proteine, die Diphosphat-haltige Cofaktoren, wie z. B. NADP(H) binden, angesehen (Rossmann et al., 1974). In der aktuellen Literatur ist eine solche Glycosyl-Donor-Bindungsdomäne als Charakteristikum für Glycosyltransferasen der GT-B-Superfamilie beschrieben worden (Hu & Walker, 2002). Sowohl die als Template verwendete Glucosyltransferase aus *A. orientalis* als auch beide modellierte UGTs gehören zu dieser Familie. Das in der Literatur als Nukleotidbindestelle diskutierte PSPG-Box Konsensus-Motiv pflanzlicher Glucosyltransferasen (1.2.1) ist in beiden Modellen innerhalb der beschriebenen $\alpha/\beta/\alpha$ -Domäne lokalisiert. Darüberhinaus ergab die genauere Analyse bekannter Kristallstrukturen von Glucosyltransferasen aus der Proteindatenbank, die mit UDP-Glucose co-kristallisiert wurden, dass die Erkennung der Riboseeinheit des Zuckerdonors entweder über einen konservierten Glutamat- oder Aspartatrest erfolgt (z. B. Moréra et al., 1999; Lari-vière et al., 2003). In beiden 3D-Strukturmodellen befindet sich in nächster Nähe zur PSPG-Box ein Glutamatrest, E³⁷⁸ im Falle der UGT73A5 und E³⁶⁹ entsprechend für die UGT73A4. Liganden-Docking-Studien mit beiden Modellstrukturen ergaben, dass UDP-Glucose in der energetisch günstigsten Anordnung in der Nähe der $\alpha/\beta/\alpha$ -Domäne, und damit des PSPG-Box-Motivs, lokalisiert ist. Eine vergrößerte Betrachtung der postulierten Binderegion für UDP-Glucose und Betanidin in beiden Modellen, unter Berücksichtigung des elektrostatischen Oberflächenpotentials der Proteinstruktur, ergibt die folgende Darstellung:

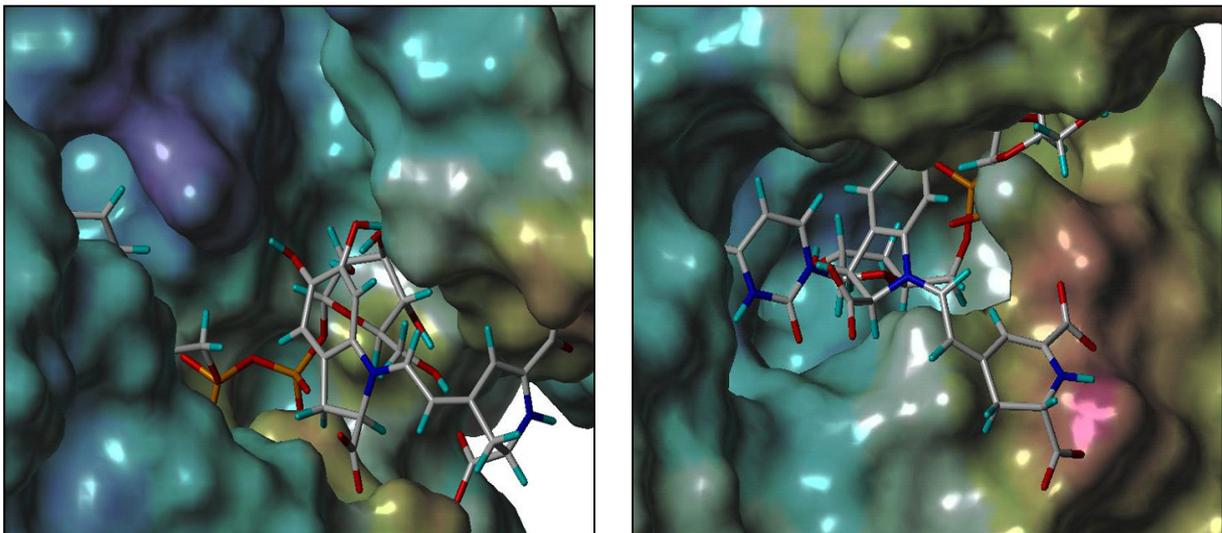


Abbildung 3.36 Darstellung der Bindungstasche der UGT73A5 (links) und der UGT73A4 (rechts) mit gedocktem Betanidin und UDP-Glucose. Das molekulare, elektrostatische Oberflächenpotential der Proteine (Conolly-Surface) wird durch gelb-rote Regionen (positives Potential) und blaue Regionen (negatives Potential) veranschaulicht.

Abbildung 3.36 reflektiert die energetisch günstigste Orientierung beider Substrate in der Bindungstasche und die mögliche Stabilisierung des Substrates Betanidin durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Carboxylgruppen des Betalaminsäureteils und basischen Aminosäureresten des Proteins. Im Falle der UGT73A5 ist diese Stabilisierung ausgeprägter, da sich hier entsprechende Interaktionen zwischen allen drei Carboxylfunktionen des Betanidins und basischen Aminosäuren ausbilden können, während dies im Modell der UGT73A4 nur für die Carboxylfunktionen des Betalaminsäureteils des Betanidinmoleküls zutrifft. Auf diesen Aspekt wird in Abschnitt 3.8.2 nochmals ausführlicher eingegangen.

3.8.2 Vergleich der modellierten aktiven Zentren beider Enzyme

Es sei darauf hingewiesen, dass beide Tertiärstrukturmodelle zunächst rein auf der Basis von Homologie-Modellierungskriterien entwickelt und bewertet wurden. Erst nachdem die Qualität der Ramachandran-Plots zufriedenstellend war, wurde unter Zuhilfenahme von Literaturdaten und experimentellen Befunden versucht, ein mögliches katalytisches Zentrum in den modellierten Strukturen zu identifizieren. Neben der postulierten Nukleotidbindestelle, dem PSPG-Box-Motiv, konnte durch gezielte Mutation einzelner Aminosäuren für die UGT73A5 aus *D. bellidiformis* gezeigt werden, dass die Aminosäuren H²² und E³⁷⁸ für die katalytische Aktivität des Enzyms essentiell sind. Der Austausch der beiden Aminosäuren gegen L²² im Falle des H²² bzw. A³⁷⁸ im Falle des E³⁷⁸ führte zu einem vollständigen Aktivitätsverlust (Hans et al., in press). Sowohl beide Aminosäuren als auch die PSPG-Box befinden sich in den beiden 3D-Modellen in der Nähe der postulierten Bindungstasche. Mit Hilfe des automatischen Dockingprogramms GOLD und Moleküldynamiksimulationen wurde zunächst UDP-Glucose in das postulierte aktive Zentrum gedockt, anschließend jeweils die Substrate Quercetin und Betanidin. Der Vergleich der energetisch günstigsten Anordnung der Liganden in beiden Strukturmodellen lässt einige wichtige Unterschiede erkennen, die mögliche Erklärungsansätze für die *in vitro* beobachteten Differenzen in den Substratspezifitäten bieten. Abbildung 3.37 stellt zunächst schematisch das modellierte aktive Zentrum der UGT73A5 mit den gedockten Substraten UDP-Glucose und Quercetin dar.

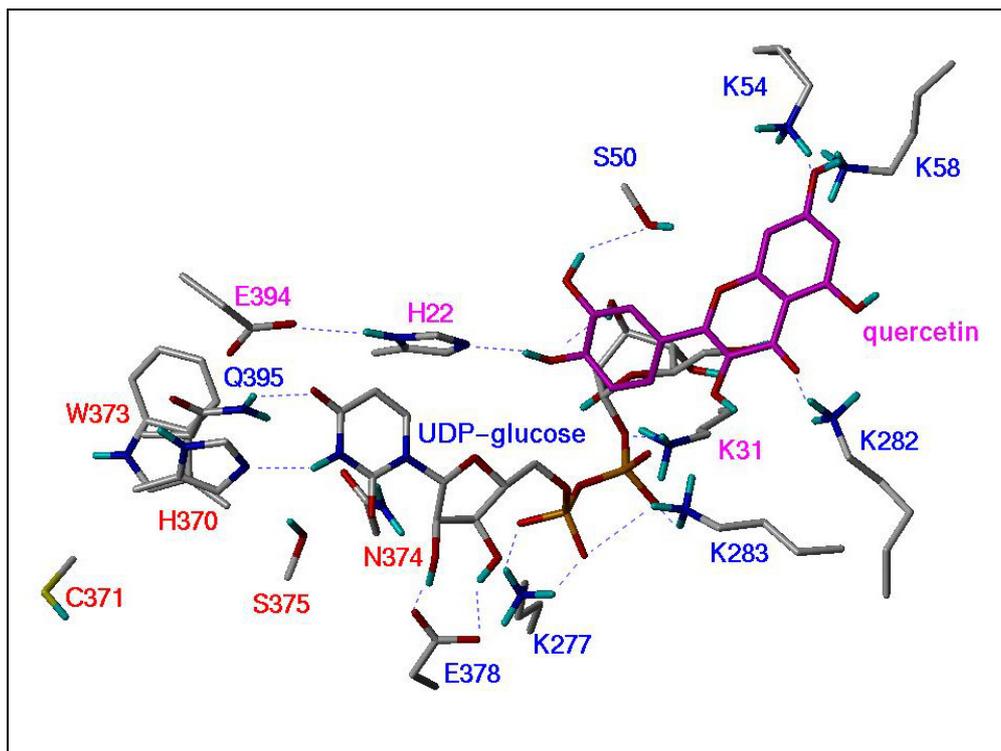


Abbildung 3.37 Schema des aktiven Zentrums der UGT73A5 mit Quercetin (magenta) und UDP-Glucose. Blaue, gepunktete Linien repräsentieren Wasserstoffbrückenbindungen. Zur PSPG-Box gehörende AS sind rot beschriftet, am postulierten Mechanismus beteiligte AS magenta. Weitere für die Substraterkennung wichtige AS sind blau markiert.

Eine Stabilisierung der UDP-Glucose ist durch die Ausbildung von Salzbrücken zwischen der α -Phosphatgruppe und K²⁷⁷ sowie der β -Phosphatgruppe und K²⁸³ möglich. Zwischen E³⁷⁸ und der Ribose-Einheit können sich zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Uracil bildet eine Wasserstoffbrücke zu H³⁷⁰ und eine zweite zu Q³⁹⁵. Die Glucoseeinheit interagiert mit dem Enzym hauptsächlich über die basische Aminosäure K³¹. Diese bildet im Modell einerseits eine Wasserstoffbrücke zur C-2-OH-Gruppe, andererseits zum Sauerstoffatom der

β -Phosphatgruppe eine Salzbrücke. Das Quercetinmolekül kann sowohl über eine Salzbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoffatom und K^{282} als auch über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der 4'-OH-Gruppe und H^{22} sowie S^{50} und der 3'-OH-Gruppe des B-Ringes im aktiven Zentrum gebunden werden.

Im Vergleich dazu ist in der folgenden Abbildung 3.38 das aktive Zentrum des UGT73A4-Modells mit der energetisch günstigsten Anordnung der Substrate Quercetin und UDP-Glucose veranschaulicht.

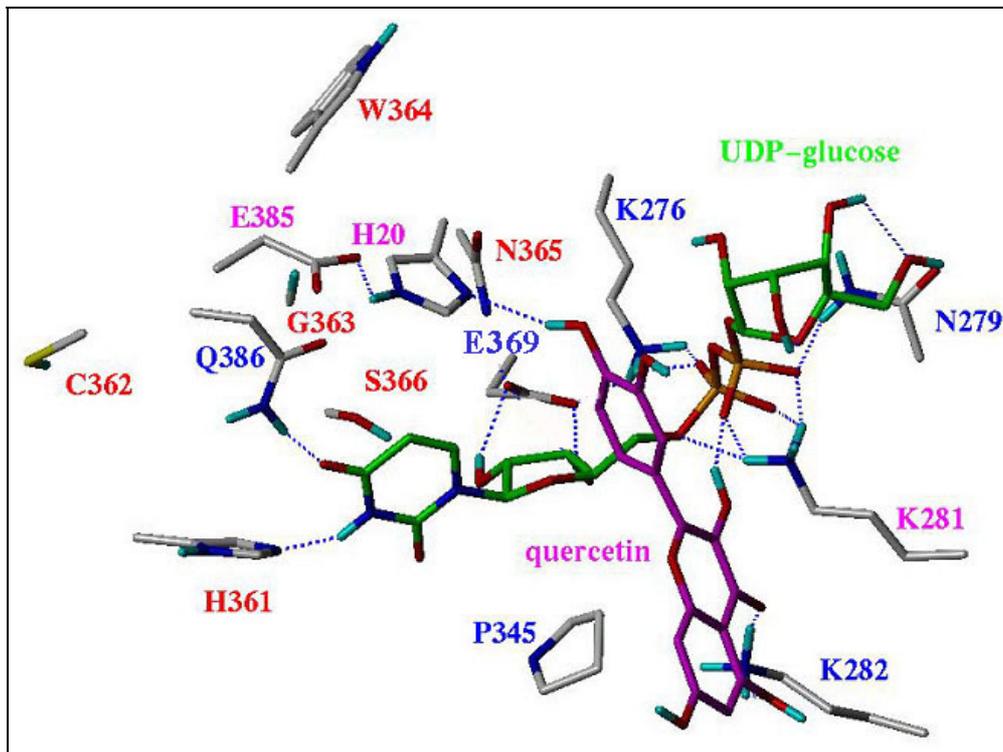


Abbildung 3.38 Schema des aktiven Zentrums der UGT73A4 mit Quercetin (magenta) und UDP-Glucose (grün). Blaue, gepunktete Linien repräsentieren Wasserstoffbrückenbindungen. Zur PSPG-Box gehörende AS sind rot beschriftet, am postulierten Mechanismus beteiligte AS magenta. Weitere für die Substraterkennung wichtige AS sind blau markiert.

Die Stabilisierung des Zuckers erfolgt in diesem Modell durch Ausbildung von Salzbrücken zwischen der α -Phosphatgruppe und den basischen Aminosäuren K^{276} sowie K^{281} und der β -Phosphatgruppe und K^{281} bzw. N^{279} . Zwischen E^{369} und der Ribose-Einheit des Zuckers können sich zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Wie bereits zuvor beschrieben, besteht für Uracil auch hier die Möglichkeit der Bildung von Wasserstoffbrücken zum H^{361} und Q^{386} . Die Glucoseeinheit interagiert über die C-4-OH-Gruppe mit dem Carbonylsauerstoffatom des Peptidrückgrats der Aminosäure N^{279} ebenfalls unter Bildung einer Wasserstoffbrücke. Die Bindung des Substrates Quercetin wird ähnlich wie bei der UGT73A5 durch Bildung einer Salzbrücke zu K^{282} und einer Wasserstoffbrückenbindung zu H^{20} ermöglicht. Zusätzliche Stabilisierung wird durch die Ausbildung einer H-Brücke zur α -Phosphatgruppe des Zuckers und hydrophobe Wechselwirkungen mit P^{345} erreicht. Die zur Erkennung und Bindung des Substrates Quercetin beitragenden Wechselwirkungen sind in beiden Strukturmodellen vergleichbar. Im Gegensatz dazu ergeben sich für die Stabilisierung des Betanidins aufgrund von Differenzen in der Aminosäuresequenz beider Proteine einige Unterschiede. Abbildung 3.39 zeigt die Orientierung von UDP-Glucose und Betanidin im aktiven Zentrum der UGT73A5.

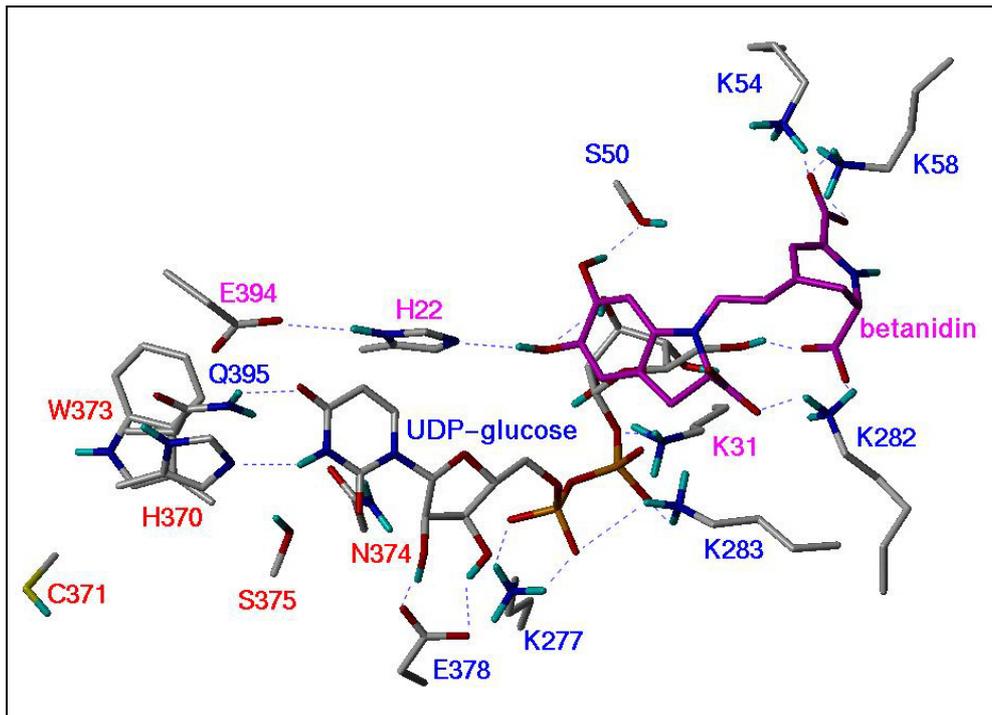


Abbildung 3.39 Schema des aktiven Zentrums der UGT73A5 mit Betanidin (magenta) und UDP-Glucose. Blaue, gepunktete Linien repräsentieren Wasserstoffbrückenbindungen. Zur PSPG-Box gehörende AS sind rot beschriftet, am postulierten Mechanismus beteiligte AS magenta. Weitere für die Substraterkennung wichtige AS sind blau markiert.

Die Interaktion der UDP-Glucose mit dem Protein kann auch hier mit Hilfe der im Zusammenhang mit Quercetin bereits erläuterten Wechselwirkungen beschrieben werden. Eine Stabilisierung des Betanidins wird maßgeblich durch die Bildung von Salzbrücken zwischen den Carboxylgruppen des Betalaminsäureteils und den Aminosäuren K⁵⁴, K⁵⁸ und K²⁸² erreicht. Eine weitere Salzbrücke kann sich im Modell zwischen der Carboxylfunktion der *cyclo*-Dopa-Einheit des Betanidinmoleküls und K²⁸² ausbilden. Darüberhinaus bildet sich zwischen der C-15-Carboxylfunktion der Betalaminsäureeinheit und der C-6-OH-Gruppe der Glucose eine H-Brücke. Die Existenz gleichartiger Wechselwirkungen zwischen der 5- und 6-OH-Gruppe der *cyclo*-Dopa-Einheit und den Aminosäureresten von S⁵⁰ und H²² ist wahrscheinlich.

Der im folgenden abgebildete Sequenzvergleich der ersten Aminosäuren der UGT73A4 bzw. UGT73A5-Sequenz verdeutlicht, dass in der Sequenz des *B. vulgaris* Enzyms anstelle des S⁵⁰ ein P⁴⁸ auftritt und K³¹ gegen R²⁹ sowie K⁵⁴ gegen T⁵² ausgetauscht sind.

UGT73A4	1	MDDKSQQ--LHIVLFPFMAHGHIPTLDIARLFAARGVKTTLITTPRNA P TFL T AIEKGN
UGT73A5	1	MGTHSTAPDLHVVFPPFLAHGHMIPSLDI A KLFAARGVKTT I IT T PLNASMFTKAIEKTR

Abbildung 3.40 Sequenzvergleich der ersten 62 bzw. 64 AS der UGT73A4 und UGT73A5. Signifikante Unterschiede in den AS sind rot gekennzeichnet.

Diese Veränderung in der Aminosäuresequenz hat Auswirkungen auf die mögliche Stabilisierung des Betanidins im aktiven Zentrum des UGT73A4-Modells (Abbildung 3.41), die im folgenden erläutert wird.

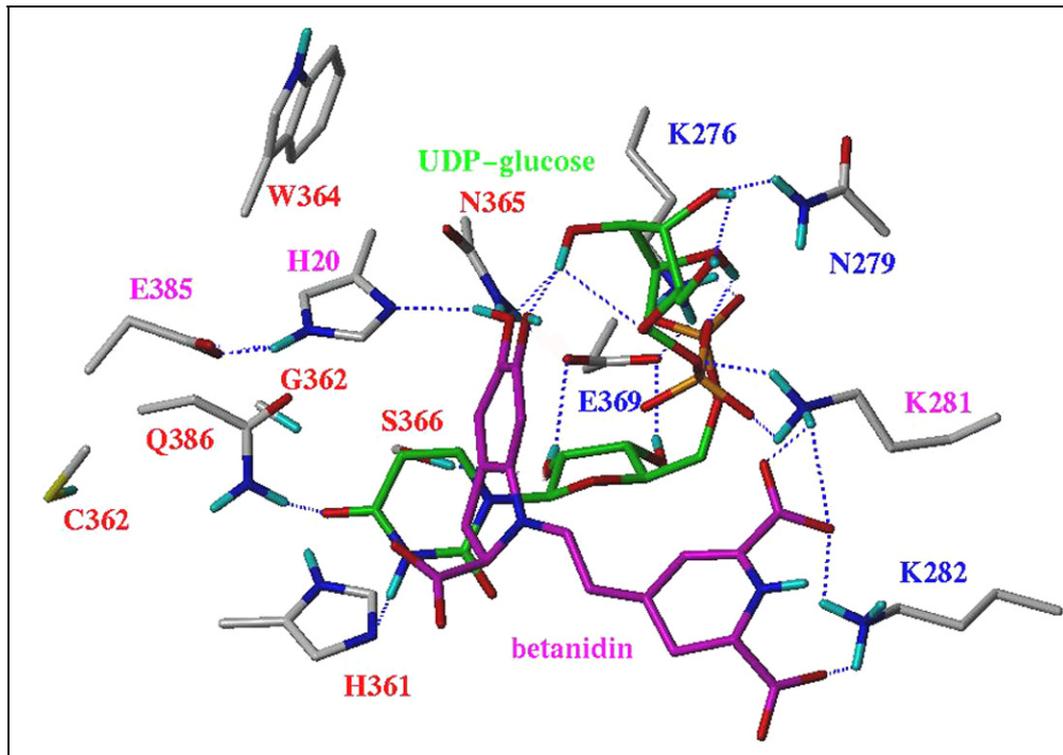


Abbildung 3.41 Schema des aktiven Zentrums der UGT73A4 mit Betanidin (magenta) und UDP-Glucose (grün). Blaue, gepunktete Linien repräsentieren Wasserstoffbrückenbindungen. Zur PSPG-Box gehörende AS sind rot beschriftet, am postulierten Mechanismus beteiligte AS magenta. Weitere für die Substraterkennung wichtige AS sind blau markiert.

Wie bereits erläutert können sich auch hier Salzbrücken zwischen den Carboxylgruppen des Betalaminsäureteils und den Aminosäuren K²⁸¹ und K²⁸² bilden. Die für die UGT73A5 postulierte Möglichkeit der Bildung einer zusätzlichen Salzbrücke zwischen der Carboxylfunktion der *cyclo*-Dopa-Einheit des Betanidinmoleküls, und einem basischen Aminosäurerest entfällt jedoch. Die Interaktion der C-15-Carboxylfunktionen der Betalaminsäureeinheit mit der C-6-OH-Gruppe der Glucose unter Ausbildung einer H-Brücke ist bei der gegebenen Anordnung der Liganden ebenfalls nicht möglich. Die 5-OH-Gruppe der *cyclo*-Dopa-Einheit kann zu H²⁰ eine Wasserstoffbrückenbindung ausbilden, während für die 6-OH-Gruppe keine analoge Stabilisierung gegeben ist. Werden die möglichen Wechselwirkungen des Enzyms mit UDP-Glucose betrachtet, so ergeben sich ebenfalls Unterschiede. Es können sich Salzbrücken zwischen der α -Phosphatgruppe und K²⁷⁶ sowie K²⁸¹ und der β -Phosphatgruppe und K²⁸¹ bilden. Die Aminosäure N²⁷⁹ kann hier nicht nur durch eine Salzbrücke zum β -Phosphat, sondern auch über eine H-Brücke mit der C-4-OH-Gruppe der Glucose interagieren. Zusätzliche Wasserstoffbrücken können zwischen N³⁶⁵ und der C-3-OH-Gruppe des Glucose-moleküls gebildet werden. Unter der Voraussetzung, dass die katalytischen Zentren korrekt modelliert wurden, lässt sich festhalten, dass die Erkennung und Bindung des Betanidins im Falle der UGT73A4 insgesamt schwächer ist als im Falle der UGT73A5, während die Verhältnisse im Falle des Quercetins vergleichbar sind. Dies korreliert mit den experimentellen kinetischen Daten.

An diesem Punkt war es interessant, festzustellen, ob auch die unterschiedliche Affinität beider Enzyme gegenüber den anderen getesteten Substraten anhand der entwickelten Modelle erklärbar wäre. Deshalb wurden weitere Liganden-Docking-Studien mit allen in Abschnitt 3.4.1 genannten Substraten durchgeführt.

3.8.3 Liganden-Docking-Studien mit *in vitro* getesteten Substraten

Zur abschließenden Überprüfung der 3D-Strukturmodelle der UGT73A5 und UGT73A4 wurden die verschiedenen, *in vitro* getesteten Substrate zunächst manuell, d.h. nicht mit einem automatischen Dockingprogramm, in das aktive Zentrum gedockt. Danach wurden Moleküldynamik-Simulationen mit anschließender Energieoptimierung durchgeführt. Die berechneten nichtbindenden Wechselwirkungsenergien (Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Wechselwirkungen) und die mit dem Programm SCORE errechneten Dissoziationskonstanten der Protein-Ligand-Komplexe für beide Modelle sind in Tabelle 3.11 und Tabelle 3.12 zusammengestellt. Die Wechselwirkungsenergien stellen eine Abschätzung der freien Wechselwirkungsenthalpie dar, wobei Entropieeffekte sowie Einflüsse der Solvation bzw. Desolvation unberücksichtigt bleiben. Bei den sich bildenden Protein-Ligand-Komplexen ist ein kleinerer (negativerer) Energiewert mit einer höheren Affinität der Liganden zum Enzym gleichzusetzen. Unter Verwendung des Programms SCORE können die zuvor vernachlässigten Faktoren zusätzlich mit einbezogen werden

Tabelle 3.11 Bindungsaffinität unterschiedlicher Liganden zum UGT73A5-Modell. Die Auflistung erfolgte nach absteigenden pK_D -(SCORE)-Werten.

Ligand	ΔE [kcal/mol]	pK_D	K_D [M]	Rel. Enzymaktivität [%]
Betanidin	-189,35	5,1	$7,94 \cdot 10^{-6}$	100
Ferulasäure	-16,91	4,77	$1,70 \cdot 10^{-5}$	0
Quercetagetin	-30,16	4,56	$2,75 \cdot 10^{-5}$	58
Quercetin (4'-OH)*	-39,75	4,15	$7,08 \cdot 10^{-5}$	75
Apigenin	-32,45	3,97	$1,07 \cdot 10^{-4}$	100
Luteolin	-40,01	3,66	$2,19 \cdot 10^{-4}$	99
Kämpferol	-30,81	3,66	$2,19 \cdot 10^{-4}$	69
Quercetin (7-OH)*	-33,17	3,63	$2,34 \cdot 10^{-4}$	25
Eriodictyol	-33,62	3,63	$2,34 \cdot 10^{-4}$	26
Myricetin	-30,90	3,63	$2,34 \cdot 10^{-4}$	52
Cyanidin	-26,44	3,63	$2,34 \cdot 10^{-4}$	20
<i>p</i> -Coumarsäure	-22,11	3,53	$2,95 \cdot 10^{-4}$	0,1
Kaffeensäure	-17,68	3,53	$2,95 \cdot 10^{-4}$	0,5
Naringenin	-26,70	3,49	$3,24 \cdot 10^{-4}$	18
Dihydroquercetin	-35,74	3,28	$5,25 \cdot 10^{-4}$	75
L-Dopa	-15,15	3,20	$6,31 \cdot 10^{-4}$	0
Scopoletin	-9,74	3,11	$7,76 \cdot 10^{-4}$	0

* Separate Betrachtung der Glucosidierung der 4'-OH- bzw. 7-OH-Gruppe des Quercetins.

Aus der Tabelle 3.11 geht hervor, dass die berechneten Wechselwirkungsenergien eine qualitative Korrelation mit den experimentell gemessenen Aktivitäten der UGT73A5 gegenüber den verschiedenen Substraten aufweisen (Vogt et al., 1999a), d.h. das *in vitro* beste Substrat Betanidin besitzt den niedrigsten Energiewert und damit die höchste Affinität zum Enzym. Mit steigender Energie (positivere Werte) nimmt die Affinität der zugehörigen Liganden ab. Werden hingegen die pK_D -(SCORE)-Werte betrachtet, so wäre Ferulasäure theoretisch das zweitbeste Substrat, obwohl diese vom Enzym nicht umgesetzt wird. Dieser Widerspruch ist momentan nicht erklärbar, insbesondere, da für die ebenfalls nicht glucosidierten Substrate Scopoletin und L-Dopa erwartungsgemäß niedrige pK_D -Werte ermittelt wurden. Die beobachtete Regiospezifität der UGT73A5 gegenüber Quercetin und die bevorzugte Glucosidierung in 4'-Position gegenüber der 7-Position wurde in die Bindungsstudien mit einbezogen und spiegelt sich sowohl in unterschiedlichen Wechselwirkungsenergien als auch in einer um eine Zehnerpotenz höheren Dissoziationskonstante wider. Insgesamt ist festzuhalten, dass die alleinige Berechnung der Wechselwirkungsenergien nicht ausreicht, um die Bindungsaffinität eines Liganden im Enzym beurteilen zu können, in Kombination mit den aus SCORE erhaltenen pK_D -Werten jedoch qualitative Rückschlüsse möglich sind.

Tabelle 3.12 Bindungsaffinität unterschiedlicher Liganden zum UGT73A4-Modell. Die Auflistung erfolgte nach absteigenden pK_D -(SCORE)-Werten.

Ligand	ΔE [kcal/mol]	pK_D	K_D [M]	Rel. Enzymaktivität [%]
Quercetin (4'-OH)*	-43,36	4,52	$3,02 \cdot 10^{-5}$	100
Apigenin	-34,95	4,31	$4,90 \cdot 10^{-5}$	100
Kämpferol	-32,425	3,63	$2,34 \cdot 10^{-4}$	95
Esculetin	-49,28	3,98	$1,05 \cdot 10^{-4}$	84
Myricetin	-34,945	3,63	$2,34 \cdot 10^{-4}$	80
Luteolin	-37,82	3,77	$1,70 \cdot 10^{-4}$	75
Eriodictyol	-11,87	3,63	$2,34 \cdot 10^{-4}$	74
Quercetagetin	-37,54	3,63	$2,34 \cdot 10^{-4}$	61
Betanidin	-113,90	2,43	$3,72 \cdot 10^{-3}$	10
Quercetin (7-OH)*	-17,07	3,08	$8,32 \cdot 10^{-4}$	25
Naringenin	-19,79	3,63	$2,34 \cdot 10^{-4}$	0
Ferulasäure	-7,29	2,92	$1,20 \cdot 10^{-3}$	0
Kaffeensäure	-5,84	2,94	$1,15 \cdot 10^{-3}$	0
<i>p</i> -Coumarsäure	-6,05	2,96	$1,10 \cdot 10^{-3}$	0
Salicylsäure	-11,04	2,91	$1,23 \cdot 10^{-3}$	0
Scopoletin	-34,0	2,78	$1,66 \cdot 10^{-3}$	0
L-Dopa	-7,08	2,31	$4,90 \cdot 10^{-3}$	0

* Separate Betrachtung der Glucosidierung der 4'-OH- bzw. 7-OH-Gruppe des Quercetins.

Die in Tabelle 3.12 für das UGT73A4-Modell aufgelisteten Daten zeigen auch hier eine Korrelation der berechneten Wechselwirkungsenergien mit den experimentell gemessenen Aktivitäten des Enzyms gegenüber den verschiedenen Substraten. Eine signifikante Ausnahme macht das Betanidin. Dieses besitzt den mit Abstand kleinsten Energiewert (-113,9 kcal/mol) und sollte demzufolge das beste Substrat sein. Eine Berücksichtigung der anhand von SCORE ermittelten Dissoziationskonstanten ergibt jedoch für Betanidin einen Wert von 3,02 mM, während die Dissoziationskonstante für das tatsächlich bevorzugte Substrat Quercetin bei 30,2 μ M liegt. Folglich reflektieren die pK_D -Werte die experimentellen Befunde in diesem Fall besser. Der Vergleich der beiden Substrate Apigenin und Scopoletin, die beide eine Wechselwirkungsenergie von -34 kcal/mol aufweisen, führt zu einem ähnlichen Ergebnis. Die nicht als Substrat akzeptierten Verbindungen zeichnen sich durch eine geringe Affinität aus, die zugehörigen Dissoziationskonstanten liegen im mM-Bereich.

3.8.4 Semiempirische Kalkulationen zur Untersuchung des Mechanismus des Zuckers-transfers unter Inversion der Konfiguration

Im nächsten Schritt stellte sich die Frage nach der Relevanz des Modells für eine mechanistische Interpretation des von den modellierten Enzymen katalysierten UDP-Glucose-transfers unter Inversion der Konfiguration ($\alpha \rightarrow \beta$) des Zuckers. Dieser Aspekt wurde mit Hilfe von semiempirischen Berechnungen genauer untersucht. Aus der Literatur ist wenig zum katalytischen Mechanismus von Glucosyltransferasen bekannt. Allgemein wird postuliert, dass die Reaktion durch die Abstraktion eines Protons vom Zuckerakzeptor durch eine als Base fungierende Aminosäure initiiert wird. Anschließend soll ein nukleophiler Angriff des Zuckerakzeptors am anomeren Kohlenstoffatom des Zuckerdonators unter Inversion der Konfiguration erfolgen. Formal würde dies einer nukleophilen Substitutionsreaktion zweiter Ordnung entsprechen (S_N2) (Kapitonov & Yu, 1999; Ünligil & Rini, 2000). Basierend auf den zuvor beschriebenden Ergebnissen wurde der positions-spezifische Glucosetransfer auf die 5-OH-Gruppe des Aglycons Betanidin mit Hilfe quantenmechanischer Methoden (PM3) für die UGT73A5 berechnet, da für dieses Enzym die essentielle Bedeutung der Aminosäuren H²² und E³⁷⁸ für die katalytische Aktivität durch experimentelle Befunde gesichert ist (Hans et al.,

in press). In Analogie zur Anordnung der Liganden im Modell (Abbildung 3.37 bzw. Abbildung 3.39) wurde im Programm SPARTAN ein Modell kreiert, das die Substrate Beta-nidin bzw. Quercetin und UDP-Glucose sowie die Aminosäuren H²², E³⁹⁴, K²⁸³ und K³¹ beinhaltet. Die Startgeometrie des Modells mit Betanidin und UDP-Glucose geht aus der nachfolgenden Abbildung 3.42 hervor und entspricht der optimalen Dockinganordnung der Liganden im Modell. Sämtliche berechneten Reaktionsschritte sind in Abbildung 3.43 nochmals schematisch mit den zugehörigen Bildungs- und Reaktionsenthalpien dargestellt. Die Bildungsenthalpie der optimierten Startstruktur betrug -1169,1 kcal/mol.

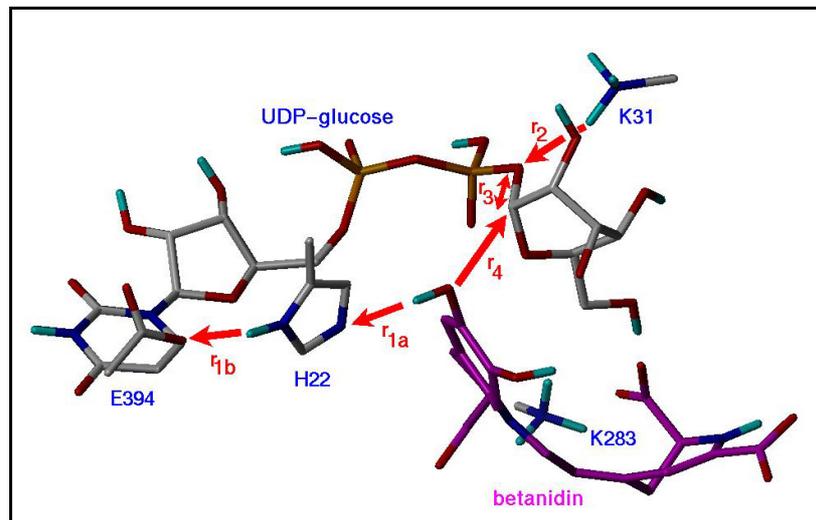


Abbildung 3.42 Modell, das für semiempirische PM3-Kalkulationen benutzt wurde. Die beschrifteten Pfeile markieren die essentiellen Reaktionsschritte im postulierten Mechanismus. Um den Rechenaufwand zu minimieren, wurden für die Aminosäuren folgende Modellkomponenten verwendet: Methylimidazol für Histidin, Acetat für Glutamat und Methylammonium für Lysin.

Die Anordnung der Aminosäuren und Liganden im postulierten aktiven Zentrum, ermöglicht die Bildung einer „katalytischen Triade“ zwischen der 5-OH-Gruppe des Betanidins, H²² und E³⁹⁴, ähnlich wie es für Serin-Proteasen (S, H und D) in der Literatur beschrieben ist (Blow, et al., 1969, 1976; Stroud, 1974; Barth et al., 1993, 1994). Aufgrund dessen wurde im Rahmen dieser Untersuchungen die Bildung des Nucleophils durch Protonenübertragung auf H²² als der entscheidende Schritt der Katalyse angesehen. Folglich wurde zunächst eine mögliche Protonenabstraktion von der 5-OH-Gruppe des Betanidins durch H²² (Reaktionskoordinate r_{1a} in Abbildung 3.42 und Abbildung 3.43a) und die simultane Protonenübertragung auf E³⁹⁴ (Reaktionskoordinate r_{1b} in Abbildung 3.42 und Abbildung 3.43a) auf quantenmechanischer Basis untersucht.

Die beiden Schritte r_{1a} und r_{1b} erfordern die Überwindung einer Energiebarriere von 14,0 kcal/mol und führen zu einem Energiegewinn von 8,9 kcal/mol, so dass die Gesamtenergie des Systems -1178,0 kcal/mol beträgt. Durch diesen thermodynamisch begünstigten Schritt wird die Nucleophilie des Zuckerakzeptors erhöht. Als zweiter Schritt wurde eine Protonenübertragung von der Seitenkette des K³¹ auf das Sauerstoffatom der zu spaltenden Zuckerphosphatesterbindung (Reaktionskoordinate r_2 in Abbildung 3.42 und Abbildung 3.43b) simuliert. Dieser Reaktionsschritt führt zu einer Energiezunahme des Systems um 4,5 kcal/mol, wobei die Gesamtenergie mit -1173,5 kcal/mol immer noch geringer ist als die der Edukte. Die Energiebarriere beträgt 13,2 kcal/mol, wobei die Bildung eines Oxoniumkations zu einer Vergrößerung des Bindungsabstandes zwischen dem C_α-Atom der Glucose und dem protonierten Sauerstoffatom von 1,39 auf 1,62 Å im Modell führt.

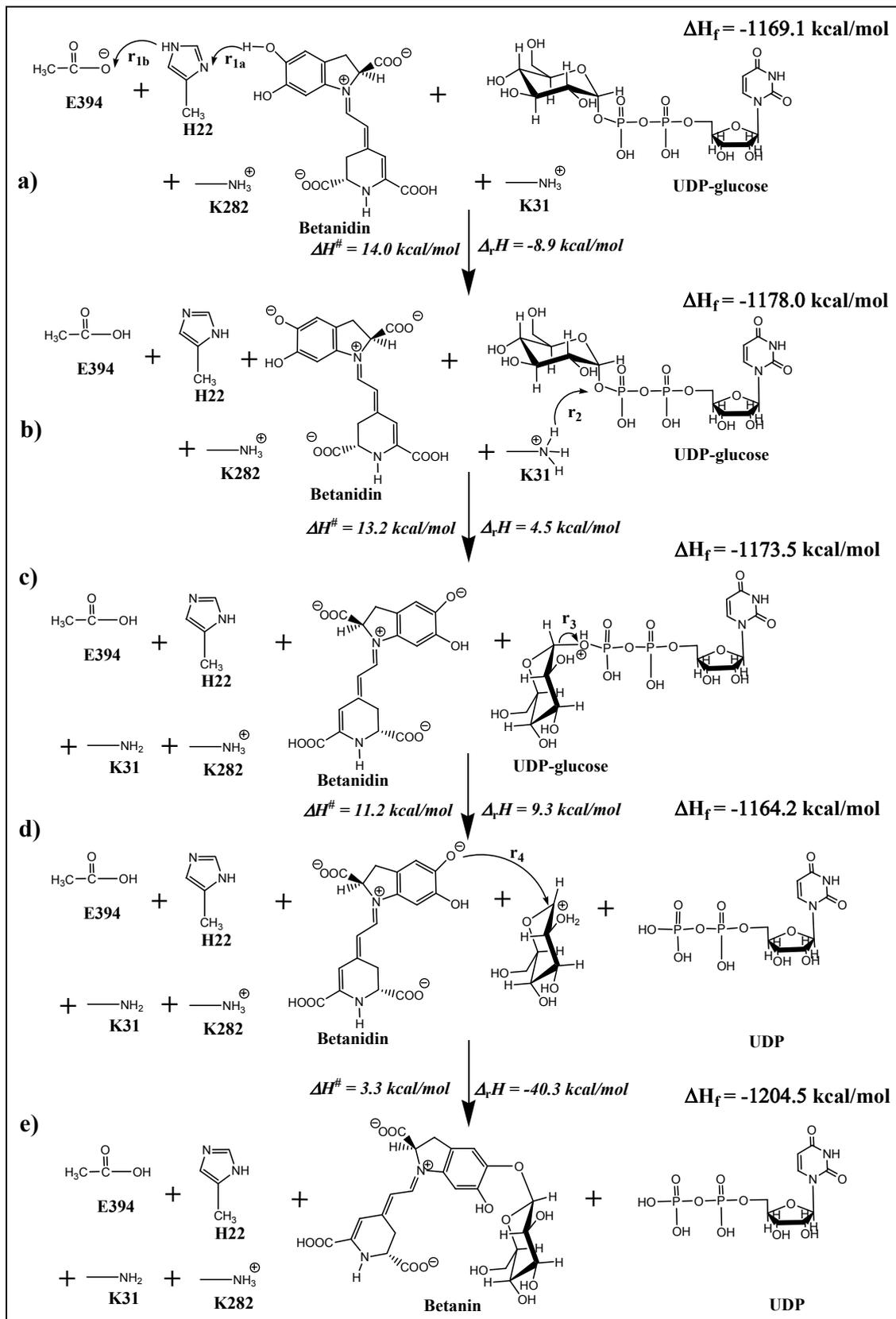


Abbildung 3.43 Postulierter S_N1 -Mechanismus des Glucosetransfers auf Betanidin am Beispiel des UGT73A5-Modells. ΔH_f bezeichnet die Summe der Bildungsenthalpien für jeden einzelnen Schritt, $\Delta_r H$ die Summe der Reaktionsenthalpien und ΔH^\ddagger repräsentiert die Aktivierungsenergie. Alle Angaben in kcal/mol.

An diesem Punkt wäre sowohl ein simultaner Angriff des Nucleophils auf das C $_{\alpha}$ -Atom der Glucose unter gleichzeitiger Abspaltung des UDP-Restes (S $_N$ 2) als auch die Bildung eines intermediären Carbokations, infolge der Spaltung der Esterbindung mit nachfolgendem Angriff des nucleophilen Zuckerakzeptors (S $_N$ 1), denkbar. Beide Mechanismen wurden auf der Basis der PM3-Methode berechnet. Für einen S $_N$ 2-Mechanismus (Reaktionskoordinate r $_4$ in Abbildung 3.42 und Abbildung 3.43d) wurde eine Aktivierungsenthalpie für den Übergangszustand von 30,4 kcal/mol ermittelt. Alternativ wurde zunächst die Spaltung der Zuckerphosphat-Esterbindung (Reaktionskoordinate r $_3$ in Abbildung 3.42 und Abbildung 3.43c), gefolgt vom Angriff des Nucleophils am C $_{\alpha}$ -Atom der Glucose unter Bildung des Produktes Betanin (Reaktionskoordinate r $_4$ in Abbildung 3.42 und Abbildung 3.43d) berechnet. Die Spaltung der Esterbindung erfordert die Überwindung einer Energiebarriere von 11,2 kcal/mol, der nucleophile Angriff erfolgt mit einem geringen Energieaufwand von 3,3 kcal/mol unter Inversion der Konfiguration des C $_{\alpha}$ -Atoms, da die Anordnung der Substrate im Enzym fixiert und die Richtung des nucleophilen Angriffs vorgegeben ist. Dieser Schritt führt insgesamt zu einem Energiegewinn von -40,3 kcal/mol.

Die berechnete Bildungsenthalpie für die Produkte beträgt -1204,5 kcal/mol, der Energiegewinn für die Gesamtreaktion -35,4 kcal/mol. Die relative hohe Energiebarriere von 30,4 kcal/mol für einen S $_N$ 2-Mechanismus im Vergleich zum alternativen S $_N$ 1-Mechanismus (11,2 kcal/mol) zeigt deutlich, dass letzterer auf der Basis des UGT73A5-Modells kinetisch begünstigt ist. Darüberhinaus zeigt die größte berechnete Aktivierungsenergie für die Bildung des Nucleophils im ersten Reaktionsschritt (vgl. Abbildung 3.42a) eine gute Übereinstimmung mit der durch den Arrhenius-Plot (3.4.3) für die UGT73A4 ermittelten Aktivierungsenergie von 9,5 kcal/mol. Für das UGT73A4-Modell wurden aus zeitlichen Gründen keine analogen Berechnungen angestellt, es ist jedoch anzunehmen, dass die Energiewerte in der gleichen Größenordnung liegen.

Am Beispiel des 3D-Modells der UGT73A5 aus *D. bellidiformis* und unter Berücksichtigung der aus Mutagenesestudien erhaltenen Resultate, wurde der katalytische Mechanismus einer Glucosyltransferase der β -Gruppe mit Hilfe quantenmechanischer Methoden untersucht. Es bleibt festzuhalten, dass diese Ergebnisse nur unter der Prämisse, dass das entwickelte 3D-Modell den realen Verhältnissen gerecht wird, gültig sind. Sicherlich ist keine Verallgemeinerung für alle Glucosyltransferasen möglich.

4. Diskussion

Viele Erkenntnisse bezüglich der an der Betalainbiosynthese beteiligten Reaktionsschritte und Enzyme wurden erst in den letzten zehn bis fünfzehn Jahren gewonnen. Die Enzyme Tyrosinase (Mueller et al., 1996; Steiner et al., 1996, 1999) und Dopa-Dioxygenase (Girod & Zryd, 1991a; Terradas & Wyler, 1991; Hinz et al., 1997; Mueller et al., 1997a,b; Christinet et al., 2004) sind inzwischen biochemisch und molekularbiologisch charakterisiert worden. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Bildung der Betaxanthine infolge einer Kondensationsreaktion zwischen Betalaminsäure und Aminosäuren bzw. Aminen sehr wahrscheinlich spontan abläuft (Schliemann et al., 1999). Die grosse Vielfalt der Betacyane beruht auf der Glycosidierung des Betanidins in C-5-OH oder C-6-OH-Position und nachfolgender Acylierung der Zucker (Strack et al., 2003). Die Beteiligung von spezifischen Glucosyltransferasen an der Biosynthese des Betacyans Betanin konnte bisher nur für *D. bellidiformis* einwandfrei gezeigt werden (Heuer & Strack, 1992; Heuer et al., 1996; Vogt et al., 1997), obwohl eine Fülle komplexer Betacyankonjugate, z. B. aus *Bougainvillea glabra* oder *Gomphrena globosa*, bekannt ist (Heuer, 1995).

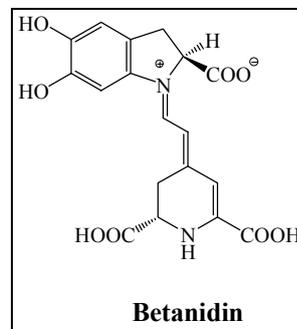


Abbildung 4.1 Blüte der Aizoacee *D. bellidiformis* (links) und Strukturformel des Aglycons Betanidin (rechts).

4.1 Methoden zur Erforschung pflanzlicher UGTs: Möglichkeiten und Grenzen

Glycosidierungen stellen oft die letzten Schritte in der Modifizierung pflanzlicher Sekundärstoffe, z. B. Flavonoidbiosynthese (Heller & Forkmann, 1988), dar und finden sowohl im Rahmen anaboler als auch kataboler Prozesse statt. Die Diversität sekundärer Glykokonjugate in einer Spezies führt zwangsläufig zu der Frage, wie viele verschiedene Glycosyltransferasen für die Synthese der entsprechenden Vielfalt von Verbindungen tatsächlich notwendig sind. Die Charakterisierung dieser Enzyme wird durch ihre im allgemeinen geringe Abundanz in der Zelle erschwert, ihre Reinigung ist aufwendig und führt meist nur zu geringen Ausbeuten (Vogt & Jones, 2000; Lim et al., 2003a). Weiterhin ist weder die Lokalisation noch die Regulation dieser Enzyme geklärt, obwohl allgemein angenommen wird, dass es sich um lösliche Enzyme handelt. Bis vor wenigen Jahren stellte die Reinigung aus pflanzlichen Rohextrakten aufgrund einer bestimmten katalytischen Aktivität die einzige Möglichkeit dar, individuelle Glycosyltransferasen zu charakterisieren (Li et al., 2001). Früher führte dieses Vorgehen jedoch dazu, dass die meisten Enzyme nur partiell gereinigt werden konnten und sich Substratspezifitäten und kinetische Parameter in einem Enzymgemisch nur ungenau bestimmen liessen (Vogt & Jones, 2000). Darüberhinaus sind UGTs oft sehr labil, ein Faktor, der ihre Reinigung, ähnlich wie die membrangebundener Enzyme, z. B. Cytochrom P450-Monooxygenasen, zusätzlich erschwert (Chapple, 1998). Erst die Entwicklung molekularbiologischer Techniken ermöglichte es, unter Verwendung bekannter UGT-Sequenzen, ein bestimmtes Enzym gezielt zu klonieren und durch heterologe Expression seine Eigenschaften *in vitro* zu untersuchen. Beispiele für die erfolgreiche Identifizierung pflanzlicher UGTs mit biochemischen Methoden und nachfolgender Klonierung der entsprechenden cDNAs sind die pathogen-induzierbare Salicylsäure-modifizierende UGT aus Tabak (Lee & Raskin, 1999)

oder die Limonoid-UGT aus *Citrus* (Kita et al., 2000). Die steigende Zahl verfügbarer Glycosyl- und Glucuronosyltransferasesequenzen in den Datenbanken machte es in den letzten 20 Jahren möglich, ein hochkonserviertes Sequenzmotiv für Glycosyltransferasen der β -Gruppe zu identifizieren und neue putative UGTs auf Homologiebasis aus verschiedenen Spezies zu klonieren. Beispiele sind die Klonierung des in die Bildung von Sinapoylglucose involvierten Enzyms aus *Brassica napus* (Milkowski et al., 2000) oder die Klonierung der Naphtol-induzierbaren-UGTs aus *Nicotiana tabacum* (Taguchi et al., 2003b). Eine wesentliche Rolle spielte dieser Ansatz auch für die Identifizierung einer Multigenfamilie von 118 Glucosyltransferasegenen im vollständig sequenzierten *Arabidopsis*-Genom (Ross et al., 2001; Paquette et al., 2003). Für die erfolgreiche Klonierung und Charakterisierung der UGT73A4 und UGT71F1 aus *B. vulgaris* im Rahmen dieser Arbeit war die Herstellung homologer Sonden, basierend auf dem PSPG-Box Konsensus-Motiv, ebenfalls von entscheidender Bedeutung.

4.2 Glucosyltransferasen aus *B. vulgaris*

Die dieser Dissertation zugrundeliegende Fragestellung beinhaltete die Untersuchung der Rolle von Glucosyltransferasen in der Betalainbiosynthese in *B. vulgaris*. Die Aktivität Betanidin-glucosidierender Enzyme aus *D. bellidiformis* wurde in der entsprechenden Zellkultur erstmals nachgewiesen (Heuer & Strack, 1992; Heuer 1995). Die korrespondierenden Enzyme wurden ebenfalls aus der Zellkultur gereinigt bzw. kloniert (Vogt et al., 1997; Vogt, 1999a). Deshalb wurde auch für *B. vulgaris* als Untersuchungsobjekt eine rote Zellsuspensionskultur gewählt. Mittels einer PCR-gestützten Strategie konnten aus einer cDNA-Bank, mehrere „full-length“-Klone isoliert werden. Ein vergleichbarer Ansatz mit einer cDNA-Bank aus *B. vulgaris*-Pflanzen, die mit einer Partialsequenz der UGT73A5 aus *D. bellidiformis* durchgemustert wurde, war zuvor ohne Ergebnis geblieben (T. Vogt, persönl. Mitteilung). Überraschenderweise zeigte sich, dass alle aus der Zellkultur isolierten und sequenzierten Klone auf Nukleotidebene identisch waren. Dies ist möglicherweise durch die Stringenz der Hybridisierungsbedingungen und die Spezifität der verwendeten homologen Sonden erklärbar. Eine weitere Interpretationsmöglichkeit ist, dass die zu den cDNAs korrespondierende mRNA in der Zellkultur dominiert. Vergleichbare Resultate wurden z. B. nach Screening einer cDNA-Bank aus einer *Catharanthus roseus*-Zellkultur erzielt. Hierbei wurde ebenfalls eine PCR-gestützte Strategie mit degenerierten Primern, die zur Klonierung von Isochinolinalkaloid-spezifischen Methyltransferasen verwendet wurden, eingesetzt (Schröder et al., 2002).

Die zur weiteren Charakterisierung ausgewählten Klone, UGT73A4 und UGT71F1, besitzen untereinander eine geringe Sequenzidentität von 24 %. Eine vorläufige funktionelle Einordnung beider *B. vulgaris*-Klone aufgrund von Sequenzdatenbankvergleichen ergab, dass beide Klone den höchsten Verwandtschaftsgrad zu den Betanidin-UGTs aus *D. bellidiformis* aufwiesen und dementsprechend zu unterschiedlichen Gruppen innerhalb der Superfamilie pflanzlicher UGTs gehören (Abbildung 3.9). Die Identifizierung eines Enzyms (UGT71F1) aus *B. vulgaris*, das in der Lage ist, UDP-Glucose auf die C-6-OH-Gruppe des Betanidins zu übertragen, ist zunächst überraschend, da das enzymatische Produkt, Gomphrenin I, in der Pflanze und der Zellkultur nicht existiert. Die Tatsache, dass sich Pflanzen im Laufe der Evolution die Fähigkeit bewahrt haben, Substanzen zu metabolisieren, die keine endogenen Substrate mehr darstellen, ist in der Literatur jedoch kein unbekanntes Phänomen. So wurde z. B. aus einer unter Lichtausschluss kultivierten *C. roseus*-Zellkultur eine flavonoidspezifische Methyltransferase gereinigt (Cacace, et al., 2003). Unter diesen Anzuchtbedingungen werden jedoch keine Flavonoide in der Zellkultur synthetisiert, da die Expression des Schlüsselenzyms der Flavonoidbiosynthese, der Chalcon-Synthase, lichtabhängig ist. Ein zu berücksichtigender Kritikpunkt ist hier allerdings, dass *Catharanthus*-Pflanzen nicht auf die entsprechende Enzymaktivität hin untersucht wurden. Die Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms führte zu

der Erkenntnis, dass diese Pflanze homologe Enzyme zum Berberinbrücken-Enzym oder der Tropinon-Reduktase besitzt, obwohl ursprünglich angenommen wurde, dass diese Enzyme nur in wenigen Spezies existieren (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Taguchi et al., 2003b). Ebenso unerwartet war die Klonierung der Arbutinsynthase aus einer Zellkultur von *R. serpentina*, da Arbutin (Hydrochinon- β -D-glucopyranosid) als Metabolit oder Produkt in dieser Pflanze oder der Zellkultur unbekannt war, jedoch inzwischen einwandfrei nachgewiesen wurde (Arend et al., 2001; Hefner et al., 2002).

4.2.1 Expressionsanalyse der UGT73A4 und UGT71F1

Die Analyse der Transkriptakkumulation der UGT73A4 in drei Ökotypen der Stammform *B. maritima* und in unterschiedlichen Altersstadien von *B. vulgaris* bestätigte, dass die UGT73A4 mRNA in allen untersuchten Geweben akkumulierte, erwartungsgemäß wurde das stärkste Signal in der Zellkultur detektiert. Der Vergleich der Zellkultur mit der Zuchtform *B. vulgaris* einerseits und der Stammform *B. maritima* andererseits, sollte sicherstellen, dass es sich bei der klonierten UGT73A4 nicht um ein Enzym handelt, das nur in der Zuchtform von *B. vulgaris* auftritt. Innerhalb der untersuchten Altersstadien wurde eine verstärkte Transkriptakkumulation 2-6 Wochen nach der Aussaat beobachtet. Dies ist möglicherweise auf eine lichtinduziert verstärkte Betalainbiosynthese zurückzuführen, wie sie in der Literatur zum Beispiel für *Amaranthus caudatus* beschrieben wurde (French et al., 1973; Guidici de Nicola et al., 1974). Für *B. vulgaris*-Zellkulturen wird ebenfalls eine Lichtabhängigkeit der Pigmentsynthese diskutiert (Leathers & Zryd, 1992). Untersuchungen zu stress-induzierten Veränderungen im Sekundärmetabolitenprofil der Aizoacee *Mesembryanthemum crystallinum* bestätigten eine licht-induzierte Betacyan-Akkumulation (Vogt et al., 1999b). Die Induzierbarkeit von Glucosyltransferasen durch verschiedenste Faktoren ist nicht ungewöhnlich. Erst kürzlich wurde an einer Tabakzellkultur gezeigt, dass die Applikation von Naphthol im Rahmen eines Detoxifikationsprozesses zur Induktion dreier UGTs führte, die Naphthol glucosidieren (Taguchi et al., 2003b). Pathogen-responsive Phenylpropanoid-UGTs aus Tabak wurden 1998 von Fraissinet-Tachet und Mitarbeitern beschrieben. Aufgrund der Sequenzhomologie der UGT73A4 zu Stress-induzierbaren UGTs aus Tabak und Tomate, wäre zu vermuten, dass die Transkription der UGT73A4 mRNA durch Salicylsäure oder Jasmonsäure induzierbar ist. Dieser Aspekt wurde aus zeitlichen Gründen nicht eingehender untersucht. Aus analogen Studien an der UGT74A5 aus *D. bellidiformis* wurden keine entsprechenden Hinweise erhalten (Vogt et al., 1999a).

Eine gewebespezifische Akkumulation der UGT73A4 mRNA in *B. vulgaris* wurde in Hypokotylen, Spross und Blättern analysiert. Das stärkste Signal wurde hierbei in den Hypokotylen detektiert, war jedoch auch in Blättern und Spross erkennbar. Folglich wäre es naheliegend gewesen, eine gewebespezifische Verteilung der Enzymaktivität entweder durch Aktivitätstests oder durch Western-Blot-Analyse zu untersuchen. Aufgrund der geringen Nachweisbarkeit der Enzymaktivität in den pflanzlichen Rohextrakten wurde eine Gewebespezifität der Enzymaktivität nicht näher untersucht. Möglicherweise sind bislang unbekannt posttranskriptionale oder posttranslationale Regulationsmechanismen eine Ursache für die geringe Enzymaktivität. Western-Blot-Analysen mit verschiedenen Geweben konnten in Ermangelung eines spezifischen Antikörpers nicht durchgeführt werden. Die Detektion der meisten rekombinanten UGTs, die als Fusionsproteine exprimiert werden, erfolgt mit Hilfe von His- oder GST-Tag-Antikörpern. Ausnahmen bilden hier die rekombinante UGT73A5 aus *D. bellidiformis*, für die ein wenig spezifischer Peptidantikörper verfügbar ist (T. Vogt, persönl. Mitteilung) sowie die rekombinanten Benzoxazinoid-GTs aus Mais (von Rad et al., 2001) und die rekombinante Phenylpropanoid-UGT aus Tabak (Chong et al., 2002). Der Nachweis des UGT71F1-Transkriptes mittels RT-PCR gelang trotz mehrfacher Wiederholung

des Experimentes nur in der Zellkultur. Für das homologe Enzym UGT71F2 aus *D. bellidiformis* konnte eine konstitutive Expression in verschiedenen Zellkulturproben detektiert werden, während die mRNA in Blüten kaum nachweisbar war (Vogt, 2002). Demnach wäre es denkbar, dass das UGT71F1-Transkript in der Pflanze nicht nachgewiesen werden konnte, weil eine gewebespezifische Expression vorliegt. Dieser Aspekt wurde an *B. vulgaris* nicht näher untersucht.

4.2.2 Überprüfung der Funktionalität *in vitro* – heterologe Expression

Die Erfahrung zeigt, dass allein auf der Basis von Sequenzhomologien keine sichere Vorhersage der Funktion eines Proteins möglich ist. Ein Beispiel hierfür ist die inzwischen klonierte und charakterisierte IAA-GT aus *A. thaliana* (Jackson et al., 2001). Die Nukleotidsequenz des Enzyms zeigt keine Übereinstimmung mit einer zuvor aufgrund der Ähnlichkeit zum *iaglu*-Gen aus Mais als IAA-GT annotierten Sequenz des *Arabidopsis*-Genoms. Darüberhinaus besitzt eine weitere putative IAA-UGT aus *Arabidopsis*, mit über 80 % Identität zum funktionell charakterisierten Enzym aus der gleichen Pflanze, nur eine verschwindend geringe Aktivität gegenüber Indolessigsäure (Jackson et al., 2001). Ein weiteres Beispiel, das besonders verdeutlicht, wie irreführend die Annotation einer Sequenz aufgrund von Datenbankvergleichen sein kann, ist die putative Betanidin-6-UGT aus *Oriza sativa* (Abbildung 3.9). Da Reis keine Betalain-führende Pflanze ist, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hier aufgrund der Ähnlichkeit zur UGT71F2 aus *D. bellidiformis* wohl eher um eine Flavonoid-3-UGT handeln könnte. In der Literatur finden sich aber auch zahlreiche Beispiele für die korrekte Annotation und Vorhersage der Substratspezifität einer UGT-Sequenz anhand des Vergleichs mit anderen, funktionell charakterisierten Glucosyltransferasen. Stellvertretend seien hier die Flavonoid-3-UGT und Anthocyanidin-5-UGT aus *Petunia hybrida* genannt (Yamazaki et al., 2002).

Zur funktionellen Expression der UGT73A4 und UGT71F1 aus *B. vulgaris* standen mehrere Systeme zur Verfügung. Da sich die Expression in *E. coli* bereits für die rekombinante UGT73A5 aus *D. bellidiformis* bewährt hat, und Glucosyltransferasen im allgemeinen als lösliche Enzyme gelten (Vogt et al., 1999a; Vogt & Jones, 2000) wurde zunächst diese schnelle und kostengünstige Methode gewählt. Sowohl die UGT73A4 als auch die UGT71F1 wurden in *E. coli* als lösliche Proteine exprimiert, wobei die Expressionsrate relativ gering war. Die Bildung von Einschlusskörpern in den unlöslichen Fraktionen konnte in der SDS-PAGE nicht beobachtet werden. In der Literatur finden sich diesbezüglich wenig Vergleichsdaten, da meistens keine Angaben über die Ausbeute an rekombinantem Protein gemacht werden. Eine Ausnahme bildet hier die Publikation zur Expression der Arbutinsynthase in *E. coli*, wo aus 20 Litern Bakterienkultur 25 mg rekombinantes Protein erhalten, 90 % des rekombinanten Proteins aber in Einschlusskörpern detektiert wurde (Arend et al., 2001). Hinsichtlich der spezifischen Aktivität im bakteriellen Rohextrakt ergab sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden *B. vulgaris*-Enzymen. Im Falle der UGT73A4 war diese mit 6,9 pkat/mg um den Faktor 8,6 höher als bei der UGT71F1 (0,8 pkat/mg). Die Stabilität der UGT71F1 nach Expression im prokaryontischen System war gering, die Halbwertszeit betrug ca. 24 Stunden bei einer Lagerung bei 4 °C. Dies steht im Gegensatz zu den für die pflanzliche UGT71F2 aus *D. bellidiformis* bekannten Daten, das partiell gereinigte, native Enzym konnte sowohl bei 4 °C als auch bei tiefen Temperaturen gelagert werden (Heuer, 1995). Die rekombinante UGT71F2 konnte allerdings bis heute nicht heterolog exprimiert werden (Vogt, 2002). Dies könnte ebenfalls auf eine Instabilität des Proteins hindeuten. Über mögliche Ursachen lässt sich an dieser Stelle nur spekulieren, da es sich bei dem von Heuer charakterisierten pflanzlichen Enzym um teilgereinigtes Protein handelte, sind stabilisierende Effekte von Begleitproteinen nicht auszuschließen. Eine ähnliche Instabilität ist z. B. für eine rekombinante Flavonol-7-GT aus *N. tabacum* beschrieben worden. Hier betrug die Halbwertszeit

des Enzyms NtGT2 sogar nur 4-6 Stunden, es konnte aber durch Zusatz von UDP-Glucose zum Extraktionspuffer eine Stabilisierung erzielt werden (Taguchi et al., 2003a). Es ist aber kritisch anzumerken, dass die Autoren bei der Charakterisierung der Enzymstabilität keine konkrete Temperaturangabe machen.

Für die schwache Expression in *E. coli* sind verschiedene Ursachen denkbar. Bakterien sind nicht in der Lage, bestimmte posttranslationale Modifikationen durchzuführen, z. B. Phosphorylierungen, Glycosidierungen oder proteolytische Spaltungen. Signalsequenzen für mögliche posttranslationale Modifizierungen konnten für beide *B. vulgaris*-Enzyme jedoch nicht identifiziert werden. Ein weiterer zu berücksichtigender Aspekt ist die Tatsache, dass die Aminosäuren durch mehr als nur ein Codon codiert sein können und Pro- und Eukaryonten diese in unterschiedlicher Quantität verwenden. Eine Analyse beider Nukleotidsequenzen mit dem Programm *E. coli* Codon Usage 2.1 führte zu dem Ergebnis, dass die UGT73A4-Sequenz 25 % Codone beinhaltet, die durch in *E. coli* selten vorkommende tRNAs codiert werden und die UGT71F1 23 %. Aus diesem Grunde wurden zur Expression beider Proteine auch *E. coli*-CodonPlus-Stämme verwendet, die zusätzliche Genkopien für seltene t-RNAs, wie Arginin, Leucin, Isoleucin und Prolin tragen. Eine signifikante Verbesserung der Expressionsrate wurde hierbei jedoch nicht beobachtet. Ein weiteres Problem der Proteinexpression in Bakterien ist die korrekte Faltung des zu exprimierenden Proteins, da hierzu oft sogenannte Chaperone benötigt werden, die in pro- und eukaryontischen Systemen unterschiedlich sind (Hartl, 1996). Um zu untersuchen, ob die Expressionsrate und im Falle der UGT71F1 auch die Stabilität des Enzyms durch Expression in einem eukaryontischen System positiv beeinflusst werden könnte, wurden entsprechende Versuche mit Insekten- und Hefezellen durchgeführt. Es gelang nicht, die beiden Proteine in *S. frugiperda* funktionell zu exprimieren, obwohl die Sequenzen korrekt in den Expressionsvektor kloniert wurden. Die Gründe hierfür sind unklar, entweder ist bereits die Transfektion der Zellen gescheitert oder die Proteine wurden nicht oder inaktiv exprimiert. Entsprechende Versuche, die UGT71F2 aus *D. bellidiformis* in diesem System zu exprimieren, scheiterten ebenfalls (Vogt, 2002).

Die funktionelle Expression beider *B. vulgaris*-Enzyme in *S. cerevisiae* war hingegen erfolgreich und ist auch in der Literatur für andere UGTs beschrieben worden, so z. B. für die Solanidin-UGT aus *S. tuberosum* (Moehs et al., 1997) und eine Anthocyanidin-UGT aus *P. frutescens* (Yamazaki et al., 1999). Sowohl für die UGT73A4 als auch die UGT71F1 konnte in der löslichen Fraktion der Hefezelleextrakte Enzymaktivität detektiert werden. Da jedoch keine verbesserte Stabilität der UGT71F1 in diesem System beobachtet werden konnte und die Enzymaktivität geringer war als in *E. coli*, erwies sich die Expression im prokaryontischen System doch als geeigneter.

Für zukünftige Projekte, z. B. Kristallisationsversuche mit der UGT73A4, sollten die Expressionsbedingungen in *E. coli* hinsichtlich einer Fermenterapplikation weiter optimiert werden, um gereinigtes Protein im größeren Maßstab gewinnen zu können. Um auch für die UGT71F1 röntgenkristallographische Daten erhalten zu können, ist zunächst eine Optimierung der Reinigungsstrategie erforderlich, die durch die Labilität des Enzyms erschwert werden dürfte. Hier ergibt sich ein wichtiger Unterschied zur nativen UGT71F2 aus *D. bellidiformis*, die durch Farbstoffligandenchromatographie an Reactive-Yellow-3 fast bis zur Homogenität gereinigt werden konnte (Vogt et al., 1997).

4.2.3 Charakterisierung der UGTs aus *B. vulgaris*

Die in dieser Arbeit klonierten und charakterisierten Enzyme sind löslich und besitzen ein Molekulargewicht von 54 kDa. Dies entspricht dem aus der Literatur bekannten charakteristischen Bereich für pflanzliche UGTs (Vogt & Jones, 2000). Es handelt sich im Falle der UGT73A4 um ein monomeres Enzym, was durch die analytische Ultrazentrifugation bestätigt wurde, für die UGT71F1 wird dies im Vergleich zur UGT71F2 aus *D. bellidiformis* ebenfalls angenommen. Beide Enzyme besitzen ein relativ breites pH-Optimum, die UGT71F1 ist sogar bei pH 9,5 aktiv. Ähnliche pH-Optima im alkalischen Milieu sind für Flavonol-UGTs aus *Medicago sativa* in der Literatur beschrieben worden (Parry & Edwards, 1994). Andere pflanzliche Glucosyltransferasen zeigen pH-Optima zwischen 7,5 und 8,5 (Paczkowski et al., 1997; Ford et al., 1998; Durren & McIntosh, 1999). Die Temperaturmaxima beider Enzyme unterscheiden sich geringfügig und liegen zwischen 30 °C (UGT73A4) und 37 °C (UGT71F1). Hier ergibt sich ein deutlicher Unterschied zur pflanzlichen UGT73A5 aus *D. bellidiformis*, für die ein Temperaturmaximum von 50 °C beschrieben wurde (Heuer, 1995). Ähnliche hohe Temperaturmaxima sind auch für die Flavonol-3-*O*-galactosyltransferase aus *Petunia hybrida* (Miller et al., 1999) oder die Arbutinsynthase aus *R. serpentina* (Hefner et al., 2002) beobachtet worden. Die im Rahmen ihrer Dissertation von S. Heuer für die aus der Zellkultur partiell gereinigten *Dorotheanthus*-Enzyme ermittelten Aktivierungsenergien von 53 kJ/mol (Heuer, 1995) weichen von den in dieser Arbeit bestimmten Werten (~38 kJ/mol) ab. Die in Zusammenhang mit den Modellierungsstudien durchgeführten semiempirischen Berechnungen ergaben für den postulierten S_N1-Mechanismus eine Aktivierungsenergie von umgerechnet 46 kJ/mol.

Die Beeinflussung der Enzymaktivität durch EDTA und divalente Kationen wurde am Beispiel der UGT73A4 untersucht, wobei keine Abhängigkeit festgestellt werden konnte. Zink und Kupferionen wirkten zwischen 10 und 100 µM inhibierend, wobei die Sensitivität gegenüber Kupfer höher war, was in Einklang mit Literaturdaten steht (Latchinian-Sadek & Ibrahim, 1991a; Ishikura & Mato, 1993). Auch hier ergeben sich für die Enzyme aus *B. vulgaris* und *D. bellidiformis* vergleichbare Eigenschaften (Vogt et al., 1997).

Der beobachtete Einfluß Aminosäure-modifizierender Reagenzien auf die Enzymaktivität der UGT73A4 und UGT71F1 gab erste Hinweise auf die mögliche Beteiligung von Cystein-, Lysin- und Histidinresten am katalytischen Mechanismus. Hier wurden deutliche Unterschiede zu den UGTs aus *D. bellidiformis* beobachtet. Die Sensitivität der UGT73A4 war zehnfach geringer gegenüber PCMBs als im Falle der UGT73A5, die Aktivität der UGT71F1 blieb im getesteten Konzentrationsbereich von 10 µM-1 mM DEPC unbeeinflusst, während die homologe UGT71F2 bereits durch 10 µM DEPC gehemmt wurde. Hier ist anzumerken, dass sowohl für die *B. vulgaris*-Enzyme als auch die *D. bellidiformis*-Enzyme keine Inhibierung durch Dithiothreitol oder Mercaptoethanol festgestellt werden konnte, so dass die Ausbildung von Disulfidbrücken für die Aktivität nicht essentiell zu sein scheint. Vergleichbare Studien an einer Solasodin-UGT aus *S. melongena* bestätigten ebenfalls die Bedeutung von Cystein-, Lysin- und Histidinresten für die katalytische Aktivität der untersuchten Glucosyltransferase (Nawloka et al., 2003).

In den letzten Jahren hat die gezielte Mutagenese von Aminosäuren verstärkt dazu beigetragen, katalytisch wichtige Aminosäuren zu identifizieren, dieser Ansatz wurde zum Beispiel erfolgreich auf UDP-Glucuronsäure-abhängige Enzyme aus bakteriellen und tierischen Organismen angewendet (Busch et al., 2000; Ouzzine, 2002). Ergebnisse aus Mutagenesestudien an einer pflanzlichen Glucosyltransferase sind erst kürzlich für die Arbutinsynthase aus *R.*

serpentina publiziert worden (Hefner & Stöckigt, 2003). Vergleichbare Daten für die UGT73A5 aus *D. bellidiformis* (Hans et al., in press) spielten eine wesentliche Rolle für die in dieser Dissertationsschrift vorgestellten Modellierungsstudien und den postulierten Reaktionsmechanismus des Enzyms.

4.2.4 Substratspezifitäten: Vergleichbarkeit *in vitro* und *in vivo*?

Vor wenigen Jahren wurde in einem Übersichtsartikel von Jones und Vogt (2001) aufgrund des Vergleichs bis dato funktionell charakterisierter Enzyme vorgeschlagen, Glycosyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels in drei Gruppen mit breiter, mittlerer und enger Substratspezifität einzuteilen. Beispiele für hochspezifische Enzyme sind die Anthocyanidin-3-UGT aus *Vitis vinifera* (Ford et al., 1998), die Flavonol-3-UGT aus *Petunia hybrida* (Miller et al., 1999) oder die DIMBOA-UGTs aus *Zea mays* (von Rad et al., 2001). Obwohl die Anzahl der hier getesteten Substrate limitiert war, liess sich erkennen, dass bevorzugt Flavonole und Flavone mit vicinalen Hydroxygruppen im B-Ring umgesetzt wurden und sich beide *B. vulgaris*-Enzyme in die Gruppe mit mittlerer Spezifität einordnen lassen. Ein herausragendes Beispiel für eine Glucosyltransferase mit äußerst breiter Substratspezifität ist die Arbutin-Synthase aus *R. serpentina* (Hefner et al., 2002). Von 74 natürlichen und synthetischen phenolischen Substraten und zwei Hydroxyzimtsäurealkoholen wurden 45 Verbindungen vom Enzym akzeptiert. Neben *O*-Methyltransferasen (z. B. Frick & Kutchan, 1999) ist die Arbutin-Synthase das erste Enzym, für das eine solche Multi-Funktionalität belegt ist, sicherlich auch dadurch begründet, dass die bis heute charakterisierten UGTs nur mit einer limitierten Anzahl potentieller Substrate getestet wurden. Die Fähigkeit pflanzlicher Glycosyltransferasen neben endogenen, physiologischen Substraten auch Xenobiotika, wie z. B. Naphtol oder 2,4,5-Trichlorphenol (TCP) umzusetzen, hat in der aktuellen Literatur zu der Erkenntnis geführt, dass nicht nur Regioselektivität (Vogt et al., 1999a; Jones & Vogt, 2001; Taguchi et al., 2001), sondern auch „Chemoselektivität“ ein entscheidendes Kriterium für die Akzeptanz eines bestimmten Substrates sein kann (Messner et al., 2003). Mit dem Begriff Chemoselektivität ist hier die chemische Reaktivität einer funktionellen Gruppe, z. B. die Acidität phenolischer Hydroxylgruppen, gemeint.

Die in der vorliegenden Arbeit erfolgte Untersuchung der Substratspezifität der rekombinanten UGTs *in vitro* und die Bestimmung der apparenten K_M -Werte zeigte, dass trotz der hohen Sequenzidentität der UGT73A4 zur UGT73A4 aus *D. bellidiformis* bzw. der UGT71F1 zur UGT71F2 die Affinität zu Betanidin im Vergleich zum Flavonol Quercetin oder Flavon Apigenin äußerst gering war. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei den *B. vulgaris*-Enzymen um regiospezifische Flavonoid-7,4'- bzw. 3-UGTs handelt, die eine Nebenaktivität gegenüber Betanidin zeigen. Konsequenterweise könnte dann angenommen werden, dass andere Flavonoid-UGTs mit vergleichbaren Substrat- und Regiospezifitäten, z. B. die Flavonol-7,4'-GT aus *A. cepa* (Kramer et al., 2003) oder die Anthocyanidin- und Flavonol-3-UGT aus *A. majus* (Jackson et al., 1992) ebenfalls Betanidin als Substrat akzeptieren sollten. Dies ist nicht der Fall, wie bereits aus der Literatur bekannt ist bzw. für die Glucosyltransferase aus *A. cepa* im Rahmen dieser Arbeit nochmals bestätigt wurde (Vogt et al., 1997). Für die Betanidin-UGTs aus *D. bellidiformis* wird eine Rekrutierung dieser Enzyme aus dem Flavonoidstoffwechsel diskutiert (Vogt et al., 1997). Die Akzeptanz von Flavonoiden und ihre regiospezifische Glucosidierung durch UGT73A5 und UGT71F2 aus *D. bellidiformis*, beruht vermutlich auf einer strukturellen Ähnlichkeit des *cyclo*-Dopa-Teils des Betanidinmoleküls und des Flavonoidgrundkörpers (Vogt et al., 1997). Diese Hypothese scheint auch im Hinblick auf die Enzyme aus *B. vulgaris* wahrscheinlich, wenn angenommen wird, dass Betanidin das endogene Substrat der UGT73A4 repräsentiert. Für die geringe Affinität des Enzyms *in vitro* gegenüber Betandin lassen sich mögliche Erklärungsansätze in der Literatur finden.

Die für die *in vitro*-Studien gewählten Reaktionsbedingungen entsprechen nicht den natürlichen Bedingungen in der pflanzlichen Zelle. Eine breite Substratspezifität eines Enzyms *in vitro* lässt somit nicht unmittelbar auf die Enzymaktivität in der Pflanze schliessen (Ross et al., 2001; Hansen et al., 2003; Jones et al., 2003). Aufgrund dessen finden sich in der Literatur immer mehr Bestrebungen, durch Transformationsexperimente gezielt den Anteil bestimmter Enzyme in Pflanzen zu erhöhen und *in vitro* und *in vivo* Substrat- und Regiospezifitäten zu vergleichen. Ein Beispiel ist eine Kaffeesäure-UGT (UGT71C1) aus *A. thaliana*, deren katalytische Effizienz gegenüber Quercetin *in vitro* um den Faktor 13 höher ist als gegenüber Kaffeesäure (Lim et al., 2003b). Experimente mit transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen haben jedoch gezeigt, dass UGT71C1 *in planta* die Bildung von Kaffeesäure-3-*O*-glucosid katalysiert, während die Bildung von Quercetinglucosiden nicht detektiert wurde (Lim et al., 2003b).

Studien zur funktionellen Charakterisierung von Flavonoid-Glycosyltransferasen aus *A. thaliana* an zwei T-DNA-knock-out-Linien haben zu interessanten Befunden geführt (Jones et al., 2003). Obwohl die untersuchten UGTs *in planta* flavonol-spezifisch sind, setzte das Enzym UGT73C6 *in vitro* auch 6- und 7-Hydroxyflavone und das Isoflavon Genistein um. Das natürliche Vorkommen von Isoflavonen ist jedoch auf Leguminosen beschränkt (Liu et al., 2002). Die Autoren kommen hier zu dem Schluss, dass „*in vitro* Studien allein nicht immer die biologische Rolle eines Enzyms in der Pflanze widerspiegeln,“ sondern dass die enzymatische Aktivität und damit das Glycosidprofil innerhalb einer Pflanze sowohl von der Verfügbarkeit metabolischer Vorstufen als auch von Kompetition, Kompartimentation und Substratspezifitäten abhängt. Nicht nur im pflanzlichen Stoffwechsel, sondern auch in tierischen Systemen kann beobachtet werden, dass die Affinität eines Enzyms *in vitro* gegenüber einem endogenen Substrat signifikant geringer sein kann. Als Beispiel sei hier eine Catechol-*O*-Methyltransferase erwähnt, deren endogene Substrate, Catecholamine, im Vergleich zu Quercetin *in vitro* mit einer um drei Größenordnungen geringeren Rate, sprich 1000-fach geringerer Effizienz, umgesetzt werden (Zhu et al., 1994). Entscheidend ist hier wohl die Korrelation von *in vitro*-Aktivitäten und Metabolitenprofilen im jeweils untersuchten Organismus.

Ein weiterer zu berücksichtigender Gesichtspunkt ist, dass Enzyme *in vivo* Bestandteil von Multienzym-Komplexen sein können. Die Umsatzgeschwindigkeit eines Substrates würde dann durch seine Verfügbarkeit in der Zelle bestimmt, d.h., die Zugänglichkeit des Substrates könnte durch andere Enzyme limitiert werden. Die mögliche Bildung sogenannter Metabolome innerhalb pflanzlicher Zellen wird schon länger in der Literatur diskutiert (z. B. Møller & Conn, 1980; Burbulis & Winkel-Shirley, 1999; Paquette et al., 2003). Ein interessantes Beispiel ist Biosynthese des cyanogenen Glucosides Dhurrin in *S. bicolor*, an der sowohl zwei Cytochrom-P450-Enzyme (CYP79A1 und CYP71E1) als auch eine Glucosyltransferase (UGT85B1) beteiligt sind. Die als spezifisch für *p*-Hydroxymandelonitril eingestufte UGT85B1 zeigte *in vitro* nicht nur Affinität zu ihrem natürlichen Substrat, sondern auch zu Benzylalkohol und dem Monoterpenoid Geraniol (Jones et al., 1999). Bereits 1980 führten radioaktive Markierungsexperimente zu der Erkenntnis, dass die Dhurrinbiosynthese „gechannelt“ ist (Møller & Conn, 1980). Nach Transformation von *A. thaliana* mit den für CYP79A1, CYP71E1 und UGT85B1 codierenden Genen und Analyse der transgenen Pflanzen, konnten keine Intermediate, sondern nur das Endprodukt Dhurrin identifiziert werden (Tattersall et al., 2001). Diese Tatsache wird als Hinweis auf die Bildung eines hochorganisierten Enzymkomplexes gedeutet, so dass das Produkt einer enzymatischen Reaktion dem katalytischen Zentrum des folgenden Enzyms unmittelbar zugänglich ist (Hansen et al., 2003). Die Untersuchung von Lokalisation und Interaktionen von Proteinen in lebenden Zellen und Geweben ist durch die fortschreitende Entwicklung mikroskopischer Techniken, z. B. FRET-Mikroskopie (Chen et al., 2003), bereits möglich geworden und wird in Zukunft dazu beitragen können, die Bildung von Multi-Enzymkomplexen auf zellulärer Ebene nachzuweisen.

Aus den im vorangegangenen Abschnitt exemplarisch ausgewählten Literaturbeispielen geht hervor, dass viele Faktoren, die Substrat- und Regiospezifitäten von Enzymen des Sekundärstoffwechsels beeinflussen, immer noch unverstanden sind. Mittlerweile sind 118 putative Glycosyltransferasegene im *Arabidopsis*-Genom identifiziert worden. Die funktionelle Charakterisierung dieser UGTs *in vitro* ist immer noch begrenzt, so z. B. auf Glucosyltransferasen des Hydroxyzimtsäurestoffwechsels (Milkowski et al., 2000; Lim et al., 2001) oder UGTs, die Salicyl-, Hydroxybenzoe- oder Indolessigsäure glucosidieren (Jackson et al., 2001; Lim et al., 2002). Die Analyse der *in planta*-Funktion der *Arabidopsis*-UGTs wurde bisher nur für die bereits genannten Flavonol-UGTs und die Kaffeesäure-UGT (Jones et al., 2003; Lim et al., 2003b) publiziert. An transgenen Tabakpflanzen wurde die Rolle einer pathogen-induzierbaren Scopoletin-UGT genauer untersucht (Chong et al., 2002). Sowohl die Phylogenie dieser Enzyme als auch die Struktur und Regulation der korrespondierenden Gene ist weitgehend unerschlossen (Bowles, 2002). Intensive Studien an ausgewählten UGTs aus *A. thaliana* haben gezeigt, dass innerhalb einer Multigenfamilie eine Korrelation zwischen phylogenetischer Verwandtschaft und Substratspezifität besteht (Li et al., 2001; Bowles, 2002). Dies scheint auf die UGT73A4 und UGT71F1 aus *B. vulgaris* und die Enzyme UGT73A5 bzw. UGT71F2 aus *D. bellidiformis* im Hinblick auf Betanidin nicht zuzutreffen. Interessanterweise zeigen die Enzyme aus *B. vulgaris* und *D. bellidiformis* gegenüber den getesteten Flavonoiden jedoch vergleichbare Affinitäten und Regiospezifitäten. Diese Tatsache stützt die Hypothese, dass Betanidin-glucosidierende Enzyme ursprünglich aus dem Flavonoidstoffwechsel rekrutiert wurden (Vogt et al., 1997; Vogt 2000). Mögliche Ursachen für die beobachteten Differenzen in den Substratspezifitäten sind bereits erläutert worden. Struktur-Wirkungsbeziehungen sind hingegen bisher unberücksichtigt geblieben und sollen nachfolgend diskutiert werden.

4.3 Komparative Modellierung der UGT73A4 und UGT73A5

Die Funktionalität eines Proteins und damit Faktoren, die Erkennung und Bindung eines Substrates beeinflussen, sind letztendlich durch seine Struktur begründet. Wie bereits erläutert, sind Struktur-Wirkungsbeziehungen von pflanzlichen Glycosyltransferasen noch weitgehend unerforscht und der katalytische Mechanismus ungeklärt. Diese Limitierung ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass bislang keine Kristallstruktur einer pflanzlichen Glycosyltransferase verfügbar ist. Obwohl diverse andere Methoden wie NMR-, Circular-Dichroismus-, IR- oder Ramanspektroskopie mittlerweile zur Strukturaufklärung von Makromolekülen eingesetzt werden können (Baker & Garrell, 2004; Doette et al., 2004; Sreerama & Woody, 2004), ist über die erfolgreiche Anwendung auf pflanzliche UGT-Strukturen bisher nichts publiziert worden. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde ein komparativer Modellierungsansatz gewählt, um durch einen Vergleich der Modelle der Enzyme UGT73A5 und UGT73A4 mögliche Erklärungsansätze für die beobachteten Unterschiede in den Affinitäten gegenüber Betanidin zu finden. Eine erfolgreiche Anwendung dieser Strategien auf ein Enzym des Sekundärstoffwechsels ist für die Polyneuridin-Aldehydesterase beschrieben (Mattern-Dogru et al., 2002). Das potentielle aktive Zentrum dieses zentralen Enzyms der Indolalkaloidbiosynthese wurde basierend auf entsprechenden Mutagenesedaten modelliert, wobei allerdings ein Template mit einer Homologie von 43 % zur zu modellierenden Proteinsequenz zur Verfügung stand. Für pflanzliche Glucosyltransferasen sind ähnliche Studien bisher nicht veröffentlicht worden. Die Problematik im Rahmen der vorliegenden Arbeit lag insbesondere darin begründet, ein geeignetes Template für die Modellierung zu finden, da eine Homologiesuche in der Datenbank zunächst fehlschlug. Eine Sekundärstrukturvorhersage identifizierte die Kristallstruktur der bakteriellen β -Glucosyltransferase GtfB aus *A. orientalis* (Mulichak et al., 2001), mit 95%iger Sicherheit als geeignetes Template für die angestrebten Untersuchungen, obwohl diese bakterielle UGT nur eine 14%ige Homologie zu den beiden pflanzlichen UGTs aufwies. Homologie-Modellierung ist normalerweise erst ab einer Homologie > 30 %

zu empfehlen. Der Vergleich der in der Proteindatenbank vorhandenen Kristallstrukturen zeigt jedoch, dass UGTs trotz geringer Sequenzidentitäten von 10 % bemerkenswerte strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen (Hu & Walker, 2002). Diese Beobachtung hat zur Identifizierung zweier struktureller Superfamilien von Glycosyltransferasen, GT-A und GT-B, geführt (Coutinho et al., 2003; Liu & Mushegian, 2003). Sowohl das verwendete Template GtfB als auch die beiden modellierten UGTs gehören zur GT-B-Superfamilie (Campbell et al., 1997; Coutinho et al., 2003). Ein entscheidender Unterschied zwischen der GT-A- und GT-B-Superfamilie ist, dass die zur letzteren Familie gehörenden Enzyme keine Abhängigkeit der Aktivität von divalenten Kationen aufweisen und ein strukturell konserviertes DXD-Motiv fehlt (Hu & Walker, 2002). Diesem Motiv wird eine Funktion bei der Koordination der Metallkationen und Erkennung des Zuckers zugeschrieben (Breton & Imberty, 1999; Ünligil & Rini, 2000). Auch für die UGT73A4 aus *B. vulgaris* bzw. UGT73A5 aus *D. bellidiformis* zeigte sich kein Effekt von divalenten Kationen auf die katalytische Aktivität. Mit Hilfe zur Verfügung stehender experimenteller und Literaturdaten konnte in den entwickelten Strukturmodellen ein mögliches aktives Zentrum identifiziert werden. Liganden-Docking-Studien liessen Unterschiede bezüglich der Erkennung und Stabilisierung der gedockten Substrate zwischen den beiden Modellen erkennen. Diese können dazu beitragen, die Ergebnisse der Substratspezifitätstests auf struktureller Basis zu interpretieren (3.8.2). Semi-empirische Berechnungen am Beispiel der UGT73A5 ermöglichten es, eine erste Vorstellung über den Mechanismus des UDP-Glucosetransfers unter Inversion der Konfiguration des anomeren C α -Atoms zu entwickeln. Kinetisch scheint hierbei ein S $_N$ 1-Mechanismus begünstigt zu sein. Dieser repräsentiert eine Alternative zum in der Literatur, auf Basis von Sequenzvergleichen, postulierten S $_N$ 2-Mechanismus, der in der folgenden Abbildung 4.2 schematisch dargestellt ist (Kapitonov & Yu, 1999).

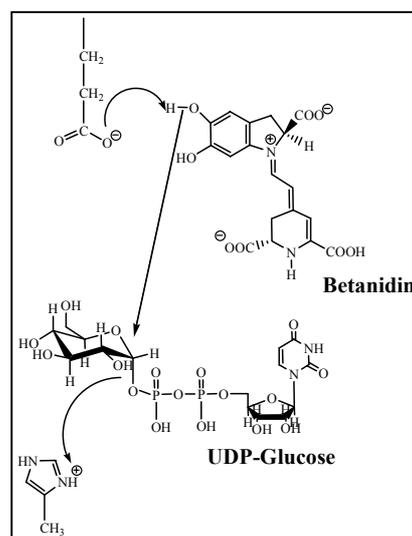


Abbildung 4.2 Schematische Darstellung des von Kapitonov & Yu postulierten Reaktionsmechanismus des Zuckertransfers unter Inversion der Konfiguration am Beispiel der Bildung von Betanidin-5-O-glucosid. Adaptiert aus: Kapitonov & Yu, 1999.

Kapitonov und Yu postulieren, dass ein Glutamatrest die Abstraktion eines Protons vom Zuckerrezeptor, in diesem Fall Betanidin, initiiert. Der Akzeptor greift dann nukleophil das C α -Atom des Zuckers an, wobei gleichzeitig die Abspaltung des UDP-Restes durch Übertragung eines Protons auf eine basische Aminosäure, z. B. Histidin, erfolgt. In unserem Modell hingegen wird die Rolle des Glutamates von H²² übernommen, während die Abspaltung des UDP-Restes durch K³¹ induziert wird. Das konservierte E³⁶⁸, dessen Mutation in der UGT73A5-Sequenz zu einem vollständigen Aktivitätsverlust führte (Hans et al., in press), ist in unserem Modell nicht direkt in den katalytischen Mechanismus involviert, spielt aber für die Erken-

nung des Zuckers eine zentrale Rolle. Die zuvor erwähnten Mutationsstudien an der Arbutinsynthese aus *R. serpentina* führten ebenfalls zu der Erkenntnis, dass das konservierte Glutamat, in diesem Fall E³⁶⁸, wahrscheinlich keine entscheidende Rolle für die Katalyse spielt, möglicherweise aber einen Einfluss auf die Substraterkennung hat. Die Mutagenesestudien an der Arbutinsynthese machen aber auch deutlich, dass die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren vermutlich individuell verschieden sind. So wurde für das genannte Enzym infolge der Mutation der Aminosäure H³⁶⁰, die sich im PSPG-Box-Motiv befindet, eine um den Faktor 4000 geringere Aktivität im Vergleich zum Wildtyp gemessen (Hefner & Stöckigt, 2003), wohingegen für die UGT73A5 nach Mutation des H³⁷⁰ überhaupt kein Einfluss auf die Enzymaktivität festgestellt werden konnte (Hans et al., in press).

Selbstverständlich können die vorgestellten Studien weder spektroskopische noch Röntgenstruktur-Analysen ersetzen und besitzen nur Gültigkeit, sofern sie die realen Verhältnisse tatsächlich widerspiegeln. Auch hier bieten sich Ansatzpunkte für weiterführende Arbeiten. Dabei stellt eine mögliche Kristallisation der beiden modellierten UGTs sicherlich die grösste Herausforderung dar. Darüberhinaus könnten Mutagenese-Studien an der UGT73A4 Aufschluss darüber geben, ob hier H²⁰ und E³⁶⁹ ebenfalls eine essentielle Rolle für die katalytische Aktivität spielen. Die interessanteste Fragestellung ist zudem, ob durch Mutation der Aminosäuren P⁴⁸ und T⁵² in der UGT73A4-Sequenz (3.8.2) tatsächlich eine Erhöhung der Affinität des Enzyms gegenüber Betanidin *in vitro* festzustellen ist. Analog könnten die Aminosäuren S⁵⁰ und K⁵⁴ bzw. K⁵⁸ in der UGT73A5-Sequenz mutiert werden, um zu überprüfen, ob diese Aminosäuren tatsächlich die postulierte Rolle für die Bindung des Betanidins spielen. Die Resultate könnten entscheidend dazubeitragen, die Validität der Modelle zu verifizieren oder respektive ad absurdum zu führen.

4.4 Zwei alternative Wege der Glucosidierung in der Betalainbiosynthese – ein speziesspezifisches Problem ?

Zu Beginn der Diskussion wurde darauf hingewiesen, dass eine Glucosidierung auf der Stufe des Betanidins in Betacyan-führenden Pflanzen bisher nur für die Aizoaceae *D. bellidiformis* nachgewiesen werden konnte. Das Auftreten des freien Aglycons Betanidin in einigen Vertretern der Aizoaceae, Nyctaginaceae, Portulacaceae und Cactaceae wurde von Piattelli und Mitarbeitern beschrieben (Piattelli & Minale, 1964b; Piattelli & Imperato, 1969). Für ein Mitglied der Familie Cactaceae, *Opuntia dillenii* Haw., wurde nach Fütterung von radioaktiv markiertem Betanidin die Bildung von radioaktivem Betanin beobachtet (Sciuto et al., 1972), was für eine Beteiligung einer entsprechenden Glucosyltransferase spricht. In *B. vulgaris* hingegen wurde eine signifikante *cyclo*-Dopa-glucosid-Akkumulation von bis zu 46 % in Relation zum Betaningehalt beschrieben (Wyler et al., 1984; Bauer, 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neben *B. vulgaris* auch Vertreter anderer Betalain-führender Pflanzenfamilien auf eine *cyclo*-Dopa-Glucosyltransferaseaktivität untersucht. Trotz der Etablierung eines sensitiven Enzymtests zum Nachweis enzymatisch gebildeten *cyclo*-Dopa-glucosides, war unter den gewählten Versuchsbedingungen in keiner der untersuchten Pflanzen die Detektion einer entsprechenden Enzymaktivität möglich. Studien zur Betalainproduktion in verschiedenen *B. vulgaris*-Zellkulturen aus dem Jahre 1992 beschreiben das Auftreten der Betacyane Betanin und Betanidin in einer roten Zellkultur, wobei Betanin 90 % des Gesamtgehaltes ausmacht (Leathers & Zryd, 1992). Diese im Widerspruch zu den genannten Publikationen von Wyler (1984) und Bauer (2001) stehenden Resultate könnten zum Beispiel durch unterschiedliche Aufarbeitungstechniken begründet sein, da in der Publikation von Wyler *B. vulgaris*-Extrakte unter stark sauren Bedingungen (pH < 3) aufgearbeitet und analysiert wurden. Die in der Publikation von Wyler und Mitarbeitern allein aufgrund quantitativer Daten dargelegte Schlussfolgerung, dass die Akkumulation von *cyclo*-Dopa-Glucosid zwangsläufig

einen alternativen Betacyan-Biosyntheseweg in *B. vulgaris* impliziert, ist so nicht nachvollziehbar.

Somit stellt sich die Frage, ob die von Wyler und Mitarbeitern beobachtete Akkumulation von *cyclo*-Dopa-Glucosid in *B. vulgaris* tatsächlich auf die Existenz einer entsprechenden Glucosyltransferase zurückzuführen ist, oder ob es sich nicht um ein Hydrolyseprodukt des Betanins handelt (Strack et al., 2003). Diese Möglichkeit wird auch von Bauer in seiner Dissertationsschrift (2001) selbst diskutiert. Für diese Hypothese sprechen auch die Ergebnisse einer in unserem Labor von W. Schliemann mit *B. vulgaris*-Pflanzen durchgeführten Wachstums-kinetik. Diese zeigte, dass in Relation zum Betaningehalt, der mit dem Frischgewicht zunimmt, nur Spuren von *cyclo*-Dopa-Glucosid auftreten (Schliemann, unveröffentlicht). Ein sogenanntes „Decolourizing enzyme“ aus *B. vulgaris*, das ein pH-Optimum von 3,4 aufweist, ist bereits 1976 von Soboleva und Mitarbeitern beschrieben worden. Eine vergleichbare Enzymaktivität ist auch aus *Amaranthus tricolor*-Pflanzen bekannt (Elliott et al., 1983). In dieser Veröffentlichung wird die Teilreinigung eines löslichen Enzyms beschrieben, das die Entfärbung von Betanin bei einem pH-Optimum von 3,4 unter Freisetzung von Betalaminsäure und *cyclo*-Dopa-Glucosid katalysiert. Im Jahre 1983 zeigten Wassermann und Mitarbeiter, dass Zellwandpräparationen aus *B. vulgaris* peroxidative Eigenschaften haben und die Entfärbung des Betanins bei pH 3,4 am schnellsten erfolgte. Eine entsprechend Peroxidase wurde von Martínez-Parra und Muñoz (2000) charakterisiert.

Qualitative Fütterungsversuche mit radioaktiv markierter UDP-Glucose an einer roten Zellsuspensionskultur von *B. vulgaris* gaben erste Hinweise auf die Bildung radioaktiv markierten Betanins. Die Applikation markierter UDP-Glucose als energiereiche Verbindung zu einer Zellkultur ist sicherlich problematisch, da die Gefahr besteht, dass die Verbindung leicht hydrolysiert und metabolisiert wird. Es liess sich jedoch zu keinem Zeitpunkt ein Einbau radioaktiv markierter UDP-Glucose in *cyclo*-Dopa-Glucosid messen. Weitere experimentelle Daten aus unserer Arbeitsgruppe sprechen ebenfalls für eine Glucosidierung auf der Stufe des Betanidins in *B. vulgaris*. Kurzzeit-Fütterungsexperimente an „Hairy root“-Kulturen der gelben Rübe belegten das Auftreten von Descarboxybetanidin und infolgedessen die Akkumulation des Glucosides Descarboxybetanin, während parallel die Abnahme des Aglycons beobachtet wurde. Das Auftreten von Descarboxy-*cyclo*-Dopa-Glucosid wurde hingegen nicht detektiert (Kobayashi et al., 2000). Eine Untersuchung von Extrakten verschiedener Betalain-führender Pflanzen und Zellkulturen auf Betanidin-glucosidierende Enzyme führte nicht zum Nachweis entsprechender Glucosyltransferaseaktivität. Dies ist vermutlich auf eine geringe Abundanz dieser Enzyme, Instabilität oder andere zelluläre Parameter, wie z. B. Membranassoziation, zurückzuführen.

Die bisher diskutierten Fakten machen deutlich, dass ein generelles Verständnis glucosidierender Prozesse im Rahmen der Betalainbiosynthese dadurch limitiert ist, dass sich viele experimentelle Daten nur auf einen einzigen Vertreter, *D. bellidiformis*, innerhalb der Ordnung Caryophyllales beziehen. Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse lassen noch keine generelle Beantwortung dieser Fragestellung für *B. vulgaris* zu. Aufgrund der dargelegten Resultate scheint die Glucosidierung auf der Stufe des Betanidins bislang wahrscheinlicher als die Existenz einer spezifischen *cyclo*-Dopa-Glucosyltransferase. Weiterführende Untersuchungen an anderen Vertretern der Caryophyllales sind notwendig, um eine Verallgemeinerung der bisherigen Befunde zu zulassen.

Die vorliegende Arbeit ist ein Beispiel dafür, dass molekulargenetische Daten allein keine Rückschlüsse auf die Funktion eines Proteins zulassen. Die funktionelle Charakterisierung der UGT73A4 und UGT71F1 aus *B. vulgaris* hat gezeigt, dass die Affinität gegenüber Betanidin

in vitro äußerst gering ist, was aufgrund der Sequenzidentität von 64 % bzw. 56 % mit den Enzymen aus *D. bellidiformis* unerwartet war. Die Isolierung der Hauptflavonoidglucoside aus *B. vulgaris*-Pflanzen führte zur Identifizierung von Apigenin als einem möglichen endogenen Substrat der UGT73A4, da die Substratspezifitätstests *in vitro* gezeigt haben, dass Apigenin spezifisch zu Apigenin-7-*O*-glucosid umgesetzt wird. Dies setzt jedoch voraus, dass die Glucosidierung der C-7-Hydroxylgruppe *in vivo* tatsächlich durch die UGT73A4 katalysiert wird und nicht durch eine andere UGT. Da Glucosyltransferasen redundante Enzyme sind, ist diese Möglichkeit nicht auszuschliessen, wenn es aufgrund der vorliegenden biochemischen Daten auch unwahrscheinlich erscheint. Ferner ist unklar, ob die *O*-Glucosidierung des Apigenins vor der C-Glucosidierung stattfindet, denn nur dann ist die Hypothese, dass Apigenin ein endogenes Substrat darstellt, richtig. Vitexin wurde mit der UGT73A4 als Substrat getestet und wurde nicht umgesetzt (nicht dargestellt).

Die UGT71F1 könnte *in vivo* die 3-*O*-Glucosidierung von Quercetin katalysieren, da das Quercetinderivat Rutin in der Zellkultur identifiziert wurde und Quercetinglucoside aus *B. vulgaris*-Blättern in der Literatur bekannt sind (Gardner et al., 1967). Die Isolierung von Vitexin aus Blättern von *B. vulgaris* wurde ebenfalls im Jahre 1967 von Gardner und Mitarbeitern publiziert. Das in der vorliegenden Dissertation identifizierte Vitexin-2''-xylosid und das 6''-malonyl-Derivat sind sowohl aus *Setaria italica* (Gluchoff-Fiasson, et al., 1989) als auch aus *B. vulgaris* bekannt (Gil et al., 1998). Allerdings wurde für das Vitexin-2''-xylosid die Präsenz zweier Konformere nicht beschrieben. Vitexin-7-*O*-glucosid ist z. B. in *Cannabis sativa* oder *Mollugo oppositifolia* als Metabolit identifiziert worden, wobei die zur Verfügung stehenden Strukturdaten jedoch begrenzt sind (Paris, et al., 1976; Chopin et al., 1984). Ein 7-*O*-glucosid des Vitexins aus *B. vulgaris* ist nicht beschrieben, es finden sich jedoch Hinweise auf ein Triglycosid des Vitexins mit Glucose, Xylose und Rhamnose (Kudrev, et al., 1977). Für die aus *B. vulgaris* isolierten Verbindungen BV-280 und BV-283 lassen sich keine entsprechenden Literaturdaten finden, so dass davon auszugehen ist, dass es sich um neue Komponenten handelt.

4.5 Weiterführende Arbeiten

Einige Ansatzpunkte für weiterführende Experimente sind in den vorangegangenen Abschnitten bereits angedeutet worden. Die interessanteste Fragestellung ist sicherlich die Klärung der Funktion der beiden klonierten Enzyme aus *B. vulgaris in vivo*. Auf diesem Hintergrund wäre eine Möglichkeit, die Frage nach der möglichen Rolle der UGT73A4 aus *B. vulgaris* in der Betalainbiosynthese, durch die Herstellung entsprechender Suppressionslinien zu beantworten. Verschiedene Transformationsprotokolle für *B. vulgaris* sind publiziert worden (Hall et al., 1996; Zhang et al., 2001). Ein alternativer Ansatz, die Expression der UGT73A4 in einer nicht-Betalain-führenden Pflanze, *Arabidopsis thaliana*, wurde in dieser Arbeit versucht, es konnte aber nicht sichergestellt werden, dass die Herbizid-selektierten Pflanzen tatsächlich transgen waren, da nach PCR-Analysen mit genspezifischen Primern, stets auch im Wildtyp Fragmente in der erwarteten Grösse erhalten wurden. Dies ist entweder auf Primerartefakte oder die Amplifizierung ähnlicher UGT-Sequenzen aus *A. thaliana* zurückzuführen. Die erfolgreiche Transformation von *N. tabacum* mit der UGT73A5 aus *D. bellidiformis*, bei der Transkriptakkumulation und Enzymaktivität nachgewiesen werden konnten, bietet hier einen alternativen Ausgangspunkt für zukünftige Experimente (Vogt, unveröffentlicht).

Um das Verständnis für die Rolle und die Evolution von Glucosyltransferasen in der Betalainbiosynthese zu vertiefen sollten weitere Vertreter der Caryophyllales mit biochemischen und molekulargenetischen Methoden untersucht werden. Möglicherweise lassen sich UGTs identifizieren, die hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber Betanidin und Flavonoiden zwischen

den Enzymen aus *B. vulgaris* und *D. bellidiformis* anzusiedeln sind. Nicht auszuschließen ist, dass in anderen Betacyan-führenden-Pflanzen oder unter anderen Bedingungen auch in *B. vulgaris* doch noch ein *cyclo*-Dopa-glucosidierendes Enzym nachgewiesen wird.

Mit Hilfe von Immunlokalisationsstudien könnte festgestellt werden, ob die in dieser Arbeit charakterisierten Enzyme membranassoziiert oder Bestandteil eines Enzymkomplexes sind. Für weitere Reinigungsversuche im Hinblick auf Kristallisationsstudien wäre das Vorhandensein eines spezifischen Antikörpers ebenfalls wünschenswert. Auf eine mögliche Anwendung der FRET-Mikroskopietechnik zur Untersuchung von zellulären Proteininteraktionen wurde bereits hingewiesen. Zur Gewinnung von Kristallstrukturdaten der UGT73A4 und der UGT73A5, die Aufschluss über die Qualität der entwickelten Strukturmodelle und die Validität des postulierten Reaktionsmechanismus geben könnten, müsste zunächst die heterologe Expression und Reinigungssequenz der beiden Proteine optimiert werden. Die fortschreitende Entwicklung verschiedenster Methoden der Strukturaufklärung, z. B. NMR-, Raman- und CD-Spektroskopie könnte ebenfalls dazu beitragen, Erkenntnisse bezüglich der Tertiärstruktur der hier charakterisierten Enzyme zu gewinnen (Baker & Garrell, 2004; Doette et al., 2004; Sreerama & Woody, 2004). Weitere Mutagenesestudien an der UGT73A4 und UGT73A5 könnten die strukturellen Untersuchungen, wie bereits diskutiert, ergänzen.

Ein weiterer Aspekt ist die mögliche Verwendung der UGT73A4 und UGT71F1 für die gezielte Produktion modifizierter Flavonoide. Dieser als „Bio-Fermentation“ bezeichnete Ansatz wurde kürzlich für die Synthese polymethylierter Flavonoidglucoside publiziert (Willits et al., 2004). Die Idee, rekombinante, pflanzliche UGTs zur Synthese spezifisch substituierter Sekundärstoffe einzusetzen, um zum Beispiel Pflanzen gegen Herbivore resistenter zu machen, ist schon länger bekannt (Arend et al., 2001; Tattersall et al., 2001). Die Bioverfügbarkeit von Flavonoiden hängt vom Glucosidierungsmuster ab. Das im Gemüse vorkommende Quercetin-3-rutinosid ist zum Beispiel für Menschen schlechter aus der Nahrung zu resorbieren als Monoglucoside (Hollman et al., 1999; Walgren et al. 2000a), so dass durch eine biotechnologische Umwandlung von Quercetinglycosiden in entsprechende Monoglucoside die Bioverfügbarkeit dieses Flavonols erhöht werden könnte (Olthof et al., 2000).

5. Zusammenfassung

Ausgangspunkt der Arbeiten war die Untersuchung der Rolle spezifischer Glucosyltransferasen in der Betalainbiosynthese in *B. vulgaris*. Literaturdaten wiesen auf eine Akkumulation von *cyclo-Dopa*-Glucosid in *B. vulgaris* (Wyler, et al., 1984) hin, so dass zunächst von einer Glucosidierung auf der Stufe des Intermediates *cyclo-Dopa* in dieser Pflanze ausgegangen wurde. Diese Vermutung wurde durch die Tatsache unterstützt, dass in keinem anderen Vertreter der Ordnung Caryophyllales vergleichbare Betanidin-glucosidierende Enzyme wie in *D. bellidiformis* bis zum jetzigen Zeitpunkt nachgewiesen werden konnten.

- Trotz Etablierung eines sensitiven Enzymassays war es nicht möglich, mit den gewählten biochemischen Methoden in verschiedenen Betalain-führenden Pflanzen die Aktivität einer *cyclo-Dopa*-Glucosyltransferase nachzuweisen. Fütterungsversuche mit radioaktiv-markierter UDP-Glucose an einer *B. vulgaris*-Zellkultur deuteten auf eine Betanidin-glucosidierende Enzymaktivität hin, da die Bildung radioaktiv-markierten Betanins durch Scintillationsmessungen bestätigt werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde kein entsprechend markiertes *cyclo-Dopa*-Glucosid detektiert. Diese Vermutung wurde durch die Tatsache bestärkt, dass eine Reproduktion der Daten von Wyler (1984) in unserem Labor nicht möglich war (W. Schliemann, unveröffentlicht).
- Ein molekularbiologischer Ansatz zur Bearbeitung dieser Fragestellung basierte auf einer PCR-gestützten Methode und degenerierten Primern, die gegen das PSPG-Box Konsensus-Motiv pflanzlicher Glucosyltransferasen der β -Gruppe gerichtet waren. Mit zwei homologen Sonden wurden aus einer cDNA-Bank einer *B. vulgaris*-Zellkultur zwei cDNAs, UGT73A4 und UGT71F1, mit durchgängigen offenen Leserahmen isoliert, die eine hohe Sequenzidentität auf Aminosäureebene zu der UGT73A5- und UGT71F2 aus *D. bellidiformis* besitzen. Durch eine phylogenetische Analyse liessen sich die beiden Klone in zwei verschiedene Untergruppen der Superfamilie pflanzlicher Glycosyltransferasen einordnen.
- Die Expressionsanalyse bestätigte die Existenz des UGT3A4-Transkriptes nicht nur in der *B. vulgaris*-Zellkultur, sondern auch in *B. vulgaris*-Pflanzen und der Stammform *Beta maritima*. Dabei konnte eine möglicherweise lichtabhängige Erhöhung der Akkumulation in 2-6 Wochen alten Pflanzen beobachtet werden. Der Nachweis des UGT71F1-Transkriptes gelang nur in der Zellkultur von *B. vulgaris* mittels RT-PCR.
- Die heterologe Expression beider Klone in *E. coli* ermöglichte es, die UGT73A4 fast bis zur Homogenität zu reinigen, während die UGT71F1 nur angereinigt werden konnte. Beide UGTs zeichnen sich durch Eigenschaften aus, die auch für andere Glycosyltransferasen des Sekundärstoffwechsels charakteristisch sind. Es handelt sich um monomere, lösliche Enzyme, die ein breites pH-Optimum und ein Temperaturmaximum von 30 °C bzw. 37 °C besitzen. Das Molekulargewicht liegt bei 54 kDa. Sie besitzen eine breite Substratspezifität gegenüber dem Zuckerakzeptor, sind aber spezifisch für den Zuckerdonator UDP-Glucose.
- Beide Enzyme konnten als Flavonoid-spezifische UGTs mit einer äußerst geringen Affinität gegenüber Betanidin charakterisiert werden. Die UGT73A4 glucosidierte bevorzugt die C-7- und C-4'-Hydroxylgruppe der getesteten Flavonoide, während die UGT71F1 Glucose spezifisch auf die C-3- und C-7-Hydroxylgruppe übertrug. Von den getesteten Substraten wurden Strukturen mit vicinalen Hydroxylgruppen im B-

Ring des Flavonoidgrunkörpers bevorzugt umgesetzt. Die im Falle der UGT73A5 und UGT71F1 aus *D. bellidiformis* unerwartete Akzeptanz von Flavonoiden als Substrat führte zu der Hypothese, dass diese Enzyme ursprünglich aus dem Flavonoidstoffwechsel rekrutiert sein könnten (Vogt et al., 1999a). Die Daten sprechen für ein evolutionär sekundäres Auftreten der Betalainbiosynthese in den Caryophyllales. Flavonoid-spezifische UGTs aus *A. cepa* mit ähnlicher Regiospezifität gegenüber Quercetin akzeptierten Betanidin nicht als Substrat. Somit sind die in dieser Arbeit charakterisierten Enzyme aus *B. vulgaris* bislang die einzigen, die, neben den Enzymen aus *D. bellidiformis*, Betanidin als Substrat akzeptieren

- Neben Betanidin konnte ein mögliches, alternatives endogenes Substrat der UGT73A4 anhand einer Metabolitenanalyse von *B. vulgaris*-Pflanzen identifiziert werden. Nach Isolierung der Flavonoidhauptkomponenten wurde die Struktur von fünf Apigeninderivaten mittels verschiedener spektroskopischer Methoden aufgeklärt. Darunter befanden sich zwei verschiedene Apigenin-7-*O*-glucoside. *In vitro*-Studien belegten die hohe Affinität des der UGT73A4 gegenüber Apigenin. Die Funktion der UGT71F1 in der Pflanze bzw. Zellkultur ist höchstwahrscheinlich die Glucosidierung von Quercetin in 3-Position, entsprechende Metabolite, wie z. B. Rutin aus der Zellkultur und Quercetinglucoside aus Blättern, sind aus *B. vulgaris* bekannt.
- Ergebnisse von Mutationsstudien an der UGT73A5 aus *D. bellidiformis* und komparative Modellierungsstudien ermöglichten es, zwei 3D-Modelle der UGT73A4 und UGT73A5 zu entwickeln, ein mögliches aktives Zentrum zu identifizieren und semiempirische Berechnungen bezüglich des Mechanismus des Zuckertransfers anzustellen. Auf der Basis des optimierten Modells, lässt sich feststellen, dass ein S_N1 -Mechanismus kinetisch begünstigt ist, der die beobachtete Inversion der Zuckerkonfiguration erklären kann. Dieser stellt eine Alternative zu bisherigen Vorschlägen in der Literatur dar. Ferner lässt ein Vergleich beider Modellstrukturen, unterstützt durch Liganden-Docking-Studien, Rückschlüsse auf mögliche Ursachen für die *in vitro* beobachteten Unterschiede in der Substratspezifität der beiden Enzyme zu.
- Die Frage, welcher der beiden alternativen Glucosidierungswege in der Betalainbiosynthese in *B. vulgaris* beschritten wird, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht abschliessend beantwortet werden. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Resultate geben erste Hinweise darauf, dass die Glucosidierung in dieser Pflanze auf der Stufe des Betanidins, ablaufen könnte. Um zu einer endgültigen Klärung der Frage beizutragen, ob die Glucosidierung auf der Stufe des Betanidins ein generelles Prinzip darstellt oder artspezifisch die alternative Glucosidierung auf *cyclo*-Dopa-Ebene doch noch nachgewiesen wird, sind weitere Untersuchungen an anderen Vertretern der Caryophyllales notwendig.

6. Summary

In the plant order Caryophyllales, the chromogenic anthocyanins have been replaced by functionally equivalent, but biosynthetically different, betacyanins (Clement & Mabry, 1996). The starting point of these investigations was the observation that, up to now, two regiospecific betanidin glucosyltransferases have been characterized (Heuer et al., 1992, 1996; Vogt et al., 1997) for only one member of the Caryophyllales, *Dorotheanthus bellidiformis* (Livingstone daisy, Aizoaceae). As the accumulation of considerable amounts of *cyclo*-Dopa 5-*O*-glucoside had been reported for *B. vulgaris* L. (Chenopodiaceae) by Wyler and co-workers in 1984, the question arose if glucosylation at the betanidin level is an exception or the rule in betacyanin biosynthesis. After development of a sensitive enzyme activity test, several plants from different families of the order Caryophyllales were screened for activity of a putative *cyclo*-Dopa-glucosyltransferase, but all attempts to show the existence of such an enzyme activity failed. Furthermore investigation of *cyclo*-Dopa glucoside accumulation in *B. vulgaris* plants over eight weeks contradicted the previously published data by Wyler and co-workers (1984, 2001). Only trace amounts of this compound were detectable, most likely liberated from betanin that is in equilibrium with its hydrolytic products, *cyclo*-Dopa 5-*O*-glucoside and betalamic acid (W. Schliemann, unpublished results).

A molecular genetic approach, based on the polymerase-chain reaction with degenerated primers derived from the Plant Secondary Product GT consensus sequence, led to the first cloning and functional expression of two full-length cDNAs from *B. vulgaris* cell suspension culture with high homology to the corresponding enzymes from *D. bellidiformis*. The open reading frame (orf) of UGT73A4 encodes a protein of 476 amino acids with a relative molecular mass of 54 kDa, whereas the orf of UGT71F1 encodes a polypeptide of 492 amino acids with a comparable relative molecular weight. Both enzymes catalyze the position-specific transfer of glucose from UDP-glucose to different flavonoids and to a very low extent to the chromogenic betanidin. *In vitro* studies on substrate specificity indicated that both enzymes exhibit a broad substrate spectrum regarding the sugar acceptor, preferring flavonoids with *ortho*-dihydroxy groups in the B-ring. In contrast, the specificity for the sugar-donor was very strict, only UDP-glucose was accepted. From our studies it may be evident that glycosylation of betacyanins is a monophyletic phenomenon originating from enzymes previously involved in flavonoid metabolism. Expression analysis revealed that UGT73A4 transcript accumulated not only in cell culture of *B. vulgaris*, but also in young plants and in *Beta maritima*. UGT71F1 mRNA could only be detected in the *B. vulgaris* cell suspension culture.

Based on site-directed mutagenesis and an homology modelling approach, two 3D-models of UGT73A5 from *D. bellidiformis* and UGT73A4 from *B. vulgaris* have been developed. They provide preliminary insight into the possible tertiary structure, with putative active sites, of two plant glucosyltransferases, and are suitable to explain observed differences between the two homologous enzymes. Semi-empirical calculations suggest that UGT73A5 from *D. bellidiformis* catalyzes an S_N1-like sugar transfer with inversion of configuration ($\alpha \rightarrow \beta$), which may be seen as an alternative to the S_N2-mechanism proposed in the literature (Kapitonov & Yu, 1999). Nevertheless the 3D-model structures presented here cannot substitute further investigations by spectroscopic methods, e.g. NMR, and their quality may be finally judged after the first crystal structure of a plant glucosyltransferase is resolved. Further studies on the glucosyltransferase pool of different members of the Caryophyllales will be required to answer the question whether glucosylation at the betanidin level is the rule or an exception throughout betacyanin-synthesizing plant families.

7. Literatur

Acquaviva R., Russo A., Galvano F., Galvano G., Barcellona M.L., Li Volti G., Vanella A. (2003) Cyanidin and cyanidin-3-*O*-beta-D-glucoside as DNA cleavage protectors and antioxidants. *Cell Biol. Taxol.* **19**: 243-252

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402

Arend J., Warzecha H., Hefner T., Stöckigt J. (2001) Utilizing genetically engineered bacteria to produce plant-specific glucosides. *Biotechnol. Bioeng.* **76**: 126-131

Bairoch A. (1991) PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucleic Acid Res.* **19**: 2241-2245

Baker B.R., Garrell R.L. (2004) G-factor analysis of protein secondary structure in solutions and thin films. *Faraday Discuss.* **126**: 209-22

Barth A., Wahab M., Brandt W., Frost K. (1993) Classification of serine proteases derived from steric comparisons of their active sites. *Drug Design Discov.* **10**: 297-317

Barth A., Frost K., Wahab M., Brandt W., Schädler H.D., Franke R. (1994) Classification of serine proteases derived from steric comparisons of their active sites, Part II: Ser, His, Asp arrangements in proteolytic and nonproteolytic proteins. *Drug Design Discov.* **12**: 89-111

Bar-Peled M., Lewinsohn E., Gressel J. (1991) UDP-rhamnose:flavanone-7-*O*-glucoside-2"-*O*-rhamnosyltransferase. Purification and characterization of an enzyme catalyzing the production of bitter compounds in citrus. *J. Biol. Chem.* **266**: 20953-9

Bate-Smith E.C. (1962) The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. *J. Linn. Soc. Bot.* **58**: 95-173

Bauer J. A. (2001) Studies on the metabolic pathways leading to betanin in *Beta vulgaris* L. cell cultures through labelling by tyrosine and dihydroxyphenylalanine. Dissertationsschrift, Universität Lausanne, Schweiz

Bernard P., Couturier M. (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J. Mol. Biol.* **226**: 735-745.

Bisswanger H. (1979) Theorie und Methoden der Enzymkinetik. Verlag Chemie, Weinheim.

Bittrich B., Amaral M.C.E. (1991) Proanthocyanidins in the testa of centrosperous seeds. *Biochem. Syst. Ecol.* **19**: 319-321

Blow D.M., Birktoft J.J., Hartley B.S. (1969) Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* **221**: 337-340

Blow D.M. (1976) Structure and mechanism of chymotrypsin. *Acc. Chem. Res.* **9**: 145-152

- Bokern M., Heuer S., Wray V., Witte L., Macek T., Vanek T., Strack D. (1991)** Ferulic acid conjugates and betacyanins from cell cultures of *Beta vulgaris*. *Phytochem.* **30**: 3261-3265
- Bourne Y., Henrissat B. (2001)** Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: Families and functional modules. *Curr. Op. Struct. Biol.* **11**: 593-600.
- Bowles D. (2002)** A multigene family of glycosyltransferases in a model plant, *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Soc. Trans.* **30**: 301-306
- Bradford M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Breton C., Imberty A. (1999)** Structure/function studies of glycosyltransferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**: 563-571.
- Breton C., Mucha J., Jeanneau C. (2001)** Structural and functional features of glycosyl transferases. *Biochimie* **83**: 713-718
- Burbulis I.E., Winkel-Shirley B. (1999)** Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 12929-12934
- Burghardt H., Brunner H., Oelmüller R., Lottspeich F., Oster U., Rudiger W. (1994)** Natural inhibitors of germination and growth.VII. Synthesis of ribulosephosphate carboxylase in darkness and its inhibition by coumarin. *Z. Naturforsch.* **49**: 321-326
- Busch C., Hofmann F., Gerhard R., Aktories K. (2000)** Involvement of a conserved tryptophan residue in the UDP-glucose binding of large clostridial cytotoxin glycosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **275**: 13228-13234.
- Cacace S., Schröder G., Wehinger E., Strack D., Schmidt J., Schröder J. (2003)** A flavonol *O*-methyltransferase from *Catharanthus roseus* performing two sequential methylations. *Phytochem.* **62**: 127-137
- Campbell J.A., Davies G.J., Bulone V., Henrissat B. (1997)** A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **326**: 929-942
- Chapple C. (1998)** Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 311-343
- Chen Y., Mills J.D., Periasamy A. (2003)** Protein localization in living cells and tissues using FRET and FLIM. *Differentiation* **71**: 528-541
- Chong J., Baltz R., Schmitt C., Beffa R., Fritig B., Saindrenan P. (2002)** Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc:phenylpropanoid glycosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *Plant Cell* **14**: 1093-1107
- Chopin J., Dellamonica G., Markham K.R., Nair A.G., Gunasegaran R. (1984)** 2''-p-Coumaroylvitexin 7-glucoside from *Mollugo oppositifolia*. *Phytochem.* **23**: 2106-2108

- Christinet L., Burdet F. X., Zaiko M., Zryd J.P. (2004)** Characterization and functional identification of a novel plant 4,5-extradiol dioxygenase involved in betalain biosynthesis in *Portulacca grandiflora*. *Plant Physiol.* **134**: 265-274
- Clark M., Cramer III R.D., van Opdenbosch N.J. (1989)** Validation of the general purpose Tripos 5.2 Force Field. *J. Comput. Chem.* **10**: 982-1012.
- Clement J.S., Mabry T.J. (1996)** Pigment evolution in the Caryophyllales: a systematic overview. *Bot. Acta* **109**: 360-367
- Cole D.J., Edwards R. (2000)** Secondary metabolism of agrochemicals in plants. In: Roberts T. (Ed.) *Metabolism of agrochemicals in plants*. Wiley, New York, pp. 107-154
- Coleman J.O.D., Blake-Kalff M.M.A., Davies T.G.E. (1997)** Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Sci.* **2**: 144-151
- Cornell W. D., Cieplak P., Bayly C. I., Gould I. R., Merz K. M. J., Ferguson, D. M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J. W., Kollman P.A. (1995)** A second generation force field for the simulation of proteins and nucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 5179-5197
- Coutinho P.M., Deleury E., Davies G.J., Henrissat B. (2003)** An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* **328**: 307-317
- Crane B.R., Siegel L.M., Getzoff E.D. (1995)** Sulfite reductase structure at 1.6 Å: evolution and catalysis for reduction of inorganic anions. *Science* **270**: 56-67
- Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G. (2000)** Natural products (Secondary Metabolites) In Buchanan et al. (Eds.) 2000, *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, ASPP, Chapter 24, pp. 1250-1341.
- Crouzet J., Chassagne D. (1999)** Glycosidally bound volatiles in plants. In Ikan R. (Ed.) *Naturally occurring glycosides*, John Wiley & Sons, pp. 225-374.
- Cuénod P., Savolainen V., Chatrou L.W., Powell M., Grayer R.J., Chase M.W. (2002)** Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S DNA and plastid *rbcL*, *atpB* And *matK* DNA sequences. *Am. J. Bot.* **89**: 132-144
- De Pascual T.S., Rivaz-Gonzalo J.C., Justensen U. (1998)** Liquid chromatography-mass spectrometry study on the flavonoids in food samples. 2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-2), <http://www.mdpi.org/ecsoc/>, September 1-30, 1998.
- Dixon S.C., Martin R.C., Mok M.C., Shaw G., Mok D.W.S. (1989)** Zeatin glucosylation enzymes in *Phaseolus*. Isolation of *O*-glucosyltransferase from *P. lunatus* and comparison to *O*-xylosyltransferase from *P. vulgaris*. *Plant Physiol.* **90**: 1316-1321
- Dixon R.A., Paiva N.L. (1995)** Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**: 1085-1097.

- Dixon R.A., Steele C.L. (1999)** Flavonoid and isoflavonoids a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci.* **4**: 394-400
- Douette P., Navet R., Bouillenne F., Brans A., Sluse-Goffart C., Matagne A., Sluse F.E. (2004)** Secondary structure characterization by far UV circular dichroism of highly purified uncoupling protein 1 expressed in yeast. *Biochem. J. Immediate Publication*, doi: 10.1042/BJ20031957
- Durren R.L., McIntosh C.A. (1999)** Flavanone-7-*O*-glucosyltransferase activity from *Petunia hybrida*. *Phytochem.* **52**: 793-798
- Elliger C.A. & Halloin J.M. (1994)** Phenolics induced in *Beta vulgaris* by *Rhizoctonia solani* infection. *Phytochem.* **37**: 691-693
- Ellis K.J., Morrison J.F. (1982)** Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. *Methods Enzymol.* **87(C)**: 405-426.
- Elliott D.C., Schultz C.G., Cassar R.A. (1983)** Betacyanin decolourizing enzyme in *Amaranthus tricolor* seedlings. *Phytochem.* **22**: 383-387
- Eloesser W., Hermann K. (1975)** Flavonols and flavones of vegetables. V. Flavonols and flavones of root vegetables. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **16**: 265-270
- Escribano J., Pedreno M.A., Garcia-Carmona F., Munoz R. (1998)** Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. *Phytochem. Anal.* **9**: 124-127
- Fedoroff N.V. (1984)** Cloning of the *bronze* locus in maize by a simple and generalizable procedure using the transposable controlling element activator (Ac). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 3825-3829
- Fischer D., Barret C. Bryson K., Elofsson A. et al. (1999)**: Critical assessment of fully automated structure prediction methods. *Proteins, Suppl.* **3**: 209-217
- Flitsch S.L. (2000)** Chemical and enzymatic synthesis of glycopolymers. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**: 619-625
- Florini J.R., Vestling C.S. (1957)** Graphical determination of the dissociation constants for two-substrate enzyme systems. *Biochim. Biophys. Acta* **25**: 575-8
- Ford C.M., Boss P.K., Hoj P.B. (1998)** Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose: flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize *bronze-1* locus that may primarily serve to glycosylate anthocyanidins *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **273**: 9224-9233
- Forkmann G., Martens S. (2001)** Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 155-160
- Frassinet-Tachet L., Baltz R., Chong J., Kauffmann S., Fritig B., Saindrenan P. (1998)** Two tobacco genes induced by infection, elicitor and salicylic acid encode Glucosyltransferases acting on phenylpropanoids and benzoic acid derivatives, including salicylic acid. *FEBS Lett.* **437**: 319-3223

- French C.J., Pecket R.C., Smith H. (1973)** Effect of light and exogenously applied precursors on Amaranthin biosynthesis in *Amaranthus caudatus*. *Phytochem.* **12**: 2887-2891
- Frick S., Kutchan M. (1999)** Molecular cloning and functional expression of *O*-methyltransferases common to isoquinoline alkaloid and phenylpropanoid biosynthesis. *Plant J.* **17**: 329-339
- Gardner R.L., Kerst A.F., Wilson D.M., Payne M.G. (1967)** *Beta vulgaris* L.: The characterization of three polyphenols isolated from the leaves. *Phytochem.* **6**: 417-422
- Gil M.I., Ferrerei F., Tomas-Barberan F.A. (1998)** Effect of modified atmosphere Packaging on the flavonoids and vitamin C content of minimally processed swisschard (*Beta vulgaris*, subsp. *cycla*). *J. Agric. Food. Chem.* **46**: 2007-2012
- Girod P., Zryd J.P. (1991a)** Biogenesis of betalains: Purification and partial characterization of DOPA 4,5-dioxygenase from *Amanita muscaria*. *Phytochem.* **30**: 169-174
- Girod P., Zryd J.P. (1991b)** Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris* L.) cells: differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **25**: 1-12
- Giudici de Nicola M., Amico V., Sciuto S., Piattelli M. (1974)** Light control of amaranthin synthesis in isolated *Amaranthus* cotyledons. *Phytochem.* **14**: 479-481
- Hahlbrock K., Scheel D. (1989)** Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 347-369
- Hall R.D., Riksen-Bruinsma T., Weyens G.J., Rosquin I.J., Denys P.N., Evans I.J., Lathouwers J.E., Lefèbre M.P., Dunwell J.M., van Tunen A., Krens F.A. (1996)** A high efficiency technique for the generation of transgenic sugar beets from stomatal guard cells. *Nat. Biotechnol.* **14**: 1133-1138
- Hall T. (1999)** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **41**: 95-98
- Hanahan D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- Hanahan D., Jessee J., Bloom F.R. (1991)** Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* **204**: 63-113
- Hansen K.S., Kristensen C., Tattersall D.B., Jones P.R., Olsen C.E., Bak S., Møller L.B. (2003)** The *in vitro* substrate regiospecificity of recombinant UGT85B1, the cyanohydrin glucosyltransferase from *Sorghum bicolor*. *Phytochem.* **64**: 143-151.
- Harborne J.B., Grayer R.J. (1993)** Flavonoids and insects. In: Harborne, J.B. (Ed.) *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*. Chapman & Hall, London, pp. 589-618
- Harborne J.B. (1995)** *Ökologische Biochemie: Eine Einführung*. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford

Harborne J.B., Baxter H. (1999) The Handbook of Natural Flavonoids, Vol. 1. John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 297-549

Hartl F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**: 571-579

Hefner T., Arend J., Warzecha H., Siems K., Stöckigt J. (2002) Arbutin Synthase, a novel member of the NRD1 β glycosyltransferase family, is a unique multifunctional enzyme converting various natural products and xenobiotics. *Bioorg. Med. Chem.* **10**: 1731-1741

Hefner T., Stöckigt J. (2003) Probing suggested catalytic domains of glycosyltransferases by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **270**: 533-538

Heissigerová H., Breton C., Moracová J., Imberty A. (2003) Molecular modelling of glycosyltransferases involved in the biosynthesis of blood group A, group B, Forssman, and iGb₃ antigens and their interaction with substrates. *Glycobiology* **13**: 377-38

Heller W., Forkmann G. (1988) Biosynthesis of flavonoids. In: Harborne J.B. (Ed.) The Flavonoids. Advances in Research Since 1980. Chapman and Hall Ltd., pp. 399-425

Heller W., Forkmann G. (1994) Biosynthesis of flavonoids. In: Harborne J.B. (Ed.) The Flavonoids. Advances in Research Since 1986. Chapman and Hall Ltd., pp. 499-535

Henikoff S., Henikoff J.G. (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 10915-10919

Henikoff S., Henikoff J.G. (1993) Performance evaluation of amino acid substitution matrices. *Proteins* **17**: 49-61.

Henning J., Malamy J., Gryniewicz G., Indulsky J., Klessig D.F. (1993) Interconversion of the salicylic acid signal and its glucoside in tobacco. *Plant J.* **4**: 593-600

Herms D.A., Mattson W.J. (1992) The dilemma of plants: To grow or to defend. The quarterly Review of Biology. The University of Chicago, Vol. **67** (3)

Heuer S., Strack D. (1992) Synthesis of betanin from betanidin and UDP-glucose by a protein preparation from cell suspension cultures of *Dorotheanthus bellidiformis* (Burm.f.) N.E.Br. *Planta* **186**: 626-628

Heuer S. (1995) Strukturen und Biosynthese von Betanidinkonjugaten. Dissertationsschrift, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

Heuer S., Vogt T., Böhm W., Strack D. (1996) Partial purification and characterization of UDP-Glucose: betanidin 5-*O*- and 6-*O*-glucosyltransferases from cell suspension cultures of *Dorotheanthus bellidiformis* (Burm.f.) N.E.Br. *Planta* **199**: 244-250

Hinz U.G., Fivaz J., Girod G.A., Zryd J.P. (1997) The gene coding for the DOPA dioxygenase involved in betalain biosynthesis in *Amanita muscaria* and its regulation. *Mol. Gen. Genet.* **256**: 1-6

Hradzina G. (1988) Purification and properties of a UDP-Glucose: flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase from *Hippeastrum* petals. *Biochim. Biophys. Acta* **955**: 301-209

- Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K., Pease L.R. (1989)** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59
- Hollman P.C.H., Bijlsman M.N.C.P., Van Gameren Y., Cnossen E.P.J., de Vries J.H.M., Katan M.B. (1999)** The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free radic. Res.* **31**: 569-573
- Hu Y., Walker S. (2002)** Remarkable structural similarities between diverse glycosyltransferases. *Chem. Biol.* **9**: 1287-1296
- Huang A.S., von Elbe J.H. (1985)** Kinetics of the degradation and regeneration of betanine. *J. Food Sci.* **50**: 1115-1120
- Hughes J., Hughes M.A. (1994)** Multiple secondary plant product UDP-Glucose glucosyltransferase genes expressed in *cassava*. *DNA Sequence* **5**: 41-49
- Ishikura N., Mato M. (1993)** Partial purification and some properties of flavonol 3-*O*-glucosyltransferases from seedlings of *Vigna mungo*, with special reference to the formation of kaempferol-3-*O*-galactoside and kaempferol-3-*O*-glucoside. *Plant Cell Physiol.* **34**: 329-335
- Jackson D., Roberts K., Martin C. (1992)** Temporal and spatial control of expression of anthocyanin biosynthetic genes in developing flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant J.* **2**: 425-434
- Jackson R.G., Lim E.K., Li Y., Kowalczyk M., Sandberg G., Hoggett J., Ashford D.A., Bowles D.J. (2001)** Identification and biochemical characterization of an *Arabidopsis* indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **276**: 4350-4356
- Jones P.R., Møller B.L., Høj P.B. (1999)** The UDP-Glucose: *p*-hydroxymandelonitrile-*O*-glucosyltransferase which catalyses the last step in synthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor*: isolation, cloning, heterologous expression and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **274**: 35483-35491
- Jones P.R., Vogt T. (2001)** Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* **213**: 164-174
- Jones P.R., Messner B., Nakajima J.I., Schaeffner A.R., Saito K. (2003)** UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavonol glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **45**: 43910-43918
- Kamsteeg J., van Brederode J., Kuipers-Tierie (1979)** A modified procedure for the preparation of UDP-beta-L-(U-14C)rhamnose. *Prep Biochem.* **9**: 457-64
- Kanner J., Harel S., Granit R. (2001)** Betalains - a new class of dietary cationized antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 5178-5185
- Kapitonov D., Yu R.K. (1999)** Conserved domains of glycosyltransferases. *Glycobiology* **9**: 961-978

- Kelley L.A., MacCallum R.M., Sternberg, M.J.E. (2000)** Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM. *J. Mol. Biol.* **299**: 499-520
- Kimler L.M., Mears J., Mabry T.J., Rosler H. (1970)** On the question of the mutual exclusiveness of betalains and anthocyanins. *Taxon* **19**: 875-878
- Kita M., Hirata Y, Moriguchi T., Endo-Inagaki T., Matsumoto R., Hasegawa S., Suhayda C.G., Omura M. (2000)** Molecular cloning and characterization of a novel gene encoding limonoid UDP-glucosyltransferase in *citrus*. *FEBS Lett.* **469**: 173-178
- Kobayashi N., Schmidt J., Wray V., Schliemann W. (2001)** Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins. *Phytochem.* **56**: 429-436
- Kramer C.M., Prata R.T.N., Willits M.G., De Luca V., Steffens J.C., Graser G. (2003)** Cloning and regiospecificity studies of two flavonoid glucosyltransferases from *Allium cepa*. *Phytochem.* **64**: 1069-1076
- Kreuz K., Tommasini R., Martinoia E. (1996)** Old enzymes for a new job. Herbicide detoxification in plants. *Plant Physiol.* **111**: 349-353
- Kudrev T., Ivanovna I., Karanov E. (1977)** *Beta vulgaris* L. flavonoids. *Plant Growth Regul. Proc. Int. Symp.*, 2nd, 228-232
- Kujala T.S., Vienola M.S., Klika K.D., Lojonen J.M., Pihlaja K. (2002)** Betalain and phenolic compositions of four beetroot (*Beta vulgaris*) cultivars. *Eur. Food Res. Technol.* **214**: 505-510
- Laemmli U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lange W., Brandenburg W.A., De Bock T.S.M. (1999)** Taxonomy and cultonomy of beet (*Beta vulgaris* L.) *Bot. J. Lin. Soc.* **130**: 81-96
- Larivière L., Gueguen-Chaignon, V., Moréra, S. (2003)** Crystal structure of the T4 phage glucosyltransferase and the D100A mutant in complex with UDP-glucose: glucose binding and identification of the catalytic base for a direct displacement mechanism. *J. Mol. Biol.* **330**: 1077-1080
- Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J. M. (1993)** PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures *J. Appl. Cryst.* **26**: 283-291
- Latchinian-Sadek L., Ibrahim R.K. (1991a)** Partial purification and some properties of a ring B-O-glucosyltransferase from onion bulbs. *Phytochem.* **30**: 1767-1771
- Lee H., Raskin I. (1999)** Purification, cloning and expression of a pathogen inducible UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *J. Biol. Chem.* **274**: 36637-36642
- Leathers R.R., Davin C., Zryd J.P. (1992)** Betalain producing cell cultures of *Beta vulgaris* L. var. *bikores monogerm* (Red Beet). *In Vitro Cell Dev. Biol.* **28P**: 39-45

- Levitt M. (1992)** Accurate modelling of protein conformation by automatic segment matching. *J. Mol. Biol.* **226**: 507-533
- Liebisch H.W., Matschiner B., Schütte H.R. (1969)** Beiträge zur Physiologie und Biosynthese des Betanins. *Z. Pflanzenphysiol.* **61**: 269-278
- Li Y., Baldauf S., Lim E.K., Bowles D.J. (2001)** Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **276**: 4338-4343.
- Lim E.K., Li Y., Parr A., Jackson R., Ashford D.A., Bowles D.J. (2001)** Identification of glucosyltransferase genes involved in sinapate metabolism and lignin synthesis in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **6**: 4344-4349
- Lim E.K., Doucet C., Li Y., Elias L., Worrall D., Spencer S.P., Ross J., Bowles D.J. (2002)** The activity of *Arabidopsis* glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid and other benzoates. *J. Biol. Chem.* **277**: 586-592
- Lim E.K., Baldauf S., Li Y., Elias L., Worrall D., Spencer S.P., Jackson R.G., Taguchi G., Ross J., Bowles D.J. (2003a)** Evolution of substrate recognition across a multigene family of glycosyltransferases in *Arabidopsis*. *Glycobiology* **13**: 139-145.
- Lim E.K., Higgins G., Li Y., Bowles D.J. (2003b)** Regioselectivity of glucosylation of caffeic acid by a UDP-glucose:glucosyltransferase is maintained *in planta*. *Biochem. J.* **373**: 987-992
- Liu C.J., Blount J.W., Steele C.L., Dixon R.A. (2002)** Bottlenecks for metabolic engineering of isoflavone Glycokonjugates in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 14578-14583
- Liu J., Mushegian A. (2003)** Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases. *Protein Sci.* **12**: 1418-1431
- Mabry T.J., Dreiding A.S. (1968)** The betalains. In: Mabry T.J., Alston R.E., Runeckles V.C. (Eds.) *Recent Advances in Phytochemistry*, Vol. 1. Appleton-Century-Crofts, New York, pp. 145-169
- Mackenzie P., Owens I., Burchell B., Bock K., Bairoch A., Bélanger A., Fournel-Gigleux S., Green M., Hum D., Iyanagi T., Lancet D., Louisot P., Magdalou J., Chowdhury J.R., Ritter J.K., Schachter H., Tephly T.R., Tipton K.F., Nebert D.W. (1997)** The UDP-glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* **7**: 255-26
- Mandel M., Higa A. (1970)** Calcium-dependant bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159-162
- Martínez-Parra J., Muñoz R. (2000)** Characterization of betacyanin oxidation catalyzed by a peroxidase from *Beta vulgaris* L. roots. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 4064-4068
- Mattern-Dogru E., Ma X., Hartmann J., Decker H., Stöckigt J. (2002)** Potential active-site residues in polyneuridine aldehyde esterase, a central enzyme of indole alkaloid biosynthesis, by modelling and site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.*, **269**: 2889-2896

- Messner B., Thulke O., Schäffner A.R. (2003)** *Arabidopsis* glucosyltransferases with activities toward both endogenous and xenobiotic substrates. *Planta* **217**: 138-146
- Middleton E. Jr., Kandaswami Ch. (1993)** The impact of flavonoids on the mammalian Biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne J.B. (Ed.) *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*. Chapman & Hall, London, pp. 619-652
- Miller K.D., Guyon V., Evans J.N.S., Shuttleworth W.A., Taylor L.P. (1999)** Purification, cloning and heterologous expression of a catalytically efficient flavonol 3-*O*-galactosyltransferase expressed in the male gametophyte of *Petunia hybrida*. *J. Biol. Chem.* **48**: 34011-34019
- Milkowski C., Baumert A., Strack D. (2000)** Identification of four *Arabidopsis* genes encoding hydroxycinnamate glucosyltransferases. *FEBS Lett.* **486**: 183-184
- Moehs C.P., Allen P.V., Friedman M., Belknap W.R. (1997)** Cloning and expression of solanidine UDP-glucose glucosyltransferase from potato. *Plant J.* **11**: 227-236
- Møller B.L., Conn E.E. (1980)** The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. Channeling of intermediates in dhurrin biosynthesis by a microsomal system from *Sorghum bicolor* (Linn) Moench. *J. Biol. Chem.* **255**: 3049-3056
- Moréra S., Imberty A., Aschke-Sonnenborn U., Ruger W., Freemont P.S. (1999)** T4 phage beta-glucosyltransferase: Substrate binding and proposed catalytic mechanism. *J. Mol. Biol.* **292**: 717-730
- Mueller L.A., Hinz U., Zryd J.P. (1996)** Characterization of a tyrosinase from *Amanita muscaria* involved in betalain biosynthesis. *Phytochem.* **42**: 1511-1515
- Mueller L.A., Hinz U., Uzé M., Zryd J.P. (1997a)** Biochemical complementation of betalain biosynthesis pathway in *Portulacca grandiflora* by a fungal 3,4-dihydroxyphenylalanine dioxygenase. *Planta* **203**: 260-263
- Mueller L.A., Hinz U., Zryd J.P. (1997b)** The formation of betalamic acid and muscaflavin by recombinant DOPA-dioxygenase from *Amanita*. *Phytochem.* **44**: 567-569.
- Mulichak A., Losey H.C., Walsh C.T., Garavito R.M. (2001)** Structure of the UDP-glucosyltransferase GtfB that modifies the heptapeptide aglycone in the biosynthesis of vancomycin group antibiotics. *Structure* **9**: 547-557
- Mullis K.B., Faloona F.A. (1987)** Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350
- Murashige T., Skoog F. (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497
- Nawloka P., Kalinowska M., Paczkowski C., Wojciechowski Z.A. (2003)** Evidence for essential histidine and dicarboxylic amino-acid residues in the active site of UDP-glucose: solasodine glucosyltransferase from eggplant leaves. *Acta Biochim. Pol.* **50**: 567-572

- Nimtz M., Mort A., Domke T. Wray V., Zhang Y., Qui F., Coplin D., Geider K. (1996)** Structure of amylovoran, the capsular exopolysaccharide from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. Carbohydr. Res. **287**: 59-76
- Olthof M.R., Hollman P.C.H., Vree T.B., Katan M.B. (2000)** Bioavailability of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. J. Nutr. **130**: 1200-1203
- Ouzzine M., Gulberti S., Netter P., Magdalou J., Fournel-Gigleux S. (2002)** The donor substrate specificity of the human beta 1,3-glucuronosyltransferase I toward UDP-glucuronic acid is determined by two crucial histidine and arginine residues. J. Biol. Chem. **277**: 25439-25445.
- Paczkowski C., Kalinowska M., Wojciechowski Z.A. (1997)** UDP-glucose:solasodine glucosyltransferase from eggplant (*Solanum melongena* L.) leaves: partial purification and characterization. Acta Biochim. Pol. **44**: 43-53
- Paquette S., Møller B.L., Bak S. (2003)** On the origin of family I plant glucosyltransferases. Phytochem. **62**: 399-413
- Paris R.R., Herni E., Paris M. (1976)** C-flavonoids of *Cannabis sativa* L. Plantae medicinale et Phytotherapie **10**: 144-54
- Parry A.D., Edwards R. (1994)** Characterization of O-Glucosyltransferases with activities towards phenolic substrates in *Alfalfa*. Phytochem. **37**: 655-661
- Pedreno M.A., Escribano J. (2000)** Studying the oxidation and the antiradical activity of betalain from beetroot. J. Biol. Educ. **35**: 49-51
- Pflugmacher S., Sandermann H. (1998)** Taxonomic distribution of plant glucosyltransferases acting on xenobiotics. Phytochem. **49**: 507-511.
- Piattelli M., Minale L. (1964a)** Isolation, structure and absolute configuration of indicaxanthin. Tetrahedron **22**: 2325-2329
- Piattelli M., Minale L. (1964b)** Pigments of Centrospermae-II. Distribution of betacyanins. Phytochem. **3**: 547-557
- Piattelli M., Imperato F. (1969)** Betacyanins of the family Cactaceae. Short communication. Phytochem. **8**: 1503-1507
- Piers K.L., Brown M.H., Hancock R.E. (1993)** Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial peptides in bacteria. Gene **134**: 7-13
- Prince R.C., Gunson D.E. (1994)** Just plain vanilla? Trends Biochem. Sci. **19**: 521
- Rice-Evans C. A., Miller N.J. (1996)** Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. Biochem. Soc. Trans. **24**: 790-794
- Rice-Evans C. A. (2001)** Flavonoid antioxidants. Curr. Emd. Chem. **8**: 797-807

- Richardson M. (1978)** Flavonols and C-glycosylflavonoids of the Caryophyllales. *Biochem. Syst. Ecol.* **6**: 283-286
- Ross, J., Li Y., Lim E.K., Bowles D.J. (2001)** Higher plant glucosyltransferases. *Genome Biol.* **2**: reviews 3004.1-3004.6
- Rossmann G., Moras D., Olsen K.W. (1974)** Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature* **250**: 194-199
- Saito K., Kobayashi M., Gong Z., Tanaka Y., Yamazaki M. (1999)** Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: molecular cloning and functional expression of a cDNA from a red form of *Perilla frutescens*. *Plant J.* **17**: 181-189
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989)** *Molecular Cloning - a Laboratory Manual*. 2. Aufl. Cold Spring Harbor Press, New York
- Sanderman H. (1994)** Higher Plant metabolism of xenobiotics: the „green liver” concept. *Pharmacogenetics* **4**: 225-241
- Schellenberger A. (1989)** *Enzymkatalyse. Einführung in die Chemie, Biochemie und Technologie der Enzyme*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Schmidt O.T., Schönleben W. (1957)** Zur Kenntnis der Farbstoffe der Roten Rübe, II. *Z. Naturforsch.* **12b**: 262-263
- Schliemann W., Steiner U., Strack D. (1998)** Betanidin formation from dihydroxyphenylalanine in a model assay system. *Phytochem.* **49**: 1593-1598
- Schliemann W., Kobayashi N., Strack D. (1999)** The decisive step in betaxanthin biosynthesis is a spontaneous reaction. *Plant Physiol.* **119**: 1217-1232
- Schröder G., Wehinger E., Schröder J. (2002)** Predicting the substrates of cloned plant *O*-methyltransferases. *Phytochem.* **59**: 1-8
- Schwinn K.L. (1997)** Expression of an *Antirrhinum majus* UDP-flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase transgene alters flavonoid glycosylation and acylation in lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Grise). *Plant Sci.* **125**: 53-61
- Sciuto S., Oriente G., Piattelli M. (1972)** Betanidin glucosylation in *Opuntia dillenii*. *Phytochem.* **11**: 2259-2262
- Sefton M.A., Francis I.L., Williams P.J. (1993)** The volatile composition of Chardonnay juices: a study by flavour precursor analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* **44**: 359-370
- Sefton M.A., Francis I.L., Williams P.J. (1994)** Free and bound volatile secondary metabolites of *Vitis vinifera* grape cv. Sauvignon blanc. *J. Food Sci.* **59**: 142-147
- Setchell K.D.R., Cassidy A. (1999)** Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J. Nutr.* **129**: 758S-767S

- Sinnott M.L. (1991)** Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **90**: 1170-1202
- Sippl M.J. (1993)** Boltzmann's principle, knowledge-based mean fields and protein folding. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **7**: 473-501
- Soboleva G.A., Ul'ianova M.S., Zakharova N.S., Bokuchava M.A. (1976)** Study of beta-cyanin-discolorating enzyme. *Biokhimiia* **41**: 968-974
- Sreerama N., Woody R.W. (2004)** On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. *Protein Sci.* **13**: 100-112
- Stafford H.A. (1991)** Flavonoid evolution: an enzymic approach. *Plant Physiol.* **82**: 952-955
- Stafford H.A. (1994)** Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Sci.* **101**: 91-98
- Steiner U., Schliemann W., Strack D. (1996)** Assay for tyrosine hydroxylation activity of tyrosinase from betalain-forming plants and cell cultures. *Anal. Biochem.* **238**: 72-75
- Steiner U., Schliemann W., Böhm H., Strack D. (1999)** Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta* **208**: 114-124
- Steglich W., Strack D. (1990)** Betalains. In: Brossi, A. (Ed.) *The Alkaloids, Chemistry and pharmacology*, Vol. **39**. Academic Press, London, pp. 1-62
- Stewart J. J. P. (1989)**, Optimization of parameters for semiempirical methods. II. Applications. *J. Comput. Chem.* **10**: 221-264
- Strack D., Vogt T., Schliemann W. (2003)** Recent advances in betalain research. *Phytochem.* **62**: 247-269
- Stroud R.M. (1974)** A family of protein-cutting proteins. *Sci. Am.* **231**: 74-88
- Szerszen J.B., Szczyglowski K., Bandurski R.S. (1994)** *iaglu*, a gene from *Zea mays* involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid. *Science* **265**: 1699-1701
- Taguchi G., Fujikawa S., Yazawa T., Kodaira R., Shimosaka M., Hayashida N., Okazaki M. (2000a)** Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the vacuoles after conversion to scopolin in 2,4-D-treated tobacco cells. *Plant Sci.* **151**: 153-161
- Taguchi G., Imura H., Maeda Y., Kodaira R., Hayashida N., Shimosaka M., Okazaki M. (2000b)** Purification and characterization of UDP-Glucose:hydroxycoumarin 7-*O*-glucosyltransferase, with broad substrate specificity from tobacco cultured cells. *Plant Sci.* **157**: 105-112
- Taguchi G., Yatawa T., Hayashida N., Okazaki M. (2001)** Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin. *Eur. J. Biochem.* **268**: 4086-4094

Taguchi G., Takahisa U., Hayashida N., Yamamoto H., Okazaki M. (2003a) Cloning and characterization of a glucosyltransferase that reacts on 7-hydroxyl group of flavonol and 3-hydroxy group of coumarin from tobacco cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **420**: 95-102

Taguchi G., Nakamura M., Hayashida N., Okazaki M. (2003b)

Exogenously added naphthols induce three glucosyltransferases, and are accumulated as glucosides in tobacco cells. *Plant Sci.* **164**: 231-240

Tattersall D.B., Bak S., Jones R.P., Olsen C.E., Nielsen J.K., Hansen M.L., Høj P.B., Møller B.L. (2001) Resistance to an herbivore through engineered cyanogenic glucoside synthesis. *Science* **293**: 1826-1818

Terradas F., Wyler H. (1991) 2,3- and 4,5-Secodopa, the biosynthetic intermediates generated from L-Dopa by an enzyme system extracted from the fly agaric, *Amanita muscaria* L., and their spontaneous conversion to muscaflavin and betalamic acid, respectively, and betalains. *Helv. Chim. Acta* **74**: 124-140

The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.

Ünligil U.M., Rini J.M. (2000) Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 510-517

Vellekoop P., Kugones L., van Brederode J. (1993) Purification of an UDP-glucose: flavone, 7-*O*-glucosyltransferase from *Silene latifolia* using a specific interaction between the enzyme and phenyl-Sepharose. *FEBS Lett.* **330**: 36-40.

Vogt T., Zimmermann E., Grimm R., Meyer M., Strack D. (1997) Are the characteristics of betanidin glucosyltransferases from cell suspension cultures of *Dorotheanthus bellidiformis* indicative for their phylogenetic relationship with flavonoid glucosyltransferases? *Planta* **203**: 349-361.

Vogt T., Grimm R., Strack D. (1999a) Cloning and expression of a cDNA encoding betanidin 5-*O*-glucosyltransferase, a betanidin – and flavonoid-specific enzyme with high homology to inducible glucosyltransferases from the Solanaceae. *Plant J.* **19**: 509-519.

Vogt T., Ibdah M., Schmidt J., Wray V., Nimtz M., Strack D. (1999b) Light-induced betacyanin and flavonol accumulation in bladder cells of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Phytochem.* **52**: 583-592

Vogt T., Jones P. (2000) Glycosyltransferases in plant natural product biosynthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci.* **5**: 380-386

Vogt T. (2002) Substrate specificity and sequence analysis define a polyphyletic origin of betanidin 5- and 6-*O*-glucosyltransferase from *Dorotheanthus bellidiformis*. *Planta* **214**: 492-495

Von Elbe J.H. (1977) The betalains. In: Furia, T. (Ed.) *Current Aspects of Food Colorants.*, CRC Press Inc., Cleveland, Ohio, p. 29

Von Rad U., Hüttl R., Lottspeich F., Gierl A., Frey M. (2001) Two glucosyltransferases are involved in detoxification of benzoxazinoids in maize. *Plant J.* **28**: 633-642

Walgren R.A., Karnaky K.J., Lindenmayer G.E., Walle T. (2000a)

Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'- β -glucoside across human intestinal caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2.

J. Pharmacol. Exp. Ther. **294**: 830-836

Wang R., Liu L., Lai L., Tang Y. (1998) SCORE: a new empirical method for estimating the binding affinity of a protein ligand complex. *J. Mol. Model.* **4**: 379-394

Wassermann B.P., Guilfooy M.P. (1983) Peroxidative properties of betanin decolorization by cell walls of red beet. *Phytochem.* **22**: 2653-2656.

Werner C., Matile P. (1985) Accumulation of coumarylglucosides in vacuoles of barley mesophyll protoplasts. *J. Plant Physiol.* **118**: 237-249.

Willits MG, Giovanni M, Prata RT, Kramer CM, De Luca V, Steffens JC, Graser G. (2004) Bio-fermentation of modified flavonoids: an example of *in vivo* diversification of secondary metabolites. *Phytochemistry.* **65**: 31-41

Winter M., Herrmann K. (1984) Analysis of hydroxycinnamic acid esters and their glucosides by reversed-phase high-performance liquid chromatography after polyamide separation. *J. Chrom.* **315**: 243-251.

Winter M., Hermann K. (1986) Esters and glucosides of hydroxycinnamic acids in vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **34**: 616-620

Wyler H., Dreiding A.S. (1957) Kristallisiertes Betanin. Vorläufige Mitteilung. *Helv. Chim. Acta* **40**: 191-92

Wyler H., Dreiding A.S. (1959) Darstellung und Abbauprodukte des Betanidins. Über die Konstitution des Randfarbstoffs Betanin. *Helv. Chim. Acta* **42**: 1699-1702

Wyler H., Mabry T.J., Dreiding, A.S. (1963) Zur Struktur des Betanidins. Über die Konstitution des Randfarbstoffs Betanin. *Helv. Chim. Acta* **46**: 1745-1748

Wyler H., Wilcox M.E., Dreiding A.S. (1965) Umwandlung eines Betacyans in ein Betaxanthin. Synthese von Indicaxanthin aus Betanin. *Helv. Chim. Acta* **42**: 1696-1698

Wyler H., Meuer U., Bauer J., Stravs-Mombelli L. (1984) Cyclodopa glucoside (= (2S)-5-(β -D-glucopyranosyloxy)-6-hydroxyindoline-2-carboxylic acid) and its occurrence in red beet (*Beta vulgaris* var. *rubra* L.). *Helv. Chim. Acta* **67**: 1348-1355

Yamazaki M. (1999) Molecular cloning and biochemical characterization of novel anthocyanidin 5-O-glucosyltransferase by mRNA differential display for plant forms regarding anthocyanin. *J. Biol. Chem.* **274**: 7405-7411

Yamazaki M., Yamagishi E., Gong Z., Fukuchi-Mizutani M., Fukui Y., Tanaka Y., Kusumi T., Yamaguchi M., Saito K. (2002) Two flavonoid glucosyltransferases from *Petunia hybrida*: molecular cloning, biochemical properties and developmentally regulated expression. *Plant Mol. Biol.* **48**: 401-411

Zhang C.L., Chen D.F., Mc Cormac A.C., Scott N.W., Elliott M.C., Slater A. (2001) Use of the GFP reporter as a vital marker for agrobacterium-mediated transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Mol. Biotechnol.* **17**: 109-117

Zhu B.T., Ezell E.L., Liehr J.G. (1994) Catechol-*O*-methyltransferase-catalyzed rapid *O*-methylation of mutagenic flavonoids. *J. Biol. Chem.* **269**: 292-299

Ziegler J., Vogt T., Miersch O., Strack D. (1997) Concentration of dilute protein solutions prior to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis. *Analyt. Biochem.* **250**: 257-260

8. Appendix

Tabelle 8.1 ¹H-NMR-Daten der Apigeninderivate aus *Beta vulgaris* mit Disaccharidsubstituenten in C-8-Position (gemessen in CD₃OD).

Verbindung	BV-279		BV-283 ^c		BV-282 ^b	
	Hauptkomponente	Nebenkompente	Hauptkomponente	Nebenkompente	Hauptkomponente	Nebenkompente
Prozentanteil^d	65	35	65	35	72	28
Chem. verschiebung [ppm]						
H-3	6,64	6,64	6,67	6,65	6,65	6,63
H-6	6,29	6,30	6,30	6,30	6,27	6,29
H-2'/6'	8,03	7,90	7,98	7,90	8,02	7,90
H-3'/5'	6,99	6,99	7,03	6,99	6,99	6,99
H-1''	5,10	5,18	5,10	5,18	5,07	5,20
H-2''	4,37	4,37	4,43	4,37	4,35	4,16
H-3''	3,77	3,80	3,79	3,81	3,93-3,71	3,93-3,71
H-4''	3,72	3,60	3,76	3,62	3,93-3,71	3,93-3,71
H-5''	3,50	3,55	3,70	3,79	3,51	3,57
H-6''A	4,00	3,93	4,54	4,57	3,99	3,93-3,71
H-6''B	3,84	3,81	4,40	4,39	3,84	3,93-3,71
H-1'''	4,24	4,35	4,25	4,36	4,18	4,18
H-2'''	3,04	2,99	3,04	2,98	3,01	
H-3'''	3,17	3,25	3,17	3,24	3,11	
H-4'''	3,20	3,11	3,20	3,10	3,27-3,11	
H-5'''	2,76	2,93	2,76	2,93	A 3,27-3,11, B 2,76-2,59	
H-6'''A	3,41	3,43	3,41	3,45-3,39		
H-6'''B	3,32	3,43	3,31	3,45-3,39		
Kopplungskonstanten [Hz]^a						
2'-3'+2'-5'	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7
1''-2''	10,0	9,8	10,1	9,8	10,0	9,8
2''-3''	8,8		8,9	9,0	8,4	
3''-4''	9,0	9,1	9,0	9,1		
4''-5''	9,2	9,1	9,0	9,3		
5''-6''A	1,8		1,7		1,8	
5''-6''B	5,5		5,2		5,3	
6''A-6''B	12,1		12,1		12,0	
1'''-2'''	7,8	7,8	7,8	8,1	7,2	
2'''-3'''	8,9	9,2	9,0	9,1	8,5	
3'''-4'''	9,0	9,2	9,0	9,1	8,3	
4'''-5'''	9,0	9,3	9,0	9,1		
5'''-6'''A	3,7		3,5			
5'''-6'''B	3,0		3,0			
6'''A-6'''B	11,2		11,4			

a) Überlappung von Signalen liess nur die Bestimmung der angegebenen Kopplungskonstanten zu. b) Die Natur der zweiten Zuckereinheit konnte anhand der MNMR-Daten bei 300 MHz nicht bestimmt werden.

c) Die Signale der Malonyleinheit wurden aufgrund eines Deuteriumaustauschs nicht detektiert. d) Bezogen auf die Peakhöhe des H-2'/6'-Signals.

Tabelle 8.2 ¹H-NMR-Daten der Apigeninderivate aus *Beta vulgaris* mit Monosaccharidsubstituenten an 7-O- und C-8-Position (gemessen in CD₃OD).

Verbindung	BV-278		BV-280	
	Hauptkomponente	Nebenkompente	Hauptkomponente	Nebenkompente
Prozentanteil^b	77	23	79	21
Chem. Verschiebung (ppm)				
H-3	6,71	6,70	6,73	6,73
H-6	6,72	6,72	6,76	6,75
H-2'/6'	8,05	7,92	8,15	8,01
H-3'/5'	6,98	6,98	7,14	7,14
4'-OCH ₃			3,94	3,94
H-1''	5,11	5,08	5,12	5,09
H-2''	4,05	4,31	4,05	4,31
H-3''	3,58	3,57	3,59	
H-4''	3,70		3,74	
H-5''	3,51		3,57-3,47	
H-6''A	4,00		3,99	
H-6''B	3,84		3,87	
H-1'''	5,08	5,10	5,09	5,11
H-2'''	3,62		3,62	
H-3'''	3,57-3,47		3,57-3,47	
H-4'''	3,57-3,47		3,57-3,47	
H-5'''	3,54		3,57-3,47	
H-6'''A	3,95		3,95	
H-6'''B	3,78		3,78	
Kopplungskonstanten (Hz)^a				
2'-3'+2'-5'	8,8	8,8	8,9	8,9
1''-2''	10,0	9,7	10,0	
2''-3''	8,9	8,8		
3''-4''	9,4		9,4	
4''-5''	9,4		9,4	
5''-6''A	2,1		2,2	
5''-6''B	5,8		5,7	
6''A-6''B	12,1		12,2	
1'''-2'''	7,6	7,3	7,6	7,6
2'''-3'''	9,1		9,1	
3'''-4'''				
4'''-5'''				
5'''-6'''A	2,1		2,1	
5'''-6'''B	5,4		5,4	
6'''A-6'''B	12,2		12,2	

a) Überlappung von Signalen liess nur die Bestimmung der angegebenen Kopplungskonstanten zu. b) Bezogen auf die Peakhöhe des H-2'/6'-Signals.

Tabelle 8.3 ^{13}C -NMR-Daten der Apigeninderivate aus *Beta vulgaris* (gemessen in CD_3OD).

Verbindungen	BV-279		BV-278 ^e	
	Hauptkomponente	Nebenkompente	Hauptkomponente	Nebenkompente
Chem. Verschiebung (ppm)				
C-2	166,5	166,3	167,0	166,6
C-3	103,8	104,0	e	
C-4	184,3 ^a	184,2 ^a	184,2	
C-5	c	c	162,9	
C-6	99,5	100,8	99,7	
C-7	164,6	164,9	163,0	
C-8	d	d	107,9	
C-9	158,3	157,7	157,0	
C-10	d	d	107,7	107,1
C-1'	123,7	123,7	123,2	
C-2'/6'	130,1	129,7	130,2	129,7
C-3'/5'	117,0	117,1	117,0	
C-4'	c	c	163,0	162,9
Kopplungskonstanten (Hz)^a				
C-1''	73,6	74,9	75,2	75,8
C-2''	81,7	82,4	73,3	72,6
C-3''	80,2	79,8	80,2	80,5
C-4''	72,1	71,3	72,1	
C-5''	82,9	82,9	82,9	82,6
C-6''	62,9	62,6 ^b	62,9	
C-1'''	105,8	106,1	102,8	
C-2'''	75,8	76,1	74,7	
C-3'''	77,7	77,9	77,6	
C-4'''	71,1	71,3	70,9	
C-5'''	77,1	77,5	78,3	
C-6'''	62,3	62,5 ^b	62,2	

a), b) Zuordnung austauschbar, c) 163,0; 162,8 x 2; 162,7. d) 105,6; 105,5; 105,1; 104,5. e) Die ^{13}C -Verschiebungen wurden anhand der Korrelationen im HMBC-Spektrum ermittelt, die Verschiebung des C-3-Atoms ist nicht bestimmbar.

Tabelle 8.4 ESI-MS-Daten (positiver Ionenmodus) und Zuckeranalyse der Apigeninderivate aus *B. vulgaris*.

Verbindung	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	$[\text{M}+\text{H}]^+$ exp.	$[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet	Summenformel	Zuckeranalyse	Struktur
BV-278	595,2	617,2	595,168	595,1663	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	Glucose	Glucose/Glucose
BV-279	595,2	617,2	595,166	595,1663	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	Glucose	Glucose/Glucose
BV-280	609,2	631,2	609,184	609,1819	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$	Glucose	Glucose/Glucose/ OCH_3
BV-282	565,1	587,1	565,155	565,1557	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	Xylose/Glucose	Xylose/Glucose
BV-283	681,2	703,1	681,167	681,1667	$\text{C}_{30}\text{H}_{21}\text{O}_{18}$	Glucose	Glucose/Glucose/Malonyl

Lebenslauf

Name: Judith Hans, geb. Stolberg

Anschrift: Ankerstrasse 12
06108 Halle

Geburtsdatum/-ort: 12.12.1974 in Düren-Birkesdorf

Werdegang:

1981-1985 Städt. Gemeinschaftsgrundschule Düren-Merken

1985-1994 Städt. Naturwissenschaftliches Gymnasium am Wirteltor, Düren

WS 1994/95-WS 1999/2000 Studium für das Lehramt an Gymnasien, Sekundarstufe I und II, in den Fächern Biologie und Chemie

WS 1998 Experimentelle Staatsexamensarbeit am Lehrstuhl für Anorganische Chemie II (Prof. Naumann) der Universität zu Köln: „Über Fluorarylverbindungen des Galliums“

09/1999-04/2000 Studentische Hilfskraft in der Abteilung Sekundärstoffwechsel (Prof. Strack) am Leibniz-Institutes für Pflanzenbiochemie (IPB) in Halle

ab 05/2000 Arbeit an der vorliegenden Dissertation in der Abteilung Sekundärstoffwechsel Leibniz-Institutes für Pflanzenbiochemie (IPB) in Halle

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertationsschrift erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe.

Ferner erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den