

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fachgebiet Biotechnologie der Naturstoffe

Funktionelle Charakterisierung von Terpenglykosyltransferasen
aus *Vitis vinifera*

Friedericke Anna Bönisch

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. W. Schwab

2. Univ.-Prof. Dr. B. Poppenberger-Sieberer

Die Dissertation wurde am 18.12.21013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 31.03.2014 angenommen.

Hela världen är full med saker, och det behövs verkligen att någon letar reda på dom.

Pippi är sakletare (Astrid Lindgren)

meiner Familie

Danksagung

Mein Dank gilt zu allererst meinem Doktorvater Prof. Dr. Wilfried Schwab für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit die theoretische und praktische Arbeit im Fachgebiet „Biotechnologie der Naturstoffe“ durchzuführen. Besonders für die stetige und unermüdliche Motivation und Begeisterung sowie die anregenden Diskussionen und wissenschaftliche Betreuung möchte ich mich bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Partner-Doktorandinnen Sarah Stanitzek (Universität Bonn) und Johanna Frotscher (Hochschule Geisenheim) für die schöne Zusammenarbeit und den wissenschaftlichen Austausch bedanken.

Ich bedanke mich auch bei der gesamten IMB-Gruppe der TU Delft (Niederlande), insbesondere Prof. Dr. Jack T. Pronk, Dr. Jean-Marc Daran sowie Gabriele Romagnoli für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Einführung in neue Arbeitsmethoden und eine wunderbare Arbeitsatmosphäre.

Mein herzlicher Dank gilt Geoffrey Behrens (Universität Greifswald) für seine Unterstützung und fachliche Kompetenz bei der Erstellung der Homologiemodelle der Glykosyltransferasen sowie Docking-Studien.

Natürlich möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Arbeitskollegen am Fachgebiet „Biotechnologie der Naturstoffe“ für die gute Zusammenarbeit, die anregenden Vor- und Ratschläge sowie die hervorragende Arbeitsatmosphäre bedanken. Insbesondere gilt mein herzlichster Dank dieser Stelle Doreen Schiller, Katrin Franz und Katja Schulenburg für eine herrlich entspannte Büroatmosphäre, den ständig währenden fachlichen Austausch und die schönen Momente zwischendurch. Zudem danke ich auch ganz besonders Dr. Stephanie Hücherig für eine wunderbare Laborarbeitszeit sowie Anregungen und Diskussionen.

Bei Dr. Thomas Hoffmann möchte ich mich für die gewissenhafte Durchsicht meines Manuskriptes und seine fachliche Kompetenz und Ratschläge bedanken.

Und natürlich bedanke ich mich ganz besonders bei meiner Mutti und meinem Bruder, ohne deren bedingungslose Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Danke an eure fortwährende Motivation, die aufbauenden Worte und den ganz normalen herrlichen Familienwahnsinn.

Tack, tack så hemsk mycket!

Vorabveröffentlichungen

Auszüge dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Publikation

F. Bönisch, J. Frotscher, S. Stanitzek, E. Rühl, M. Wüst, O. Bitz, W. Schwab. (2014) A UDP-glucose:monoterpenol glucosyltransferase adds to the chemical diversity of the grapevine metabolome (*Vitis vinifera* L). *Plant Physiology* (akzeptiert)

Vorträge

F. Boenisch, W. Schwab: “Characterization of terpene glycosyltransferases from grapes (*Vitis vinifera*)” (Vortrag). 4th European Yeast Flavour Workshop, 22.07. und 23.07.2013 in Freising

F. Boenisch, W. Schwab: “Functional characterization of terpene glycosyltransferases from grapes (*Vitis vinifera*)” (Vortrag). Sektionstreffen “Pflanzliche Naturstoffe” der Deutschen Botanischen Gesellschaft (DBG), 30.09. bis 2.10.2012 in Hildesheim

Poster

F. Boenisch, W. Schwab: “Hidden wine aroma: Functional characterization of terpene glycosyltransferases from grapes (*Vitis vinifera*)” (Poster). Botaniker Tagung 31.09. bis 4.10.2013 in Tübingen

F. Boenisch, W. Schwab: “Functional characterization of terpene glycosyltransferases from grapes (*Vitis vinifera*)” (Poster). Conference Plant Biology for the Next Generation (SFB924) 18.09. bis 20.09.2013 in Freising

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	VII
Summary	IX
1 Einleitung	1
1.1 <i>Wein</i>	1
1.1.1 <i>Die Geschichte des Weinbaus.....</i>	1
1.1.2 <i>Die Weinrebe</i>	1
1.1.3 <i>Die Weinbeere: Wachstum und Reifung.....</i>	2
1.1.4 <i>Zusammensetzung der einzelnen Komponenten in der Weinbeere</i>	4
1.2 <i>Terpene.....</i>	7
1.2.1 <i>Biosynthese von Terpenen in Pflanzen</i>	7
1.2.2 <i>Monoterpene.....</i>	9
1.2.3 <i>Die Bedeutung der Monoterpene und deren Glykoside für das Weinaroma.....</i>	9
1.3 <i>Glykosyltransferasen.....</i>	11
1.3.1 <i>Glykosyltransferase 1 Familie.....</i>	12
2 Zielsetzung.....	17
3 Ergebnisse	19
3.1 <i>Annotierung und phylogenetische Analyse der putativen Glykosyltransferasen aus Vitis vinifera.....</i>	19
3.2 <i>Expression und Untersuchung putativer Glykosyltransferasen aus Gruppe D.....</i>	21
3.2.1 <i>Expression und Nachweis der rekombinanten Proteine.....</i>	21
3.2.2 <i>Substratpräferenz der rekombinanten Proteine in vitro</i>	23
3.3 <i>Expression und Untersuchung putativer Glykosyltransferasen aus Gruppe L</i>	24
3.3.1 <i>Expression und Nachweis der rekombinanten Proteine.....</i>	24
3.3.2 <i>Substratpräferenz der rekombinanten Proteine in vitro</i>	25
3.4 <i>Expression und Untersuchung putativer Glykosyltransferasen aus Gruppe E.....</i>	26
3.4.1 <i>Expression und Nachweis der rekombinanten Proteine.....</i>	26
3.4.2 <i>Substratpräferenz der rekombinanten Proteine in vitro</i>	28
3.4.3 <i>Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen</i>	29
3.4.4 <i>Nachweis der Terpenglukoside mittels Dünnschichtchromatographie.....</i>	31
3.4.5 <i>Bestimmung der kinetischen Daten von VvGT7a-c.....</i>	31

3.4.6	Sequenzvergleich der VvGT7-Varianten, zielgerichtete Mutagenese und deren Einfluss auf die <i>in vitro</i> Aktivität	32
3.4.7	Untersuchung der <i>in vivo</i> Aktivität mittels Aglykaextrakt	35
3.5	Expression und Untersuchung putativer Glykosyltransferasen aus Gruppe G	36
3.5.1	Expression und Nachweis der rekombinanten Proteine	36
3.5.2	Substratpräferenz der rekombinanten Proteine <i>in vitro</i>	38
3.5.3	Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen	40
3.5.4	Nachweis der Terpenglukoside mittels Dünnschichtchromatographie	41
3.5.5	Bestimmung der kinetischen Daten von VvGT14a und VvGT16	42
3.5.6	Untersuchung der <i>in vivo</i> Aktivität mittels Aglykaextrakt	43
3.6	Expression und Untersuchung putativer Glykosyltransferasen aus Gruppe H	44
3.6.1	Expression und Nachweis der rekombinanten Proteine	44
3.6.2	Substratpräferenz der rekombinanten Proteine <i>in vitro</i>	45
3.6.3	Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen	46
3.6.4	Nachweis der Terpenglukoside mittels Dünnschichtchromatographie	48
3.6.5	Bestimmung der kinetischen Daten von VvGT15	48
3.6.6	Untersuchung der <i>in vivo</i> Aktivität mittels Aglykaextrakt	49
4	Diskussion	51
4.1	Glykosyltransferasen aus <i>Vitis vinifera</i>	51
4.2	Gruppe D-Glykosyltransferasen aus <i>Vitis vinifera</i>	53
4.2.1	Heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i>	53
4.2.2	<i>In vitro</i> Aktivität von VvGT12 und VvGT13	55
4.3	Gruppe L-Glykosyltransferasen aus <i>Vitis vinifera</i>	56
4.4	Gruppe E-Glykosyltransferase aus <i>Vitis vinifera</i>	58
4.4.1	<i>In vitro</i> Aktivität von VvGT7 und biochemische Charakterisierung von VvGT7a-c	58
4.4.2	Positionsgerichtete Mutagenese zur Identifizierung aktivitätsbeeinflussender Aminosäuren	60
4.5	Gruppe G-Glykosyltransferasen aus <i>Vitis vinifera</i>	62
4.5.1	<i>In vitro</i> Aktivität von VvGT14 und die biochemische Charakterisierung	63
4.5.2	<i>In vitro</i> Aktivität von VvGT16 und die biochemische Charakterisierung	64
4.6	Gruppe H-Glykosyltransferase aus <i>Vitis vinifera</i>	65
4.6.1	<i>In vitro</i> Aktivität von VvGT15 und die biochemische Charakterisierung	65
5	Material und Methoden	67
5.1	Materialien	67
5.1.1	Chemikalien	67
5.1.2	Bakterienstämme	67
5.1.3	Vektoren	67

5.1.4	DNA-Marker für Agarosegele	69
5.1.5	Protein-Marker für SDS-PAGE und Western Blot	69
5.1.6	Antibiotika	69
5.1.7	Enzyme	70
5.1.8	Primer	70
5.1.9	Kommerzielle Kits	71
5.1.10	Puffer und Medien.....	72
5.2	Software und Internetressourcen.....	76
5.3	Geräte	77
5.4	Methoden	78
5.4.1	Mikrobiologische Arbeitsmethoden.....	78
5.4.2	Molekularbiologische Methoden	80
5.4.3	Biochemische Methoden	84
5.4.4	Analytische Methoden	86
6	Literaturverzeichnis	89
7	Anhang	95

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
A	Ampère
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Å	Ångström
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
CAW	Chloroform-Essigsäure-Wasser-Gemisch (<i>chloroform:acetic acid:water mixture</i>)
CAZy	<i>carbohydrate-active enzyme</i>
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dpm	radioaktive Zerfälle pro Minute (<i>decay per minute</i>)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fa	<i>Fragaria ananassa</i>
fw	vorwärts (<i>forward</i>)
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GST	Glutathion-S-Transferase
GT	Glykosyltransferase
h	Stunde (<i>hour</i>)
His ₆	6 Histidin-Reste
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
k	Kilo
kb	Kilobasen
k _{cat}	Wechselzahl (<i>catalytic constant</i>)
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
L	Liter
LB	Nährmedium für Bakterien (<i>lysogeny broth</i>)
LC	Flüssigkeitschromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
m	Milli

M	Mol pro Liter
MQ-Wasser	speziell aufgearbeitetes Wasser
MS	Massenspektrometrie
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
p	Piko
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSPG	Sequenzmotiv bei pflanzlichen Glykosyltransferasen (<i>plant secondary product glycosyltransferase</i>)
rac	razemisch
R _f	Retentionsfaktor (<i>retarding factor</i>)
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
rv	rückwärts (<i>reverse</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
sec	Sekunde
TCA	Trichloressigsäure
Terpenol	Terpenalkohol
u.a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-abhängige Glykosyltransferase
UV	ultraviolette Strahlung
V	Volt
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
Vv	<i>Vitis vinifera</i>
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel

Des Weiteren werden die üblichen Bezeichnungen und Codes für Aminosäuren und Nukleotide sowie die Abkürzungen der chemischen Elemente verwendet. Im Allgemeinen werden Genbezeichnungen kursiv und die Proteinbezeichnungen normal geschrieben.

Zusammenfassung

Die Qualität des Genussmittels Wein wird primär durch das Aroma festgelegt. Neben der Beeinflussung des Weinbouquets durch Gärungs- und Lagerungsprozesse bestimmt primär die Rebsorte das Weinaroma, welches sich aus bis zu 800 Einzelkomponenten zusammensetzt. Terpenoide haben eine zentrale Bedeutung für das Rebsorten-typischen Bouquet. Terpenoide wie die Monoterpenole Geraniol und Nerol werden während der Beerenreife produziert und teilweise glykosyliert, so dass bis zu 80 % aller Terpenalkohole (Terpenole) als Aroma-unwirksame Glykoside vorliegen und nicht zum Aroma der Weinbeere und des resultierenden Weines beitragen. Dieses „versteckte Aromapotential“ der Glykoside kann durch säurebedingte oder enzymatisch-katalysierte Hydrolyse genutzt werden, jedoch ist zum einen die sogenannte Weinschönung nur eingeschränkt erlaubt und zum anderen können bei der Hydrolyse auch unerwünschte Aromakomponenten freigesetzt werden. Eine alternative Überlegung wäre, bereits die Bildung der Glykoside zu verringern bzw. zu unterbinden. Die hierfür verantwortlichen Zucker-übertragenden Enzyme, die Glykosyltransferasen (GT), sind in der Weinbeere bislang kaum untersucht. Es konnten zwar Glykosyltransferasen aus *Vitis vinifera* isoliert und charakterisiert werden, jedoch zeigten diese keine Substratspezifität gegenüber Terpenolen.

Im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* wurden kürzlich Glykosyltransferasen identifiziert, die Terpenole glukosylierten. Aufgrund dieser Untersuchung sind 57 putative Terpenol-Glykosyltransferase-Gene im *Vitis vinifera* Genom über Sequenzhomologien identifiziert worden, die sich in fünf phylogenetische Glykosyltransferase-Gruppen einteilen ließen. Aus jeder Gruppe wurde die Expression zufällig selektierter Gene untersucht. Basierend auf den Expressionsdaten wurden insgesamt 10 Gene (*VvGT7* bis *VvGT16*) ausgewählt, heterolog in *Escherichia coli* als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein exprimiert, affinitätschromatographisch aufgereinigt und bezüglich ihrer Substratspezifität untersucht. Zusätzlich konnten in verschiedenen Rebsorten unterschiedliche Genvarianten identifiziert werden, so dass verschiedene Varianten eines Proteins vorlagen.

Die Ermittlung der enzymatischen Aktivität erfolgte durch die Inkubation der aufgereinigten Enzyme mit radioaktiv markierter UDP-[U-¹⁴C]Glukose als Donormolekül und diversen Akzeptormolekülen verschiedener Stoffklassen. Neben den Aroma-relevanten Terpenolen wurden auch Moleküle, die nachweislich als Glykoside in der Weinbeere vorliegen wie Flavonoide, kurzkettige und aromatische Monoalkohole, auf Glukosylierung untersucht. Bei acht der zehn Proteine konnte eine Glukosyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden. Für die Proteine aus Gruppe D (*VvGT12* und *VvGT13*) konnte keine Aktivität mit dem Zuckerdonor und den untersuchten Akzeptormolekülen gemessen werden. Während die Proteine der Gruppe L (*VvGT8*, *VvGT9*, *VvGT10* und *VvGT11*) bevorzugt die Flavonoide Kämpferol und Quercetin umsetzten, katalysierten die Proteine *VvGT7* aus Gruppe E, *VvGT14* und *VvGT16* aus Gruppe G sowie *VvGT15* aus Gruppe H die Übertragung von Glukose auf Terpenole. Interessanterweise wurde die primäre Hydroxygruppe von Nerol, Geraniol und Citronellol bevorzugt glukosyliert, während Linalool, α -Terpineol und 8-Hydroxylinalool, die sterisch anspruchsvolle tertiäre Hydroxygruppen besitzen, gar nicht oder nur marginal umgesetzt wurden. Von *VvGT7* konnten insgesamt zehn Proteinvarianten identifiziert und exprimiert werden, wobei nur acht dieser Proteinvarianten aktiv waren. Durch Sequenzvergleich der zehn Proteinvarianten und

positionsgerichteter Mutagenese wurden drei Aminosäuren außerhalb des aktiven Zentrums identifiziert, die für die Ausbildung enzymatischer Aktivität notwendig waren. Jedoch konnte eine Glukosylierung der Terpenole *in planta* durch VvGT7 sowie VvGT16 aufgrund der ermittelten kinetischen Daten ausgeschlossen werden. In einem weiterführenden Experiment wurde anstelle reiner Substrate ein Aglykaextrakt aus Weinbeeren verwendet, der die natürlich vorliegenden Substrate repräsentiert. Hierbei konnte die Annahme, dass VvGT7 und VvGT16 *in vivo* keine Terpenole glukosyliert, bestätigt werden. Im Gegensatz dazu deuteten die K_M - und k_{cat} -Werte von VvGT14 und VvGT15, die für die Glukosylierung von Geraniol, Citronellol und Nerol ermittelt wurden, auf eine Terpenol-GT-Aktivität *in vivo* hin. Durch den Umsatz des Aglykaextrakts mit diesen Proteinen konnte die Bildung von Geranyl-, Citronellyl- und Neryl- β -O-Glukosid bestätigt und ein zusätzlicher Hinweis auf die *in planta* Aktivität von VvGT14 und VvGT15 gegeben werden.

Die biochemischen Untersuchungen und Rebsorten-spezifischen Expressionsanalysen der in dieser Arbeit beschriebenen Glykosyltransferasen können nun bei der Züchtung neuer Genotypen mit einer geringeren Terpenol-Glykosyltransferase-Aktivität und verbesserter Aromaqualität genutzt werden.

Summary

The quality of the luxury food wine is mainly defined by the aroma. Besides the influence of the fermentation and storage conditions on the bouquet, the aroma, which is composed of more than 800 components, is particularly affected by the cultivar. Especially terpenoids are responsible for the characteristic bouquet of a particular cultivar. Terpenoids such as the monoterpenoids geraniol and nerol are produced during the ripening of the berry and are partially glycosylated, so that up to 80 % of the terpenoids occur as aroma-inactive glycosides, which do not affect the aroma of vine berries and the resulting wine any more. This “hidden aroma potential” of the glycosides can be exploited by releasing the terpenoids by enzymatic and acidic hydrolysis. However, on the one hand the fining of wine is strictly regulated and on the other hand the unspecific hydrolysis of glycosides releases unwanted flavour compounds. The decline or inhibition of the formation of terpene glycosides would be an alternative approach. However, the glycoside-forming enzymes, the glycosyltransferases (GTs), have been rarely analyzed in grapes, yet. Although GTs have been previously isolated from *Vitis vinifera* and characterized, they showed no specificity towards terpene alcohols (terpenols).

Recently, several GTs from the model plant *Arabidopsis thaliana* have been identified to glucosylate terpenols. Based on this investigation, 57 homologous gene sequences encoding for putative terpenol GTs were identified in the *Vitis* genome. The phylogenetic analysis clustered these sequences into five GT groups. Out of each GT group the expression pattern of randomly chosen genes was determined and 10 genes (*VvGT7* to *VvGT16*) were selected for heterologous expression as glutathione-S-transferase (GST) fusion proteins in *Escherichia coli*. The affinity-chromatographically purified enzymes were screened against several putative substrates. Additionally, different variants of one gene could be identified in different cultivars, which resulted in several protein variants.

To determine the enzyme activity, assays containing the purified enzymes, radioactive labeled UDP-[U-¹⁴C] glucose and different acceptor molecules like the aroma-relevant terpenols were performed. Molecules, which have been shown to be glycosylated in grapes like flavonoids and short-chained and aromatic mono alcohols, were also tested. Eight of the ten proteins showed GT activity. However, the two proteins *VvGT12* and *VvGT13* of the phylogenetic group D did not show any GT-activity against the tested donor and acceptors at all. The proteins of group L (*VvGT8*, *VvGT9*, *VvGT10* and *VvGT11*) preferred the flavonoids quercetin and kaempferol as main substrate, while the proteins *VvGT7* from group E, *VvGT14* and *VvGT16* from group G as well as *VvGT15* from group H transferred glucose to terpenols. Interestingly, the primary hydroxyl group of nerol, geraniol and citronellol was preferably glucosylated compared to the non or barely converted linalool, α -terpineol and 8-hydroxylinalool, which have sterically demanding tertiary hydroxyl groups. Ten variants of *VvGT7* were identified and heterologously expressed, whereas eight variants were catalytically active. The comparison of the protein sequences of *VvGT7* variants and the following site-directed mutagenesis experiments illustrated the importance of three amino acids, which were essentially for the activity of *VvGT7*. Interestingly, these amino acids were not part of the active site of the enzyme. However, due to the determined kinetic data, it was assumed, that *VvGT7* and *VvGT16* are not responsible for the glucosylation of terpenols *in planta*. This assumption was confirmed by an additional experiment, in which an extract of aglycones, representing the substrate condition *in vivo*, was used as potential

acceptor molecules. On the contrary, the acquired K_M - and k_{cat} -values of VvGT14 and VvGT15 for geraniol, nerol and citronellol referred to a terpenol GT activity *in planta*. The analyses of the converted aglycones extract by these two proteins confirmed the formation of geranyl-, citronellyl- and neryl- β -*O*-glucoside and approved the roles of VvGT14 and VvGT15 *in planta*.

The biochemical results and the cultivar-dependent expression analyses of the GT, which have been thoroughly investigated in this study, may be used in future breeding programs for the development of new genotypes with reduced GT activity and improved aroma quality.

1 Einleitung

1.1 Wein

1.1.1 Die Geschichte des Weinbaus

Die Ursprünge der Kultivierung der Kulturrebe *Vitis vinifera* (6000 bis 5000 vor Christus) werden im Nahen Osten und an der Ostküste des Schwarzen Meeres vermutet. Von dort aus gelang die Weinrebe zunächst über Syrien und Ägypten in den Mittelmeerraum (Griechenland, Italien) und verbreitete sich weiter in Richtung Norden bis nach Großbritannien. Mit der Entdeckung der Neuen Welt gelangte die Weinrebe nach Amerika und durch weitere Entdeckungsreisen bis nach Südafrika, Australien und Neuseeland (Creasy and Creasy, 2009), (Mullins et al., 1992). Heutzutage ist die Weinrebe eine weltweit angebaute Kulturpflanze von großem wirtschaftlichem Interesse. Aktuelle Statistiken zeigen, dass sich die Weinanbaufläche vor allem in China, Chile und Neuseeland deutlich vergrößert hat, wobei der globale Anbau zwischen den Jahren 2000 und 2012 an Fläche zurückgegangen ist. Dieser Trend ist primär auf den Rückgang der Kulturflächen in Europa zurückzuführen (Castellussi, 2013).

1.1.2 Die Weinrebe

Die Weinrebe gehört botanisch betrachtet zur Familie der Vitaceae. Diese wird wiederum in zwölf Genera unterteilt. Die kulturell größte Bedeutung hat hierbei die Gattung *Vitis*, deren Subgenus *Euvitis* die Spezies *Vitis vinifera* beinhaltet. Die Sorten von *Vitis vinifera* werden weltweit kultiviert und besitzen die größte wirtschaftliche Bedeutung. Insgesamt umfasst *Vitis* mehr als 50 Spezies. Neben *V. vinifera* wird die vor allem in Nordamerika verbreitete Spezies *Vitis labrusca* kultiviert. *V. labrusca* zeichnet sich durch ihre Robustheit und ihre Unempfindlichkeit gegenüber Pathogenen aus. Sie besitzt jedoch einen Fox-Ton, der in der Weinindustrie als sogenannter „off-flavour“ (Fehlaroma) gilt und unerwünscht ist.

Die Weinrebe ist eine mehrjährige Kulturpflanze, die sich in den warmen bis gemäßigten Klimazonen zwischen den 10 °C- und 20 °C-Jahresisothermen bevorzugt kultivieren lässt (Creasy and Creasy, 2009). Regionen außerhalb dieses Anbaugürtels können klimatische Ungunsth Faktoren durch lokale und gebietsspezifische Umweltfaktoren ausgleichen. So liegen beispielsweise die deutschen Weinanbauregionen nicht in den bevorzugten Kultivierungsgebieten der Weinrebe, aber aufgrund der regionspezifischen Besonderheiten am Rhein, Main und an der Mosel ist der Weinbau in diesen Regionen möglich. Generell gilt die vollständige Traubenreife als der limitierende Faktor für den ökonomischen Weinbau (Winkler, 1962).

Die Weinrebe gehört zu den dikotylen Lianen (Holzgewächsen), die blattgegenständige Ranken besitzt. Die kleinen Blüten sind ein- oder zweigeschlechtlich und rispenförmig angeordnet (Abbildung 1). Die Frucht der Weinrebe, die Weinbeere, ist botanisch betrachtet eine echte Beere, die zwei bis vier Samen ausbildet

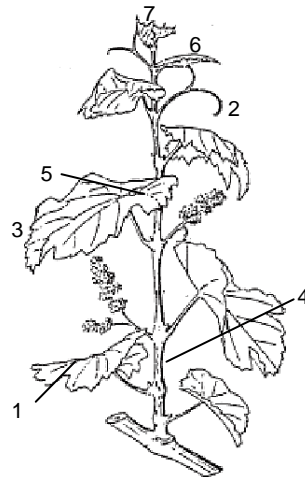


Abbildung 1: Darstellung eines Sprosses von *Vitis vinifera*. Die Skizze zeigt den prinzipiellen Aufbau einer Weinrebe. (1) Blütenrispe/ Geschein, (2) Ranke, (3) Blatt, (4) Internodium, (5) axiale Knospung, (6) Stipel, (7) Triebspitze. Die Abbildung wurde aus der Quelle „Wine Science: Principles and Applications“ übernommen und modifiziert (Jackson, 2008).

1.1.3 Die Weinbeere: Wachstum und Reifung

Die Blüten der Weinrebe sind in sogenannten Gescheinen angeordnet, sind primär zweigeschlechtlich und besitzen sowohl männliche als auch weibliche Organe. Die fünf Stamina befinden sich ringförmig um den Stempel. Der Fruchtknoten besitzt vier Samenanlagen (Ovula). Am unteren Teil der Blüte sind Saftdrüsen (Nektarien) lokalisiert, die jedoch keinen Nektar, sondern bei einigen *Vitis* Arten Duftstoffe bilden (Abbildung 2).

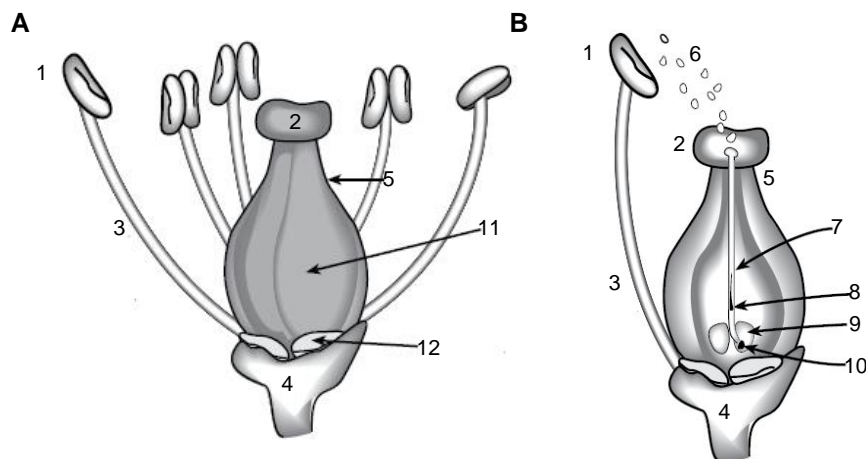


Abbildung 2: Darstellung einer zweigeschlechtlichen Blüte (A) und der Bestäubung (B). (1) Staubblätter/ Anthere, (2) Stigma, (3) Filament, (4) Blütenstiel, (5) Griffel, (6) Pollen, (7) Pollengang, (8) Samen, (9) Embryosack, (10) Ovulum, (11) Fruchtknoten, (12) Nektarium. Die Abbildungen wurde aus dem Kapitel 5 „Grape Berry Growth and Development“ von N. Dokoozlian aus dem Buch „Raisin Production Manual“ übernommen und modifiziert (Christensen, 2000).

Die Anthese (Blütezeit) beginnt abhängig von den Umweltbedingungen sechs bis acht Wochen nach dem Sprosswachstum und dauert in der Regel eine bis zwei Wochen. Die Bestäubung verläuft Insekten- und Wind-unabhängig und beginnt direkt nach Blütenöffnung. Nach der Bestäubung bildet der Pollen einen Pollenschlauch aus, der dem Transport zum Ovulum dient. Dieser Vorgang dauert unter idealen Umweltbedingungen etwa drei Tage. Tiefe und hohe Temperaturen

(18,5 °C < Temperatur > 38 °C) sowie zu viel Niederschlag beeinflussen die Bestäubung und die Ausbildung des Pollenschlauches. Durchschnittlich entwickeln sich 20 bis 30 % der Blüten zu Weinbeeren weiter (Christensen, 2000). Die Weinbeere ist eine fleischige Frucht, die zwei Samenkammern besitzt, die von einem Perikarp umgeben sind. Das Perikarp besteht aus einem Exokarp (Haut) und einem Mesokarp (Fruchtfleisch). Eine dünne Wachsschicht bildet die schützende Kutikula auf der Beerenhaut. Das Fruchtfleisch umfasst etwa 80 bis 90 % des Gesamtgewichtes der Frucht (Abbildung 3) (Christensen, 2000).

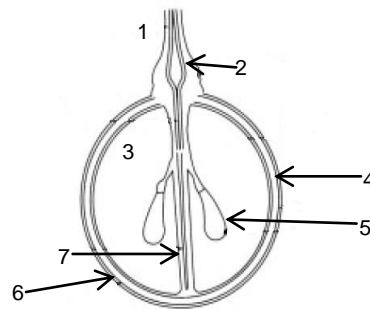


Abbildung 3: Querschnitt einer reifen Weintraube. (1) Stielansatz, (2) Fruchtboden, (3) Mesokarp, (4) Exokarp, (5) Samen, (6) periphere Gefäßbündel, (7) axiale Gefäßbündel. Die Abbildung wurde aus den Präsentationen „Weinbau & Kellerwirtschaft“ von (Prinz zur Lippe, 2013) und „Einflüsse auf die Fruchtqualität bei Weinreben“ von (Forneck, 2011) übernommen und modifiziert.

Die Ausbildung und das Wachstum der Beere kann in drei Stadien eingeteilt werden. Diese Stadien umfassen zwei sigmoide Wachstumsphasen, die von einer stationären lag-Phase unterbrochen werden (Abbildung 4).

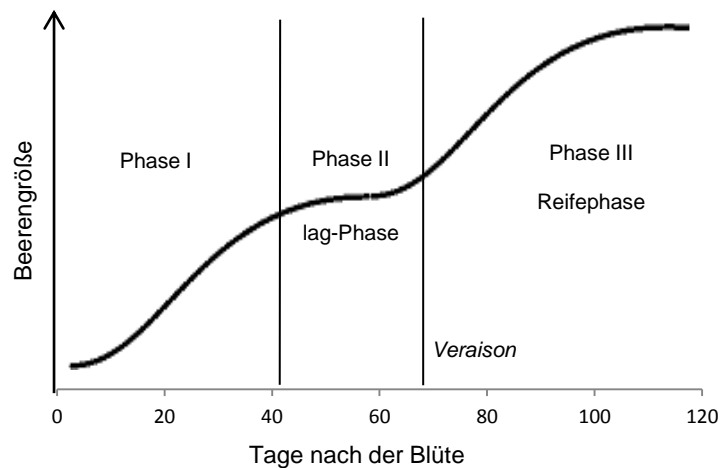


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Entwicklungs- und Reifephase einer Weinbeere. Die Entwicklung und Reifung der Weinbeere beschreibt drei Phasen: Phase I ist die erste schnelle Wachstumsphase, die sich direkt nach der Befruchtung anschließt. Sie endet in Phase II (lag-Phase), in der es zu einem stark verlangsamten Wachstum der Beere kommt. Anschließend erfolgt erneut eine schnelle Wachstumsphase (Phase III oder Reifephase), in der neben Anthocyanen und organischen Säuren auch Aromastoffe gebildet werden (Christensen, 2000), (Kennedy, 2002).

Phase I: Die Phase I der Wachstumsphase schließt sich direkt an die Befruchtung an. Hierbei vergrößert sich das Beerenvolumen aufgrund von Zellteilung und -wachstum. In diesem Stadium sind die Beeren noch grün und fest. Der Zuckergehalt in den Beeren ist konstant niedrig, während organische Säuren angereichert werden. Diese Phase dauert etwa drei bis vier Wochen.

Phase II: In der sogenannten lag-Phase verlangsamt sich merklich das Beerenwachstum. In diesem Stadium ist die Konzentration an organischen Säuren am höchsten und das Chlorophyll in den Beeren wird langsam abgebaut. Durchschnittlich dauert diese Phase zwei bis drei Wochen.

Phase III: Die Phase III beginnt mit der sogenannten Veraison, in der die Fruchtfestigkeit abnimmt und die Bildung der Farbstoffe wie Anthocyane initiiert wird. Zudem lagert sich Zucker in den Früchten ein und die Konzentration an Säuren nimmt ab. Die Bildung von Sekundärmetaboliten wie flüchtige Aromastoffe und Farbstoffe wird induziert. In dieser Phase nimmt der Beerendurchmesser weiter zu. Das Wachstum in diesem Stadium beruht allein auf Zellexpansion. Phase III dauert in der Regel sechs bis acht Wochen.

Die Größe und das Gewicht der Weinbeere hängen von den drei Faktoren Zellzahl, Zellgröße und Zuckergehalt ab. Die Anzahl der Zellen wird in Phase I festgelegt. Anschließend werden Größen- sowie Gewichtszu- und -abnahme durch das Zellvolumen reguliert. Dieses vergrößert sich primär in Phase I und Phase III signifikant. Zudem nimmt in Phase III auch die Zuckerkonzentration stark zu. Das Zellvolumen vergrößert sich von der Anthese bis zur Ernte insgesamt um den Faktor 300 (Kennedy, 2002) (Christensen, 2000). Diverse Umweltfaktoren beeinflussen jedoch die endgültige Beerengröße. So werden die Zellteilung und das Zellvolumen signifikant von der Temperatur beeinflusst. Des Weiteren wirken sich Lichtverhältnisse sowie Niederschlag auf das Beerenvolumen aus (Christensen, 2000).

1.1.4 Zusammensetzung der einzelnen Komponenten in der Weinbeere

Im Verlauf der Beerenreife verändert sich aufgrund verschiedener Faktoren die Zusammensetzung der einzelnen Beerenkomponenten durch anabole und katabole Stoffwechselprozesse. Die einzelnen Beerenkomponenten sind nicht nur für die Qualität der Weinbeere entscheidend, sondern auch für deren Produkte wie Traubensaft, Rosinen und vor allem Wein.

1.1.4.1 Wasser

Zum Zeitpunkt der Ernte beträgt der Wassergehalt am Frischgewicht der Weinbeere zwischen 60 und 85 %. Die Wasserversorgung der Beere wird bis zur Veraison primär durch das Xylem gewährleistet. Aus bislang unbekannter Ursache wird kurz nach der Veraison die Xylem-Versorgung blockiert, sodass anschließend die Wasserversorgung vollständig durch das Phloem vollzogen wird. Wassermangel, der während der Reifung der Beere auftritt, führt neben der Ausbildung kleinerer Beeren auch zur veränderten Biosynthese verschiedener Sekundärmetabolite sowie Zusammensetzung der löslichen und unlöslichen Komponenten in der Frucht (Christensen, 2000), (Conde et al., 2007).

1.1.4.2 Zucker

Der für die Entwicklung der Beere notwendige Zucker wird in Form von Saccharose aus den Blättern in die Früchte transportiert. Die Saccharose wird in den Beeren zunächst in die beiden Monosaccharide Glukose und Fruktose hydrolysiert und anschließend weiter metabolisiert oder gelagert. Während Phase I ist die Zuckerkonzentration in der Beere mit etwa 2 % des Frischgewichtes noch relativ niedrig. Nach der Veraison wird jedoch verstärkt Zucker eingelagert, so dass die Menge

bis zur Ernte 25 % oder mehr des Frischgewichtes betragen kann (Christensen, 2000), (Kennedy, 2002). Der Zuckergehalt legt häufig den Erntezeitpunkt fest. Bei der Weinfermentation kann abhängig vom resultierenden Wein der gesamte Zucker in Alkohol umgewandelt werden (Conde et al., 2007).

1.1.4.3 Organische Säuren (Weinsäure und Äpfelsäure)

Wein- und Äpfelsäure sind mit etwa 90 % aller Säuren in der Weinbeere die dominierenden Säuren. Der Gehalt an Säure steigt in Phase I stetig an und besitzt kurz vor der Veraison die höchste Konzentration. Weinsäure wird durch die Metabolisierung von Ascorbinsäure nur bis zur Veraison synthetisiert. Die Menge an Weinsäure ändert sich anschließend kaum noch, wobei sich ihre Konzentration durch Verdünnungseffekte aufgrund von Zellwachstum und erhöhtem Wassergehalt verringert (Conde et al., 2007). Der Gehalt von Äpfelsäure hingegen variiert während der Beerenreife und erreicht kurz vor der Veraison sein Maximum. Äpfelsäure entsteht durch die irreversible Carboxylierung von Phosphoenolpyrophosphat und anschließender Reduktion des Oxalacetats. Der Gehalt an Malaten, Salze der Äpfelsäure, verringert sich im Laufe der Beerenreife durch enzymatischen Abbau. Malat kann zum einen durch oxidative Decarboxylierung in Pyruvat umgewandelt oder zum anderen in den Mitochondrien zu Oxalacetat oxidiert werden (Conde et al., 2007). Untersuchungen zum Äpfelsäuregehalt in Weinbeeren zeigten, dass die Malatkonzentration in Regionen mit tieferen Temperaturen im Vergleich zu Gebieten mit wärmeren Temperaturen höher ist (Christensen, 2000). Die genauen Ursachen hierfür sind noch nicht bekannt, doch konnten Experimente zeigen, dass die Isoenzyme der Malatdehydrogenase (cytosolisch und mitochondrial), die Phosphoenolpyruvatcarboxylase und das Malatenzym verschiedene Temperaturoptima besitzen. Die höchste Malatakkumulation wird demnach bei Temperaturen zwischen 20 und 25 °C erreicht. Bei niedrigeren Temperaturen wird zum einen weniger Äpfelsäure synthetisiert und zum anderen mehr Malat katabolisiert (Conde et al., 2007). In der reifen Weinbeere sind zudem geringe Konzentrationen von Zitronen-, Succinyl-, Milch- und Essigsäure zu finden (Conde et al., 2007).

1.1.4.4 Phenolische Verbindungen

Phenolische Verbindungen sind natürliche Substanzen, die ein Phenylrückgrat besitzen, das diverse Substitutionen aufweisen kann. Zu den wichtigsten phenolischen Verbindungen der Weinbeere gehören die Catechine, Tannine und Anthocyanine (Conde et al., 2007). Die phenolischen Verbindungen werden in Flavonoide und Nicht-Flavonoide eingeteilt. Die Flavonoide beinhalten verschiedene Klassen an Molekülen wie die Proanthocyanidine (Tannine), Anthocyanine und Flavan-3-ol-Monomere (Catechine). Viele dieser Metabolite wie Kämpferol, Pelargonidin, Resveratrol und 2-Phenylethanol liegen primär als Glykoside in der Frucht vor (Castillo-Muñoz et al., 2010), (Ono et al., 2010), (Waterhouse and Lamuela-Raventós, 1994), (Sefton et al., 1994).

In der Weinbeere werden sogenannte kondensierte Tannine synthetisiert, die Makromoleküle aus kondensierten Flavan-3-ol darstellen und sich in der Beerenhaut und den Kernen befinden. Sie besitzen aufgrund der unterschiedlichen Anzahl ihrer Untereinheiten eine große Variabilität und beeinflussen die Adstringenz von Rotwein. Des Weiteren werden auch sogenannte hydrolysierbare Tannine wie Ellagitannine und Gallotannine bei der Lagerung in Eichenfässern an den Wein abgegeben (Herderich and Smith, 2005).

Anthocyanine sind für die rote Farbe von Rotwein verantwortlich und ebenfalls in der Beerenhaut lokalisiert. Häufig sind Anthocyanine mit Hydroxy- oder Methylgruppen substituiert.

Flavan-3-ole (Catechine) werden in der Beerenhaut gefunden und werden wie die Tannine mit Adstringenz und Bitterkeit von Wein in Verbindung gebracht. Weinbeeren synthetisieren vor allem (+)-Catechin, (-)-Epicatechin und (-)-Epicatechin-3-O-gallat.

Nicht-Flavonoide sind, mit Ausnahme von Hydroxyzimtsäuren, nur in geringen Konzentrationen vorhanden. Hydroxyzimtsäuren sind nicht nur in der Beerenhaut sondern auch im Fruchtfleisch lokalisiert. Flüchtige Phenol-verwandte Verbindungen wie Benzaldehyd, Benzylalkohol oder 2-Phenylethanol befinden sich vor allem in der Beerenhaut. Eine weitere wichtige Nicht-Flavonoid-Stoffklasse sind die Stilbene, zu denen Resveratrol gehört. Resveratrol wird seit 1992 mit dem positiven Effekt von Rotwein auf das kardiovaskuläre System in Verbindung gebracht (Conde et al., 2007), (Kennedy, 2002), (Christensen, 2000). Phenolische Verbindungen werden am Ende von Phase I oder in Phase III nach der Veraison gebildet.

1.1.4.5 Aromastoffe

Die Zusammensetzung der Aroma-prägenden Stoffe eines Weines ist sehr komplex und umfasst mehrere hundert Aromastoffe, deren Konzentrationen zwischen ng/L bis mg/L variieren. Das Aroma eines Weins entwickelt sich im Laufe der Herstellung und Lagerung. Die Aromastoffe der Weinbeere prägen hierbei das Grundaroma des Weins. Die wichtigsten in der Weinbeere gebildeten Aromastoffe sind Monoterpene, C₁₃-Norisoprenoide, Methoxypyrazine und schwefelhaltige Verbindungen.

Schwefelhaltige Verbindungen liegen nur in geringen Konzentrationen vor (etwa 40 ng/L in Sauvignon Blanc) und werden nur in einigen Rebsorten gebildet. Das Aroma der S-Cystein-Derivate wird als Buchsbaum- oder Ginster-ähnlich beschrieben. Methoxypyrazine liegen in freier und gebundener Form in der Beere vor und bilden das würzige Aroma einiger Rebsorten wie Sauvignon Blanc und Cabernet Sauvignon. Die Konzentrationen der Methoxypyrazine sind meist sehr gering (im ng/L-Bereich) und nehmen im Verlauf des Reifeprozesses ab. Norisoprenoide wie das β -Damascenon und das β -Ionon werden durch den oxidativen Abbau von Carotinoiden während der Phase III gebildet. Norisoprenoide sind in allen Rebsorten zu finden. Ihr Aroma wird als fruchtig exotisch, blumig oder Veilchen-ähnlich beschrieben. Terpene bilden eine heterogene Gruppe an Aromastoffen. Sie liegen als freie flüchtige Stoffe oder in glykosylierter, nicht Aroma-aktiver Form in der Beere vor. Die Terpene werden als Sekundärmetabolite nach der Veraison in Phase III synthetisiert (Conde et al., 2007), (Kennedy, 2002), (Christensen, 2000).

Viele der flüchtigen Aroma-prägenden Metabolite sind nur in geringen Konzentrationen in freier Form in der Weinbeere vorhanden. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass neben Monoterpenen (Geraniol, Linalool und Nerol) und verschiedenen Alkoholen wie Eugenol, *cis* 3-Hexenol, *trans* 2-Hexenol und Hexanol auch Norisoprenoide wie Blumenol C und Vitispirane sowie Benzenderivate wie Benzylalkohol und 2-Phenylethanol als Glykoside vorliegen. Die Glykosylierung erhöht die Wasserlöslichkeit und vermindert die Toxizität der hydrophoben Sekundärmetabolite und ermöglicht so deren Akkumulation und Kompartimentierung (Williams et al., 1982a) (Sefton et al., 1994) (Lamorte et al., 2008) (Rivas et al., 2013).

1.2 Terpene

Terpene sind Naturstoffe, die aus Isopreneinheiten aufgebaut sind. In Abhängigkeit von der Anzahl der Kohlenstoffatome werden Terpene in Hemiterpene (C₅), Monoterpene (C₁₀), Sesquiterpene (C₁₅), Diterpene (C₂₀), Triterpene (C₃₀), Tetraterpene (C₄₀) und Polyterpene (C₅)_n (mit n>8) eingeteilt (Abbildung 5) (Breitmaier, 2006). Viele Terpene sind lipophil und besitzen meist eine oder mehrere Doppelbindungen. Aufgrund der hohen Variabilität der Isopreneinheiten sowie der chemischen Modifikationen stellen die Terpene mit bislang 25000 identifizierten Strukturen eine der variationsreichsten Naturstoffgruppen dar.

Viele der bekannten Terpene werden von Pflanzen synthetisiert. Sie fungieren zum Beispiel als Lockstoff möglicher Bestäuber oder aber als Abwehrstoff von Pathogenen oder Fraßfeinden. Außerdem sind Terpene Bestandteil der Zellmembran und dienen als Pigmentmoleküle (Carotinoide). Viele Pflanzen produzieren Harze oder Pflanzensäfte, in denen Terpene gelöst sind (Gershenzon and Dudareva, 2007). Pflanzenterpene werden in vielen praktischen Bereichen eingesetzt: Sie dienen als Duft- und Aromastoffe in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie, als Wirkstoffe oder Vorläufermoleküle in der Pharmaindustrie und werden in der Landwirtschaft als natürliches Insektizid eingesetzt (Heldt and Piechulla, 2010).

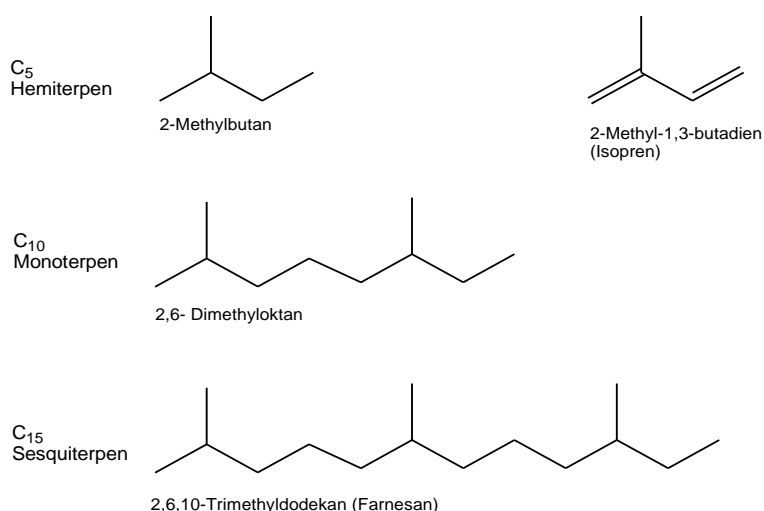


Abbildung 5: Chemische Strukturen der Isoprenuntereinheit sowie das Grundgerüst von Hemi-, Mono- und Sesquiterpenen. Die Darstellung wurde nach einer Abbildung aus „Organische Chemie“ von Breitmaier (Breitmaier and Jung, 2005) modifiziert.

1.2.1 Biosynthese von Terpenen in Pflanzen

In Pflanzen existieren zwei Biosynthesewege zur Darstellung von Terpenen: der Mevalonat-Weg (MVA) und der Desoxyxylulosephosphat/Methylerythritolphosphat-Weg (DOXP/MEP). Beide Biosynthesewege sind kompartimentiert und führen vermutlich zu verschiedenen Endprodukten. Der cytosolische MVA-Weg dient der Generierung von Sesqui-, Tri- und Polyterpenen, während der DOXP/MEP-Weg in den Plastiden lokalisiert ist und als Endprodukte Mono- und Diterpene sowie Carotinoide bildet. Es existiert jedoch keine strikte Trennung zwischen den beiden Biosynthesewegen (Aharoni et al., 2006).

1.2.1.1 MVA-Weg

Zu Beginn der Terpen-Biosynthese im Cytosol bilden zwei Acetyl-CoA Moleküle in einer Kondensationsreaktion Acetoacetyl-CoA. Durch die Addition eines weiteren Acetyl-CoA-Moleküls entsteht β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Beide Reaktionsschritte werden von der HMG-CoA-Synthase katalysiert (Abbildung 6). In einer anschließenden Reduktion unter Verbrauch von zwei NADPH Molekülen wird Mevalonat gebildet. Das Mevalonat reagiert anschließend durch Verbrauch von zwei ATP zu 5-Pyrophosphomevalonat, welches durch eine ATP-abhängige Decarboxylierung in Isopentenylpyrophosphat (IPP) umgewandelt wird. Die IPP-Isomerase katalysiert die Umwandlung von IPP in Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und umgekehrt. In einer elektrophilen Kondensationsreaktion, die von der Farnesylpyrophosphat (FPP)-Synthase katalysiert wird, werden IPP und DMAPP miteinander zu FPP verbunden. FPP wird als Substrat von Terpen-Synthasen für die Gewinnung verschiedener Terpene verwendet (Heldt and Piechulla, 2010), (Breitmaier and Jung, 2005).

1.2.1.2 DOXP/MEP-Weg

Das namensgebende 1-Desoxy-D-xylose-5-phosphat (DOXP) wird durch die Thiaminpyrophosphat-abhängige DOXP-Synthase aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) unter dem Verlust von Kohlenstoffdioxid gebildet (Abbildung 6). Das DOXP wird dann durch verschiedene enzymatische Schritte in IPP umgewandelt. Die IPP-Isomerase katalysiert auch in den Plastiden die Umwandlung zwischen IPP und DMAPP. Anschließende Synthase-katalysierte Reaktionen führen zur Bildung von Geranylpyrophosphat (GPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP), die in weiteren Reaktionen zu verschiedenen Terpenen katalytisch umgewandelt werden (Breitmaier and Jung, 2005) (Heldt and Piechulla, 2010).

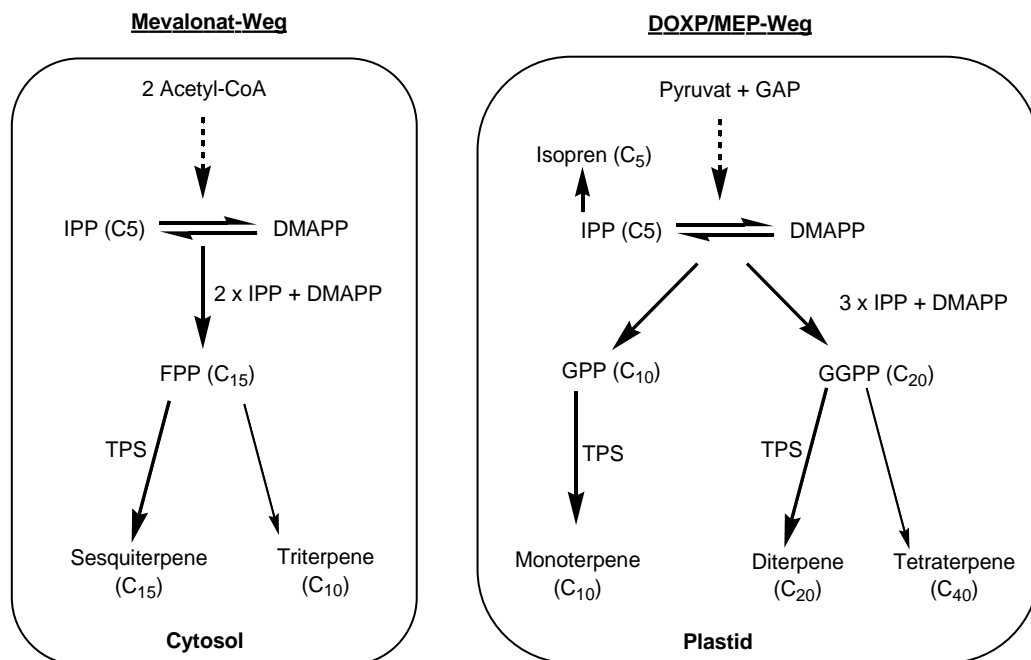


Abbildung 6: Schematische Darstellung der in Pflanzen existierenden Terpen-Biosynthesewege. GAP: Glycerinaldehyd-3-phosphat, IPP: Isopentenylpyrophosphat, DMAPP: Dimethylallylpyrophosphat, FPP: Farnesylpyrophosphat, MEP: Methylerythritol-4-phosphat, GPP: Geranylpyrophosphat, GGPP: Geranylgeranylpyrophosphat, TPS: Terpensynthase. Der gestrichelte Pfeil steht für mehrere enzymatische Reaktionen. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Aharoni et al., 2006).

1.2.2 Monoterpene

Monoterpene werden aus zehn Kohlenstoffatomen gebildet und bestehen aus zwei Isopreneinheiten. Sie umfassen etwa 1500 dokumentierte Moleküle. Viele Monoterpene besitzen Doppelbindungen oder funktionelle Gruppen wie Hydroxy- oder Oxogruppen oder stellen zyklische Verbindungen dar. Monoterpene und deren Derivate sind primär leicht flüchtige Duftstoffe oder Bestandteil von ätherischen Ölen oder Harzen. Die Duftnoten reichen von blumig und Zitrus-ähnlich bis waldig, erdig und würzig.

Die Pflanzen nutzen Monoterpene sowohl zur Anlockung von potentiellen Bestäubern als auch zum Schutz vor Herbivoren (Breitmaier, 2006). Monoterpene werden wohl in erster Linie in Pflanzen durch den DOXP/MEP-Weg in den Plastiden gebildet (Luan and Wüst, 2002). Die Hydrolyse von GPP, katalysiert durch das Enzym Geraniol-Synthase, resultiert in der Bildung von Geraniol. Die Umlagerung der Hydroxygruppe bzw. die Isomerisierung von Geraniol führt zur Bildung von Linalool bzw. Nerol und die Reduktion einer Doppelbindung zu Citronellol. Die Zyklisierung von GPP durch intramolekulare Prenylierung führt zur Gewinnung von zyklischen Monoterpenen, wie Limonen oder α -Terpineol. Durch weitere enzymatisch katalysierte Oxidations- und Reduktionsreaktionen wird z.B. Menthol erhalten.

1.2.3 Die Bedeutung der Monoterpene und deren Glykoside für das Weinaroma

Das Aroma oder Bouquet, das charakteristisch für jeden Wein ist, entsteht durch die Kombination mehrerer hundert Komponenten, die mit unterschiedlicher Empfindlichkeit von den Sinnesorganen wahrgenommen werden. Man unterscheidet bei einem Wein zwischen folgenden Bouquet-Kategorien: Das originäre oder primäre Bouquet beinhaltet die Aromastoffe, die in der Beere vorliegen und während des Reifeprozesses der Beere gebildet werden. Die bei der Verarbeitung (Mahlen, Maischen und Pressen) freigesetzten Aromakomponenten bezeichnet man als sekundäres Traubenbouquet. Sie werden durch chemische, enzymatische oder thermische Reaktionen freigesetzt. Das sogenannte Gärbouquet wird während der alkoholischen Gärung gebildet. Die bei der Lagerung der Weine freigesetzten Aromastoffe werden als Lagerbouquet bezeichnet. Aufgrund signifikanter Unterschiede in der Zusammensetzung der Aromastoffe lassen sich die einzelnen Rebsorten und sogar deren Klone voneinander differenzieren. Hierbei zählen die Monoterpene zu den wichtigsten Aromakomponenten (siehe 1.1.4.5). Zwar wird das Monoterpen-Profil eines Weines primär durch die Rebsorte geprägt, doch werden während der Weinherstellung einige glykosidisch gebundene Aromastoffe freigesetzt oder modifiziert (Rapp, 1992). Bislang sind etwa 50 Monoterpenkomponenten bekannt, die primär in der Beerenhaut lokalisiert sind. Monoterpene, vor allem die Monoterpenalkohole (Monoterpenole) Linalool, Geraniol, Citronellol, α -Terpineol und Nerol, prägen das Aroma von den Muskat-Rebsorten (Abbildung 7).

Linalool ist ein Monoalkohol, der zwei Enantiomere besitzt. Diese unterscheiden sich in ihrem Duft, der generell als blumig-frisch beschrieben wird. Im sauren Milieu wird Linalool leicht zu Geraniol, Nerol und α -Terpineol umgewandelt. Der Geruchsschwellenwert liegt bei 15 $\mu\text{g/L}$. Geraniol besitzt einen blumig-vollen Geruch. Es wird direkt aus GPP gebildet und kann durch Umlagerungsreaktionen zu den anderen Monoterpenen Nerol, Linalool, Citronellol und α -Terpineol reagieren. Der

Geruchsschwellenwert von Geraniol wird mit 30 µg/L angegeben. Nerol ist das *cis*-Isomer des Geraniols und besitzt einen frischen, blumigen Duft mit einem Geruchsschwellenwert von 400 µg/L. Der Monoalkohol Citronellol weist einen frischen, leicht blumigen Zitrusduft auf. Citronellol besitzt zwei Enantiomere, wobei in der Weinbeere nur das (*S*)-Enantiomer auftritt (Luan et al., 2005). Der Geruchsschwellenwert beträgt 15 µg/L. Das zyklische Monoterpen α -Terpineol besitzt einen Fichtennadel-ähnlichen, kühl-herben Duft mit einem Geruchsschwellenwert von 400 µg/L.

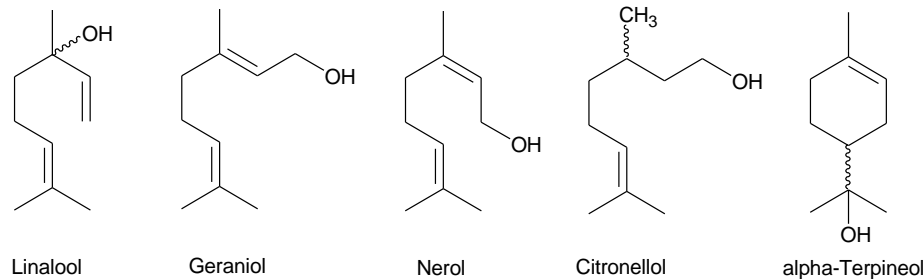


Abbildung 7: Strukturformeln der Monoterpene Geraniol, Linalool, Nerol, Citronellol und α -Terpineol. Von Citronellol, Linalool und α -Terpineol existieren verschiedene Enantiomere, die durch die gewellte chemische Bindung dargestellt sind. Die Strukturen wurden mit ChemDraw erstellt.

Die Biosynthese der Monoterpene findet primär nach der Veraison in Phase III der Beerenreife statt. Interessanterweise konnten Untersuchungen zeigen, dass die Bildung von Monoterpenen zwischen der Beerenhaut und dem Fruchtfleisch kompartimentiert ist. Experimente mit Deuterium-markierten Substraten konnten nachweisen, dass Geraniol lediglich in der Beerenhaut synthetisiert wird, während die Bildung von Linalool sowohl in der Beerenhaut als auch im Fruchtfleisch stattfindet (Luan and Wüst, 2002).

Generell lassen sich Rebsorten entsprechend ihres Monoterpen-Gehaltes in drei Kategorien einteilen. Die geschmacklich intensiven Muskatsorten gehören zur ersten Kategorie und besitzen einen freien Monoterpengehalt von bis zu 6 mg/L. Die zweite Klasse wird von den aromatischen Nicht-Muskatsorten gebildet. Bei diesen Sorten, wie zum Beispiel dem Traminer, Huxel oder Riesling, liegt die freie Monoterpenkonzentration zwischen 1 und 4 mg/L. Die neutralen Rebsorten gehören der dritten Kategorie an, bei der die Monoterpene aufgrund ihrer niedrigen Konzentration (weniger als 1 mg/L) kaum zum Aroma beitragen. Hierzu zählen Sorten wie Merlot, Shiraz und Chardonnay.

Neben den oben genannten freien flüchtigen Monoterpenen werden in den Beeren auch freie aromalose Polyole der Monoterpene, die unter anderem durch biochemische Umwandlung der Monoalkohole durch die Edelfäule (*Botrytis cinerea*) gebildet werden (Rapp, 1992), und die glykosylierten aromalosen Monoterpene gefunden (Mateo and Jimenez, 2000). Bereits in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde postuliert, dass ein Großteil der Aroma-prägenden Monoterpene als gebundene Moleküle vorliegen (Cordonnier and Bayonove, 1974). Ein Jahrzehnt später konnte diese Hypothese durch den Nachweis von Monoterpenglykosiden durch die hydrolytische Spaltung der glykosidischen Bindung verifiziert werden (Williams et al., 1982a), (Williams et al., 1982c) (Williams et al., 1982b). Neben den Monoterpenalkoholen (Monoterpenolen) Linalool, Geraniol und Nerol wurden auch andere Aroma-prägende Moleküle wie Benzylalkohol, 2-Phenylethanol und Hexanol als Aglyka identifiziert (Williams et al., 1982c) (Gunata et al., 1986). Das große Interesse an der Entschlüsselung der Weinaroma-Komponenten führte zum Nachweis weiterer

Terpene (α -Terpineol, Citronellol, Farnesol und 8-Hydroxylinalool) und deren glykosidischen Verbindungen (Williams et al., 1982c) (Gunata et al., 1985). Die Monoterpenglykoside werden auch als „verstecktes Aromapotential“ bezeichnet (Gunata et al., 1988). Günata *et al.* (Gunata et al., 1985) konnte bei der Analyse der freien und glykosylierten Monoterpene in Muskat-Rebsorten zeigen, dass Monoterpene und Glykoside vor allem in der Beerenhaut lokalisiert sind, wobei der Anteil der jeweiligen Glykoside deutlich höher ist als der des Aglykons. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Konzentrationen der Monoterpene und der Glykoside im Verlauf des Reifeprozesses ansteigen. Als Zuckerreste wurden Rutinose (6-O- α -L-Rhamnopyranosyl- β -D-glukopyranosid), 6-O- α -L-Arabinofuranosyl- β -D-glukopyranosid, 6-O- β -D-Apiofuranosyl- β -D-glukopyranosid und β -D-Glukopyranosid identifiziert (Gunata et al., 1985) (Williams et al., 1982a).

Die Aroma-prägenden Monoterpene werden primär als Apiosylglykosid gefunden (bis zu 50 % aller Glykoside). Der Anteil der Rutinoside beträgt 6 bis 13 % und der Glukosidanteil liegt bei 4 bis 9 %. Die Zusammensetzung der Glykoside variiert jedoch stark zwischen den einzelnen Rebsorten (Bayonove et al., 1992) (Mateo and Jimenez, 2000). Im Verlauf der verschiedenen Stufen der Weinherstellung werden zwar einige Aglyka hydrolytisch freigesetzt, jedoch bleibt der Großteil der Monoterpene glykosidisch gebunden und besitzt somit keinen prägenden Einfluss auf das Weinaroma (Mateo and Jimenez, 2000).

1.3 Glykosyltransferasen

Glykosyltransferasen (GT) sind eine heterogene Gruppe von Enzymen, die in Viren, Archaeobakterien, Bakterien und Eukaryoten zu finden ist. Sie übertragen chemisch aktivierte Zuckermoleküle auf eine Vielzahl von Akzeptormolekülen wie Zucker und Polysaccharide, Lipide, Proteine, Nukleinsäuren, Antibiotika sowie andere kleine Moleküle und Sekundärmetabolite (Yonekura-Sakakibara and Hanada, 2011). In der Regel werden Enzyme entsprechend ihrer katalytischen Funktionalität und Substratspezifität gemäß der *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) mit einer *Enzyme Commission Number*, einer EC-Nummer, klassifiziert. Glykosyltransferasen gehören demnach der Klasse EC 2.4.x.y an. Eine genaue Zuordnung und Einteilung ist jedoch häufig nicht möglich, weil viele Glykosyltransferasen nicht ausreichend biochemisch charakterisiert sind und/oder die Enzyme ein breites Spektrum an Substraten besitzen (Coutinho et al., 2003). Aufgrund dessen wurde von Campbell *et al.* 1997 ein modifiziertes System zur Kategorisierung von Glykosyltransferasen entwickelt, das 2003 von Coutinho *et al.* nochmal adaptiert wurde (Campbell et al., 1997) (Coutinho et al., 2003). Die Einteilung beruht hierbei auf Sequenz- und Strukturhomologien sowie dem katalytischen Mechanismus der GT. Die Entwicklung neuartiger Sequenziermethoden und die Etablierung von *Next Generation Sequencing* führten in den letzten Jahren zu einem enormen Anstieg verfügbarer Genomdaten. In Folge dessen ist auch die Anzahl von annotierten und funktionell-analysierten Glykosyltransferasen deutlich gestiegen. 2003 wurden von Coutinho 65 Glykosyltransferase-Gruppen ermittelt, deren Zahl im Jahr 2013 auf 91 gestiegen ist (Coutinho et al., 2003) (Yonekura-Sakakibara and Hanada, 2011). In der *carbohydrate-active enzyme* (CAZy) Datenbank werden alle Glykosyltransferasen und deren Gruppen archiviert, aktualisiert und veröffentlicht. Insgesamt umfasst die Datenbank fast 120000 Sequenzen, von denen etwa 20 % noch keiner Gruppe zugeordnet werden konnten (<http://www.cazy.org/GlycosylTransferases.html>; Stand

08.08.2013). Das Genom des pflanzlichen Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* umfasst 562 Glykosyltransferase-Sequenzen, im Reisgenom (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) lassen sich 602 Glykosyltransferasegene identifizieren, während der Mensch (*Homo sapiens*), *Caenorhabditis elegans* und die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* mit 236, 261 und 150 deutlich weniger Glykosyltransferase-Sequenzen besitzen (Stand: 08.08.2013). Bei allen fünf genannten Organismen werden die Glykosyltransferasen hauptsächlich der GT1 (etwa 30 % aller Sequenzen) und GT31 Familie (etwa 10 % aller Sequenzen) zugeordnet (Yonekura-Sakakibara and Hanada, 2011).

1.3.1 Glykosyltransferase 1 Familie

Die Glykosyltransferasen, die der GT1 Familie zugeordnet werden, nutzen aktivierte Uridindiphosphat (UDP)-Zucker als Donormoleküle, so dass sie auch als UDP-abhängige Glykosyltransferasen (UGT) bezeichnet werden. UGT zeigen meist eine hohe Spezifität gegenüber dem Donormolekül. Das bevorzugte Substrat ist UDP-D-Glukose, wobei von einigen charakterisierten UGT auch UDP-D-Glucuronsäure (Sawada et al., 2005), UDP-D-Galaktose (Miller et al., 1999), UDP-D-Xylose (Martin et al., 1999) und UDP-L-Rhamnose (Jones et al., 2003) akzeptiert werden. UGT sind selten spezifisch gegenüber einem bestimmten Akzeptormolekül und glykosylieren in der Regel diverse Substrate. Experimentell konnte jedoch gezeigt werden, dass die Glykosylierung häufig regiospezifisch ist (Janvary et al., 2009) (Griesser et al., 2008a). Die Glykosylierung resultiert meistens in einer Stabilisierung, einer erhöhten Wasserlöslichkeit oder der Inaktivierung bzw. Detoxifizierung von Naturstoffen. Während UGT in Säugerzellen membrangebunden sind (Mackenzie et al., 2005), sind pflanzliche UGT in der Regel lösliche cytosolische Enzyme, die die Glykosylierung von verschiedenen Pflanzenmetaboliten wie Flavonoiden, Phenylpropanoiden, Terpenen, Steroiden sowie Pflanzenhormone katalysieren (Yonekura-Sakakibara and Hanada, 2011). Zudem weisen alle pflanzlichen UGT eine C-terminale konservierte Proteinsequenz auf, die als PSPG (*plant secondary product glycosyltransferase*)-Box bezeichnet wird (Hughes and Hughes, 1994) (Abbildung 8).



Abbildung 8: Die Consensus-Sequenz der PSPG (*plant secondary product glycosyltransferase*)-Box pflanzlicher UDP-Glykosyltransferasen. Bei dieser Darstellung ist die Größe der Buchstaben direkt proportional zum Auftreten der Aminosäure (Osmani et al., 2009).

Bislang wurden die Kristallstrukturen von fünf pflanzlichen UGT veröffentlicht: UGT71G1 (*Medicago truncatula*) (Shao et al., 2005), UGT72B1 (*Arabidopsis thaliana*) (Brazier-Hicks et al., 2007), UGT78G1 (*M. truncatula*) (Modolo et al., 2009), UGT85H2 (*M. truncatula*) (Li et al., 2007) und VvGT1 (*Vitis vinifera*) (Offen et al., 2006). Trotz der geringen Sequenzidentität zwischen den Enzymen zeigen die Glykosyltransferasen eine hohe Strukturhomologie. Die Strukturen besitzen eine sogenannte GT-B-Faltung, die eine N- und C-terminalen Domäne mit einer $\beta/\alpha/\beta$ Rossmann-ähnlichen Faltung aufweist (Lairson et al., 2008) (Wang, 2009). Ein Spalt zwischen den beiden Domänen bildet die

Substratbindetasche. Die Koordination des Zucker-Donormoleküls findet primär durch die in der C-terminalen Domäne lokalisierten PSPG-Box statt, während das Akzeptormolekül über die N-terminale Domäne gebunden wird (Abbildung 9). Der strukturelle Vergleich von GT1 Enzymen konnte zeigen, dass die C-terminale Domäne eine höhere Sequenzähnlichkeit aufweist als die N-terminale. Diese Beobachtung bietet eine Erklärung für die geringe Variabilität des Donormoleküls im Vergleich zum Akzeptormolekül (Wang, 2009).

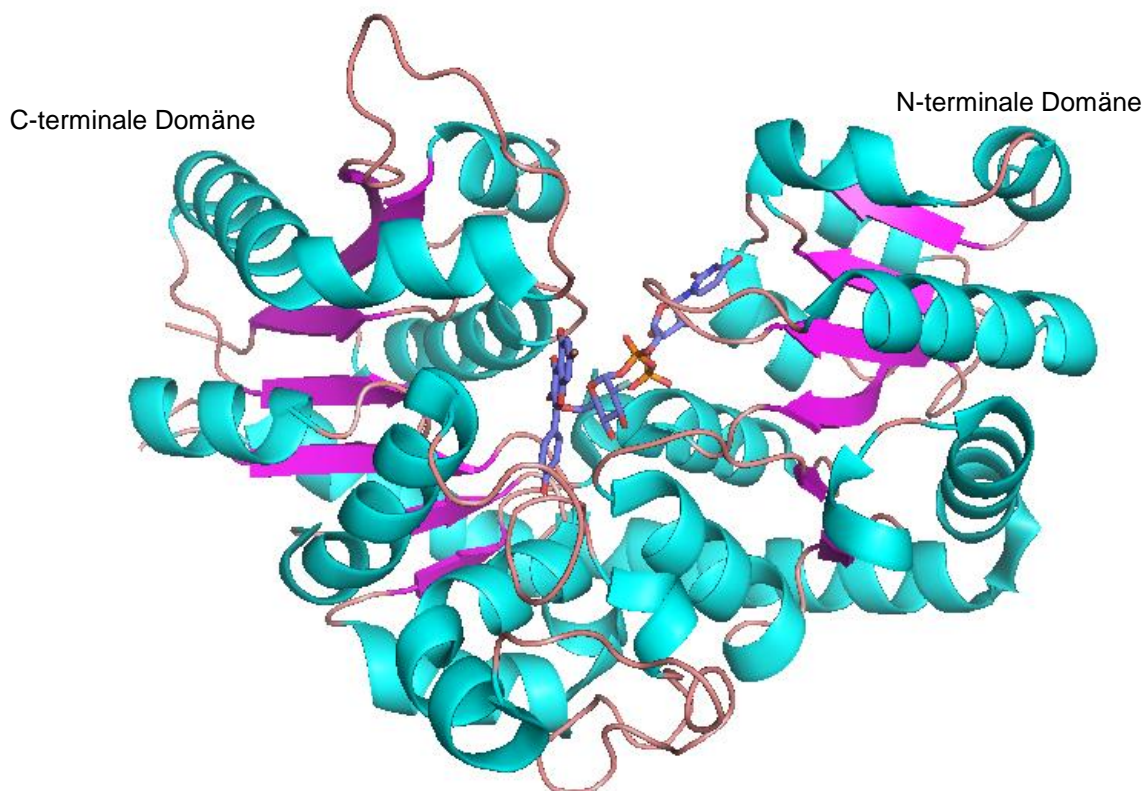


Abbildung 9: Dreidimensionale Struktur von VvGT1 mit U2F (Uridin-5'-diphospho-2-desoxy-2-fluoro- α -D-Glukose) und Kämpferol im aktiven Zentrum (pdb: 2C1Z) (Offen et al., 2006). Die Sekundärstrukturelemente sind unterschiedlich gefärbt (α -Helices: türkis; β -Faltblatt: pink, loop: apricot). Die beiden Substrate U2F und Kämpferol sind als Stäbe dargestellt (Kohlenstoffatome: blau, Sauerstoffatome: rot, Phosphoratome: orange) und befinden sich in dem von den beiden Domänen gebildeten Spalt. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm PyMOL.

Der genaue Reaktionsmechanismus für die Glykosylierung ist bislang noch nicht bekannt. Es wurden aber zwei Mechanismen postuliert.

Die erste Hypothese legt einen S_N2 -ähnlichen Mechanismus zugrunde, bei dem die Übertragung des Zuckerrestes in der beobachteten Inversion des anomeren Kohlenstoffatoms des Zuckers resultiert (Lairson et al., 2008). In den oben genannten Kristallstrukturen konnte ein Histidin-Rest im N-Terminus identifiziert werden (His22 in UGT71G1 und His20 in VvGT1), welcher in einem Abstand von weniger als 4 Å vom Zuckerrest und vom Akzeptormolekül lokalisiert ist. Dieses Histidin dient als Protonenakzeptor in der katalytischen Reaktion. Zusätzlich verstärkt ein Aspartat (Asp121 in UGT71G1 und Asp119 in VvGT1) die Protonen-ziehende Kraft des Histidins durch die Abstraktion eines Wasserstoffions vom Imidazolring. Das resultierende Oxyanion, das durch die Deprotonierung des Akzeptormoleküls entstanden ist, kann nun das Kohlenstoffatom an Position C1 des Zuckers nukleophil angreifen und somit die Bildung einer neuen β -glykosidischen Bindung zwischen dem Zuckerrest und dem Akzeptormolekül generieren (Shao et al., 2005) (Lairson et al., 2008).

Der zweite postulierte Reaktionsmechanismus basiert auf strukturellen Studien und Berechnungen möglicher exo- und endothermer Schritte während der enzymatischen Katalyse (Hans et al., 2004). Die *in silico* Studie mit UGT73A5, einer Betanidin-5-O-glukosyltransferase (*Dorotheanthus bellidiformis*), zeigte, dass ein S_N1 -Mechanismus energetisch günstiger sei als ein S_N2 -Mechanismus. Bei diesem Mechanismus wird durch die Ausbildung einer katalytischen Triade zwischen den Aminosäuren Histidin 22 und Glutamat 394 und dem Betanidin die 5-Hydroxygruppe des Betanidins deprotoniert. In einem weiteren Schritt erfolgt anders als bei dem S_N2 -Mechanismus zunächst die Spaltung der energiereichen Diphosphatbindung zwischen der Glukose und dem UDP, woraufhin die neue Bindung zwischen dem Betanidin und der Glukose gebildet wird. Auch hierbei findet eine Inversion des anomeren Kohlenstoffatoms der Glukose statt (Hans et al., 2004). Die Bedeutung des N-terminalen Histidins am Reaktionsmechanismus konnte experimentell durch den resultierenden Aktivitätsverlust bei dem Austausch von Histidin gegen ein Alanin gezeigt und bestätigt werden (Brazier-Hicks et al., 2007) (Offen et al., 2006).

Neben der üblichen O-Glykosylierung konnten auch weitere Glykosylierungen an Schwefel-, Stickstoff- und Kohlenstoffatomen beobachtet und nachgewiesen werden. Viele dieser teilweise auch bifunktionellen Enzyme (UGT72B1 aus *A. thaliana*: O- und N-Glykosylierung (Brazier-Hicks et al., 2007)) sind bislang weder charakterisiert noch kristallisiert, so dass über den katalytischen Mechanismus dieser Reaktionen nur spekuliert werden kann.

Die bislang biochemisch charakterisierten UGT bevorzugen UDP-Glukose als Donormolekül, wobei einige Enzyme auch alternative UDP-konjugierte Zucker akzeptieren (Bowles et al., 2006) (Ono et al., 2010). So setzt VvGT1 GDP-Glukose und dTDP-Xylose als Zuckerdonor um (Offen et al., 2006). Die Analyse der dreidimensionalen Strukturen zeigte, dass die PSPG-Box eine Substruktur bildet, in die sich der UDP-Zucker einlagert und von verschiedenen Aminosäuren des Motives koordiniert werden. Die Akzeptorbindetasche wird primär von der N-terminalen Domäne und einigen Aminosäuren der C-terminalen Domäne gebildet. Dieser Bereich, der von helikalen Strukturelementen und Schleifen dominiert wird, besitzt eine hohe Variabilität (Wang, 2009). Neben der VvGT1 (UDP-Glukose: Flavonoid 3-O-Glukosyltransferase) wurden die Glykosyltransferasen VvGT5 (Flavonol 3-O-Glukuronyltransferase) und 6 (Flavonol 3-O-Glukosyl/Galaktosyltransferase) (Ono et al., 2010), GT5 (Anthocyanin 5-O-Glukosyltransferase) (Janvary et al., 2009) sowie VvGT1-3 (Hydroxybenzoat-/Hydroxyzimtsäure-Glukosyltransferase) (Khater et al., 2012) aus *V. vinifera* biochemisch untersucht, wobei bislang keine Terpen-spezifische Glykosyltransferase aus der Weinbeere in der Literatur beschrieben wurde.

Pflanzliche UGT bieten aufgrund ihrer Substratpromiskuität ein breites Feld für mögliche biotechnologische Anwendungen. Von besonderem Interesse ist hierbei die hohe Regioselektivität der Enzyme. Die verschiedenen Glykoside unterscheiden sich in ihren chemischen Eigenschaften und ihrer Funktionalität. Die enzymatisch katalysierte regioselektive Glykosylierung besitzt somit gegenüber der organischen Synthese den Vorteil, dass keine Schutzgruppenchemie entwickelt und durchgeführt werden muss.

Glykosyltransferasen können für die enzymatische Biosynthese von Glykosiden im zellfreien System (immobilisierte Enzyme) oder im Ganzellsystem genutzt werden. Zwar bietet das zellfreie System die Möglichkeit, die immobilisierten Enzyme mehrfach zu verwenden und das Produkt direkt zu isolieren,

doch muss der aktivierte Zucker (UDP-Glukose) als kostenintensive Komponente zugesetzt werden. In Ganzzellsystemen wird die UDP-Glukose von dem Organismus, meist *Escherichia coli* oder verschiedenen Hefestämmen, selbst produziert. Interessanterweise werden die dem Medium zugesetzten Aglyka in bakteriellen Ganzzellsystemen aus dem Medium in die Zelle transportiert und die entstanden Glykoside anschließend wieder in das Medium abgegeben, so dass diese direkt aus dem Medium isoliert werden können. Eine Zerstörung der Zellen und aufwendige Aufreinigung ist somit nicht notwendig (Lim et al., 2004) (Willits et al., 2004). Die Strukturaufklärung von fünf pflanzlichen GTs ermöglicht es zudem mithilfe gezielter Veränderungen der Proteinsequenz durch den Austausch einzelner Aminosäuren oder ganzer Domänen die Aktivität von Enzymen zu beeinflussen (Cartwright et al., 2008) (Hansen et al., 2009).

Es gibt Überlegungen durch die veränderte GT-Expression *in planta* das Erscheinungsbild und/oder die Qualität von Lebensmitteln zu beeinflussen. So wurden beispielsweise UGT in *Citrus* Sorten identifiziert, die die Bitterstoffe Naringinin (Bar-Peled et al., 1991) und Limonoid (Kita et al., 2000) glykosylieren und somit den bitteren Geschmack maskieren. Durch eine erhöhte GT-Expression könnte der Anteil dieser unerwünschten Aromen reduziert werden. Vergleichbare Überlegungen existieren auch für *V. vinifera*, bei der die Akkumulation von Anthocyaninen (Farbstoffe) mit der Aktivität bestimmter GT in Verbindung steht (Vogt and Jones, 2000).



2 Zielsetzung

Es heißt im Volksmund, dass ein Wein mit dem Alter immer besser wird. Ob ein Wein während der Flaschenlagerung wirklich „besser“ wird, ist natürlich abhängig vom Geschmack des jeweiligen Verbrauchers. Wissenschaftliche Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass sich das Weinbouquet während der Lagerung verändert. Der Abbau von Essigsäureestern verursacht eine Abnahme der Frische und Fruchtigkeit des Weines, die Bildung von Vitispiranen sorgt für eine Kerosin- bzw. Petrolnote und die chemische Modifikation von Terpenen sorgt für individuelle Komplexität des Weinaromas (Rapp, 1992). Terpene haben in freier Form entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung des Weinbouquets. Im Gegensatz dazu sind Terpenglykoside nicht Aroma-aktiv. Sie werden jedoch aufgrund ihrer hohen Wasserlöslichkeit und geringen Toxizität in der Weinbeere gebildet. Die Glykosylierung maskiert sozusagen die Aroma-prägenden Terpene, so dass die Glykoside als „verstecktes Aromapotential“ bezeichnet werden. Die Biosynthese von verschiedenen Terpenen und deren Glykosylierung ist primär Rebsorten-abhängig. Viele Forschungsansätze, die sich mit der Ausprägung des Weinaromas beschäftigen, sind entweder auf die Terpen-Synthese oder die Freisetzung der gebundenen Terpene fokussiert. Die für die Glykosylierung verantwortlichen Enzyme, die Glykosyltransferasen (GT), wurden bislang noch nicht identifiziert und untersucht.

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von Terpenalkohol-Glykosyltransferasen (Terpenol-GT) aus *Vitis vinifera* durch heterologe Expression und funktionelle Charakterisierung der exprimierten Proteine. Bei Untersuchungen zur Aktivität von Glykosyltransferasen aus *A. thaliana* konnten Enzyme identifiziert werden, die Weinaroma-relevante Monoterpenole wie Geraniol und Citronellol glykosylieren. Mithilfe der Gensequenzen dieser UGT wurden im Genom von *V. vinifera* 57 homologe Sequenzen ermittelt und die Expressionsprofile einiger dieser Gene in verschiedenen Geweben und Rebsorten durch einen Kooperationspartner (Hochschule Geisenheim) untersucht. Basierend auf diesen Expressionsdaten sollten GT-Kandidatengene zur heterologen Expression in *E. coli* ausgewählt, die Proteine mit einem N-terminalen GST-Tag exprimiert und die Umsetzung von UDP-[U-¹⁴C]Glukose als Donorsubstrat und verschiedenen Akzeptormolekülen bestimmt werden.

Als Substrate sollten neben den Aroma-relevanten Terpenolen Citronellol, Geraniol, Nerol, Linalool und α -Terpineol auch nachweislich in der Weinbeere vorliegende (glykosylierte) Flavonoide (Cyanidin, Pelargonidin, Quercetin und Kämpferol) und diverse Aromakomponenten wie Benzylalkohol, 2-Phenylethanol und Eugenol untersucht werden. Die Analyse der Enzymaktivität sollte mittels Flüssigkeitsszintillationsmessung erfolgen, wobei die gemessene Radioaktivität direkt proportional zu Produktbildung ist. Bei nachgewiesener Aktivität gegenüber Terpenolen sollten die kinetischen Daten der Enzyme bezüglich dieser Substrate und die Enantioselektivität der Enzyme bestimmt werden. Die Bestätigung der Produktbildung sollte zum einen mittels Radio-Dünnschichtchromatographie sowie LC- und GC-MS-Analytik erfolgen. Die LC- und GC-MS-Analytik wurde an der Universität Bonn durchgeführt.

In einem weiteren Versuch sollte anstelle der reinen Substrate eine aus den Weinbeeren isolierte Aglykamischung verwendet und mit dem aufgereinigten Enzym inkubiert werden. Diese Aglyka spiegeln repräsentativ die Zusammensetzung möglicher Substrate *in planta* wider. Mit diesem Versuch sollte eine Verbindung zwischen den *in vitro* und den *in planta* Substraten hergestellt werden.

Die generelle Produktbildung sollte zunächst mittels Flüssigkeitsszintillationsmessung nachgewiesen und anschließend zum Nachweis der gebildeten Glykoside Radio-Dünnschichtchromatographie, LC- und GC-MS-Analytik verwendet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Annotierung und phylogenetische Analyse der putativen Glykosyltransferasen aus *Vitis vinifera*

Monoterpenole wie Geraniol und Citronellol sind prägende Aromakomponenten der Weinbeere und des Weins. Während der Reifung wird ein Großteil dieser Aromastoffe durch Glykosylierung in Aroma-inaktive Moleküle umgewandelt (Mateo and Jimenez, 2000). Die Identifizierung der hierfür verantwortlichen Glykosyltransferasen (GT) war lange Zeit aufgrund der hohen Heterogenität dieser Enzymgruppe und dem fehlenden Wissen über Terpenol-Glykosyltransferasen schwer durchzuführen. Erst im Jahr 2008 konnten 27 Glykosyltransferasen aus *A. thaliana* identifiziert werden, die Terpene glykosylierten (Caputi et al., 2008). Basierend auf diesen Sequenzen wurde nach ähnlichen, annotierten Genen im Genom von *V. vinifera* (Velasco et al., 2007) (Jaillon et al., 2007) gesucht. Für jede der 27 UGT wurden die sechs ähnlichsten Sequenzen des *V. vinifera* Genoms ermittelt, wodurch ein Sequenz-Pool von 162 Genen erhalten wurde. Aufgrund von Redundanz konnte die Zahl der putativen UGT-Sequenzen auf 67 reduziert werden (Stand 2010). Diese bioinformatische Arbeit wurde von Johanna Frotscher an der Hochschule Geisenheim durchgeführt. Durch modifizierte Annotierungsmethoden und veränderten Datenbank-Einträgen wurde die Anzahl der Sequenzen auf 57 (Stand 2013) angepasst. Eine phylogenetische Analyse der 57 ausgewählten Proteinsequenzen zeigte, dass die Proteine in fünf phylogenetische Gruppen eingeteilt werden können. Die Benennung der Gruppen D, L, H, G und E erfolgte analog zu der von *A. thaliana*. Die Gruppe L umfasst die größte Anzahl an putativen Glykosyltransferasen (Anhang Abbildung 56).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt zehn putative UGT-Gene aus den fünf Gruppen ausgewählt. Die Gene, die zwischen 1300 und 1900 Basenpaaren umfassen, wurden aus 5 verschiedenen Weinbau-relevanten Rebsorten (Roter Traminer 11-18 Gm, Roter Traminer FR 46-107, Weißer Riesling 239-34 Gm, Weißer Riesling 24-196 Gm und Gelber Muskateller FR 90) isoliert. Die *in silico* Analyse mit dem Programm SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) ergab, dass die Sequenzen keine Signal- oder Transmembransequenz besitzen.

Die Proteine der Gruppe L teilen sich in zwei phylogenetische Äste auf, die von VvGT8 zum einen und von VvGT9, VvGT10 und VvGT11 zum anderen gebildet werden. VvGT8 zeigt zu den annotierten Terpen-Glykosyltransferasen BAD90934 und BAD90935 aus *Eucalyptus perriniana* eine höhere Sequenzähnlichkeit als zu den *Arabidopsis* GT. Die bereits charakterisierte UDP-Glukose:Flavonoid 3-O-glykosyltransferase VvGT1 aus *V. vinifera* bildet einen eigenen phylogenetischen Ast (Abbildung 10).

Bei der Untersuchung der Gensequenzen aus den unterschiedlichen Rebsorten zeigte sich, dass verschiedene Genvarianten mit sogenannten Einzelnukleotid-Polymorphismen (englisch: SNP, *single nucleotide polymorphism*) nachgewiesen werden konnten, die in einer veränderten Proteinsequenz resultierten. Die Proteinvarianten unterscheiden sich meist nur in wenigen Aminosäuren (eine bis 22 Aminosäuren). Es konnten auch verschiedene Sequenzvarianten in einer Rebsorte identifiziert werden, wobei nicht alle Varianten in allen Rebsorten vertreten waren (Tabelle 1).

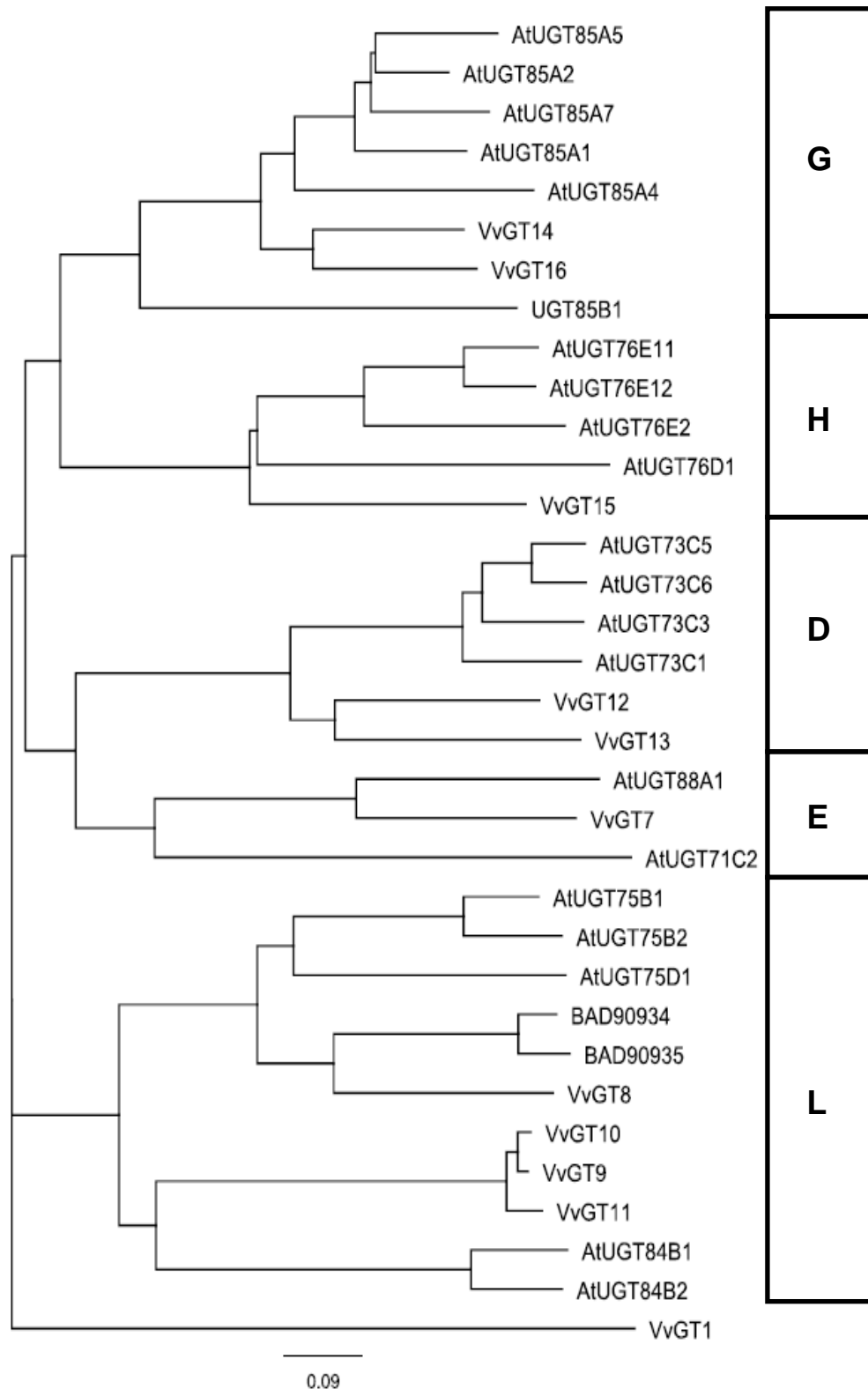


Abbildung 10: Phylogenetischer Baum der 10 heterolog exprimierten VvGTs, Terpenol-konvertierenden GTs aus *A. thaliana* (AtUGT nach (Caputi et al., 2008)), aus *S. bicolor* (UGT85B1, (Hansen et al., 2009)) sowie den Glykosyltransferasen BAD90934 und BAD90935 aus *E. perriniana* (Nagashima et al., 2004) und der charakterisierten VvGT1 aus *V. vinifera* (Offen et al., 2006). Die GT lassen sich in die Gruppen D, E, H, L und G einteilen. Die 10 VvGT-Sequenzen wurden von (Frotscher, 2013) ermittelt. Der phylogenetische Baum wurde mit Geneious Pro 5.5.6 nach der *neighbor joining* Methode erstellt.

Tabelle 1: Übersicht der putativen Glykosyltransferasen aus *Vitis vinifera* und die aus 5 verschiedenen Rebsorten identifizierten Proteinvarianten. Die VvGT-Sequenzen wurden von (Frotscher, 2013) zur Verfügung gestellt.

VvGT-Nummer	VvGT-Bezeichnung (Proteinvariante)	Rebsorte*
VvGT7	VvGT7a	4
	VvGT7b	1, 2, 3, 5
	VvGT7c	2
	VvGT7d	2
	VvGT7e	3
	VvGT7f	3
	VvGT7g	1, 5
	VvGT7h	1
	VvGT7i	4
	VvGT7j	4
	VvGT8	VvGT8a
VvGT8b		2
VvGT8c		4
VvGT8d		4
VvGT9	VvGT9a	2, 4
	VvGT9b	4
VvGT10	VvGT10a	2, 4
VvGT11	VvGT11a	2
VvGT12	VvGT12a	1, 2, 3
	VvGT12b	1, 2, 3, 4
	VvGT12c	4
VvGT13	VvGT13a	1
	VvGT13b	1, 2, 3, 4
	VvGT13c	2, 3
VvGT14	VvGT14a	1, 2
	VvGT14b	2
	VvGT14c	1
VvGT15	VvGT15a	1, 2, 4
	VvGT15b	1
	VvGT15c	4
VvGT16	VvGT16a	1

* 1 Roter Traminer 11-18 Gm, 2 Weißer Riesling 239-34 Gm, 3 Weißer Riesling 24-196 Gm, 4 Gelber Muskateller FR 90, 5 Roter Traminer FR 46-107

3.2 Expression und Untersuchung putativer Glykosyltransferasen aus Gruppe D

3.2.1 Expression und Nachweis der rekombinanten Proteine

Die an der Hochschule Geisenheim isolierten Gene von *VvGT12* und *VvGT13* wurden für die heterologe Expression in den Expressionsvektor pET29a (+) kloniert. Die rekombinanten Fusionsproteine besaßen einen C-terminalen His-Tag. *VvGT12* und *VvGT13* wiesen drei Sequenzvarianten auf, die aus insgesamt vier Traubensorten isoliert werden konnten (Frotscher, 2013) (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht der Anzahl der Aminosäureunterschiede zwischen den einzelnen Proteinvarianten von VvGT12 (A) und VvGT13 (B) (Alignment im Anhang Abbildung 64, 65).

A			B		
	VvGT12a	VvGT12b		VvGT13a	VvGT13b
VvGT12b	1		VvGT13b	6	
VvGT12c	2	1	VvGT13c	1	5

Für erste Expressionsuntersuchungen wurden die Varianten VvGT12b und VvGT13a ausgewählt. Die Expression erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS und Rosetta (DE3) pLysS. Bei der Anfertigung einer SDS-PAGE und Immunodetektion des Fusionsproteins konnte nur eine geringe oder keine Expression nachgewiesen werden (Abbildung 11).

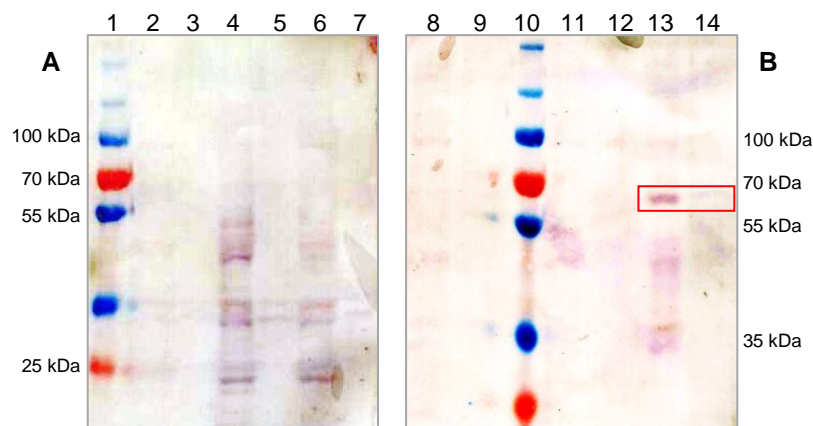


Abbildung 11: Immunodetektion der in BL21 (DE3) pLysS (A) und Rosetta (DE3) pLysS (B) exprimierten His-Fusionsproteine VvGT12 und VvGT13. Die Fraktionen (2) bis (7) entstanden bei der Expression in *E. coli* BL21 (DE3)pLysS und die Proben (8), (9), (11) bis (14) stammen aus der Expression in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS. (1), (10) Größenstandard, (2) Leervektor Proteinrohextrakt und (3) Leervektor konzentrierte Elutionsfraktion, (4) VvGT12b Proteinrohextrakt, (5) VvGT12b konzentrierte Elutionsfraktion, (6) VvGT13a Proteinrohextrakt, (7) VvGT13a konzentrierte Elutionsfraktion, (8) Leervektor Proteinrohextrakt, (9) Leervektor konzentrierte Elutionsfraktion, (11) VvGT12b Proteinrohextrakt, (12) VvGT12b konzentrierte Elutionsfraktion, (13) VvGT13a Proteinrohextrakt, (14) VvGT13a konzentrierte Elutionsfraktion, Das rote Rechteck markiert das exprimierte Fusionsprotein VvGT13a.

Die Gene wurden daraufhin in den Expressionsvektor pGEX-4T-1 kloniert. pGEX-Vektoren wurden bereits in dieser und in anderen Arbeitsgruppen zur Gewinnung löslicher Glykosyltransferasen verwendet (Bayonove et al., 1992), (Griesser et al., 2008a) (Caputi et al., 2008). Der fusionierte GST-Tag soll zum einen die Löslichkeit des rekombinanten Proteins erhöhen und zum anderen dient er als Erkennungsdomäne bei der Affinitätschromatographie. Die nach dem Zellaufschluss erhaltenen Proteinrohextrakte von VvGT12a-c und VvGT13a-c wurden partiell aufgereinigt und die Proteinfractionen mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Hierbei konnten jeweils das Fusionsprotein sowie der GST-Tag nachgewiesen werden (Abbildung 12, 13).

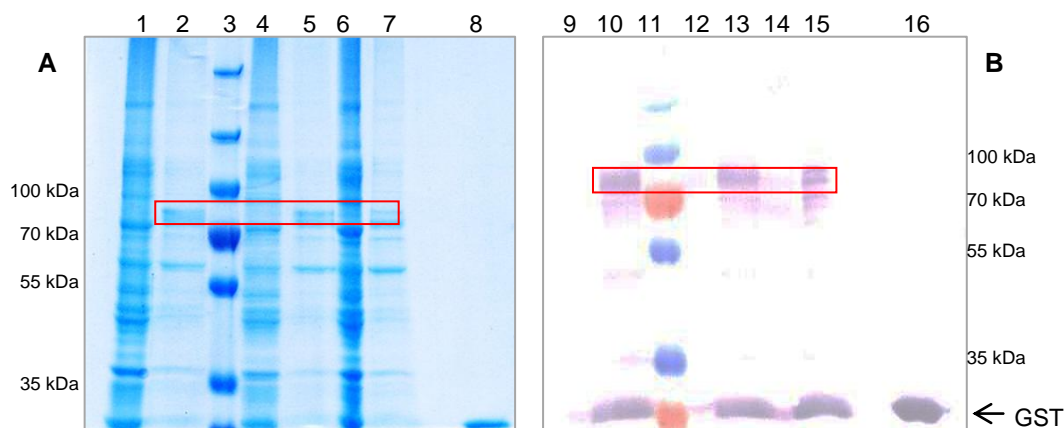


Abbildung 12: SDS-PAGE (Coomassie-gefärbt) (A) und Immunodetektion (B) der in *E. coli* exprimierten GST-Fusionsproteine VvGT12a-c. In die Spuren 1 bis 16 wurden folgende Proben aufgetragen: (1) (9) VvGT12a Proteinrohextrakt (2) (10) VvGT12a Elutionsfraktion (3) (11) Größenstandard, (4) (12) VvGT12b Proteinrohextrakt, (5) (13) VvGT12b Elutionsfraktion, (6) (14) VvGT12c Proteinrohextrakt, (7) (15) VvGT12c Elutionsfraktion, (8) (16) Leervektor Elutionsfraktion. Die roten Rechtecke markieren die exprimierten GST-VvGT12-Fusionsproteine im Polyacrylamidgel und Western Blot.

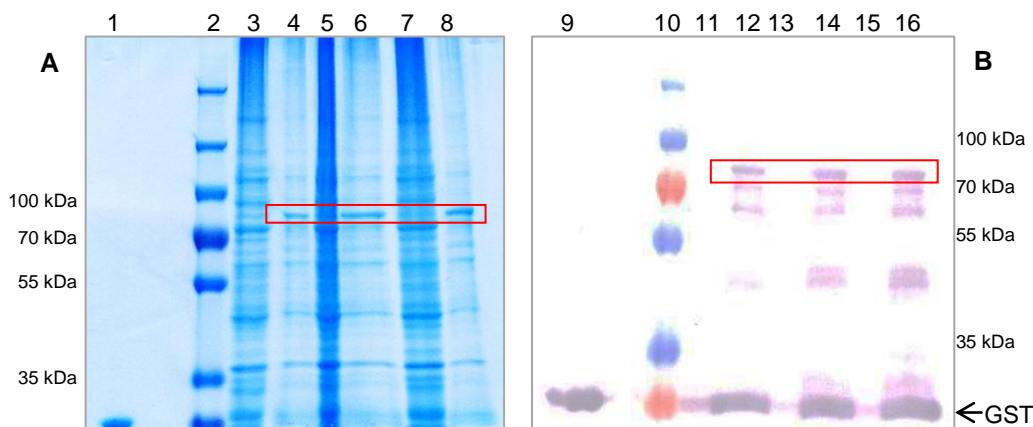


Abbildung 13: SDS-PAGE (Coomassie-gefärbt) (A) und Immunodetektion (B) der heterolog exprimierten GST-Fusionsproteine VvGT13a-c. Die Spuren 1 bis 16 zeigen folgende Proben: (1) (9) Leervektor Elutionsfraktion, (2) (10) Größenstandard (3) (11) VvGT13a Proteinrohextrakt (4) (12) VvGT12a Elutionsfraktion, (5) (13) VvGT12b Proteinrohextrakt, (6) (14) VvGT12b Elutionsfraktion, (7) (15) VvGT12c Proteinrohextrakt, (8) (16) VvGT12c Elutionsfraktion, Die roten Rechtecke markieren die exprimierten GST-VvGT13-Fusionsproteine im Polyacrylamidgel und Western Blot.

3.2.2 Substratpräferenz der rekombinanten Proteine *in vitro*

Der Nachweis möglicher Substrate der rekombinanten GST-UGT erfolgte mittels Enzymassay mithilfe UDP-[U-¹⁴C]Glukose und anschließender Rבודetektion der Produkte. Es wurden neben den Aroma-relevanten Terpenolen Citronellol, Geraniol, α -Terpineol, Nerol und Linalool auch 8-Hydroxylinolool sowie verschiedene Flavonoide (Cyanidin, Kämpferol, Pelargonidin und Quercetin) und Monoalkohole (Eugenol, 2-Phenylethanol, Benzylalkohol und Farnesol) als putative Substrate verwendet. Als Negativkontrolle ist aufgereinigter Proteinextrakt aus BL21 (DE3) pLysS Zellen eingesetzt worden, die den leeren Expressionsvektor pGEX-4T-1 enthielten. Allen Enzymassays wurden 10 mM β -Mercaptoethanol frisch hinzugefügt. Bei den untersuchten Enzymen VvGT12a-c und VvGT13a-c konnte weder mit den aufgereinigten Enzymen noch mit dem Proteinrohextrakt Umsetzung der untersuchten Substrate nachgewiesen werden.

3.3 Expression und Untersuchung putativer Glykosyltransferasen aus Gruppe L

3.3.1 Expression und Nachweis der rekombinanten Proteine

Die Gene *VvGT8*, *VvGT9*, *VvGT10* und *VvGT11* konnten phylogenetisch der Gruppe L zugeordnet werden. Die Sequenzanalyse dieser Gene bei den Sorten Gelber Muskateller FR 90 und Weißer Riesling 239-34 Gm lieferte für die resultierenden Proteine *VvGT8* vier und für *VvGT9* zwei Sequenzvarianten (Frotscher, 2013).

Tabelle 3: Übersicht der Aminosäureunterschiede zwischen den einzelnen identifizierten Enzymvarianten von *VvGT8* (A) und *VvGT9* (B) (Alignment im Anhang Abbildung 62, 63).

A				B	
	VvGT8a	VvGT8b	VvGT8c		VvGT9a
VvGT8b	7			VvGT9b	2
VvGT8c	9	3			
VvGT8d	9	3	2		

Die Proteine wurden als Fusionsproteine mit einem N-terminalen GST-Tag (etwa 80 kDa) heterolog in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt (Abschnitt 3.2) und konnten anhand von SDS-PAGE und immunospezifischer Detektion des GST-Tags nachgewiesen werden (Abbildung 14, 15). Zusätzliche Proteinbanden, welche sich ebenfalls in der Kontrolle mit dem Leervektor zeigten, deuteten auf eine partiell unspezifische Aufreinigung hin, so dass die eingesetzte Proteinmenge bei der Umsetzung verschiedener Substrate eine gewisse Varianz besaß.

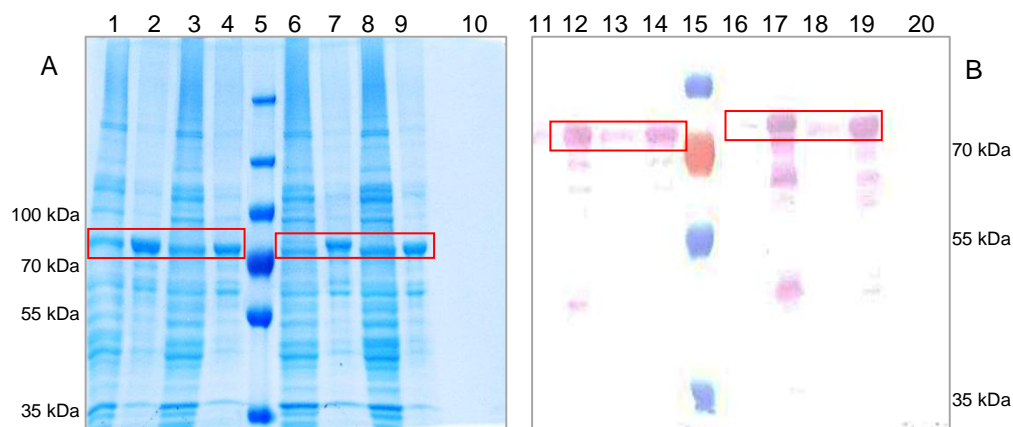


Abbildung 14: SDS-PAGE (Coomassie-gefärbt) (A) und Immunodetektion (B) der GST-Fusionsproteine *VvGT8a-d*. Die heterologe Expression und die Aufreinigung der Fusionsproteine konnte anhand der SDS-PAGE und der immunospezifischen Detektion nachgewiesen werden. In den Spuren 1 bis 20 sind folgende Proben aufgetragen: (1) (11) *VvGT8a* Proteinrohextrakt, (2) (12) *VvGT8a* Elutionsfraktion, (3) (13) *VvGT8b* Proteinrohextrakt (4) (14) *VvGT8b* Elutionsfraktion, (5) (15) Größenstandard, (6) (16) *VvGT8c* Proteinrohextrakt, (7) (17) *VvGT8c* Elutionsfraktion, (8) (18) *VvGT8d* Proteinrohextrakt, (9) (19) *VvGT8d* Elutionsfraktion (10) (20) Leervektor Elutionsfraktion. Die roten Rechtecke markieren die exprimierten GST-*VvGT8*-Fusionsproteine im Polyacrylamidgel und Western Blot.

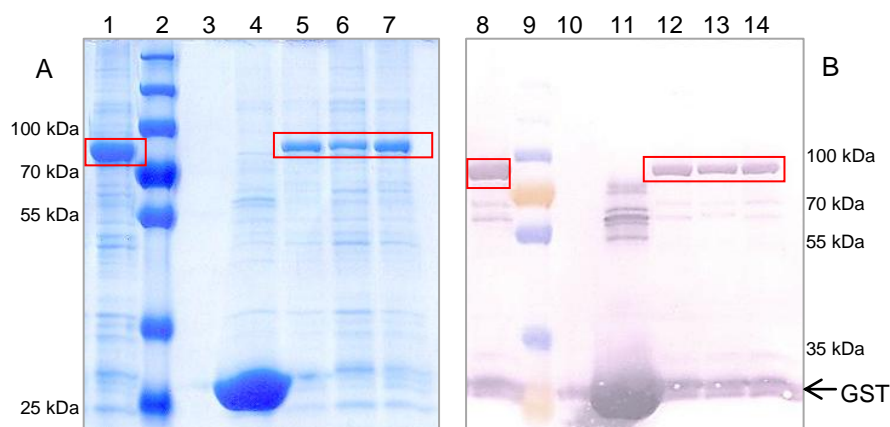


Abbildung 15: SDS-PAGE (Coomassie-gefärbt) (A) und Immunodetektion (B) der GST-Fusionsproteine VvGT9a und b, VvGT10 und VvGT11. Die Fusionsproteine VvGT9a und b, VvGT10 und VvGT11 wurde in *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS heterolog exprimiert und über Affinitätschromatographie aufgereinigt. In den Spuren 1 bis 14 wurden folgende Proben aufgetragen: (1) (8) VvGT9a Elutionsfraktion, (2) (9) Größenstandard, (3) (10) leer (4) (11) Leervektor Elutionsfraktion, (5) (12) VvGT9b Elutionsfraktion, (6) (13) VvGT10 Elutionsfraktion, (7) (14) VvGT11 Elutionsfraktion. Die roten Rechtecke markieren die exprimierten GST-Fusionsproteine im Polyacrylamidgel und Western Blot.

3.3.2 Substratpräferenz der rekombinanten Proteine *in vitro*

Die aufgereinigten GST-Fusionsproteine von VvGT8, VvGT9, VvGT10 und VvGT11 wurden bezüglich der Umsetzung verschiedener Substrate (Terpenole, Flavonoide und Monoalkohole) getestet. Als Negativkontrolle wurde die Elutionsfraktion von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS mit dem Leervektor pGEX-4T-1 verwendet. Zudem wurde auch der Rohproteinextrakt auf enzymatische Umsetzung der Substrate untersucht. Die aufgereinigten Proteine VvGT9a, VvGT9b, VvGT10 und VvGT11 akzeptierten neben den Flavonoiden Kämpferol und Quercetin auch Eugenol als Substrat. VvGT9a glukosylierte außerdem Cyanidin (Abbildung 16). Das Protein VvGT8a zeigte das gleiche Substratspektrum wie VvGT9b, VvGT10 und VvGT11, wobei der Umsatz wesentlich geringer war. Alle anderen untersuchten Substrate wurden nicht oder kaum und mit hoher Varianz umgesetzt.

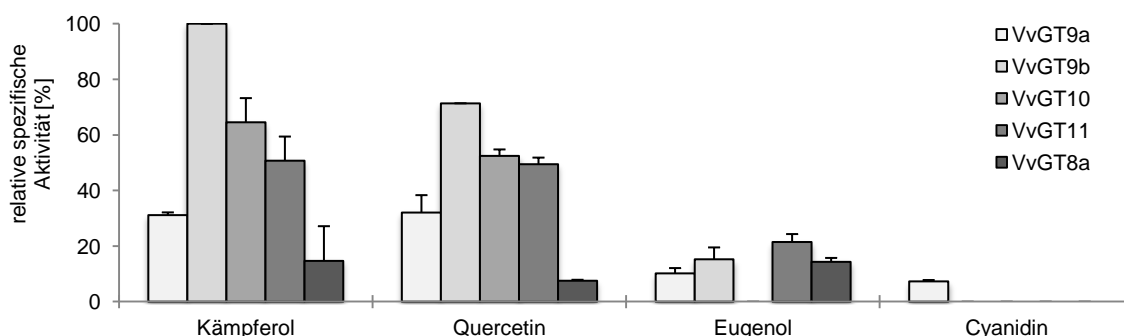


Abbildung 16: Relative spezifische Aktivitäten unterschiedlicher putativer Substrate von VvGT9a und b, VvGT10, VvGT11 und VvGT8a. Die rekombinanten Fusionsproteine wurden mit dem Akzeptormolekül und UDP-[U-¹⁴C]Glukose bei 30 °C und pH 7,5 (100 mM Tris HCl Puffer mit 10 mM β -Mercaptoethanol) für 18,5 Stunden inkubiert. Die Enzyme VvGT8b-d waren nicht aktiv gegenüber den getesteten Substraten und werden deshalb nicht aufgeführt. Die relative spezifische Aktivität bezieht sich auf die höchste spezifische Aktivität, die beim Umsatz von Kämpferol durch VvGT9b ermittelt wurde. Die Substrate Citronellol, Geraniol, 8-Hydroxylinalool, Linalool, Nerol, α -Terpineol, Pelargonidin, Benzylalkohol, 2-Phenylethanol und Farnesol wurde kein Umsatz gemessen.

Die drei weiteren Sequenzvarianten von VvGT8 zeigten keine katalytische Aktivität. Interessanterweise war der Zusatz von β -Mercaptoethanol (10 mM) essentiell für eine nachweisbare Enzymaktivität. Die Proben mit dem Proteinrohextrakt wiesen keine enzymatische Aktivität auf, so dass für die weiteren Analysen ausschließlich aufgereinigtes Protein verwendet wurde.

3.4 Expression und Untersuchung putativer Glykosyltransferasen aus Gruppe E

Aufgrund der hohen Anzahl von nachgewiesenen Sequenzvarianten der putativen UGT-Gene der Gruppe E in den insgesamt fünf verschiedenen Traubensorten, wurde die Untersuchung der heterolog exprimierten Proteine zunächst auf die Varianten aus den Traubensorten Gelber Muskateller FR 90 (VvGT7b-c) und Weißer Riesling 239-34 Gm (VvGT7a und VvGT7i-j) beschränkt. Die Klone dieser Traubensorten zeichnen sich zum einen durch ihre Bedeutung in der Weinindustrie als auch durch ihre unterschiedlichen Terpenegehalte aus. So weist der Gelbe Muskateller FR 90 im Gegensatz zum Weißen Riesling 239-34 Gm hohe Terpenolkonzentrationen auf (persönliche Kommunikation, Stanitzek, 2013). Die Umsetzung von Terpenolen durch VvGT7a-c veranlasste die Analyse weiterer Sequenzvarianten, die zusätzlich in anderen Traubensorten (Weißer Riesling 24-196 Gm, Roter Traminer 11-18 Gm und Roter Traminer FR 46-107) nachgewiesen werden konnten (Frotscher, 2013) (Tabelle 4). Die Optimierung der Reaktionsbedingungen sowie die kinetischen Daten wurden für die exprimierten Proteine VvGT7a-c bestimmt. Aufgrund der guten Übereinstimmung der Umsetzung der Terpene durch die Proteinvarianten von VvGT7 wurden die kinetischen Daten für andere VvGT7-Varianten nicht ermittelt.

Tabelle 4: Übersicht der Aminosäureunterschiede zwischen den zehn identifizierten Proteinvarianten von VvGT7 (Alignment im Anhang Abbildung 61).

	7a	7b	7c	7d	7e	7f	7g	7h	7i
7b	6								
7c	11	10							
7d	7	1	11						
7e	12	1	1	12					
7f	8	2	10	3	11				
7g	1	5	10	6	11	7			
7h	7	1	11	2	12	3	6		
7i	8	4	14	5	15	6	9	5	
7j	7	5	15	6	16	7	8	6	1

3.4.1 Expression und Nachweis der rekombinanten Proteine

Der aus fünf verschiedenen Traubensorten isolierten VvGT7-Gensequenzen konnten zehn Proteinvarianten zugeordnet werden (VvGT7a-j). Diese wurden analog zu den bereits untersuchten UGT-Genen der Gruppe D und L als Fusionsproteine mit N-terminalem GST-Tag heterolog exprimiert und aufgereinigt. Mithilfe von SDS-PAGE und Antikörper-spezifischem Nachweis des GST-Tags konnte die Expression und die Aufreinigung über Affinitätschromatographie nachgewiesen werden (Abbildung 17-19). Neben der Proteinbande des Fusionsproteins mit einer Größe von 79 kDa zeigte sich in dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel eine vergleichbar ausgeprägte Proteinbande mit einer Größe von etwa 60 kDa in den Elutionsfraktionen. Zur Identifizierung wurde diese Proteinbande von

VvGT7c und VvGT7j aus dem Gel isoliert und am Lehrstuhl für Proteomik und Bioanalytik von Prof. Dr. Küster (Technische Universität München) mithilfe massenspektrometrischer Untersuchungen sequenziert. Die ermittelten Proteinsequenzen stimmten mit der Aminosäureabfolge der Nicht-Fusionsproteine überein. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass das Fusionsprotein entweder eine generelle Instabilität aufweist (Isayenkova et al., 2006) (Jackson et al., 2001) oder die denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE eine Abspaltung des GST-Tags hervorrufen.

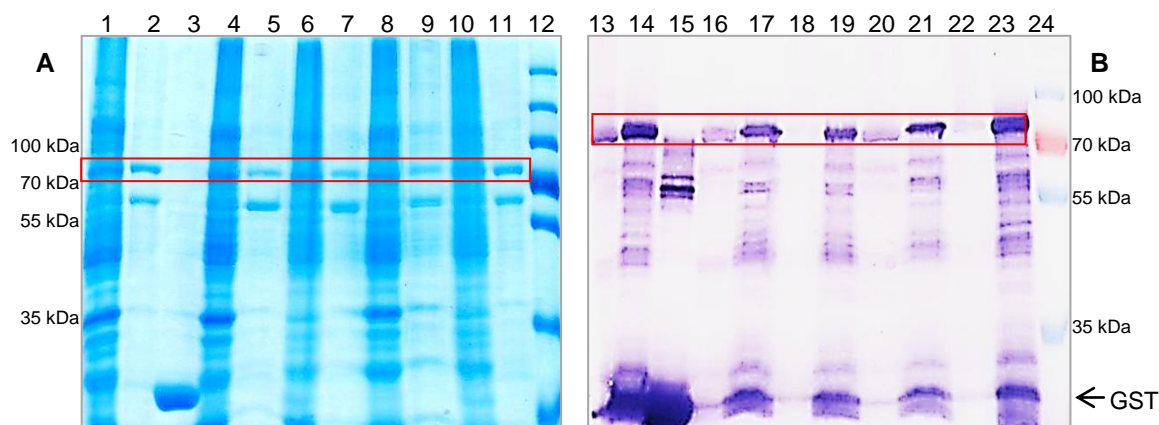


Abbildung 17: SDS-PAGE (Coomassie-gefärbt) (A) und Immunodetektion (B) der GST-Fusionsproteine VvGT7a-c und VvGT7i und j. Die heterologe Expression der Fusionsproteine konnte mithilfe von SDS-PAGE und Immunodetektion verifiziert werden. Es wurden folgende Proben aufgetragen: (1) (13) VvGT7c Proteinrohextrakt, (2) (14) VvGT7c Elutionsfraktion, (3) (15) Leervektor Elutionsfraktion, (4) (16) VvGT7i Proteinrohextrakt, (5) (17), VvGT7i Elutionsfraktion (6) (18) VvGT7j Proteinrohextrakt, (7) (19) VvGT7j Elutionsfraktion, (8) (20) VvGT7a Proteinrohextrakt, (9) (21) VvGT7a Elutionsfraktion (10) (22) VvGT7a Proteinrohextrakt, (11) (23) VvGT7a Elutionsfraktion, (12) (24) Größenstandard. Die roten Rechtecke markieren die exprimierten GST-VvGT8-Fusionsproteine im Polyacrylamidgel und Western Blot.

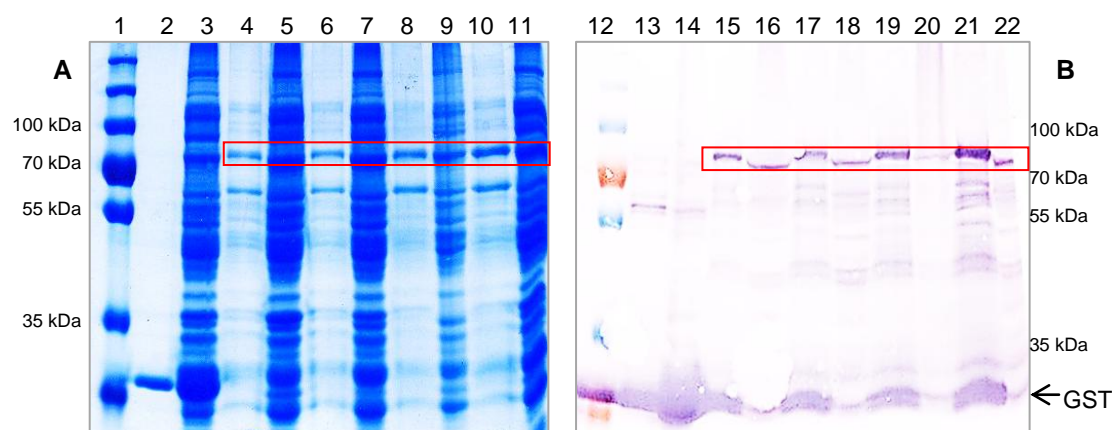


Abbildung 18: SDS-PAGE (Coomassie-gefärbt) (A) und Immunodetektion (B) der GST-Fusionsproteine VvGT7d und VvGT7f-h. Der Nachweis der heterologen Expression der GST-UGT erfolgte mittels SDS-PAGE und immunospezifischer Detektion. Die in A und B gezeigten Spuren beinhalten folgende Proben: (1) (12) Größenstandard, (2) (13) Leervektor Elutionsfraktion, (3) (14), Leervektor Proteinrohextrakt, (4) (15) VvGT7d Elutionsfraktion, (5) (16), VvGT7d Proteinrohextrakt (6) (17) VvGT7f Elutionsfraktion, (7) (18) VvGT7f Proteinrohextrakt, (8) (19) VvGT7h Elutionsfraktion, (9) (20) VvGT7h Proteinrohextrakt, (10) (21) VvGT7g Elutionsfraktion, (11) (22) VvGT7g Proteinrohextrakt. Die roten Rechtecke markieren die exprimierten GST-VvGT8-Fusionsproteine im Polyacrylamidgel und Western Blot.

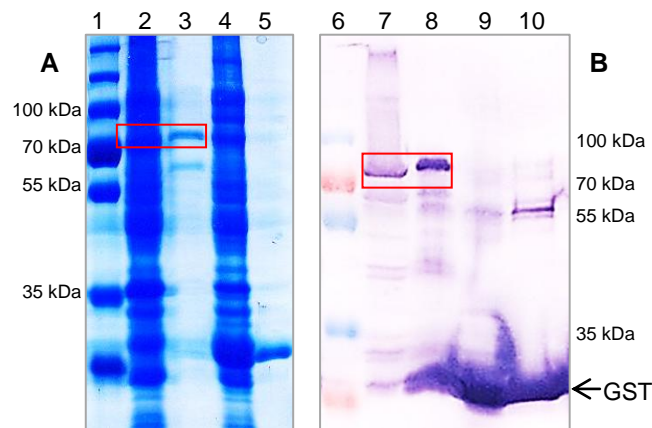


Abbildung 19: SDS-PAGE (Coomassie-gefärbt) (A) und Immunodetektion (B) des GST-Fusionsproteins VvGT7e. Das Protein VvGT7e wurde als GST-Fusionsprodukt in *E. coli* heterolog exprimiert und anschließend affinitätschromatographisch aufgereinigt. In den Spuren 1 bis 10 wurden folgende Proben aufgetragen: (1) (6) Größenstandard, (2) (7) VvGT7e Proteinrohextrakt, (3) (8), VvGT7e Elutionsfraktion, (4) (9) Leervektor Proteinrohextrakt, (5) (10), Leervektor Elutionsfraktion. Die roten Rechtecke markieren die exprimierten GST-VvGT7e-Fusionsproteine im Polyacrylamidgel und Western Blot.

3.4.2 Substratpräferenz der rekombinanten Proteine *in vitro*

Der Umsatz verschiedener putativer Substrate (Terpenole, Flavonoide sowie kurzkettige und aromatische Monoalkohole) wurde mit den aufgereinigten GST-Fusionsproteinen von VvGT7 durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde die Elutionsfraktion von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS mit dem Leervektor pGEX-4T-1 verwendet. Anhand der Enzymassays zeigte sich, dass die Proteinvarianten VvGT7a-h eine Präferenz bezüglich der Glukosylierung von Terpenolen (Nerol, Geraniol und Citronellol) sowie Eugenol und Benzylalkohol aufwiesen (Tabelle 5). Zusätzlich wurde Quercetin als Substrat von VvGT7b-g akzeptiert. VvGT7g zeigte eine vergleichsweise hohe Umsetzung von 2-Phenylethanol. Kurzkettige Monoalkohole wurden marginal glukosyliert. Die Proteinvariante VvGT7i akzeptierte nur Eugenol und VvGT7j keines der putativen Substrate als Akzeptormolekül.

Citronellol liegt als Enantiomergemisch vor. Zur Ermittlung der Enantiopräferenz von VvGT7 wurde VvGT7b mit enantiomerenreinen (S)- und (R)-Citronellol und UDP-[U-¹⁴C]Glukose inkubiert und analysiert. Hierbei zeigte sich, dass VvGT7 beide Enantiomere umsetzte, jedoch das nicht natürlich in der Traube vorhandene (R)-Enantiomer bevorzugt glukosylierte (Abbildung 20).

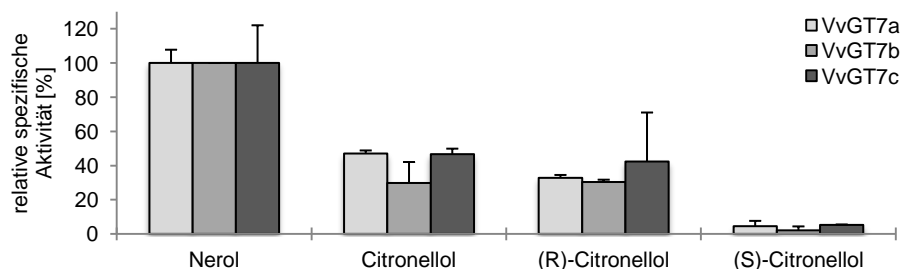






Abbildung 20: Relative spezifische Aktivitäten der verschiedenen Enantiomere von Citronellol VvGT7a-c. Die rekombinanten Fusionsproteine von VvGT7a-c wurden mit dem Akzeptormolekül und UDP-[U-¹⁴C]Glukose inkubiert. Die relative spezifische Aktivität [%] bezieht sich auf die höchsten spezifischen Aktivitäten, die beim Umsatz des favorisierten Substrates Nerol durch VvGT7a-c gemessen wurden.

Tabelle 5: Relative spezifischen Aktivitäten der VvGT7-Varianten gegenüber den getesteten Substraten. Der Standardreaktionsassay bestand aus UDP-[U-¹⁴C]Glukose, dem jeweiligen Substrat und 15 µg aufgereinigten Enzym. Es wurde Tris HCl (100 mM mit 10 mM β-Mercaptoethanol) mit einem pH von 8,0 verwendet. Die Inkubation erfolgte für 18,5 Stunden bei 30 °C. Die relative spezifische Aktivität [%] bezieht sich auf die höchste spezifische Aktivität, die beim Umsatz von Nerol durch VvGT7g ermittelt wurde. Die Standardabweichungen sind dem Anhang (Tabelle 27) zu entnehmen.

	VvGT7a	VvGT7b	VvGT7c	VvGT7d	VvGT7e	VvGT7f	VvGT7g	VvGT7h	VvGT7i	VvGT7j	Leervektor
Citronellol	48	67	73	71	71	33	45	10	2	0	0
Geraniol	27	51	60	37	32	19	32	6	0	0	0
8-Hydroxylinalool	1	5	4	3	1	2	1	0	0	0	0
Linalool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nerol	70	99	91	90	76	72	100	54	4	0	0
Terpineol	0	1	0	0	1	2	0	1	0	0	0
Cyanidin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kämpferol	1	4	3	1	2	2	1	0	0	0	1
Pelargonidin	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Quercetin	4	17	17	11	6	14	9	1	0	0	0
Benzylalkohol	15	21	23	11	22	9	19	2	1	1	0
Phenylethanol	4	5	2	5	5	3	20	1	0	0	0
Eugenol	16	38	46	43	40	26	40	23	10	0	0
Farnesol	2	1	0	1	0	2	0	0	1	1	0
Hexanol	5	2	1	5	4	4	6	3	0	0	0
Oktanol	1	6	5	4	5	3	6	1	0	0	0
Mandelonitril	3	2	0	3	2	3	4	1	0	0	0
3-Methyl-2-butenol	3	5	4	4	6	4	6	1	1	1	0
3-Methyl-3-butenol	2	3	2	2	2	2	3	0	0	0	0
cis 3-Hexenol	4	5	4	4	5	3	8	1	0	0	0
trans 2-Hexenol	8	8	8	7	8	5	11	4	0	0	0

 : 5-10 %
 : 11-50 %

 : 51-80 %
 : > 80 %

3.4.3 Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen

Die Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde für VvGT7a-c mit UDP-[U-¹⁴C]Glukose und Nerol durchgeführt. Hierfür wurde zunächst die Menge des aufgereinigten Enzyms auf 15 µg und die Inkubationszeit auf 1 Stunde für VvGT7b und c bzw. 2 Stunden für VvGT7a festgelegt. Die höchste Umsatzrate von Nerol wurde mit VvGT7a bei pH 8,0 in Tris HCl Puffer (100 mM mit 10 mM β-Mercaptoethanol) bei 30 °C (Abbildung 21), mit VvGT7b bei pH 8,5 in Tris HCl Puffer (100 mM mit 10 mM β-Mercaptoethanol) bei 30 °C (Abbildung 22) und mit VvGT7c bei pH 8,5 in Tris HCl Puffer (100 mM mit 10 mM β-Mercaptoethanol) bei 37 °C (Abbildung 23) gemessen. Bei pH-Werten von 2,0 bis 6,0 war keine Aktivität messbar. Die Produktzunahme des Nerylglukosid war für mindestens eine Stunde (VvGT7b und c) bzw. 2 Stunden (VvGT7a) linear.

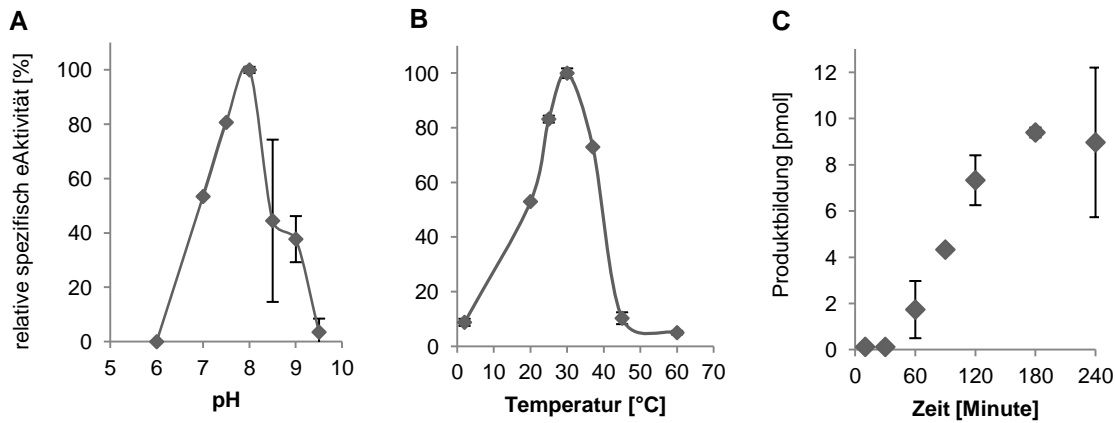


Abbildung 21: Optimierung der Reaktionsbedingungen von VvGT7a mit dem Substrat Nerol und UDP-[U-¹⁴C] Glukose. (A) Einfluss des pH-Wertes auf die Bildung von Nerylglukosid bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C und einer Inkubationszeit von 2 Stunden. Bis zu einem pH-Wert von 6,0 war keine Aktivität messbar. (B) Einfluss der Temperatur auf die Bildung von Nerylglukosid bei einem pH-Wert von 8,0 (100 mM Tris HCl mit 10 mM β -Mercaptoethanol) und einer Inkubationszeit von 2 Stunden. (C) Einfluss der Inkubationszeit auf die Produktbildung. Die Produktbildung war bis mindestens 2 Stunden linear.

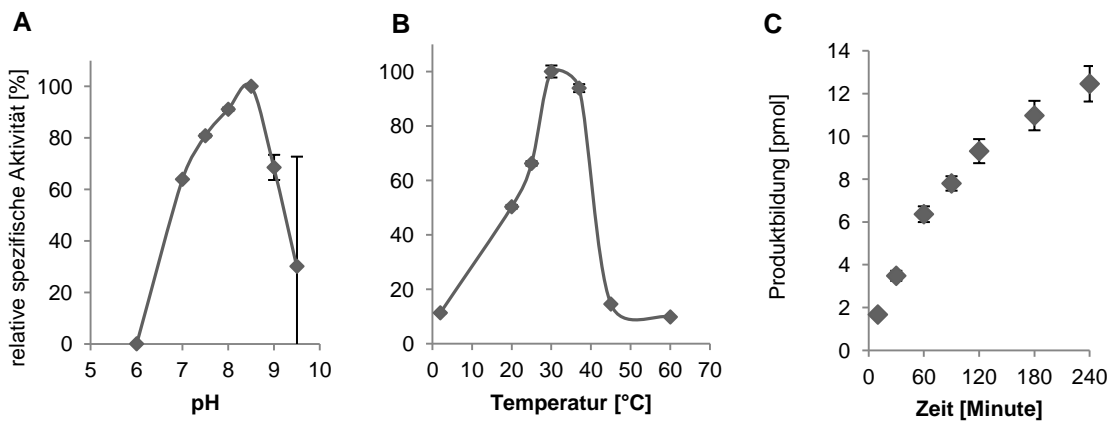


Abbildung 22: Optimierung der Reaktionsbedingungen von VvGT7b mit dem Substrat Nerol und UDP-[U-¹⁴C] Glukose. (A) Einfluss des pH-Wertes auf die Bildung von Nerylglukosid bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C und einer Inkubationszeit von 1 Stunden. Bis zu einem pH-Wert von 6,0 war keine Aktivität messbar. (B) Einfluss der Temperatur auf die Bildung von Nerylglukosid bei einem pH-Wert von 8,5 (100 mM Tris HCl mit 10 mM β -Mercaptoethanol) und einer Inkubationszeit von 1 Stunden. (C) Einfluss der Inkubationszeit auf die Produktbildung. Die Produktbildung war bis mindestens 1 Stunden linear.

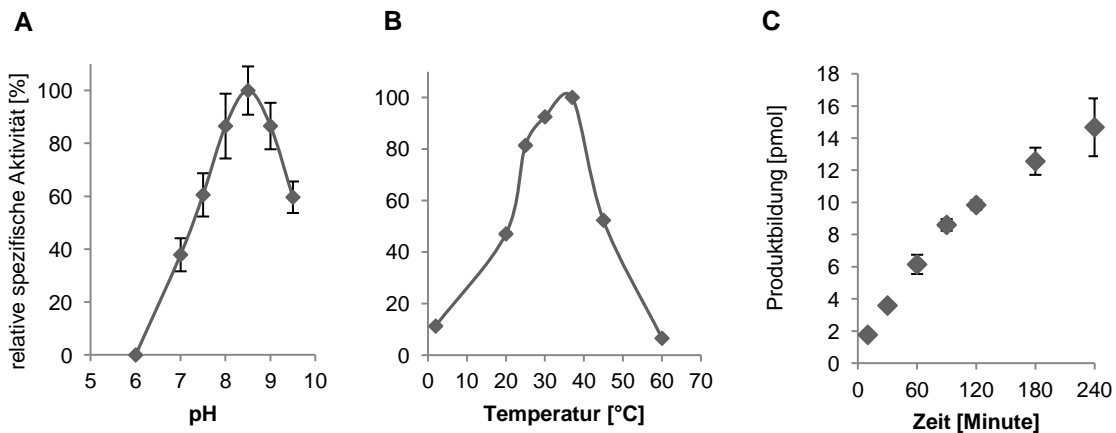


Abbildung 23: Optimierung der Reaktionsbedingungen von VvGT7c mit dem Substrat Nerol und UDP-[U-¹⁴C] Glukose. (A) Einfluss des pH-Wertes auf die Bildung von Nerylglukosid bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C und einer Inkubationszeit von 1 Stunden. Bis zu einem pH-Wert von 6,0 war keine Aktivität messbar. (B) Einfluss der Temperatur auf die Bildung von Nerylglukosid bei einem pH-Wert von 8,5 (100 mM Tris HCl mit 10 mM β -Mercaptoethanol) und einer Inkubationszeit von 1 Stunden. (C) Einfluss der Inkubationszeit auf die Produktbildung. Die Produktbildung war bis mindestens 1 Stunden linear.

3.4.4 Nachweis der Terpenglukoside mittels Dünnschichtchromatographie

Mithilfe der Dünnschichtchromatographie konnte die Produktbildung visualisiert werden. Die entstandenen Glukoside wurden im Gegensatz zu der hydrophilen radioaktiv markierten UDP-[U-¹⁴C] Glukose entlang der Lösungsmittelfront transportiert. Die Detektion erfolgte mit einem Autoradiographen.

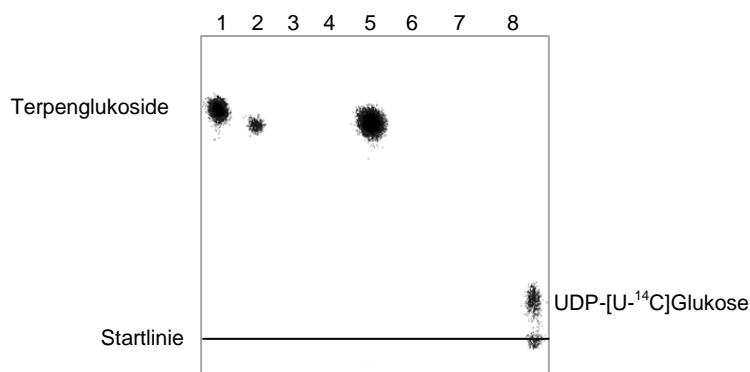


Abbildung 24: Dünnschichtchromatographie der Umsetzung der Terpene mit VvGT7a. Verschiedene Terpene wurden mit Hilfe von affinitätsgereinigtem VvGT7a Protein und UDP-[U-¹⁴C] Glukose glukosyliert, die Glukoside mittels Ethylacetat extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mittels Autoradiographen über vier Stunden. Verwendete Terpene in (1) Citronellol, (2) Geraniol, (3) 8-Hydroxylinalool, (4) Linalool, (5) Nerol, (6), α -Terpineol, (7) Leerkontrolle ohne Substrat und (8) UDP-[U-¹⁴C]Glukose.

Die glukosylierten Produkte der Akzeptormoleküle Nerol, Geraniol und Citronellol konnten chromatographisch nachgewiesen werden (Abbildung 24). Hierbei wurde nur ein radioaktiver Produktfleck für das jeweilige Terpenglukosid detektiert. Aufgrund der chemischen und strukturellen Ähnlichkeit der Akzeptormoleküle ist die Laufweite der entstehenden Produkte annähernd identisch. Bei dem Einsatz von 8-Hydroxylinalool, Linalool und α -Terpineol konnten entsprechend der zuvor ermittelten Substratpräferenzen keine radioaktiv markierten Produkte detektiert werden. Durch die vergleichende Auftragung des radioaktiv markierten Donormoleküls konnte gezeigt werden, dass bei der Extraktion keine UDP-[U-¹⁴C] Glukose in die organische Phase übertragen wurde. Die Dünnschichtchromatogramme der Produkte von VvGT7b und c sind mit dem von VvGT7a vergleichbar und im Anhang zu finden (Anhang Abbildung 57, 58).

3.4.5 Bestimmung der kinetischen Daten von VvGT7a-c

Die kinetischen Daten wurden für die drei Akzeptormoleküle Nerol, Geraniol und Citronellol mit festgesetzter UDP-Glukose-Konzentration (502,5 μ M) und für UDP-Glukose mit konstanter Nerol-Konzentration (VvGT7a: 400 μ M Nerol; VvGT7b, c: 200 μ M Nerol) bestimmt. Es zeigte sich, dass die kinetischen Daten von VvGT7b und c ähnliche Werte aufweisen.

Die k_{cat} -Werte dieser Enzymvarianten für die Umsetzung von Nerol und UDP-Glukose sind mit 14 bis $20 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ bzw. 12 bis $14 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ drei- bis fünfmal größer als die von VvGT7a. Die Wechselzahl der Terpene Geraniol und Citronellol hingegen zeigt bei allen drei VvGT7-Varianten eine vergleichbare Größenordnung (1 bis $3 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$). Die K_M -Werte von Nerol sind bei VvGT7b und c mit etwa 200 μ M halb so groß wie bei VvGT7a. Die ermittelten K_M -Werte von Citronellol und Geraniol sowie die der UDP-Glukose zeigen bei allen drei Enzymvarianten vergleichbare Konzentrationen (Tabelle 6).

Tabelle 6: Übersicht der kinetischen Daten von VvGT7a, VvGT7b und VvGT7c. Die kinetischen Daten für die Akzeptormoleküle Nerol, Citronellol und Geraniol wurden bei konstanter UDP-Glukose-Konzentration unter optimalen Bedingungen ermittelt. Die Daten für die UDP-Glukose wurden bei konstanter Nerol-Konzentration unter optimalen Bedingungen bestimmt. Die Auswertung erfolgte mittels der Solver-Funktion mit Office Excel, Lineweaver-Burk und Hanes-Woolf.

Substrat	K_M [μM]	k_{cat} [10^{-4} sec^{-1}]	k_{cat}/K_M [$10^{-4} \text{ sec}^{-1} \text{ mM}^{-1}$]
VvGT7a			
Nerol	417 ± 4	4	10
Citronellol	433 ± 62	2	4
Geraniol	464 ± 56	1	2
UDP-Glukose	52 ± 9	3	53
VvGT7b			
Nerol	204 ± 27	20	70
Citronellol	306 ± 75	2	10
Geraniol	396 ± 12	2	10
UDP-Glukose	48 ± 1	12	260
VvGT7c			
Nerol	211 ± 16	14	70
Citronellol	445 ± 21	3	7
Geraniol	321 ± 2	3	6
UDP-Glukose	56 ± 3	14	260

3.4.6 Sequenzvergleich der VvGT7-Varianten, zielgerichtete Mutagenese und deren Einfluss auf die *in vitro* Aktivität

Die Untersuchungen der Substratpräferenz der zehn heterolog exprimierten Proteinvarianten von VvGT7 ergaben, dass die Varianten VvGT7i und VvGT7j eine geringe Umsetzung von Eugenol bzw. keine Aktivität gegenüber den getesteten Substraten zeigten. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der zehn VvGT7-Varianten zeigte, dass sich die aktiven und die inaktiven Enzyme in exakt drei Aminosäuren (Positionen in der Consensus-Sequenz: L186V, I210L und P318A) unterscheiden (Abbildung 25).

A	Consensus Identity	170	180	*	190	200	*	210
		DLNTHLHI PGLPPVPA	SDMAKPI	IXDR	EXKAYE	FXNMS	IHLPRSAG	IJVNTFEAL
WGT7a	DLNTHLHI PGLPPVPA	SDMAKPI	LDRE	KAYE	LVNMS	IHLPRSAG	IJVNTFEAL	E
WGT7b	DLNTHLHI PGLPPVPA	SDMAKPI	LDRE	KAYE	LVNMS	IHLPRSAG	IJVNTFEAL	E
WGT7c	DLNTHLHI PGLPPVPA	SDMAKPI	LDRE	KAYE	FFLNMS	IHLPRSAG	IJVNTFEAL	E
WGT7d	DLNTHLHI PGLPPVPA	SDMAKPI	LDRE	KAYE	LVNMS	IHLPRSAG	IJVNTFEAL	E
WGT7e	DLNTHLHI PGLPPVPA	SDMAKPI	LDRE	KAYE	FFLNMS	IHLPRSAG	IJVNTFEAL	E
WGT7f	DLNTHLHI PGLPPVPA	SDMAKPI	LDRE	KAYE	LVNMS	IHLPRSAG	IJVNTFEAL	E
WGT7g	DLNTHLHI PGLPPVPA	SDMAKPI	LDRE	KAYE	LVNMS	IHLPRSAG	IJVNTFEAL	E
WGT7h	DLNTHLHI PGLPPVPA	SDMAKPI	LDRE	KAYE	LVNMS	IHLPRSAG	IJVNTFEAL	E
WGT7i	DLNTHLHI PGLPPVPA	SDMAKPI	VDRE	KAYE	LVNMS	IHLPRSAG	IJVNTFEAL	E
WGT7j	DLNTHLHI PGLPPVPA	SDMAKPI	VDRE	KAYE	LVNMS	IHLPRSAG	IJVNTFEAL	E

B	Consensus Identity	300	310	*	320
		IAVGLERSGQR	FLWVVRSP	PXSKD	
WGT7a	IAVGLERSGQR <td>FLWVVRSP <td>P</td> <td>SKD</td> <td></td> </td>	FLWVVRSP <td>P</td> <td>SKD</td> <td></td>	P	SKD	
WGT7b	IAVGLERSGQR <td>FLWVVRSP <td>P</td> <td>SKD</td> <td></td> </td>	FLWVVRSP <td>P</td> <td>SKD</td> <td></td>	P	SKD	
WGT7c	IAVGLERSGQR <td>FLWVVRSP <td>P</td> <td>SKD</td> <td></td> </td>	FLWVVRSP <td>P</td> <td>SKD</td> <td></td>	P	SKD	
WGT7d	IAVGLERSGQR <td>FLWVVRSP <td>P</td> <td>SKD</td> <td></td> </td>	FLWVVRSP <td>P</td> <td>SKD</td> <td></td>	P	SKD	
WGT7e	IAVGLERSGQR <td>FLWVVRSP <td>P</td> <td>SKD</td> <td></td> </td>	FLWVVRSP <td>P</td> <td>SKD</td> <td></td>	P	SKD	
WGT7f	IAVGLERSGQR <td>FLWVVRSP <td>P</td> <td>SKD</td> <td></td> </td>	FLWVVRSP <td>P</td> <td>SKD</td> <td></td>	P	SKD	
WGT7g	IAVGLERSGQR <td>FLWVVRSP <td>P</td> <td>SKD</td> <td></td> </td>	FLWVVRSP <td>P</td> <td>SKD</td> <td></td>	P	SKD	
WGT7h	IAVGLERSGQR <td>FLWVVRSP <td>P</td> <td>SKD</td> <td></td> </td>	FLWVVRSP <td>P</td> <td>SKD</td> <td></td>	P	SKD	
WGT7i	IAVGLERSGQR <td>FLWVVRSP <td>A</td> <td>SKD</td> <td></td> </td>	FLWVVRSP <td>A</td> <td>SKD</td> <td></td>	A	SKD	
WGT7j	IAVGLERSGQR <td>FLWVVRSP <td>A</td> <td>SKD</td> <td></td> </td>	FLWVVRSP <td>A</td> <td>SKD</td> <td></td>	A	SKD	

Abbildung 25: Ausschnitte des Sequenzvergleiches der 10 Proteinvarianten von VvGT7a-j. Die Ausschnitte zeigen die drei Aminosäuren, in denen sich die aktiven (VvGT7a-h) von den inaktiven (VvGT7i-j) Enzymen unterscheiden. Diese Positionen sind oberhalb der Consensus-Sequenz mit einem Sternchen markiert. Ausschnitt (A) zeigt die beiden Positionen 186 und 210 und Ausschnitt (B) zeigt die Position 318 (Nummerierung in der Consensus-Sequenz). Die identischen Aminosäuren sind in der Abbildung transparent dargestellt, während die Positionen, in denen sich die Sequenzen unterscheiden, schwarz hervorgehoben sind. Die Darstellung wurde mit dem Programm Geneious Pro 5.5.6 erstellt.

Basierend auf bekannten Kristallstrukturen von Glykosyltransferasen wurde die 3D-Struktur der aktiven Enzyme VvGT7a-c und der inaktiven Proteine VvGT7i und j über sogenanntes „Homology Modeling“ berechnet. In die errechnete Struktur von VvGT7c konnten dann die beiden Substrate Nerol und UDP-Glukose integriert werden. Diese Analysen wurden von Geoffrey Behrens an der Universität Greifswald mit der Strukturanalyse-Software YASARA durchgeführt. Anhand der 3D-Struktur zeigte sich, dass die drei relevanten Aminosäurepositionen nicht in direkter Nähe (Abstand $\leq 5 \text{ \AA}$) zum aktiven Zentrum und den gebundenen Substraten lokalisiert sind (Abbildung 26).

Während die Aminosäuren 186 und 210 in der N-terminalen Domäne, die für die Bindung des Akzeptormoleküls verantwortlich ist, vorliegen, befindet sich die Aminosäure 318 in einer Domäne, die eine Schleifen-Struktur, einen sogenannten „loop“, bildet. Dieser loop gehört zu der C-terminalen Domäne des Proteins und ist am äußeren Eingangsbereich des aktiven Zentrums lokalisiert.

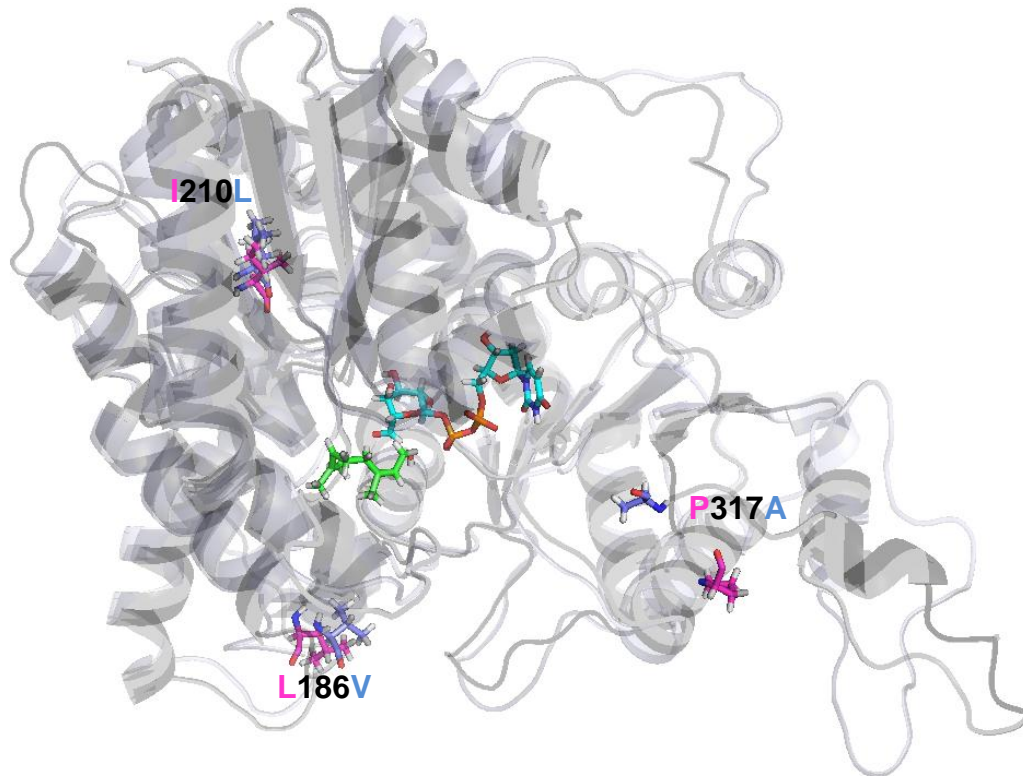




Abbildung 26: Alignment der dreidimensionalen Strukturen von VvGT7b und VvGT7i (Cartoon-Darstellung). Die drei Aminosäuren, die die aktiven (pink) Glykosyltransferasen von den nicht-aktiven (blau) Enzymen unterscheidet, sind als Stäbe dargestellt. Außerdem sind die beiden Substrate Nerol (grün) und UDP-Glucose (türkis) zu erkennen. Die Nummerierung der Aminosäurereste bezieht sich auf die Consensus-Sequenz.


Die *in silico* Berechnung möglicher intramolekularer Interaktionen dieser drei Positionen mithilfe des RING-Webservers (<http://protein.bio.unipd.it/ring/>) ergab, dass diese Aminosäuren keine direkten Einflüsse auf das aktive Zentrum ausüben sollten. Um die Effekte dieser Aminosäuren auf die Aktivität des Enzyms *in vitro* zu analysieren, wurden die Aminosäuren der inaktiven Enzymvarianten in die der aktiven Proteine mutiert. Aufgrund der Information über die putative Struktur und der generellen Eigenschaften der verschiedenen Aminosäuren, wurde zunächst die Consensus-Position 318 mutiert. Hierbei wurde das Gencodon so verändert, dass anstelle eines Alanins ein Prolin translatiert wurde. Der Austausch dieser Aminosäure ergab jedoch keine Veränderung der Aktivität sowohl für VvGT7i-A317P als auch für VvGT7j-A317P (Tabelle 7). Anschließend wurden ausgehend von den Einfachmutanten die Doppelmutanten VvGT7i-L210I-A317P und VvGT7i-V186L-A317P bzw. VvGT7j-L210I-A317P und VvGT7j-V186L-A317P konstruiert und exprimiert. Hierbei zeigte sich, dass die jeweiligen Doppelmutanten von VvGT7i eine vergleichbare Umsetzung von Nerol und Citronellol aufwiesen und die Doppelmutanten von VvGT7j eine Aktivität gegenüber Nerol zeigten. Die Veränderung der dritten Position resultierte bei VvGT7i in einer Tripelmutante, die eine vergleichbare Aktivität gegenüber den getesteten Substraten aufwies wie VvGT7a und VvGT7f (Tabelle 5). Nerol konnte als präferiertes Substrat nachgewiesen werden. Zudem wurden Citronellol, Geraniol, Eugenol, Benzylalkohol, Hexanol und *trans* 2-Hexenol als Substrate akzeptiert. Die Tripelmutante VvGT7j-V186L-L210I-A317P konnte ebenfalls Nerol, Citronellol, Eugenol und Benzylalkohol glukosylieren und akzeptierte zusätzlich Kämpferol, Quercetin und 3-Methyl-2-butenol. Generell war die Gesamtaktivität

der VvGT7j-Tripelmutante geringer als die der aktiven Proteinvarianten und der Dreifachmutante VvGT7i-V186L-L210I-A317P.

Tabelle 7: Relative spezifischen Aktivitäten der VvGT7i- und VvGT7j-Mutanten gegenüber den getesteten Substraten. Der Standardreaktionsassay bestand aus UDP-[U-¹⁴C]Glukose, dem jeweiligen Substrat und 15 µg aufgereinigten Enzym. Es wurde Tris HCl (100 mM mit 10 mM β-Mercaptoethanol) mit einem pH von 8,0 verwendet. Die Inkubation erfolgte für 18,5 Stunden bei 30 °C. Die relative spezifische Aktivität [%] bezieht sich auf die höchste spezifische Aktivität, die beim Umsatz von Nerol durch VvGT7g ermittelt wurde. Die Standardabweichungen sind dem Anhang (Tabelle 26) zu entnehmen.

	VvGT7g	VvGT7i	VvGT7i-A317P	VvGT7i-L210I-A317P	VvGT7i-V186L-A317P	VvGT7i-V186L-L210I-A317P	VvGT7j	VvGT7j-A317P	VvGT7j-L210I-A317P	VvGT7j-V186L-A317P	VvGT7j-V186L-L210I-A317P
Citronellol	45	0	1	14	13	48	0	0	0	0	20
Geraniol	32	0	0	4	4	19	0	0	0	0	0
8-Hydroxylinalool	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Linalool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nerol	100	4	0	22	22	78	0	0	5	5	27
Terpineol	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Cyanidin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kämpferol	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	20
Pelargonidin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Quercetin	9	0	0	0	0	4	0	0	0	0	8
Benzylalkohol	19	0	4	4	4	10	0	6	0	0	9
Phenylethanol	20	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Eugenol	40	10	6	10	12	12	0	0	0	0	13
Farnesol	0	0	3	0	0	0	0	4	0	0	3
Hexanol	6	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
Oktanol	6	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Mandelonitril	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-Methyl-2-butenol	6	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5
3-Methyl-3-butenol	3	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0
cis 3-Hexenol	8	0	0	0	1	4	0	0	0	0	0
trans 2-Hexenol	11	0	0	1	0	6	0	0	0	0	0

 : 5-10 %
 : 11-50 %

 : 51-80 %
 : > 80 %

3.4.7 Untersuchung der *in vivo* Aktivität mittels Aglykaextrakt

Um putative *in vivo* Substrate zu identifizieren, wurde ein Aglykaextrakt aus den Rebsorten Gelber Muskateller FR 90 (später Erntetermin) und Roter Traminer 11-18 Gm (früher und später Erntetermin) hergestellt (zur Verfügung gestellt von Sarah Stanitzek, Universität Bonn) und mit dem Enzym inkubiert. Aufgrund der vergleichbaren Substratpräferenz der aktiven Proteinvarianten und der kinetischen Daten von VvGT7a-c wurde die Umsetzung nur mit dem Enzym VvGT7b durchgeführt. Für die Reaktion ist zum einen UDP-[U-¹⁴C]Glukose und zum anderen nicht-markierte UDP-Glukose verwendet worden. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte unter idealen Bedingungen über

Nacht. Als Positivkontrolle wurden Reaktionsansätze mit Geraniol verwendet. Die Analyse der Proben mit UDP-[U-¹⁴C]Glukose erfolgte mittels Flüssigkeits-szintillationsmessung und Dünnschichtchromatographie. Anhand der Positivkontrollen mit Geraniol konnte die generelle Aktivität von VvGT7b bestätigt werden. Es zeigte sich, dass bei dem Reaktionsansatz mit dem Aglykaextrakt vom Gelben Muskateller FR 90 mittels Flüssigkeitsszintillationsmessung Aktivität nachgewiesen werden konnte und zwei Produktflecke mittels Dünnschichtchromatographie detektiert wurden, die nicht dem Geranylglukosid entsprachen. Dagegen konnte bei den Reaktionsansätzen mit dem Extrakt aus dem Roten Traminer 11-18 Gm (früher und später Erntetermin) weder mithilfe der Flüssigkeits-szintillationsmessung noch mittels Dünnschichtchromatographie Aktivität oder Produkte gemessen oder visualisiert werden (Abbildung 27). Die Identifizierung der Produkte bei dem Umsatz des Aglykaextrakts vom Gelben Muskateller FR 90 soll in einem Nachfolgeprojekt durchgeführt werden.

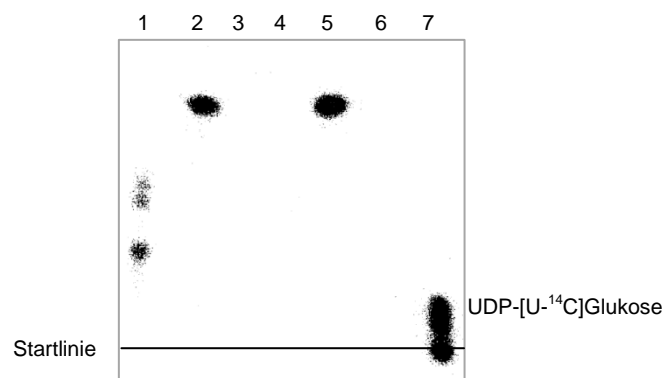


Abbildung 27: Dünnschichtchromatographie der Umsetzung der Aglykaextrakte aus dem Gelben Muskateller FR 90 und dem Roten Traminer 11-18 Gm (später Erntetermin) sowie Geraniol mit VvGT7b. Aglykaextrakte oder Geraniol wurden mit Hilfe von affinitätsgereinigten VvGT7b Protein und UDP-[U-¹⁴C]Glukose glukosyliert, die Produkte mittels Ethylacetat extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mittels Autoradiographen über vier Stunden. (1) VvGT7b mit Aglykaextrakt aus dem Gelben Muskateller FR 90, (2) VvGT7b mit Geraniol, (3) Leerkontrolle ohne Substrate, (4) VvGT7b mit Aglykaextrakt aus dem Roten Traminer 11-18 Gm, (5) VvGT7b mit Geraniol, (6) Leerkontrolle ohne Substrat und (7) UDP-[U-¹⁴C]Glukose. Die Flüssigkeitsszintillationsmessung des Enzymassays von VvGT7b mit dem Extrakt des Roten Traminer 11-18 Gm (früher Erntezeitpunkt) konnte keinen Umsatz nachweisen, so dass von diesem Ansatz keine dünnschichtchromatographische Untersuchung durchgeführt wurde.

3.5 Expression und Untersuchung putativer Glykosyltransferasen aus Gruppe G

3.5.1 Expression und Nachweis der rekombinanten Proteine

Die Gene *VvGT14* und *VvGT16* wurden phylogenetisch der Gruppe G zugeordnet. In den untersuchten Traubensorten Roter Traminer 11-18 Gm und Weißer Riesling 239-34 Gm konnten drei Proteinvarianten von *VvGT14* und eine von *VvGT16* identifiziert werden (Frotscher, 2013) (Tabelle 8).

Tabelle 8: Übersicht der Aminosäureunterschiede der Proteinvarianten, die für *VvGT14* in zwei Rebsorten identifiziert werden konnten (Alignment im Anhang (Abbildung 66)).

	VvGT14a	VvGT14b
VvGT14b	1	
VvGT14c	21	22

Die Gene wurden in den Expressionsvektor pGEX-4T-1 kloniert. Die Expression als Fusionsprotein mit einem N-terminalen GST-Tag wurde mithilfe von SDS-PAGE und Immunodetektion nachgewiesen. Die GST-assoziierten Proteine VvGT14a-c (Abbildung 28, 29) und VvGT16 besitzen eine Größe von ca. 81 kDa und konnten über den GST-Tag partiell aufgereinigt werden. Bei VvGT16 zeigte sich in der Elutionsfraktion eine dominierende Bande mit einer Proteingröße, die dem Protein ohne GST-Tag entspricht (Abbildung 30).

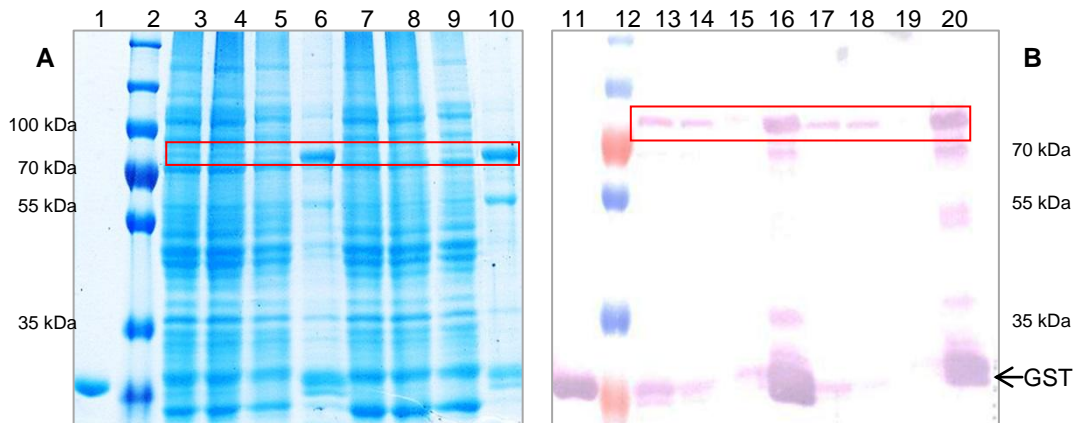


Abbildung 28: SDS-PAGE (Coomassie-gefärbt) (A) und Immunodetektion (B) der GST-Fusionsproteine VvGT14b und c. Der Proteinrohextrakt sowie die einzelnen Fraktionen der Aufreinigung wurden auf die Expression des Zielproteins untersucht. Die Spuren 1 bis 20 beinhalten folgende Proben: (1) (11) Leervektor Elutionsfraktion, (2) (12) Größenstandard, (3) (13) VvGT14b Proteinrohextrakt, (4) (14) VvGT14b Durchfluss, (5) (15), VvGT14b Waschfraktion, (6) (16) VvGT14b Elutionsfraktion, (7) (17) VvGT14c Proteinrohextrakt, (8) (18) VvGT14c Durchfluss, (9) (19) VvGT14c Waschfraktion, (10) (20) VvGT14c Elutionsfraktion. Die roten Rechtecke markieren die exprimierten GST-VvGT14b und c-Fusionsproteine im Polyacrylamidgel und Western Blot.

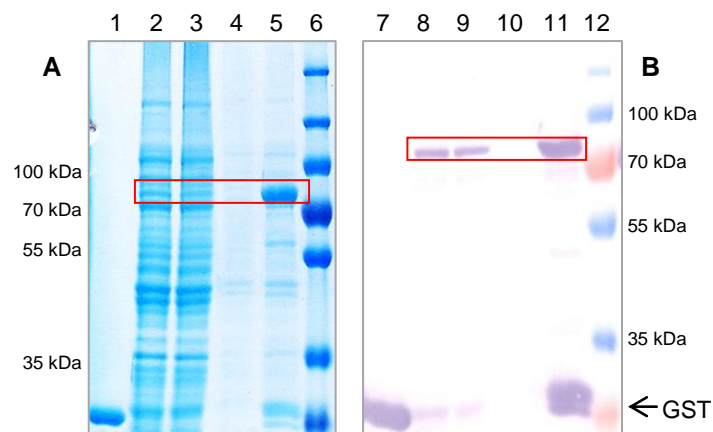


Abbildung 29: SDS-PAGE (Coomassie-gefärbt) (A) und Immunodetektion (B) des GST-Fusionsproteins VvGT14a. Die Expression der GST-UGT konnte mittels SDS-PAGE und immunospezifischer Detektion visualisiert und nachgewiesen werden. Es wurden folgende Proben aufgetragen: (1) (7) Leervektor Elutionsfraktion, (2) (8) VvGT14a Proteinrohextrakt, (3) (9) VvGT14a Durchfluss, (4) (10) VvGT14a Waschfraktion, (5) (11), VvGT14a Elutionsfraktion, (6) (12) Größenstandard. Die roten Rechtecke markieren das exprimierte GST-VvGT14a-Fusionsprotein im Polyacrylamidgel und Western Blot.

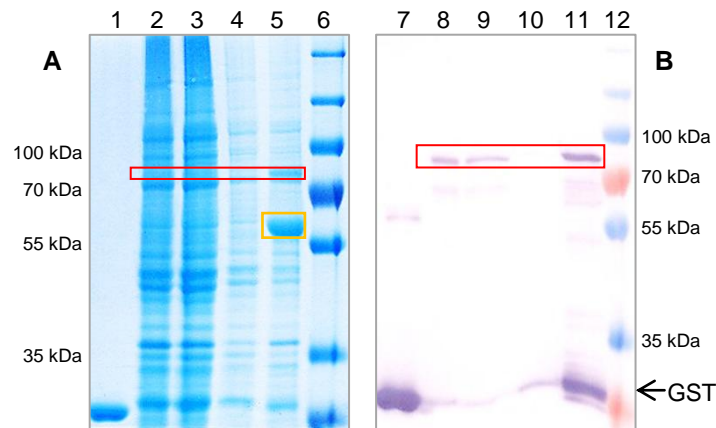


Abbildung 30: SDS-PAGE (Coomassie-gefärbt) (A) und Immunodetektion (B) des GST-Fusionsproteins VvGT16. Die Expression des GST-gekoppelten Proteins VvGT16 wurde mithilfe von SDS-PAGE und immunospezifischer Detektion verifiziert. Hierbei wurden folgende Proben verwendet: (1) (7) Leervektor Elutionsfraktion, (2) (8) VvGT16 Proteinrohextrakt, (3) (9) VvGT16 Durchfluss, (4) (10) VvGT16 Waschfraktion, (5) (11), VvGT16 Elutionsfraktion, (6) (12) Größenstandard. Die roten Rechtecke markieren das exprimierte GST-VvGT16-Fusionsprotein im Polyacrylamidgel und Western Blot. Das orangene Rechteck markiert VvGT16 ohne GST-Tag.

3.5.2 Substratpräferenz der rekombinanten Proteine *in vitro*

Die Bestimmung des Umsatzes der putativen Substrate wurde mit den aufgereinigten GST-Fusionsproteinen durchgeführt. Die Messung der Enzymaktivität zeigte, dass VvGT14a alle Substrate außer den Flavonoiden (Cyanidin, Kämpferol, Pelargonidin und Quercetin) glukosylierte. VvGT14b konnte die Terpene Citronellol, Geraniol und Linalool sowie Mandelonitril in sehr geringen Mengen umsetzen. Die Proteinvariante VvGT14c wies keine Aktivität auf (Abbildung 31). Die Bestimmung der Enantiopräferenz von VvGT14a bei der Umsetzung von Citronellol erfolgte durch den Einsatz von enantiomerenreinem (*S*)- und (*R*)-Citronellol (Abbildung 32). VvGT14a glukosyliert beide Enantiomere mit annähernd gleicher Effizienz. Auch für Linalool konnte kein bevorzugter Umsatz eines Enantiomers nachgewiesen werden. Die Messung erfolgte mittels GC-MS an der Universität Bonn durch Sarah Stanitzek im AK Prof. Wüst.

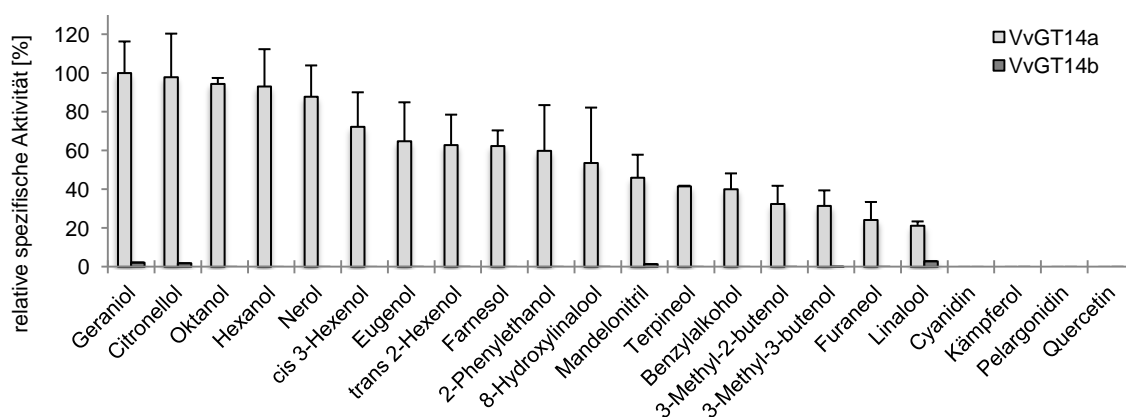


Abbildung 31: Relative spezifische Aktivitäten unterschiedlicher putativer Substrate von VvGT14a und b. Die rekombinanten Fusionsproteine wurden mit dem Akzeptormolekül und UDP-[U-¹⁴C]Glukose bei 30 °C und pH 8,5 (100 mM Tris HCl Puffer mit 10 mM β -Mercaptoethanol) für 1,5 Stunden inkubiert. Die Enzymvariante VvGT14c war nicht aktiv gegenüber den getesteten Substraten und wird deshalb nicht aufgeführt. Die relative spezifische Aktivität [%] bezieht sich auf die höchste spezifische Aktivität, die beim Umsatz von Geraniol durch VvGT14a ermittelt wurde.

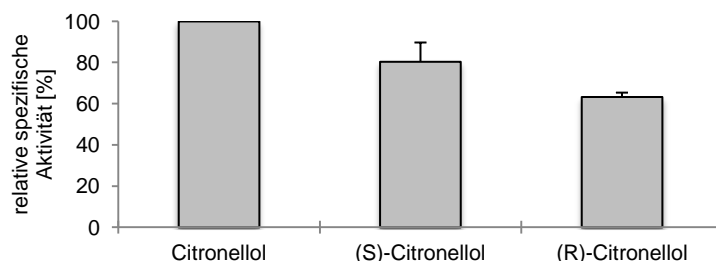


Abbildung 32: Relative spezifische Aktivitäten der verschiedenen Enantiomere von Citronellol VvGT14a. Die rekombinanten Fusionsproteine wurden mit dem Akzeptormolekül und UDP-[U-¹⁴C]Glukose inkubiert. Die relative spezifische Aktivität [%] bezieht sich auf die höchste spezifische Aktivität, die beim Umsatz von racemischen Citronellol durch VvGT14a gemessen wurde.

VvGT16 glukosyliert neben Benzylalkohol und Phenylethanol auch die Terpene Citronellol, Geraniol und Nerol sowie die kurzkettigen Monoalkohole Hexanol, 3-Methyl-2-butenol, *cis* 3-Hexenol und *trans* 2-Hexenol. Die Terpene 8-Hydroxylinalool, Terpeneol und Linalool, die Flavonoide Cyanidin, Kämpferol, Pelargonidin und Quercetin sowie die Monoalkohole Eugenol, Farnesol, Oktanol, Mandelonitril, 3-Methyl-3-butenol und Furaneol werden nicht als Substrate akzeptiert (Abbildung 33). Die Bestimmung der Enantiopräferenz bei der Umsetzung von enantiomerenreinem (S)- und (R)-Citronellol ergab keine bevorzugte Umsetzung eines Enantiomers (Abbildung 34).

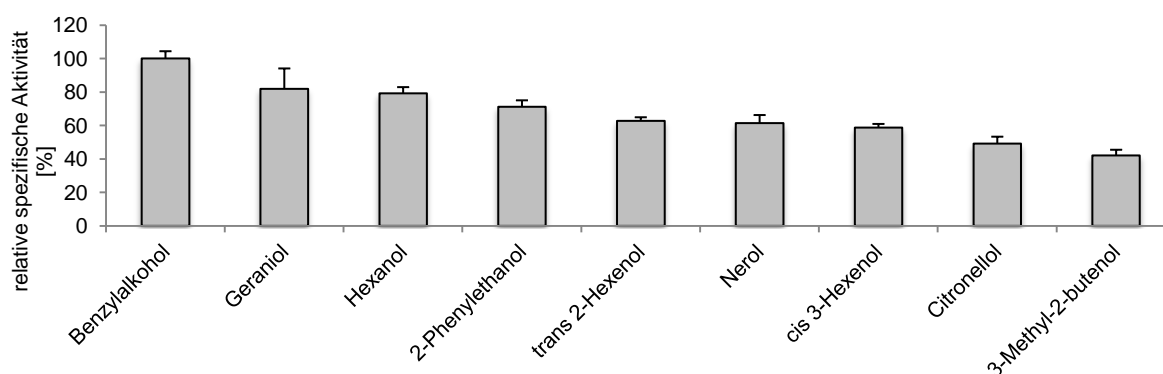


Abbildung 33: Relative spezifische Aktivitäten unterschiedlicher putativer Substrate von VvGT16. Das rekombinante Fusionsprotein wurde mit dem Akzeptormolekül und UDP-[U-¹⁴C]Glukose bei 30 °C und pH 8,5 (100 mM Tris HCl Puffer mit 10 mM β -Mercaptoethanol) für 4 Stunden inkubiert. Die relative spezifische Aktivität [%] bezieht sich auf die höchste spezifische Aktivität, die beim Umsatz von Benzylalkohol durch VvGT16 ermittelt wurde. Nerol, *cis* 3-Hexenol, Citronellol, 3-Methyl-2-butenol, 8-Hydroxylinalool, Linalool, α -Terpeneol, Cyanidin, Kämpferol, Pelargonidin, Quercetin, Eugenol, Farnesol, Oktanol, Mandelonitril, 3-Methyl-3-butenol und Furaneol wurden nicht als Substrate akzeptiert.

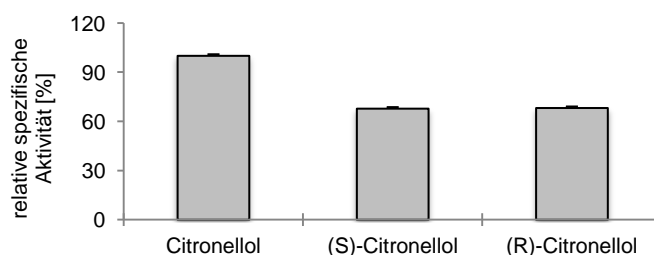


Abbildung 34: Relative spezifische Aktivitäten der verschiedenen Enantiomere von Citronellol VvGT16. Die rekombinanten Fusionsproteine wurden mit den Enantiomeren von Citronellol und UDP-[U-¹⁴C]Glukose inkubiert. Die relative spezifische Aktivität [%] bezieht sich auf die höchste spezifische Aktivität, die beim Umsatz von racemischen Citronellol durch VvGT16 gemessen wurde.

3.5.3 Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen

Aufgrund der nur marginal nachweisbaren Aktivität von VvGT14b im Vergleich zu VvGT14a ist die Optimierung der Reaktionsbedingungen sowie die weitere Charakterisierung nur für VvGT14a durchgeführt worden. Die Menge des aufgereinigten Proteins wurde hierfür auf 0,1 μg und die Inkubationszeit auf 1,5 Stunden festgelegt. Als Substrat wurde Geraniol verwendet. Die höchste Produktbildung konnte bei einem pH von 8,5 (100 mM Tris HCl Puffer mit 10 mM β -Mercaptoethanol) und einer Temperatur von 30 $^{\circ}\text{C}$ nachgewiesen werden. Die Bildung von Geranylglukosid war für mindestens 2 Stunden linear (Abbildung 35). Die optimalen Reaktionsbedingungen von VvGT16 wurden unter der Verwendung von Geraniol als bevorzugtes Terpenol und UDP-[U- ^{14}C]Glukose bestimmt. Hierfür wurden 5 μg aufgereinigtes Protein verwendet. Die Inkubationszeit der Reaktionsansätze betrug 4 Stunden. Die Bildung von Geranylglukosid war bei einem pH von 8,5 in Tris HCl Puffer (100 mM mit 10 mM β -Mercaptoethanol) bei 30 $^{\circ}\text{C}$ maximal. Die gebildete Menge an Produkt war für mindestens 5 Stunden linear (Abbildung 36).

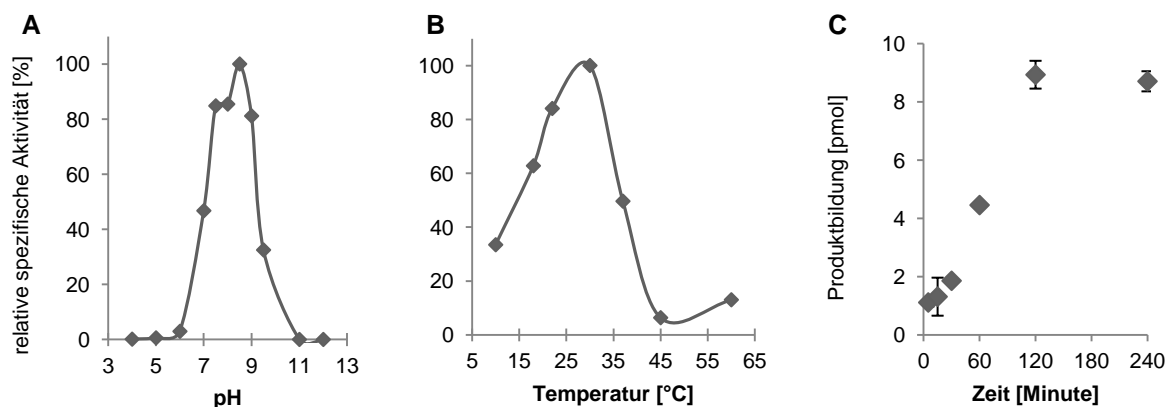


Abbildung 35: Optimierung der Reaktionsbedingungen von VvGT14a mit dem Substrat Geraniol und UDP-[U- ^{14}C] Glukose. A Einfluss des pH-Wertes auf die Bildung von Geranylglukosid bei einer Inkubationstemperatur von 30 $^{\circ}\text{C}$ und einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden. B Einfluss der Temperatur auf die Bildung von Geranylglukosid bei einem pH-Wert von 8,5 (100 mM Tris HCl mit 10 mM β -Mercaptoethanol) und einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden. C Einfluss der Inkubationszeit auf die Produktbildung. Die Produktbildung war bis mindestens 2 Stunden linear.

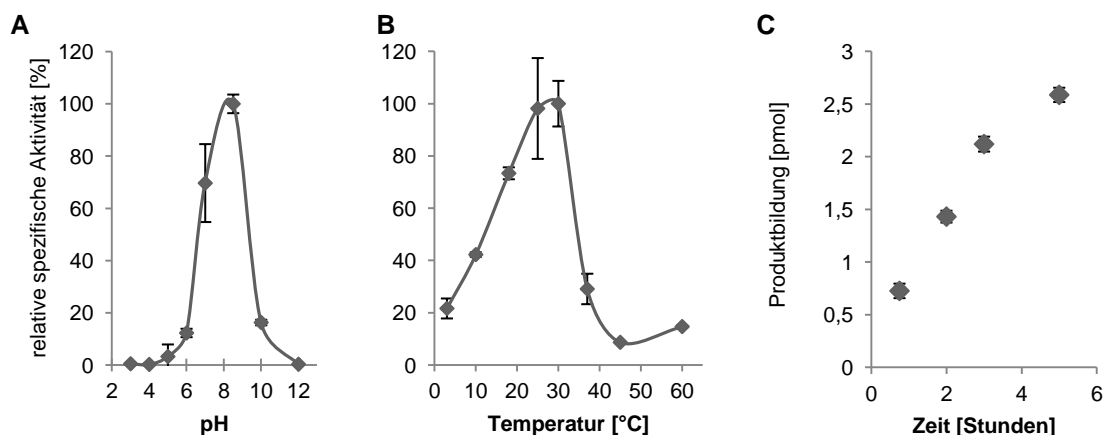


Abbildung 36: Optimierung der Reaktionsbedingungen von VvGT16 mit dem Substrat Geraniol und UDP-[U- ^{14}C] Glukose. A Einfluss des pH-Wertes auf die Bildung von Geranylglukosid bei einer Inkubationstemperatur von 30 $^{\circ}\text{C}$ und einer Inkubationszeit von 4 Stunden. B Einfluss der Temperatur auf die Bildung von Geranylglukosid bei einem pH-Wert von 8,5 (100 mM Tris HCl mit 10 mM β -Mercaptoethanol) und einer Inkubationszeit von 4 Stunden. C Einfluss der Inkubationszeit auf die Produktbildung. Die Produktbildung war bis mindestens 5 Stunden linear.

3.5.4 Nachweis der Terpenglukoside mittels Dünnschichtchromatographie

Mithilfe der Dünnschichtchromatographie konnte die Bildung der Terpenglukoside nachgewiesen werden. Die entstandenen Produkte wurden im Gegensatz zu der hydrophilen UDP-[U-¹⁴C]Glukose entlang der Lösungsmittelfront transportiert. Die Detektion erfolgte mit einem Autoradiographen über eine Dauer von vier Stunden.

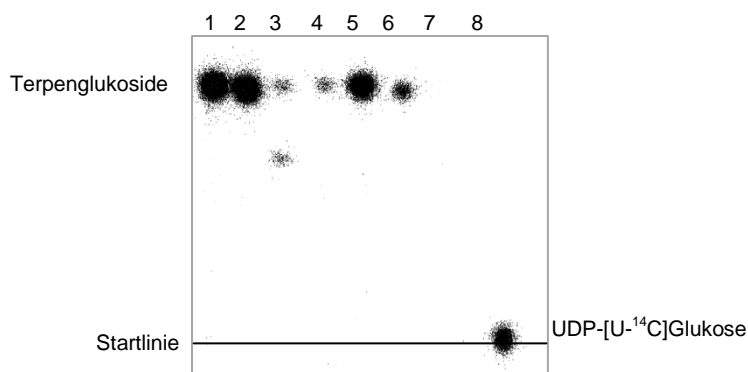


Abbildung 37: Dünnschichtchromatographie der Umsetzung der fünf getesteten Terpene mit VvGT14a. Verschiedene Terpene wurden mit Hilfe von affinitätsgereinigten VvGT14a Protein und UDP-[U-¹⁴C]Glukose glukosyliert, die Glukoside mittels Ethylacetat extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die Radioaktivität wurde mittels Autoradiographen über vier Stunden gemessen. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte mit 0,1 µg aufgereinigtem Enzym bei 30 °C in Tris HCl Puffer (100 mM mit 10 mM β-Mercaptoethanol) für 18,5 Stunden. VvGT14a mit (1) Citronellol (2) Geraniol, (3) 8-Hydroxylinalool, (4) Linalool, (5) Nerol, (6) Terpeneol, (7) Leerkontrolle ohne Akzeptormolekül und (8) UDP-[U-¹⁴C]Glukose.

Die Glukosidbildung bei der Umsetzung mit VvGT14a konnte chromatographisch bestätigt werden (Abbildung 37). Hierbei zeigten sich bei allen sechs getesteten Terpenen Produktflecke. Die Umsetzung von 8-Hydroxylinalool lieferte zwei Produkte was auf eine zweifache Glukosylierung des Diols hinweist. Die Migration der Terpenglukoside ist aufgrund der vergleichbaren chemischen Eigenschaften sehr ähnlich. Die vergleichende Auftragung des radioaktiv markierten Donormoleküls zeigte, dass keine UDP-[U-¹⁴C]Glukose in die organische Phase extrahiert wurde (Abbildung 37). Die Bildung der Terpenglukoside wurde weiterhin vom Kooperationspartner (Sarah Stanitzek, Universität Bonn) mittels LC-MS/MS Analyse bestätigt.

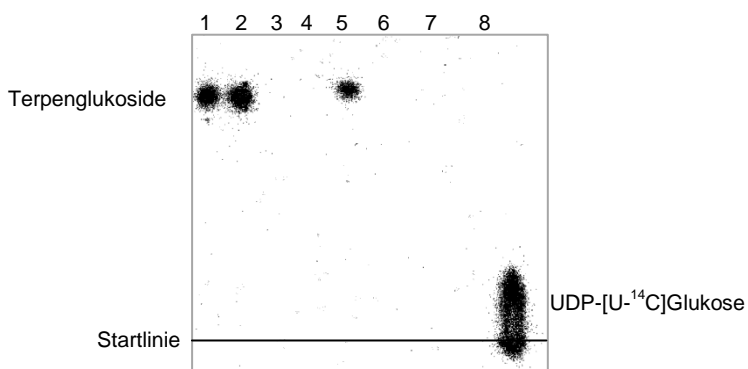


Abbildung 38: Dünnschichtchromatographie der Umsetzung der verwendeten Terpene mit VvGT16. Verschiedene Terpene wurden mit Hilfe von affinitätsgereinigten VvGT16 Protein und UDP-[U-¹⁴C]Glukose glukosyliert, die Glukoside mittels Ethylacetat extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mittels Autoradiographen über vier Stunden. Die Inkubation der Reaktionsansätze wurde mit 5 µg aufgereinigtem Enzym bei 30 °C in Tris HCl Puffer (100 mM mit 10 mM β-Mercaptoethanol) für 18,5 Stunden durchgeführt. VvGT16 mit (1) Citronellol (2) Geraniol, (3) 8-Hydroxylinalool, (4) Linalool, (5) Nerol, (6) Terpeneol, (7) Leerkontrolle ohne Akzeptormolekül und (8) UDP-[U-¹⁴C]Glukose.

Die Bildung von Citronellyl-, Geranyl- und Nerylglukosid bei der Umsetzung mit VvGT16 konnte mithilfe der Dünnschichtchromatographie gezeigt werden (Abbildung 38). Die Produktflecke wiesen ähnliche R_f -Werte auf. Eine Übertragung von UDP-[U- 14 C]Glukose bei der Extraktion in die organische Phase konnte ausgeschlossen werden (Abbildung 38).

3.5.5 Bestimmung der kinetischen Daten von VvGT14a und VvGT16

Die kinetischen Daten von VvGT14a wurden für die sechs Akzeptormoleküle Geraniol, Citronellol, Nerol, Linalool, α -Terpineol und 8-Hydroxylinalool mit festgesetzter UDP-Glukose-Konzentration (0,1 mM UDP-Glukose) und für UDP-Glukose mit konstanter Geraniol-Konzentration (0,1 mM Geraniol) bestimmt.

K_M und k_{cat} sind mit 9 μ M und 0,02 sec^{-1} für Citronellol und Geraniol gleichwertig (Tabelle 9). Dies korreliert mit den Daten der Substratpräferenz, bei der sich die spezifischen Aktivitäten beider Substrate nur geringfügig unterscheiden. Bei der Umsetzung von Nerol ergeben sich ebenfalls vergleichbare kinetische Daten ($K_M = 10 \mu\text{M}$, $k_{cat} = 0,02 \text{sec}^{-1}$). Die K_M -Werte von 8-Hydroxylinalool, α -Terpineol und Linalool bewegen sich in einem Bereich von 30 bis 50 μ M und sind somit drei- bis fünfmal größer als von Nerol, Geraniol und Citronellol. Die Wechselzahlen der Akzeptormoleküle 8-Hydroxylinalool, α -Terpineol und Linalool sind dementsprechend 10- bzw. 100-mal kleiner als die der anderen drei Substrate. Die kinetischen Daten, die für die Umsetzung von UDP-Glukose ermittelt wurden, liegen für k_{cat} mit 0,03 sec^{-1} im Bereich von Geraniol, Nerol und Citronellol, während K_M mit 16 μ M etwa doppelt so groß ist als die der bevorzugten Akzeptormoleküle (Tabelle 9).

Tabelle 9: Übersicht der kinetischen Daten von VvGT14a. Die kinetischen Daten für die Akzeptormoleküle Geraniol, Citronellol, Nerol, 8-Hydroxylinalool, α -Terpineol und Linalool wurden bei konstanter UDP-Glukose-Konzentration (0,1 mM) unter optimalen Bedingungen ermittelt. Die Daten für die UDP-Glukose wurden bei konstanter Geraniol-Konzentration (0,1 mM) unter optimalen Bedingungen bestimmt. Die Auswertung erfolgte mittels der Solver-Funktion mit Office Excel, Lineweaver-Burk und Hanes-Woolf.

Substrat	K_M [μ M]	k_{cat} [1/sec]	k_{cat}/K_M [1/(sec*mM)]
Citronellol (rac)	9 \pm 0,3	0,02	2,5
Geraniol	9 \pm 1,2	0,02	2,6
Nerol	10 \pm 0,7	0,02	2,0
8-Hydroxylinalool	48 \pm 2,0	0,002	0,03
α -Terpineol	33 \pm 4,4	0,003	0,1
Linalool (rac)	47 \pm 0,1	0,0003	0,01
UDP-Glukose	16 \pm 0,03	0,03	1,6

VvGT16 konnte ebenfalls Geraniol, Nerol und Citronellol als Akzeptormolekül umsetzen. Die Bestimmung der kinetischen Daten für diese Substrate erfolgte bei konstanter UDP-Glukose-Konzentration (0,5 mM). Während der K_M -Wert von Geraniol 355 μ M beträgt, sind die K_M -Werte von Citronellol und Nerol mit 110 μ M nur 1/3 so groß (Tabelle 10). Der Unterschied spiegelt sich auch in der Wechselzahl der drei Akzeptormoleküle wider. Der k_{cat} von Geraniol ist mit einem Wert von 0,015 sec^{-1} doppelt so groß wie die k_{cat} -Werte von Nerol und Citronellol (0,009 bzw. 0,008 sec^{-1}). Die Ermittlung der kinetischen Daten der UDP-Glukose wurde bei konstanter Geraniol-Konzentration (1,25 mM) durchgeführt. Der resultierende K_M -Wert ist mit etwa 150 μ M nur geringfügig höher als die

Werte von Nerol und Citronellol. Der k_{cat} -Wert liegt mit $0,013 \text{ sec}^{-1}$ im Bereich von Geraniol (Tabelle 10).

Tabelle 10: Übersicht der kinetischen Daten von VvGT16. Die kinetischen Daten für die Akzeptormoleküle Geraniol, Citronellol und Nerol wurden bei konstanter UDP-Glukose-Konzentration (0,5 mM) bei unter optimalen Bedingungen ermittelt. Die Daten für die UDP-Glukose wurden bei konstanter Geraniol-Konzentration (1,25 mM) unter optimalen Bedingungen bestimmt. Die Auswertung erfolgte mittels der Solver-Funktion mit Office Excel, Lineweaver-Burk und Hanes-Woolf.

Substrat	K_M [μM]	k_{cat} [1/sec]	k_{cat}/K_M [1/(sec*mM)]
Citronellol (rac)	$108 \pm 2,5$	0,008	0,07
Geraniol	355 ± 14	0,015	0,04
Nerol	$118 \pm 4,7$	0,009	0,08
UDP-Glukose	149 ± 10	0,013	0,09

Der Vergleich der kinetischen Daten der beiden Enzyme aus der Gruppe G zeigt, dass die Enzyme VvGT14a und VvGT16 eine vergleichbare Wechselzahl für Geraniol als präferiertes Substrat mit etwa $0,02 \text{ sec}^{-1}$ besitzen, sich jedoch die K_M -Werte um den Faktor 40 unterscheiden. Generell liegen die K_M -Werte von VvGT16 in einem 2- bis 40-fach höherem Konzentrationsbereich als bei VvGT14a.

Bei dem Vergleich der Enzyme aus der den phylogenetischen Gruppen E und G zeigt sich, dass die katalytische Effizienz von VvGT7 deutlich niedriger ist als die von VvGT14a und VvGT16. Interessanterweise präferieren jedoch alle drei Enzyme die strukturell sehr ähnlichen Monoalkohole Nerol, Geraniol und Citronellol als Akzeptormolekül, während die Terpenole α -Terpineol, Linalool und 8-Hydroxylinalool nur von VvGT14a umgesetzt werden.

3.5.6 Untersuchung der *in vivo* Aktivität mittels Aglykaextrakt

Die aufgereinigten Enzyme VvGT14a und VvGT16 wurden mit Aglykaextrakt aus dem Roten Traminer 11-18 Gm (früher und später Erntetermin; zur Verfügung gestellt von Sarah Stanitzek, Universität Bonn) unter idealen Bedingungen über Nacht inkubiert. Zusätzlich wurde VvGT16, welche besonders in den Blüten exprimiert wird, mit einem Aglykaextrakt, der aus Blüten des Roten Traminer 11-18 Gm gewonnen wurde, inkubiert. Die Reaktion wurde zum einen mit UDP-[U- ^{14}C]Glukose und zum anderen mit nicht-markierter UDP-Glukose durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden Reaktionsansätze mit Geraniol verwendet. Die Analyse der Proben mit UDP-[U- ^{14}C]Glukose erfolgte über Flüssigkeitsszintillationsmessung und Dünnschichtchromatographie (Abbildung 39). Anhand der Positivkontrollen mit Geraniol konnte die generelle Aktivität der beiden Enzyme bestätigt werden. Die Messungen der Radioaktivität mittels Flüssigkeitsszintillationsmessung sowie Dünnschichtchromatographie ergaben eine Produktbildung bei der Inkubation von VvGT14a mit dem Aglykaextrakt. Die Migrationsweite dieses radioaktiv markierten Produktes und des Geranylglukosids waren vergleichbar. Die Untersuchung des entsprechenden Reaktionsansatzes mit nicht-markierter UDP-Glukose an der Universität Bonn konnte neben der Bildung des Geranylglukosids auch die Glukosylierung von Nerol und Citronellol nachweisen.

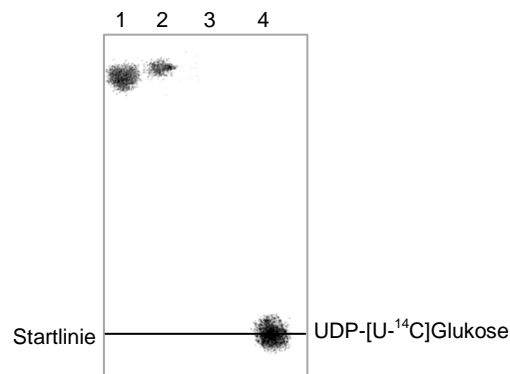


Abbildung 39: Dünnschichtchromatographie der Umsetzung der Aglykaextrakte aus dem Roten Traminer 11-18 Gm (früher Erntetermin) sowie Geraniol mit VvGT14a. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mittels Autoradiographen über vier Stunden. (1) VvGT14a mit Aglykaextrakt aus dem Roten Traminer 11-18 Gm (früher Erntetermin), (2) VvGT14a mit Geraniol, (3) Leerkontrolle ohne Substrate und (4) UDP-[U-¹⁴C]Glukose. Die Umsetzung des Aglykaextrakts zum frühen und späten Erntetermin ergaben die gleichen Ergebnisse, so dass nur der Umsatz des frühen Erntezeitpunktes gezeigt wird.

Die Analysen der Reaktionsansätze mit VvGT16 und den Extrakten aus den Beeren und den Blüten des Roten Traminer 11-18 Gm zeigten weder bei der Szintillationsmessung noch bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung (nur für den Extrakt aus dem Roten Traminer 11-18 Gm durchgeführt) eine Produktbildung (Abbildung 40).

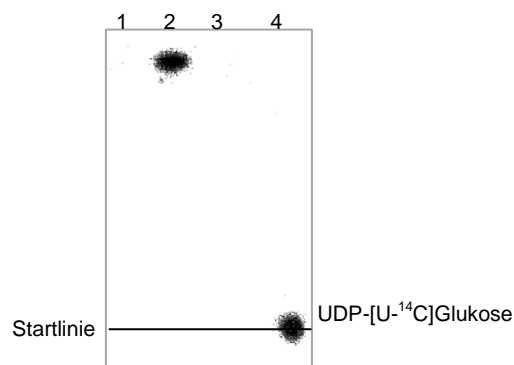


Abbildung 40: Dünnschichtchromatographie der Umsetzung der Aglykaextrakte aus dem Roten Traminer 11-18 Gm (früher und später Erntetermin) sowie Geraniol mit VvGT16. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mittels Autoradiographen über vier Stunden. (1) VvGT16 mit Aglykaextrakt aus dem Roten Traminer 11-18 Gm (früher Erntetermin), (2) VvGT16 mit Geraniol, (3) Leerkontrolle ohne Substrate und (4) UDP-[U-¹⁴C]Glukose. Weder gegenüber dem Aglykaextrakt des frühen noch des späten Erntetermins konnte Aktivität nachgewiesen werden, so dass hier nur das Ergebnis des frühen Erntetermins gezeigt wird.

3.6 Expression und Untersuchung putativer Glykosyltransferasen aus Gruppe H

3.6.1 Expression und Nachweis der rekombinanten Proteine

Das Gen *VvGT15* wurde der phylogenetischen Gruppe H zugeordnet. Insgesamt wurden in den untersuchten Sorten Roter Traminer 11-18 Gm, Gelber Muskateller FR 90 und Weißer Riesling 239-34 Gm drei Proteinvarianten identifiziert (Frotscher, 2013) (Tabelle 11).

Tabelle 11: Übersicht der Aminosäureunterschiede zwischen den identifizierten VvGT15 Proteinvarianten (Alignment im Anhang Abbildung 67).

	VvGT15a	VvGT15b
VvGT15b	4	
VvGT15c	1	5

Für die heterologe Expression wurden die Gene in den Expressionsvektor pGEX-4T-1 kloniert und in *E. coli* Zellen BL21 (DE3) pLysS als GST-Fusionsprotein exprimiert. Die Expression konnte mithilfe von SDS-PAGE und Immunodetektion verifiziert werden. Die partielle Aufreinigung der Proteine erfolgte mittels Affinitätschromatographie über den N-terminal fusionierten GST-Tag. Die GST-Fusionsproteine besaßen ein Molekulargewicht von 76 kDa. In den Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgelen konnte bereits im Gegensatz zu den Proteinen aus den anderen phylogenetischen Gruppen deutliche Expression von VvGT15 nachgewiesen werden (Abbildung 41, 42).

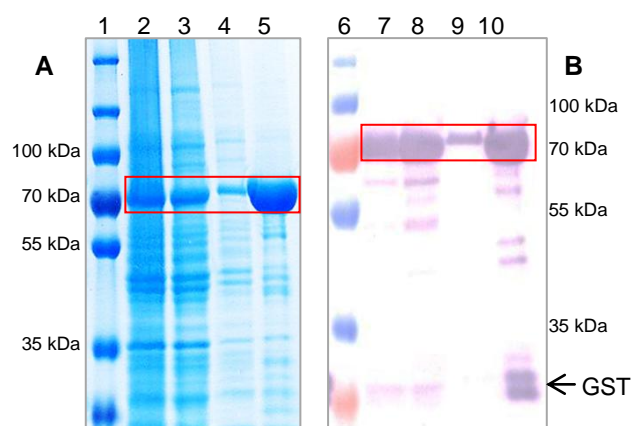


Abbildung 41: SDS-PAGE (Coomassie-gefärbt) (A) und Immunodetektion (B) des GST-Fusionsproteins VvGT15a. Der Proteinrohextrakt sowie die einzelnen Fraktionen der Proteinaufreinigung wurden auf Expression des Fusionsproteins untersucht. Es wurden folgende Proben aufgetragen: (1) (6) Größenstandard, (2) (7) VvGT15a Proteinrohextrakt, (3) (8) VvGT15a Durchfluss, (4) (9) VvGT15a Waschfraktion, (5) (10), VvGT15a Elutionsfraktion. Die roten Rechtecke markieren das exprimierte GST-VvGT15a-Fusionsprotein im Polyacrylamidgel und Western Blot.

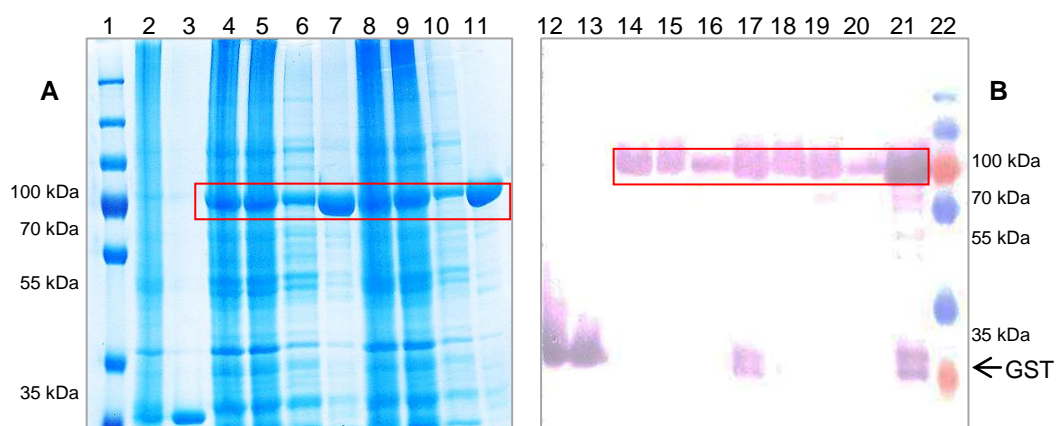


Abbildung 42: SDS-PAGE (Coomassie-gefärbt) (A) und Immunodetektion (B) der GST-Fusionsproteine VvGT15b und c. Die heterolog exprimierte Fusionsproteine wurden über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Anschließend wurde die Expression und die Aufreinigung mittels SDS-PAGE und immunospezifischer Detektion visualisiert und verifiziert. Die Proben wurden wie folgt aufgetragen: (1) (22) Größenstandard, (2) (12) Leervektor Proteinrohextrakt, (3) (13) Leervektor Elutionsfraktion, (4) (14) VvGT15b Proteinrohextrakt, (5) (15), VvGT15b Durchfluss, (6) (16) VvGT15c Waschfraktion, (7) (17) VvGT15b Elutionsfraktion, (8) (18) VvGT15c Proteinrohextrakt, (9) (19) VvGT15c Durchfluss, (10) (20) VvGT15c Waschfraktion, (11) (21) VvGT15c Elutionsfraktion. Die roten Rechtecke markieren das exprimierte GST-VvGT16-Fusionsprotein im Polyacrylamidgel und Western Blot.

3.6.2 Substratpräferenz der rekombinanten Proteine *in vitro*

Die Ermittlung der *in vitro* Substratpräferenz erfolgte mit den aufgereinigten GST-Fusionsproteinen. Die ebenfalls aufgereinigte Proteinfraction der Kultivierung von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS mit dem Leervektor pGEX-4T-1 diente als Negativkontrolle. Alle drei Proteinvarianten von VvGT15 zeigten

enzymatische Aktivität, wobei VvGT15c die Substrate am effizientesten umsetzte (Abbildung 43). Die VvGT15-Varianten glukosylierten die Terpene Geraniol, Citronellol und Nerol, Hexanol und Oktanol. Zusätzlich akzeptierten VvGT15a und c 8-Hydroxylinalool und *trans* 2-Hexenol als Substrat. VvGT15a setzte außerdem Farnesol um. Die anderen getesteten Substrate wurden nicht als Substrat akzeptiert. Die Bestimmung der Enantiopräferenz von VvGT15 bei der Umsetzung von Citronellol erfolgte durch den Einsatz von enantiomerenreinem (*S*)- und (*R*)-Citronellol. VvGT15 glukosyliert bevorzugt das (*S*)-Enantiomer (Abbildung 44).

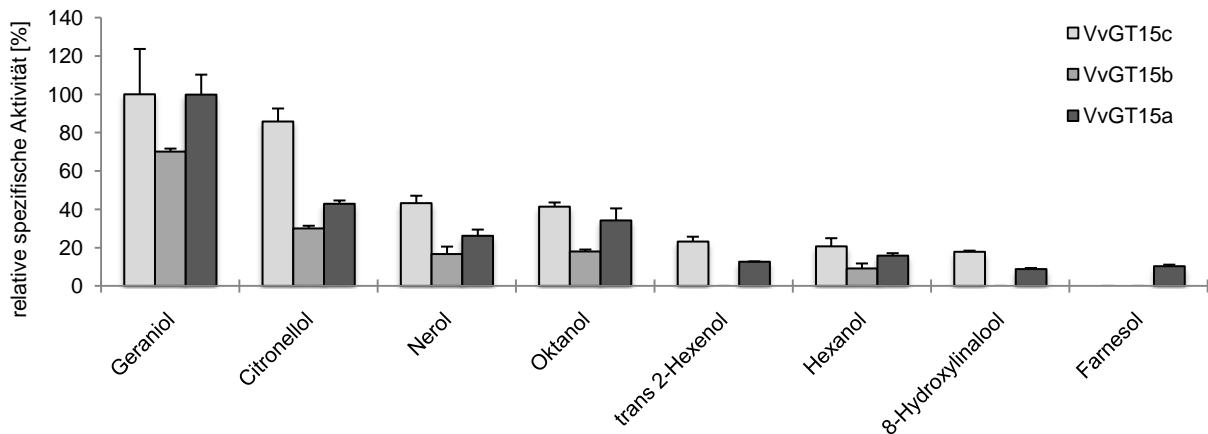


Abbildung 43: Relative spezifische Aktivitäten unterschiedlicher putativer Substrate von VvGT15a, b und c. Die rekombinanten Fusionsproteine wurden mit dem Akzeptormolekül und UDP-[U-¹⁴C]Glukose bei 30 °C und pH 7,5 (100 mM Tris HCl Puffer mit 10 mM β-Mercaptoethanol) für 20 Minuten (VvGT15a, b) oder 10 Minuten (VvGT15c) inkubiert. Die relative spezifische Aktivität bezieht sich auf die höchste spezifische Aktivität, die beim Umsatz von Geraniol durch VvGT15c ermittelt wurde. Linalool, α-Terpineol, Cyanidin, Kämpferol, Pelargonidin, Quercetin, Benzylalkohol, 2-Phenylethanol, Eugenol, Mandelonitril, 3-Methyl-2-butenol, 3-Methyl-3-butenol, *cis* 3-Hexenol und Farnesol wurden nicht glukosyliert.

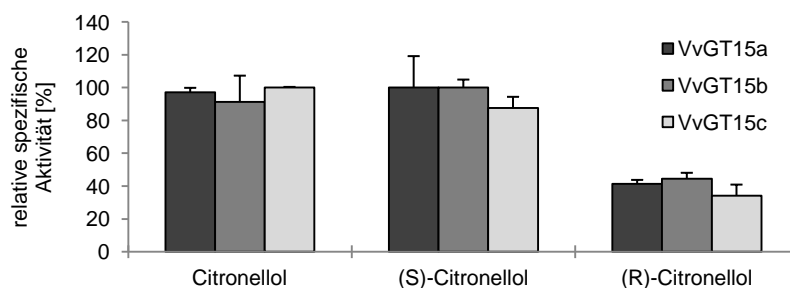


Abbildung 44: Relative spezifische Aktivitäten der verschiedenen Enantiomere von Citronellol VvGT15a-c. Die rekombinanten Fusionsproteine wurden mit dem Akzeptormolekül und UDP-[U-¹⁴C]Glukose inkubiert. Die relative spezifische Aktivität [%] bezieht sich auf die höchste spezifische Aktivität, die beim Umsatz von (*S*)-Citronellol durch VvGT15a gemessen wurde.

3.6.3 Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen

Die optimalen Reaktionsbedingungen wurden mit einer Proteinmenge von 0,1 µg und dem Substrat Geraniol durchgeführt. Die Inkubationszeit wurde für die Enzymvarianten VvGT15a und b auf 20 Minuten und für VvGT15c auf 10 Minuten festgelegt. Die höchste Produktbildung konnte bei allen Enzymvarianten bei einem pH-Wert von 7,5 (100 mM Tris HCl Puffer mit 10 mM β-Mercaptoethanol) und einer Temperatur von 30 °C gemessen werden. Die katalytische Umsetzung von Geraniol und UDP-Glukose zu dem Geranylglukosid durch VvGT15a-c war für mindestens 30 Minuten linear (Abbildung 45-47).

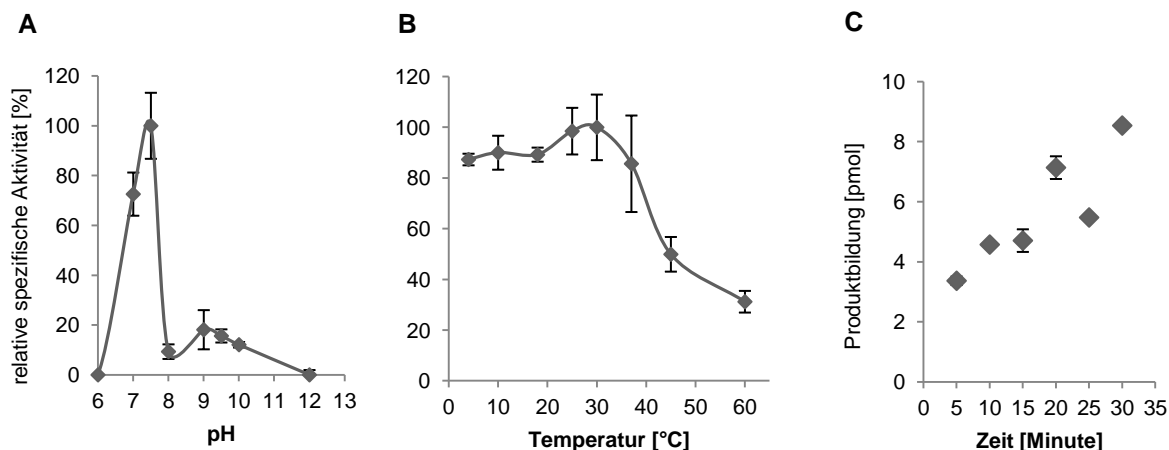


Abbildung 45: Optimierung der Reaktionsbedingungen von VvGT15a mit dem Substrat Geraniol und UDP-[U-¹⁴C]Glukose. A Einfluss des pH-Wertes auf die Bildung von Geranylglukosid bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C und einer Inkubationszeit von 20 Minuten. Bei den pH-Werten zwischen 2 und 6 konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. B Einfluss der Temperatur auf die Bildung von Geranylglukosid bei einem pH-Wert von 7,5 (100 mM Tris HCl mit 10 mM β -Mercaptoethanol) und einer Inkubationszeit von 20 Minuten. C Einfluss der Inkubationszeit auf die Produktbildung. Die Produktbildung war bis mindestens 30 Minuten linear.

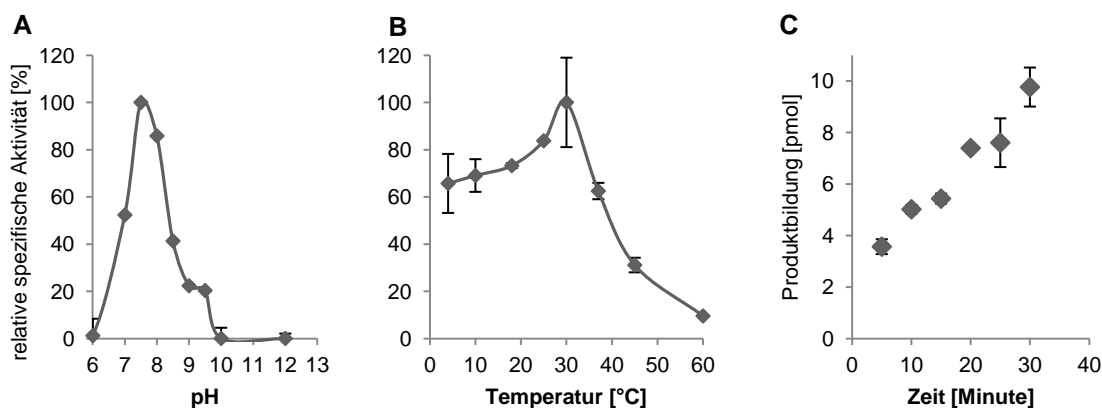


Abbildung 46: Optimierung der Reaktionsbedingungen von VvGT15b mit dem Substrat Geraniol und UDP-[U-¹⁴C]Glukose. A Einfluss des pH-Wertes auf die Bildung von Geranylglukosid bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C und einer Inkubationszeit von 20 Minuten. Bei den pH-Werten zwischen 2 und 6 konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. B Einfluss der Temperatur auf die Bildung von Geranylglukosid bei einem pH-Wert von 7,5 (100 mM Tris HCl mit 10 mM β -Mercaptoethanol) und einer Inkubationszeit von 20 Minuten. C Einfluss der Inkubationszeit auf die Produktbildung. Die Produktbildung war bis mindestens 30 Minuten linear.

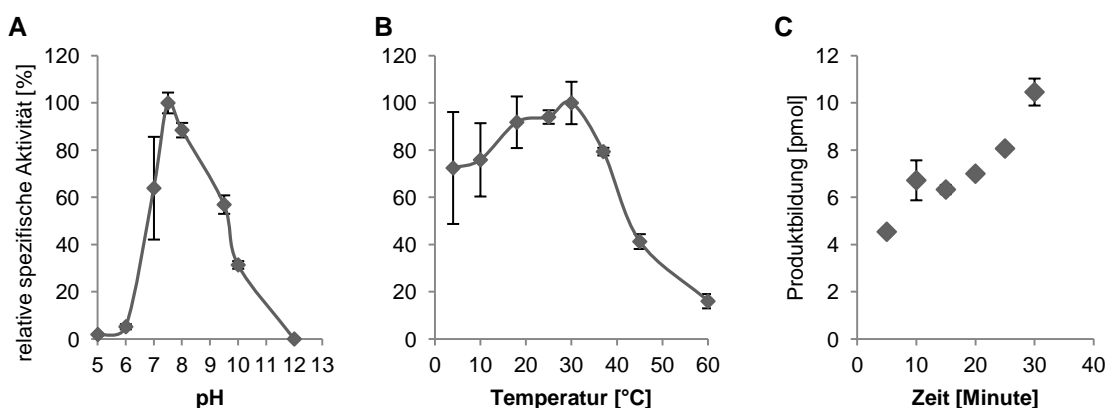


Abbildung 47: Optimierung der Reaktionsbedingungen von VvGT15c mit dem Substrat Geraniol und UDP-[U-¹⁴C]Glukose. A Einfluss des pH-Wertes auf die Bildung von Geranylglukosid bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C und einer Inkubationszeit von 10 Minuten. Bei den pH-Werten zwischen 2 und 6 konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. B Einfluss der Temperatur auf die Bildung von Geranylglukosid bei einem pH-Wert von 7,5 (100 mM Tris HCl mit 10 mM β -Mercaptoethanol) und einer Inkubationszeit von 10 Minuten. C Einfluss der Inkubationszeit auf die Produktbildung. Die Produktbildung war bis mindestens 20 Minuten linear.

3.6.4 Nachweis der Terpenglukoside mittels Dünnschichtchromatographie

Die Entstehung der Terpenglukoside bei der Umsetzung mit VvGT15 konnte mittels Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden. Die Detektion der Glukoside erfolgte mit einem Autoradiographen über eine Messdauer von vier Stunden. Aufgrund der Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie wird hier nur beispielhaft das Detektionsergebnis von VvGT15a gezeigt. Die Abbildungen von VvGT15b und c befinden sich im Anhang (Abbildung 59, 60). Die R_f -Werte der gebildeten Produkte von Geraniol, Citronellol und Nerol sind aufgrund ihrer chemischen Struktur sehr ähnlich. Die schwachen Signale der Glukoside von 8-Hydroxylinool resultierten aus der geringen Umsetzung des Akzeptormoleküls. Die vergleichende Auftragung des radioaktiv markierten Donormoleküls zeigte, dass bei der Extraktion keine UDP-[U- 14 C]-Glukose in die organische Phase übertragen wurde.

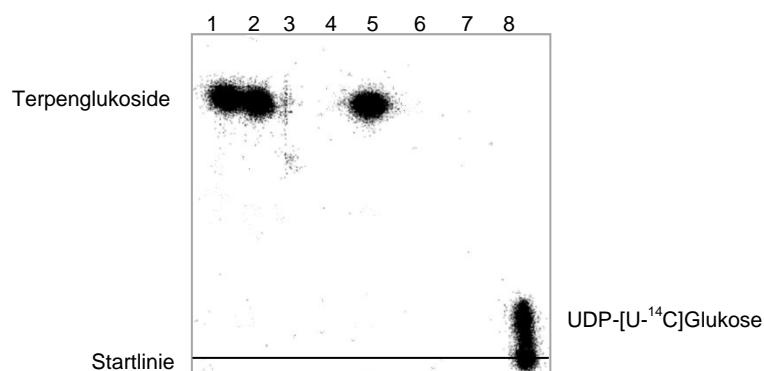


Abbildung 48: Dünnschichtchromatographie der Umsetzung der verwendeten Terpene mit VvGT15a. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mittels Autoradiographen über vier Stunden. Die Inkubation der Reaktionsansätze wurde mit 2 μ g aufgereinigtem Enzym bei 30 °C in Tris HCl Puffer (100 mM mit 10 mM β -Mercaptoethanol) für 18,5 Stunden durchgeführt. VvGT15a mit (1) Citronellol (2) Geraniol, (3) 8-Hydroxylinool, (4) Linalool, (5) Nerol, (6) Terpeneol, (7) Leerkontrolle ohne Akzeptormolekül und (8) UDP-[U- 14 C]Glukose.

3.6.5 Bestimmung der kinetischen Daten von VvGT15

Die Daten von K_M und k_{cat} wurden für die vier Akzeptormoleküle Geraniol, Nerol, (S)-Citronellol und 8-Hydroxylinool mit konstanter UDP-Glukose-Konzentration (0,1 mM) und für UDP-Glukose mit festgelegter Geraniol-Konzentration (0,1 mM) ermittelt (Tabelle 12).

Die Werte von K_M und k_{cat} von VvGT15a-c ähneln sich sehr (Tabelle 12). Die Wechselzahlen für (S)-Citronellol und Nerol (0,02 bis 0,06 sec^{-1}) sowie 8-Hydroxylinool (0,003 bis 0,004 sec^{-1}) sind bei den Enzymvarianten fast identisch. Die K_M -Werte für diese Akzeptormoleküle liegen in einem Bereich von 17 μ M für 8-Hydroxylinool (VvGT15c) bis 55 μ M für (S)-Citronellol (VvGT15b). Die k_{cat} - als auch die K_M -Werte für Geraniol sind bei allen drei VvGT15-Varianten zwei- bis sechsmal größer (0,1 bis 0,17 sec^{-1}) (43 bis 81 μ M) als die für (S)-Citronellol und Nerol.

Die kinetischen Daten von VvGT15a und b mit UDP-Glukose sind mit 49 bzw. 43 μ M und 0,18 bzw. 0,17 sec^{-1} annähernd identisch. VvGT15c zeigt von den drei Enzymvarianten die höchste Affinität (43 μ M) und die größte Wechselzahl (0,17 sec^{-1}) gegenüber Geraniol. Der K_M - und der k_{cat} -Wert von VvGT15c für UDP-Glukose besitzen mit 51 μ M bzw. 0,26 sec^{-1} eine ähnliche Größenordnung wie die jeweiligen Werte für Geraniol.

Tabelle 12: Übersicht der kinetischen Daten von VvGT15a-c für die Terpenol-Substrate und UDP-Glukose. Die kinetischen Daten für die Akzeptormoleküle Geraniol, (S)-Citronellol, Nerol und 8-Hydroxylinalool wurden bei konstanter UDP-Glukose-Konzentration (0,1 mM) unter optimalen Bedingungen ermittelt. Die Daten für die UDP-Glukose wurden bei konstanter Geraniol-Konzentration (0,1 mM) unter optimalen Bedingungen bestimmt. Die Auswertung erfolgte mittels der Solver-Funktion mit Office Excel, Lineweaver-Burk und Hanes-Woolf.

Substrat	K_M [μ M]	k_{cat} [1/sec]	k_{cat}/K_M [1/(sec*mM)]
VvGT15a			
(S)-Citronellol	29 ± 3,0	0,02	0,9
Geraniol	63 ± 2,4	0,12	1,9
Nerol	48 ± 1,7	0,04	0,7
8-Hydroxylinalool	32 ± 1,4	0,003	0,1
UDP-Glukose	49 ± 12,0	0,18	3,7
VvGT15b			
(S)-Citronellol	55 ± 1,3	0,03	0,6
Geraniol	81 ± 1,0	0,10	1,2
Nerol	40 ± 3,7	0,03	0,8
8-Hydroxylinalool	33 ± 1,8	0,003	0,1
UDP-Glukose	43 ± 1,0	0,17	4,1
VvGT15c			
(S)-Citronellol	20 ± 1,6	0,03	1,8
Geraniol	43 ± 0,7	0,17	3,9
Nerol	28 ± 0,9	0,06	2,2
8-Hydroxylinalool	17 ± 0,2	0,004	0,3
UDP-Glukose	51 ± 1,6	0,26	5,0

Der Vergleich der Terpenol-konvertierenden Enzyme aus den phylogenetischen Gruppen E, G und H zeigt, dass die Enzyme VvGT15a-c und VvGT14a die höchste Affinität und Wechselzahl bezüglich der Umsetzung der Terpenole Geraniol, Nerol und Citronellol aufweisen. Die vier Glykosyltransferasen präferieren Geraniol, Nerol und Citronellol als Akzeptormolekül, während die anderen drei Terpenole 8-Hydroxylinalool, Linalool und α -Terpineol nur gering oder gar nicht glukosyliert werden.

3.6.6 Untersuchung der *in vivo* Aktivität mittels Aglykaextrakt

Aufgrund sehr ähnlicher Aktivitäten der VvGT15-Varianten wurde der Reaktionsansatz mit dem Aglykaextrakt aus dem Roten Traminer 11-18 Gm (früher und später Erntetermin) nur mit VvGT15c unter idealen Bedingungen für 18,5 Stunden inkubiert. Die Reaktion wurde zum einen mit UDP-[U- 14 C]Glukose und zum anderen mit nicht-markierter UDP-Glukose durchgeführt. Die Analyse der Proben mit UDP-[U- 14 C]Glukose erfolgte über Flüssigkeitsszintillationsmessung und Dünnschichtchromatographie. Die Positivkontrolle mit Geraniol diente dem generellen Aktivitätsnachweis des Enzyms. Die Messung der Radioaktivität mittels Szintillationsmessung ergab eine Produktbildung bei der Inkubation des Enzyms mit dem Aglykaextrakt (zur Verfügung gestellt von Sarah Stanitzek, Universität Bonn) (Abbildung 49). Die Auswertung der Dünnschichtchromatographie zeigte eine Produktbildung bei der Inkubation mit dem Aglykaextrakt. Wie bei VvGT14a entsprach der R_f -Wert

dieses Produktes der des Geranylglukosids. Die Untersuchung des entsprechenden Reaktionsansatzes mit nicht-markierter UDP-Glukose an der Universität Bonn konnte neben der Bildung des Geranylglukosids auch die Glukosylierung von Nerol und Citronellol zeigen.

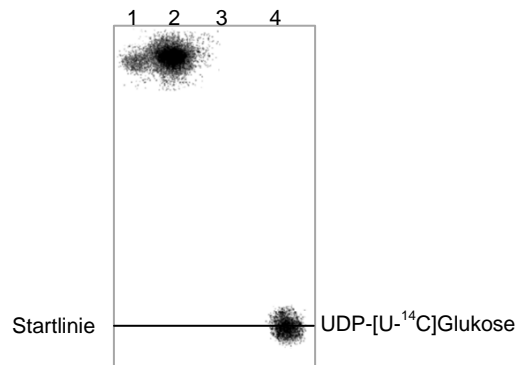


Abbildung 49: Dünnschichtchromatographie der Umsetzung des Aglykaextrakts aus dem Roten Traminer 11-18 Gm (früher Erntetermin) sowie Geraniol mit VvGT15c. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mittels Autoradiographen über vier Stunden. (1) VvGT15c mit Aglykaextrakt aus dem Roten Traminer 11-18 Gm (früher Erntetermin), (2) VvGT15c mit Geraniol, (3) Leerkontrolle ohne Substrate und (4) UDP-[U-¹⁴C]Glukose. Die Umsetzung des Aglykaextrakts zum frühen und späten Erntetermin ergaben die gleichen Ergebnisse, so dass nur der Umsatz des frühen Erntezeitpunktes gezeigt wird.

4 Diskussion

Der Weinbau und die Herstellung von Wein sind eng mit der Entwicklung der menschlichen Kultur verknüpft. Im Rahmen der Weinbaugeschichte wurden die Rebsorten in Bezug auf verschiedene Faktoren wie dem Zuckergehalt und der Beerenmorphologie zugunsten der ökonomischen Nutzbarkeit selektiert (This et al., 2006). Neben der Farbgebung sind der Geschmack und das Aroma von Wein entscheidende Qualitätskriterien. Viele Faktoren beeinflussen das Weinbouquet während des Prozesses der Weinherstellung und dessen Lagerung, wobei das sogenannte primäre Weinaroma im Verlauf der Beerenreife selbst gebildet wird (Rapp, 1992).

Die Terpene, vor allem Monoterpenalkohole (Monoterpenole), zählen zu den prägenden Aromakomponenten. *Vitis vinifera* produziert u.a. die Monoterpenole Geraniol, Nerol, Citronellol, α -Terpineol und Linalool, die zu den wichtigsten Aromastoffen von Wein zählen. Sie werden während der zweiten Reifephase der Weinbeere synthetisiert. Untersuchungen über die Bedeutung von Monoterpenolen in der Pflanze konnten zeigen, dass diese Moleküle eine antimikrobielle und antifungale Wirkung besitzen und der Herbivorabwehr dienen (Gershenzon and Dudareva, 2007). Das Terpenolprofil ist Rebsorten-abhängig, wobei in der Weinbeere die Terpenole primär als Aromainaktive Glykoside vorliegen. Die Glykosylierung maskiert zum einen die reaktiven Gruppen der Terpenole und erhöht zum anderen die Hydrophilie, so dass die Glykoside in der Vakuole der Pflanze gespeichert werden können (Rivas et al., 2013). Bislang sind die Mechanismen der Glykosylierung der Terpene in der Weinbeere noch nicht wissenschaftlich untersucht worden. Eine Identifizierung und Charakterisierung der Proteine, die eine Glykosylierung katalysieren, wäre ein wichtiger Schritt für die Aromaforschung des Weins, weil Korrelationen der geno- und phänotypischen Ausprägung des primären Weinbouquets untersucht werden könnten und diese Informationen für die Züchtung neuer Weinsorten nützlich sind.

4.1 Glykosyltransferasen aus *Vitis vinifera*

Die zunehmende Verfügbarkeit von Genomdaten verschiedener Organismen hat zu einem massiven Anstieg annotierter Gene geführt. Die Suche homologer Gensequenzen in einem Genom liefert Kandidatengene, die putativ eine bestimmte Funktion erfüllen können (Gachon et al., 2005) (This et al., 2006). Das Genom des diploiden Organismus *V. vinifera* (Rebsorte *Pinot noir*) wurde 2007 von zwei Gruppen unabhängig voneinander veröffentlicht (Jaillon et al., 2007) (Velasco et al., 2007). Für die Suche nach Terpen-UGT-Kandidatengen im *Vitis*-Genom wurden die 2008 veröffentlichten Sequenzen der Terpen-konvertierenden UGT aus *A. thaliana* verwendet (Caputi et al., 2008). Es sind zunächst 67 Sequenzen, die große Ähnlichkeiten mit den *Arabidopsis*-GTs aufwiesen, ausgewählt worden (Stand 2010). Aufgrund modifizierter Gen-Annotierungsmethoden und Überarbeitung der Genomdaten wurde die Anzahl der Kandidatengene auf 57 angepasst (Stand 2013) (Anhang Abbildung 56).

Die phylogenetische Analyse der resultierenden Proteinsequenzen zeigte die bereits bei den UGT von *Arabidopsis* und anderen Spezies auftretende Gruppierung der Proteine (Osmani et al., 2009). Häufig kann diesen phylogenetischen Gruppen eine gewisse Substratspezifität zugeordnet werden (Radomska-Pandya et al., 1999) (Ross et al., 2001). So besitzen die UGT von *A. thaliana*, die für die

Auswahl der UGT-Kandidatengene verwendet wurden, eine Gruppen-abhängige Präferenz der Substrate. Die UGT von *Arabidopsis* aus Gruppe L nutzen nur die Terpene Linalool, Retinol- und Artemisinsäure als Substrat. Linalool wird außer von diesen Enzymen nur noch von zwei UGT der Gruppe H umgesetzt. Farnesol wird ausschließlich von Enzymen der Gruppen D, G und E akzeptiert. Die Terpenole Geraniol und Citronellol werden nur von den UGT der Gruppe L nicht glukosyliert (Caputi et al., 2008).

Im Gegensatz dazu ergab eine phylogenetische Untersuchung diverser UGT der GT1 Familie aus sechs verschiedenen Organismen der GT1 Familie (*P. patens*, *S. moellendorffii*, *O. sativa*, *P. trichocarpa*, *A. thaliana* und *A. lyrata*), dass es innerhalb der orthologen Gruppen eine gewisse Streuung der Substratpräferenz gibt, die sich durch evolutionäre Prozesse unabhängig voneinander entwickelt hat (Yonekura-Sakakibara and Hanada, 2011). Diese Substratdiversität zwischen orthologen Proteinen erschwert die Suche nach noch unbekanntem Proteinen mit vergleichbarer Enzymaktivität. Auf der anderen Seite können auch evolutionär früh getrennte Enzyme gleiche Substratspezifitäten aufgrund vergleichbarer Evolutionsfaktoren entwickelt haben. UGT besitzen meist ein breites Substratspektrum *in vitro*, wobei eine Aussage über die *in planta* Substrate nur eingeschränkt möglich ist (Gachon et al., 2005) (Yonekura-Sakakibara and Hanada, 2011). So wurden zwei UGT aus *E. perriniana* als Terpen-Glykosyltransferasen annotiert. Die biochemische Charakterisierung zeigte jedoch, dass die beiden Enzyme bevorzugt Zimtsäure, Isoeugenol und Quercetin als Substrate konvertierten, während die Terpene Menthol und Borneol in einem deutlich geringeren Maße (etwa 10 % des Umsatzes von Zimtsäure) umgesetzt wurden (Nagashima et al., 2004). Die Bestimmung der *in planta* Aktivität kann durch Metabolom- und Transkriptom-Daten unterstützt und erleichtert werden (Gachon et al., 2005). Generell ist die Genom-Annotierung eine wichtige *in silico* Methode zur Identifizierung neuer Gene, doch ist die Verifizierung der Aktivität z.B. durch *in vitro* und *in vivo* Expression sowie biochemischer Charakterisierung der Enzyme essentiell.

Die offenen Leserahmen der identifizierten Gene umfassen zwischen 1329 bp (*VvGT15*) und 1488 bp (*VvGT12*), die für Proteine mit 443 AS und 496 AS codieren. Die Größe der Proteine ist mit den in der Literatur beschriebenen Pflanzen-GT vergleichbar (*FaGT6* und *7* aus *F. ananassa*: 479 und 487 AS (Griesser et al., 2008a), *UGT85B1* aus *S. bicolor*: 492 AS (Hansen et al., 2003), *VvGT1* aus *V. vinifera*: 456 AS (Offen et al., 2006) und *AtUGT* aus *A. thaliana*: 438-496 AS (Caputi et al., 2008).

Bei der Sequenzierung der cDNAs der zehn untersuchten UGT (*VvGT7-16*), die aus verschiedenen Weinbau-relevanten Rebsorten isoliert wurden, wurden verschiedene Genvarianten der UGT identifiziert, deren Translation in verschiedenen Proteinvarianten resultierten (Ausnahme *VvGT16*, *VvGT10* und *VvGT11*, Tabelle 1). So konnten für *VvGT7* bislang die meisten Varianten identifiziert werden, wobei eine der *in vitro* aktivste Variante *VvGT7b* in vier der fünf Rebsorten vertreten ist. Interessanterweise konnten im Gelben Muskateller FR 90 drei Proteinvarianten von *VvGT7* nachgewiesen werden, von denen zwei (*VvGT7i* und *j*) keine *in vitro* Aktivität gegenüber den getesteten Substraten zeigten. *Vitis vinifera* sollte jedoch als diploider Organismus maximal zwei Allele und Proteine aufweisen. Die erhöhte Anzahl von Allelen und resultierenden Proteinen kann mehrere Ursachen haben, wobei eine fehlerhafte Transkription und Amplifikation des genetischen Materials durch Mehrfachsequenzierung ausgeschlossen werden konnte. Zwar wurden alle Allelsequenzen von *VvGT7* einem Genlokus auf dem Chromosom 16 zugeordnet (persönliche Kommunikation, (Frotscher,

2013)), jedoch können die häufig in Pflanzengenomen auftretende Tandemduplikationen eine fehlerhafte Lokalisierung aufgrund von hoher Sequenzähnlichkeit verursachen (Claros et al., 2012). VvGT7 könnte somit mindestens zwei Gene umfassen. Eine weitere mögliche Erklärung für das Auftreten von mehr als zwei Allelen könnte das Phänomen des periklinalen Chimärismus sein. *Vitis vinifera* besitzt zwei Zelllinien (Epidermis- und innere Zelllinie), die sich genetisch aufgrund von Mutationsereignissen voneinander unterscheiden können. Der Nachweis von mehr als zwei Allelen aufgrund des periklinalen Chimärismus konnte bereits von anderen Forschungsgruppen bei verschiedenen Rebsorten von *V. vinifera* nachgewiesen werden (Bertsch et al., 2005) (Hocquigny et al., 2004) (Riaz et al., 2002). Bei den Proteinen VvGT8 bis VvGT16 konnten bis zu vier Proteinvarianten identifiziert werden, wobei in der Regel eine oder zwei Enzymvarianten in den untersuchten Rebsorten dominierten. Der Nachweis mehrerer Allele korreliert mit der Beobachtung, dass viele der bislang untersuchten Rebsorten heterozygot sind (Thomas et al., 1994). Interessanterweise zeigt sich, dass die Enzymvarianten, die relativ hohe katalytische Aktivitäten aufweisen, meistens ubiquitär in den Rebsorten auftreten (Bowers et al., 1996).

Die Untersuchung der Expressions- und Aktivitätsprofile der verschiedenen UGT-Varianten stellt eine aussichtsreiche Möglichkeit dar, das Glykosylierungsprofil von Terpenolen wissenschaftlich zu erklären und mit dem Weinaroma bei verschiedenen Rebsorten zu vergleichen.

4.2 Gruppe D-Glykosyltransferasen aus *Vitis vinifera*

Aus der Gruppe D wurden die Sequenzen von VvGT12 und VvGT13 ausgewählt, wobei jeweils drei Proteinvarianten in vier Rebsorten identifiziert werden konnten, die sich in zwei bzw. sechs Aminosäurepositionen unterscheiden. VvGT12a und VvGT13a weisen eine Identität von 58 % auf, wobei der Hauptteil der identischen Positionen im C-terminalen Bereich, vor allem in der PSPG-Box, zu finden ist (Position 352 bis 499 des Sequenzvergleiches besitzt eine Identität von 72 %). Die an der Hochschule Geisenheim von Johanna Frotscher durchgeführten Expressionsanalysen der Gene in verschiedenen Geweben zeigten, dass VvGT12 primär in den Blättern und am Ende der Fruchtreifung exprimiert wurde. VvGT13 besaß zu Beginn der Beerenreife das höchste Expressionslevel, das anschließend im Reifeverlauf auf ein Minimum abnahm (unveröffentlichte Daten, (Frotscher, 2013)).

4.2.1 Heterologe Expression in *Escherichia coli*

Für die heterologe Expression in *E. coli* wurden die Gene in den Expressionsvektor pET29a (+) kloniert. Dieser Vektor trägt die genetische Information für einen C-terminalen His₆-Tag und einen N-terminalen S-Tag mit einer Thrombin-Schnittstelle. Der S-Tag ist ein Peptidfragment (15 AS) des S-Peptides der RNase S (Raines et al., 2000). Die Aufreinigung mithilfe des S-Tags erfolgt unter aggressiven Bedingungen mit 3 M Guanidiniumthiocyanat-Lösung. Guanidiniumthiocyanat ist ein chaotropes Detergenz. Es wird empfohlen, den Tag zur Gewinnung funktioneller Proteine enzymatisch zu entfernen. Der zweite Tag, der His₆-Tag, ist ein häufig genutzter Tag, der in verschiedenen Vektorsystemen zum Einsatz kommt. Die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie über eine regenerationsfähige Nickel-Matrix gilt als stringent, so dass eine hohe Reinheit des aufgereinigten Proteins üblich ist. Zudem lassen sich Proteinaggregate, sogenannte „inclusion bodies“, mithilfe des His-Tags aufreinigen und anschließend renaturieren. Die Elution des Proteins kann mithilfe von

Imidazol oder einem pH-Gradienten erfolgen. Die geringe Größe des Tags gilt als vorteilhaft, weil eine mögliche Interaktion mit dem eigentlichen Protein als gering angesehen wird (Walls and Loughran, 2011) (Terpe, 2003). Die Aufreinigung von Metallo-Enzymen mithilfe eines His-Tags wird jedoch nicht empfohlen, weil die für die Aktivität notwendigen Metallionen von der Aufreinigungsmatrix komplexiert werden können. Zudem werden einige Enzyme durch Imidazol gehemmt, so dass nach der Aufreinigung eine Entfernung des Imidazols zum Beispiel durch Dialyse notwendig ist (Khalifah et al., 1987).

Aufgrund der harschen Elutionsbedingungen, die die Aufreinigung mithilfe des S-Tags erfordert, erfolgte die Integration der offenen Leserahmen in der Weise, dass die exprimierten Proteine einen C-terminalen His₆-Tag aufwiesen. Die His-Tag gekoppelte Expression der UGT FaGT1 aus *F. ananassa* wurde erfolgreich durchgeführt (Griesser et al., 2008b). Die Expression eines löslichen His-Tag-assoziierten VvGT12-Proteins konnte jedoch weder in einem SDS-Proteingel noch bei der immunospezifischen His₆-Tag Detektion festgestellt werden. Die Optimierungsversuche der Kultivierungsbedingungen durch die Verwendung eines alternativen Expressionsstammes (Rosetta (DE3) pLysS) oder die Adaption der Expressionszeit führten ebenfalls nicht zur Expression des Enzymes. Aufgrund des Sequenzierungsergebnisses des transformierten Vektors mit der genetischen Information für das Fusionsprotein ließ sich ein vorzeitiger Abbruch der Transkription durch eine fehlerhafte Integration des Gens ausschließen. Die Expression des Fusionsproteins VvGT13 mit His₆-Tag konnte durch Immunodetektion nur in Rosetta (DE3) pLysS-Zellen nachgewiesen werden. Rosetta *E. coli*-Zellen zeichnen sich durch ein erweitertes t-RNA-Spektrum aus, so dass Eukaryotentypische Codons effizienter erkannt werden. Das exprimierte Zielprotein war in der Elutionsfraktion, deren Volumen durch Zentrifugation verringert wurde, nur durch eine sehr schwache Farbreaktion nachweisbar. Die Glykosyltransferasen aus *M. domestica* (Jugde et al., 2008) und *V. vinifera* (Ono et al., 2010) (Ford et al., 1998) konnten als Fusionsproteine mit einem His-Tag heterolog exprimiert werden. Interessanterweise ist der His₆-Tag bei diesen UGT N-terminal assoziiert. Eine Literaturrecherche zur Expression pflanzlicher Glykosyltransferasen in *E. coli* ergab, dass UGT bevorzugt mit einem N-terminalen GST-Tag exprimiert und aufgereinigt wurden (Moraga et al., 2009), (Griesser et al., 2008a) (Lim et al., 2004) (Caputi et al., 2008). Es lässt sich somit vermuten, dass weniger die Größe als vielmehr die Position des Tags einen entscheidenden Einfluss auf die heterologe Darstellung der Glykosyltransferasen in *E. coli* ausübt. Analog konnte in einem Zell-freien Proteinexpressionssystem gezeigt werden, dass die Position des His-Tags nicht nur einen Einfluss auf die Proteinlöslichkeit sondern auch auf das Expressionslevel hat (Busso et al., 2003).

Der Glutathion-S-Transferase (GST)-Tag ist ein 26 kDa großer Tag, der 1988 zum ersten Mal in der Literatur beschrieben wurde (Smith and Johnson, 1988). Die pGEX-Vektorsysteme sind so konzipiert, dass der GST-Tag durch enzymatische Spaltung vom Fusionsprotein entfernt werden kann. Die Aufreinigung erfolgt über eine Sepharose-Glutathion-Matrix. Das Fusionsprotein wird mittels milder, nicht-denaturierender Bedingungen durch reduziertes Glutathion eluiert. Die Aufreinigung gilt jedoch im Vergleich zu dem His₆-Tag-Nickel-Matrix-System aufgrund der langsamen Bindekinetik als weniger effizient (Walls and Loughran, 2011) (Scheich et al., 2003). Expressionsstudien zur Untersuchung verschiedener N-terminaler Tags konnten zeigen, dass zum einen das Expressionslevel und zum

anderen die Löslichkeit der exprimierten humanen Proteine mit einem GST-Tag im Vergleich zu einem His₆-Tag erhöht waren (Hammarström et al., 2002).

Die genetische Information für VvGT12 und VvGT13 wurde daraufhin alternativ in das GST-Expressionssystem pGEX-4T-1 kloniert. Die Expression der beiden löslichen GST-Fusionsproteine konnte im denaturierenden Proteingel und mithilfe von GST-spezifischer Immunodetektion nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich, dass auch das GST in den Elutionsfraktionen vorlag. Das freie GST kann zum einen durch partielle Transkription und Translation oder zum anderen durch die Abspaltung des GST-Tags aufgrund der denaturierenden Bedingungen vor und während der Durchführung des SDS-Proteingels entstanden sein (Jackson et al., 2001) (Isayenkova et al., 2006) (Griesser et al., 2008a). So konnte auch eine generelle Tendenz zur Proteolyse bzw. partieller Degradation humaner GST-Fusionsproteinen beobachten werden. Es wird angenommen, dass der Abbau der exprimierten rekombinanten Fusionsproteine bereits vor der Zellyse stattfindet (Braun et al., 2002).

Die Untersuchung der beiden Expressionssysteme pET29a (+) und pGEX-4T-1 zur heterologen Expression der Proteine VvGT12 und VvGT13 mit einem C-terminalen His₆-Tag bzw. einem N-terminalen GST-Tag haben gezeigt, dass das pGEX-4T-1-System ein geeigneteres Expressionssystem zur Darstellung der GT aus *V. vinifera* war.

4.2.2 In vitro Aktivität von VvGT12 und VvGT13

Weder die Proteinrohextrakte noch die aufgereinigten GST-UGT VvGT12 und VvGT13 zeigten katalytische Aktivität gegenüber den getesteten Substraten und UDP-[U-¹⁴C]Glukose bei den Standardbedingungen (30 °C und 100 mM Tris HCl Puffer pH 7,5 mit 10 mM β-Mercaptoethanol). Diese Reaktionsbedingungen wurden basierend auf den in der Literatur beschriebenen Konditionen gewählt (He et al., 2006) (Moraga et al., 2009) (Witte et al., 2009) (Hansen et al., 2003). Eine Beeinflussung der Enzymaktivität durch den GST-Tag kann zwar nicht ausgeschlossen werden, jedoch weisen die GST-GT, die in der Literatur beschrieben und im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, keinen Aktivitätsverlust aufgrund des GST-Tags auf (Huang et al., 2004) (Jin et al., 2013b).

Die Glykosyltransferasen UGT73C6 und UGT73C5 aus *A. thaliana*, die der Gruppe D zugeordnet werden, dienten der Auffindung der putativen Terpenalkohol-spezifischen UGT VvGT12 und VvGT13 aus *Vitis vinifera*. Es konnte gezeigt werden, dass UGT73C6 und UGT73C5 Terpene als Substrate akzeptierten (Caputi et al., 2008). Zuvor war UGT73C6 als Enzym charakterisiert worden, das einen Glukoserest auf die 7-Hydroxygruppe von Kämpferol-3-O-Rhamnosid und Quercetin-3-O-Rhamnosid überträgt (Jones et al., 2003). Die Glykosyltransferase UGT73C5 wurde als Brassinosteroid-O-Glukosyltransferase identifiziert (Poppenberger et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Phytohormone und Flavonoidglykoside jedoch nicht als putative Akzeptormoleküle untersucht.

Als Donormolekül wurde in dieser Arbeit nur UDP-Glukose eingesetzt. Glykosyltransferasen übertragen jedoch auch andere Zuckermoleküle wie Galaktose und Rhamnose auf die Akzeptormoleküle, so dass VvGT12 und VvGT13 eine Präferenz bezüglich eines anderen Donormoleküls besitzen könnten. Die Bindung des Donors erfolgt primär über die PSPG-Box, die bei VvGT12 und VvGT13 eine Identität von 84 % aufweist. Bislang konnten drei Positionen in der PSPG-Box identifiziert werden (Osmani et al., 2009), die für die Donorbindung wichtig sind. Diese

Aminosäuren W22, 43E/D und Q44 (Nummerierung bezieht sich auf die Stellung in der PSPG-Box) sind auch in der PSPG-Box von VvGT12 und VvGT13 vorhanden und lassen somit auf eine potentielle UGT-Aktivität schließen (Abbildung 50).

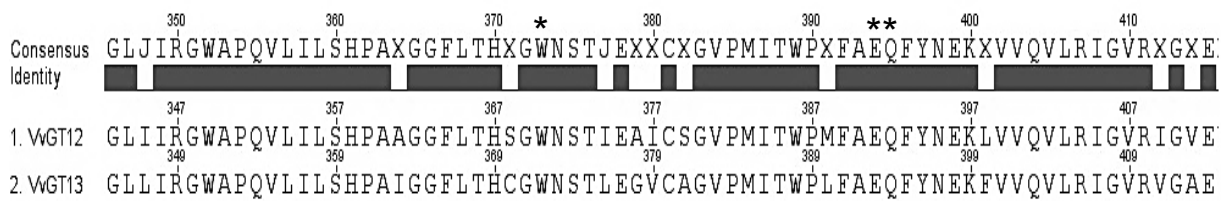


Abbildung 50: Alignment der Aminosäuresequenzen von VvGT12 und VvGT13 im Bereich der PSPG-Box. Die Aminosäuren, die für die Bindung des Donormoleküls verantwortlich sind, sind mit einem Sternchen gekennzeichnet. Die schwarze Linie markiert die Aminosäuren der PSPG-Box.

Die Bedeutung dieser drei Aminosäuren Tryptophan, Glutaminsäure/Asparaginsäure und Glutamin für die Bindung des Donors ist bislang noch nicht ausreichend geklärt. Sequenzvergleiche und Substratpräferenzen von UGT zeigten, dass die Glutaminsäure an Position 43 der PSPG-Box sowohl in Glukosyl-, Galaktosyl- und Glucuronsäure-übertragenden Transferasen auftritt (Osmani et al., 2009) (Ono et al., 2010). Rhamnosyltransferasen sind bislang kaum biochemisch untersucht worden, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass UDP-Rhamnose nicht kommerziell erhältlich ist. Es ist somit möglich, dass die UGT VvGT12 und VvGT13 keine Glukose übertragen, sondern eine andere Donorspezifität besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass die glykosylierten Terpenole in Muskattrauben primär an 6-O- α -L-Arabinofuranosyl- β -D-glukopyranose oder an Rutinose gebunden sind und nur ein geringer Teil als Glukosid vorliegt (Gunata et al., 1988) (Voirin et al., 1992). Eine Untersuchung weiterer Donormoleküle sowie die Erweiterung der putativen Akzeptormoleküle wäre ein sinnvoller Ansatz, um die *in vivo* Aktivitäten von VvGT12 und VvGT13 zu ermitteln.

4.3 Gruppe L-Glykosyltransferasen aus *Vitis vinifera*

Aus der phylogenetischen Gruppe L wurden die Sequenzen von VvGT8, VvGT9, VvGT10 und VvGT11 für die heterologe Expression und Untersuchung der Substratpräferenz ausgewählt. Bei den putativen Terpenol-Glykosyltransferasen VvGT8 konnten vier und bei VvGT9 zwei Proteinvarianten in zwei Rebsorten identifiziert werden. Die Proteinsequenzen von VvGT9, VvGT10 und VvGT11 besitzen eine Identität von knapp 92 %. Der Sequenzvergleich dieser drei VvGTs mit VvGT8 identifiziert nur 36 % identische Aminosäurepositionen. Diese Diskrepanz in den Proteinsequenzen spiegelt sich auch in der phylogenetischen Analyse wider (Abbildung 10). VvGT8 und VvGT9-11 lassen sich in zwei verschiedene Äste der Gruppe L einordnen. VvGT8 besitzt eine Identität von etwa 58 % mit den UGT aus *E. perriniana* BAD90934 und BAD90935, die neben Zimtsäure auch Isoeugenol und Flavonoide als Substrate akzeptierten (Nagashima et al., 2004). Die untersuchten *Arabidopsis* UGT der Gruppe L präferierten Linalool, Artemisin- und Retinolsäure als Akzeptormolekül (Caputi et al., 2008). Die Genexpressionsanalysen verdeutlichten, dass alle vier UGT einen ähnlichen hyperbolisch abfallenden Expressionsverlauf während des Reifeprozesses der Weinbeere besitzen. VvGT8 wird verstärkt in den Blättern exprimiert, während VvGT10 und VvGT11 eine hohe Expression in den Blüten aufweisen.

VvGT9 wird sowohl in der Blüte als auch in den Blättern exprimiert (unveröffentlichte Daten, (Frotscher, 2013)).

Die Untersuchung der Substratpräferenz mit den aufgereinigten Enzymen von VvGT8-11 ergab, dass diese UGT die Glukosylierung von Kämpferol, Quercetin und Eugenol katalysierten. Interessanterweise zeigte nur die Proteinvariante VvGT8a enzymatische Aktivität. Die drei inaktiven Proteinvarianten VvGT8b-d besitzen eine höhere paarweise Identität untereinander (99,4 %) als zu VvGT8a (98,3 %). Der Vergleich des PSPG-Box-Motives dieser Proteine mit drei strukturell untersuchten pflanzlichen Glykosyltransferasen (VvGT1 aus *V. vinifera*, MtUGT71G1 aus *M. truncatula* und AtUGT72B1 aus *A. thaliana*) zeigt, dass die zehn Aminosäuren, die für eine Interaktion mit dem Donormolekül primär verantwortlich sind, in allen VvGT8-Varianten vorliegen (Osmani et al., 2009). Die sieben Unterschiede in den Proteinsequenzen von VvGT8b-d und VvGT8a sind vor allem im N-terminalen Bereich der GT zu finden. Diese Domäne vermittelt primär die Koordination des Akzeptormoleküls. Ein Vergleich dieser Positionen mit den homologen Positionen in VvGT1 aus *Vitis vinifera* erbrachte keinen direkten Zusammenhang zwischen den Aminosäuren und der Enzymaktivität (Osmani et al., 2009). Interessanterweise ist ein Aminosäureunterschied im C-terminalen Bereich lokalisiert (VvGT8a: R428; VvGT8b-d: K428). Die Proteine von VvGT1 (Offen et al., 2006), VvGT5 und VvGT6 (Ono et al., 2010) sowie UGT85B1 aus *S. bicolor* (Hansen et al., 2003) weisen an der entsprechenden Position ebenfalls ein Arginin auf. Diese Aminosäure befindet sich in einem α -helikalen Bereich, der sich über die beiden Hauptdomänen der UGT legt. In der Literatur konnte nachgewiesen werden, dass das Fehlen dieses Strukturelementes zur Inaktivierung einer UGT aus *V. vinifera* führt (5GT aus *V. vinifera*, (Janvary et al., 2009)). Die Bedeutung dieser Domäne ist bislang noch nicht genau geklärt, doch es wird angenommen, dass die α -Helix die Flexibilität der Struktur und somit die Aktivität der UGT verändert. Eine Veränderung dieser Aminosäure durch Mutagenese könnte einen zusätzlichen Hinweis auf deren Einfluss auf die GT-Aktivität liefern.

Die Proteinsequenzen VvGT9a und VvGT9b unterscheiden sich in zwei Aminosäuren, die sich am C-terminalen Bereich der Enzyme befinden. Die spezifische Enzymaktivität von VvGT9a ist unter den gleichen Reaktionsbedingungen im Vergleich zu VvGT9b für die Umsetzung von Kämpferol um den Faktor 3 und für die Umsetzung von Quercetin um den Faktor 2 geringer. VvGT9a besitzt an den Positionen 438 und 470 jeweils ein Methionin, während VvGT9b an der Position 438 ein Threonin und an der Position 470 ein Leucin trägt. Diese beiden Aminosäurepositionen sind ebenfalls in der oben beschriebenen α -helikale Domäne lokalisiert. Es wird angenommen, dass die modifizierten Aminosäuren die intramolekularen Interaktionen beeinflussen, so dass die Enzymaktivität verringert wird.

VvGT10 und VvGT11 besitzen ähnliche Aktivität gegenüber Kämpferol, Quercetin und Eugenol. Der Vergleich der Proteinsequenzen mit VvGT9a zeigt, dass VvGT10 eine höhere Sequenzhomologie zu VvGT9a hat als VvGT11. VvGT10 und VvGT11 weisen ebenfalls primär in dem C-terminalen α -helikalen Bereich gemeinsame Sequenzunterschiede mit VvGT9a auf, so dass postuliert werden kann, dass auch bei diesen Enzymen die verringerte Aktivität im Vergleich zu VvGT9b auf eine veränderte Flexibilität dieser Domäne beruht.

Die Flavonoide Quercetin und Kämpferol sind wichtige antioxidative Substanzen, die in der Weinbeere gebildet werden und die als gesundheitsförderlich gelten (Castillo-Muñoz et al., 2010). In der

Weinbeere werden vor allem die 3-O-Glykoside von Quercetin und Kämpferol nachgewiesen. Die gebundenen Zuckerreste sind hierbei sehr vielfältig und können neben Glukose auch Galaktose, Glucuronsäure, Arabinose und Xylose aufweisen, die auch miteinander glykosidische Bindungen ausbilden können (Makris et al., 2006). Quercetin- und Kämpferolglykoside sind in hellen und dunklen Trauben zu finden, wobei die genetische Informationen von VvGT8-11 aus den hellen Rebsorten Weißer Riesling 239-34 Gm und Gelber Muskateller FR 90 isoliert wurden. Untersuchungen der Flavonolglykoside in verschiedenen hellen Weinbeeren haben gezeigt, dass von Kämpferol primär das 3-O-Glukosid und von Quercetin das 3-O-Glukosid und das 3-O-Glukuronid nachgewiesen werden (Castillo-Muñoz et al., 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch keine weitere Charakterisierung der entstandenen Glukoside oder die Bestimmung der enzymatischen Aktivität von VvGT8-11 durchgeführt. Es konnte zwar eine *in vitro* Aktivität dieser Glykosyltransferasen gegenüber Kämpferol und Quercetin gezeigt werden, doch müssen für die Ermittlung der natürlichen Funktion die Enzyme umfassender charakterisiert werden.

Interessanterweise konnte mit dem Proteinrohextrakt der aktiven Enzyme keine Aktivität unter den gleichen Reaktionsbedingungen gemessen werden. In der Literatur ist ein solcher Effekt bei Glykosyltransferasen, die in *E. coli* exprimiert wurden, bislang nicht beschrieben worden. Es wird vermutet, dass entweder Enzyme aus dem Bakterium die glykosidische Bindung hydrolytisch spalten oder aber die Glykosyltransferasen durch unbekannte Prozesse gehemmt werden. Aufgrund dieser Beobachtung wurden alle weiteren Aktivitätsuntersuchungen mit dem aufgereinigten Enzym durchgeführt.

4.4 Gruppe E-Glykosyltransferase aus *Vitis vinifera*

Aus der Gruppe E wurde die Sequenz von VvGT7 für die heterologe Expression in *E. coli* und anschließende Untersuchung des exprimierten Proteins ausgewählt. Insgesamt konnten aus fünf Rebsorten die genetische Information von zehn Proteinvarianten VvGT7a-j isoliert werden. Die Sequenzen der Proteinvarianten besitzen eine paarweise Identität von 98 %. Die homologen UGT aus *A. thaliana* UGT88A1 und UGT71C2 wurden als Quercetin-Glukosyltransferasen identifiziert, wobei sie auch Citronellol, Geraniol und Farnesol als Substrate akzeptieren (Lim et al., 2004) (Caputi et al., 2008). Die homologen UGT88A8 und UGT88A9 aus *Hieracium pilosella* L. glykosylierten unter anderem Flavonole, Flavone, Kaffeesäure, Esculetin, Catechol, Apigenin und Luteolin (Witte et al., 2009). Das Expressionsprofil von VvGT7 weist zwei Maxima zu Beginn und zum Ende der Beerenreife auf. Zudem wird VvGT7 vor allem in jungen Blüten und Blättern exprimiert (unveröffentlichte Daten, (Frotscher, 2013)).

4.4.1 *In vitro* Aktivität von VvGT7 und biochemische Charakterisierung von VvGT7a-c

Für acht der zehn Proteinvarianten konnte *in vitro* Glukosyltransferaseaktivität gegenüber einem breiten Spektrum von Akzeptormolekülen nachgewiesen werden. Neben den Terpenolen Nerol, Geraniol und Citronellol wurden auch Quercetin, Benzylalkohol, 2-Phenylethanol, Eugenol und einige kurzkettige Monoalkohole glykosyliert. Ein Großteil der Substrate liegt auch in der Weinbeere frei oder glykosyliert vor (Terpenole, Flavonoide, aromatische Monoalkohole und Eugenol) (Mateo et al., 1997). Mandelonitril wird von der Glykosyltransferase UGT85B1 aus *S. bicolor* als Hauptsubstrat umgesetzt

(Hansen et al., 2003). Da diese UGT zudem Geraniol, Citronellol und Nerol als Substrat akzeptiert, wurde Mandelonitril als mögliches Akzeptormolekül zusätzlich untersucht, aber von VvGT7 Varianten nicht glukosyliert. Als Zucker-Donor ist nur UDP-Glukose verwendet worden.

Die optimalen Reaktionsbedingungen wurden für VvGT7a-c mit Nerol als Substrat ermittelt. Die optimale Temperatur lag bei 30 °C (VvGT7a, b) bzw. 37 °C (VvGT7c). Die in der Literatur beschriebenen pflanzlichen UGT besitzen ein Temperaturoptimum zwischen 20 °C und 30 °C (Lim et al., 2001) (Lunkenbein et al., 2006) (Hall et al., 2011) (Hall et al., 2012) (Lim et al., 2004). Die 2013 beschriebene Auxin-Glykosyltransferase UGT74D1 weist bei 37 °C die höchste katalytische Aktivität auf (Jin et al., 2013b). Das pH-Optimum der *V. vinifera* UGT beträgt pH 8,0 (VvGT7a) bzw. pH 8,5 (VvGT7b, c) in 100 mM Tris HCl Puffer. Interessanterweise liegen die pH-Optima im alkalischen Bereich. Der pH-Wert in der Weinbeere wird vor allem durch Äpfel- und Weinsäure bestimmt und beträgt am Ende der Reifung etwa pH 4,0. In diesem pH-Bereich konnte *in vitro* jedoch keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Die Äpfel- und Weinsäure werden jedoch primär in der Vakuole gespeichert, während die Glykosyltransferasen vermutlich im Cytosol lokalisiert sind. Im Cytosol herrscht ein pH von 7,0 bis 7,5, so dass die pH-Optima von VvGT7a-c nur leicht höher liegen (Ono et al., 2010). VvGT5 aus *V. vinifera* besitzt ebenfalls ein pH-Optimum im alkalischen pH-Bereich (pH 9,1), während VvGT6 die höchste Aktivität bei pH 7,4 aufweist (Ono et al., 2010).

Die kinetischen Daten von VvGT7a-c wurden unter optimalen Reaktionsbedingungen für Nerol, Citronellol und Geraniol bestimmt. Es handelt sich bei diesen bevorzugten Substraten um primäre Alkohole, die sich sterisch ähneln. Die tertiären Alkoholgruppen von Linalool und α -Terpineol sind sterisch schwerer zugänglich und werden nicht glukosyliert. Bei 8-Hydroxylinalool werden vermutlich aufgrund der sperrigen Struktur weder die primäre noch die tertiäre Alkoholgruppe enzymatisch modifiziert.

Die Größenordnung der ermittelten K_M -Werte ist vergleichbar mit denen, die für Glykosyltransferasen aus *V. vinifera* (100-800 μ M) und *F. ananassa* (300-700 μ M) bestimmt wurden (Khater et al., 2012) (Lunkenbein et al., 2006) (Landmann et al., 2007). Die Dhurrin-generierende UGT85B1 aus *S. bicolor* akzeptiert ebenfalls die Terpenole Geraniol, Nerol und Citronellol. Die K_M -Werte dieser UGT für den Umsatz der Terpenole (150 μ M bis 1,1 mM) liegen ebenfalls in dem für VvGT7a-c ermittelten Konzentrationsbereich (200-400 μ M) (Hansen et al., 2003). Der k_{cat} -Wert für die Glukosylierung von Nerol ist vergleichbar mit den Werten, die für eine Sterol-Glykosyltransferase aus *Withania somnifera* ($1 \cdot 10^{-4}$ bis $6 \cdot 10^{-4}$ sec^{-1}) und die Isoflavonoid-Glykosyltransferase-Mutanten von UGT71G1 aus *Medicago truncatula* ($8 \cdot 10^{-4}$ bis $17 \cdot 10^{-4}$ sec^{-1}) beschrieben wurden (Madina et al., 2007) (He et al., 2006). Die k_{cat} -Werte von UGT85B1, die als Nebenaktivität die Terpenole Geraniol, Citronellol und Nerol glukosyliert, sind jedoch um den Faktor 30 bis 450 größer als die von VvGT7a-c (Hansen et al., 2003). Die niedrigen k_{cat} -Werte von VvGT7a-c implizieren somit, dass VvGT7 zwar die Terpenole verglichen mit den anderen untersuchten Substraten bevorzugt glukosyliert, diese Reaktion jedoch *in planta* nicht von VvGT7 katalysiert wird. Für die Umsetzung von Citronellol konnte zusätzlich gezeigt werden, dass VvGT7 das (*R*)-Enantiomer, welches nicht in der Traube vorliegt (Luan et al., 2005), mit starker Präferenz glukosyliert, so dass eine putative *in planta* Glukosylierung von Citronellol ausgeschlossen werden kann.

Die Untersuchung der natürlichen Funktion erfolgt in der Regel durch reverse Genetik, wobei die Genfunktion ausgeschaltet wird und die Auswirkungen analysiert werden. Diese Studien sind aber besonders in polyploiden Organismen nicht eindeutig, weil mehrere Kopien eines Gens in dem Organismus vorliegen (Lawrence and Pikaard, 2003). Zum anderen weisen verschiedene Enzyme eine gewisse Redundanz auf, so dass das Fehlen eines Enzyms durch die Aktivität anderer Proteine kompensiert werden kann (Jin et al., 2013b) (Yonekura-Sakakibara and Hanada, 2011). Des Weiteren werden Substratpräferenzen mit den Reinsubstanzen bestimmt. In der Pflanze steht dem Enzym jedoch eine komplexe Mischung verschiedener putativer Substrate zur Verfügung, so dass ein *in vitro* umgesetztes Substrat *in planta* nicht zwingend von dem untersuchten Enzym katabolisiert werden muss. Zur Imitation der *in planta* vorliegenden Substratverfügbarkeit wurde ein Aglykaextrakt hergestellt. Hierfür wurde zunächst die Gesamtheit der Glykoside aus den Beerenhäuten isoliert. Anschließend wurden über hydrolytische Spaltung die Zuckerreste entfernt und die resultierenden Aglyka extrahiert. Das Aglykagemisch wurde dann als Substrat in der enzymatischen Reaktion eingesetzt.

VvGT7 (VvGT7b) zeigte katalytische Aktivität gegenüber dem Aglykagemisch aus dem Gelben Muskateller FR 90 und bestätigt somit die Glukosyltransferaseaktivität von VvGT7. Die Erntetermine der Weinbeeren zur Herstellung des Aglykaextrakts entsprechen den Genexpressionsmaxima von VvGT7 kurz nach der Veraison und am Ende der Beerenreife und stellen somit die zu diesen Zeitpunkten in der Pflanze vorliegenden Aglykaprofile dar. Zudem konnte verifiziert werden, dass VvGT7 die Terpenole, die als Aglyka vorliegen, vermutlich nicht *in planta* als Substrat umsetzt. Die Durchführung der Dünnschichtchromatographie verdeutlichte, dass mindestens zwei Glukoside gebildet wurden, die in einem Nachfolgeprojekt identifiziert werden sollen. Aufgrund des Laufverhaltens lässt sich folgern, dass die Produkte eine höhere Hydrophilie als die Terpenglukoside besitzen. Somit ist die Verwendung eines Glykosides als Akzeptormolekül aufgrund der chemischen Eigenschaften möglich. Diese zwei Produkte konnten hingegen bei der Verwendung eines Aglykaextrakts aus dem Roten Traminer 11-18 Gm nicht nachgewiesen werden. Dies ist insofern interessant, da VvGT7 auch im Roten Traminer 11-18 Gm exprimiert wird, aber offensichtlich keines der vorliegenden Aglyka glukosyliert. UGT können jedoch auch bifunktional bezüglich des Donormoleküls sein (Ono et al., 2010), so dass VvGT7 neben der untersuchten UDP-Glukose auch andere aktivierte Zucker als Donor nutzen kann. Des Weiteren können auch Glykoside als Akzeptormoleküle präferiert werden (Janvary et al., 2009), die in dem Aglykagemisch nicht vorlagen. Für die Extraktion des Aglykagemisches wurde Methyl-*tert*-butylether (MTBE) verwendet. Hierbei lösen sich die hydrophoben Aglyka wie die Terpenole bevorzugt in der Etherphase, während hydrophile Moleküle wie Glykoside in der wässrigen Phase verbleiben. Durch die Verwendung hydrophilerer Extraktionsmittel wie Ethylacetat könnte eine alternative Aglykabibliothek generiert werden, in der auch Glykoside als mögliche Substrate enthalten sind.

4.4.2 Positionsgerichtete Mutagenese zur Identifizierung aktivitätsbeeinflussender Aminosäuren

Zwei der isolierten Proteinvarianten von VvGT7, VvGT7i und VvGT7j, zeigten kaum bzw. keine Aktivität gegenüber den getesteten Substraten. Anhand des Vergleiches der Sequenzen aller zehn

Proteinvarianten konnten exakt drei Aminosäurepositionen identifiziert werden, in denen sich die inaktiven von den aktiven Proteinvarianten unterschieden. Basierend auf den Homologiemodellen der dreidimensionalen Struktur von VvGT7i und VvGT7b konnte visualisiert werden, dass diese drei Aminosäuren nicht im aktiven Zentrum lokalisiert waren (Consensus-Position 186, 210 und 318).

Das Alanin an der Position 317 in VvGT7i und j ist in einem Schleifenmotiv (loop) positioniert, das sich im Eingangsbereich zum aktiven Zentrum des Enzyms befindet. In den aktiven Proteinvarianten ist an der äquivalenten Position ein Prolin. Prolin ist eine strukturell besondere Aminosäure, bei der die Aminogruppe in einen Pyrrolidinring eingebaut ist. Zudem unterbricht Prolin die Ausbildung von Sekundärstrukturen. Aufgrund der strukturbeeinflussenden Eigenschaft von Prolin könnte eine Veränderung dieser Aminosäure die Aktivität beeinflussen. Zudem konnte bei Mutagenesestudien die Wichtigkeit dieser loop-Region für die Enzymaktivität bei der UGT72B1 nachgewiesen werden (Brazier-Hicks et al., 2007). Während die Einfachmutanten keine veränderte Aktivität zeigten, konnte die Mutation einer zweiten und der dritten Aminosäure einen sukzessiven Anstieg der Aktivität gegenüber den getesteten Substraten sowie eine Erweiterung des Substratspektrums hervorrufen. Die Dreifachmutanten VvGT7i-PIL und VvGT7j-PIL besitzen eine vergleichbare Akzeptormolekülpräferenz wie VvGT7a-h. Interessanterweise ist im Vergleich zu VvGT7i-PIL die Gesamtaktivität der Dreifachmutante VvGT7j-PIL geringer, jedoch weist VvGT7j-PIL eine deutliche Umsetzung von Kämpferol auf, die 44-mal größer ist als die von VvGT7i-PIL. VvGT7j-PIL besitzt in der C-terminalen Domäne an der Position 443 ein zusätzliches Arginin. Diese Aminosäure ist C-terminal in der α -helikalen Domäne, die für die Flexibilität der Struktur verantwortlich sein soll, lokalisiert (Janvary et al., 2009). Das zusätzliche Arginin scheint die Flexibilität der Proteinstruktur zugunsten des Umsatzes von Kämpferol zu verändern.

Die beiden Aminosäuren an den Positionen 186 und 210 liegen in einem Bereich, der kaum konservierte Positionen aufweist, jedoch für die Akzeptormolekülbindung wichtig ist (Osmani et al., 2009). Die Aminosäure an der Position 186 liegt in der Nähe der Position 190. Alle VvGT7-Proteinsequenzen besitzen an der Position 190 ein Aspartat, während VvGT7h an dieser Stelle eine Glycin trägt. VvGT7h besitzt im Vergleich zu VvGT7a-g eine deutlich geringere Aktivität und ein engeres Substratspektrum. Interessanterweise unterscheidet sich VvGT7h nur in dieser Position von der Proteinvariante VvGT7b, die eine hohe Aktivität und ein breites Substratspektrum aufweist. Hieraus lässt sich schließen, dass diese Aminosäure D190 eine wichtige Rolle für die generelle Aktivität von VvGT7 besitzt. Saure Aminosäuren können aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften als Protonenakzeptor dienen und intramolekulare Interaktionen aufbauen (Noble et al., 2000). UGT85B1, UGT71G1 (*S. bicolor*) und UGT72B1 (*A. thaliana*) weisen an der entsprechenden Position ebenfalls eine Asparaginsäure auf. Die Aminosäure 210 befindet sich in Nachbarschaft zu dem N212. Diese Position ist in allen VvGT7-Proteinvarianten sowie in den strukturell aufgeklärten pflanzlichen GT VvGT1 (Offen et al., 2006), UGT85H2 (Li et al., 2007), UGT78G1 (Modolo et al., 2009), UGT71G1 (Shao et al., 2005) und UGT72B1 (Brazier-Hicks et al., 2007) konserviert, wobei deren Bedeutung bislang noch nicht geklärt ist. Interessanterweise konnten strukturbasierte Berechnungen der intramolekularen Netzwerke mit dem RING-Server zeigen, dass die Aminosäuren an den Positionen 186 und 210 über Wechselwirkungen mit Akzeptor- und Donormolekül-bindenden Resten im aktiven Zentrum in Verbindung stehen. Val186 in VvGT7i beeinflusst u.a. Arginin 399, welches in direkter

Nachbarschaft zum konservierten Glutamin 398 der PSPG-Box liegt. Diese Wechselwirkung tritt bei dem aktiven VvGT7b nicht auf. Die Aminosäure an Position 210 interagiert mit einem Strukturelement im N-terminalen Bereich des Proteins, das direkt neben Thr138 liegt. Die homologe Position von Threonin138 in VvGT1 interagiert direkt mit der 6'-Hydroxygruppe der Glukose des aktivierten Donormoleküls (Offen et al., 2006). Es kann angenommen werden, dass die in den Mutanten berechneten Interaktionen aufgrund der mutierten Aminosäuren 210 und 186 die Koordination der UDP-Glukose beeinflussen, so dass die Übertragung des Zuckers oder die Bindung des aktivierten Zuckers nicht mehr möglich ist.

Basierend auf der positionsgerichteten Mutagenese der inaktiven bzw. kaum aktiven Proteinvarianten VvGT7i und VvGT7j ließ sich nachweisen, dass Aminosäuren, die nicht direkt im aktiven Zentrum eines Proteins liegen, die Enzymaktivität maßgeblich verändern können. Zudem konnte ein additiver Effekt bei der stufenweisen Mutagenese beobachtet werden, der darauf schließen lässt, dass das Netzwerk der Aminosäuren und damit ihre Interaktionen entscheidend für die Enzymaktivität sind. Die biochemische Charakterisierung von VvGT7b und c verdeutlicht weiterhin, dass eine Variation der Aminosäuresequenz in zehn Positionen zu keiner relevanten Beeinflussung der Substratpräferenz und der kinetischen Daten führt (Tabelle 4, 5). Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass Veränderungen der Aminosäuren in der N-terminalen Domäne (Aminosäure 2, 11, 28, 117 und 132) der VvGT7-Proteine tendenziell zu einer veränderten Substratpräferenz führten, während eine Mutation der Aminosäuresequenz in der C-terminalen Domäne (Aminosäure 318 und 443) in einer generellen Veränderung der Enzymaktivität resultierte. Diese Beobachtung bekräftigt die Hypothese, dass die N-terminale Domäne von UGT primär der Koordination des Akzeptormoleküls dient, während der Zuckerdonor bevorzugt von C-terminalen Strukturelementen gebunden wird (Wang, 2009).

4.5 Gruppe G-Glykosyltransferasen aus *Vitis vinifera*

Die beiden Sequenzen von VvGT14 und VvGT16 konnten der Gruppe G zugeordnet werden. Von VvGT14 wurde die genetische Information für drei resultierende Proteinvarianten aus dem Roten Traminer 11-18 Gm und dem Weißen Riesling 239-34 Gm isoliert. VvGT14c besitzt eine 21 Aminosäuren umfassende Deletion in der N-terminalen Domäne. Die Sequenzen der Proteine VvGT14a und VvGT14b unterscheiden sich in einer Aminosäureposition, die in der PSPG-Box lokalisiert ist. Von VvGT16 liegt nur eine translatierte Proteinvariante vor. Die homologen UGT aus *A. thaliana* AtUGT85A1, 2, 4, 5 und 7 wurden als Cytokinin-UGT beschrieben und glukosylieren zudem Citronellol, Geraniol und α -Terpineol (Woo et al., 2007) (Hou et al., 2004) (Jin et al., 2013a) (Caputi et al., 2008). UGT85B1 aus *S. bicolor* lässt sich ebenfalls phylogenetisch in die Gruppe G einordnen. Zwar konnte UGT85B1 als UDP-Glukose:*p*-Hydroxymandelonitrile-O-Glukosyltransferase identifiziert werden, doch besitzt dieses Enzym auch eine UGT-Aktivität gegenüber den Terpenolen Geraniol, Nerol und Citronellol (Hansen et al., 2003). VvGT14 wird primär in den Beeren exprimiert, wobei das Expressionslevel im Reifeverlauf deutlich ansteigt. VvGT16 wird vor allem am Ende der Beerenreife und in den Blüten exprimiert (unveröffentlichte Daten, (Frotscher, 2013)).

4.5.1 *In vitro* Aktivität von VvGT14 und die biochemische Charakterisierung

VvGT14 besitzt drei Proteinvarianten, von denen nur VvGT14a Aktivität aufweist. VvGT14 glukosyliert, mit Ausnahme der Flavonoide, alle getesteten Substrate. Die Flavonoide besitzen im Gegensatz zu den anderen Akzeptormolekülen keine lineare Struktur und tragen mehrere reaktive Hydroxygruppen. Der Vergleich der Aminosäurereste von VvGT14a und VvGT1 (Offen et al., 2006), die sich in einem Abstand von 5 Å um das Akzeptormolekül Kämpferol befinden, zeigt, dass die Bindetasche vermutlich durch große Aminosäurereste räumlich blockiert wird. Hieraus lässt sich vermuten, dass die Flavonoide sterisch zu anspruchsvoll sind, um gebunden oder umgesetzt zu werden.

Die Terpenole Geraniol, Citronellol und Nerol sowie die Monoalkohole Hexanol und Oktanol werden bevorzugt als Substrat akzeptiert. Die entsprechenden Glykoside konnten auch in der Weinbeere nachgewiesen werden (Williams et al., 1982c) (Ugliano and Moio, 2008). Die Bestimmung der Enantioselektivität von VvGT14a gegenüber Citronellol und Linalool konnte keine signifikante Enantiopräferenz nachweisen. VvGT14 besitzt wie VvGT7 eine Präferenz bezüglich primärer Hydroxygruppen, wobei VvGT14 auch in der Lage war, tertiäre Alkohole zu glukosylieren. Aufgrund der Dünnschichtchromatographie, bei der im Fall von 8-Hydroxylinalool mindestens zwei Produkte nachweisbar waren, lässt sich vermuten, dass 8-Hydroxylinalool an beiden Alkoholgruppen glukosyliert wurde.

Die Daten von K_M (9 bzw. 10 μM) und k_{cat} (0,02 sec^{-1}) für die Substrate Citronellol, Nerol und Geraniol waren vergleichbar. Für die Glykosylierung durch VvGT1 (Offen et al., 2006) und CaUGT2 (aus *Catharanthus roseus*) (Masada et al., 2007) konnten ähnliche kinetische Daten ermittelt werden. Die K_M -Werte für VvGT5 (5 μM für Quercetin) und VvGT6 (4 bis 10 μM für die Substrate Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin) besaßen eine vergleichbare Größenordnung wie VvGT14a (Ono et al., 2010). Die kinetischen Daten deuteten darauf hin, dass VvGT14 auch *in planta* die Glukosylierung dieser Substrate durchführen könnte. Die K_M - und k_{cat} -Werte von VvGT14a für die Umsetzung von 8-Hydroxylinalool, α -Terpineol und Linalool waren hingegen drei- bis fünffach größer bzw. 10- bis 100-fach kleiner als die für Nerol, Citronellol und Geraniol. Linalool, α -Terpineol und 8-Hydroxylinalool werden zwar *in vitro* als Substrate akzeptiert, scheinen jedoch *in planta* nicht von VvGT14 glukosyliert zu werden. VvGT14a wurde zudem mit einem Aglykaextrakt des Roten Traminers 11-18 Gm (früher und später Erntetermin) getestet. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung sowie die an der Universität Bonn durchgeführte LC-MS/MS-Analyse der gebildeten Produkte identifizierten die Glukoside von Geraniol, Citronellol und Nerol. VvGT14a wird im Roten Traminer 11-18 Gm reifekorreliert exprimiert (Frotscher, 2013). Zudem konnte die Bildung von Geranyl-, Neryl- und Citronellylglukosid während der Beerenreife bei dieser Rebsorte gezeigt werden (Stanitzek, 2013). Die Verknüpfung dieser Ergebnisse lassen darauf schließen, dass VvGT14a eine *in planta* Funktion als Terpenol-UGT besitzt.

Die Proteinvarianten VvGT14b und VvGT14c zeigten keine enzymatische Aktivität. VvGT14c ist eine Deletionsvariante von VvGT14a, bei der 21 Aminosäuren in der N-terminalen Domäne fehlen. Die entsprechenden Aminosäuren in den Proteinen VvGT1 (aus *V. vinifera*), UGT71G1, UGT85H2 (aus *M. truncatula*) und UGT72B1 (aus *A. thaliana*) beeinflussen die Bindung von UDP-Glukose (Osmani et al., 2009), so dass eine Deletion in diesem Bereich zu einem Verlust der Koordination des Donormoleküls zu führen scheint. Die inaktive VvGT14b unterscheidet sich nur in einer Aminosäure in

der PSPG-Box von VvGT14a. Die inaktive Proteinvariante besitzt ein Leucin anstelle eines Prolins an der PSPG-Box-Position 39 (Hughes and Hughes, 1994). Dieses Prolin ist eine konservierte Aminosäure, die im Vergleich von UGT-Sequenzen verschiedener Spezies die vorherrschende Aminosäure darstellt (Kumar et al., 2012) (Caputi et al., 2012). Prolin ist aufgrund seiner Struktur wichtig für die Ausbildung von Sekundärstrukturen und Proteinfaltung. Häufig ist diese Aminosäure konserviert, so dass deren Mutation, wie bei VvGT14b zu einem Aktivitätsverlust des Proteins führt (Morris et al., 1992). Die genaue Bedeutung des Prolins in der PSPG-Box wurde in der Literatur jedoch noch nicht beschrieben. Es kann jedoch postuliert werden, dass aufgrund der Aminosäuremutation eine strukturelle Veränderung der PSPG-Box vorliegt, so dass der Zuckerdonor fehlerhaft oder nicht mehr koordiniert wird.

4.5.2 *In vitro* Aktivität von VvGT16 und die biochemische Charakterisierung

Von VvGT16 konnte die genetische Information für eine Proteinvariante isoliert werden. Das aufgereinigte Enzym zeigte im Vergleich zu VvGT14 ein enges Substratspektrum. Neben Benzylalkohol und 2-Phenylethanol wurden auch Geraniol, Nerol, Citronellol, Hexanol, 3-Methyl-2-butenol, *cis* 3-Hexenol und *trans* 2-Hexenol glukosyliert. Benzylalkohol und 2-Phenylethanol gehören neben den Monoterpenen zu den Aroma-prägenden Verbindungen des Weins und liegen sowohl frei als auch glykosidisch gebunden vor (Lamorte et al., 2008) (Williams et al., 1982c) (Sefton et al., 1994). VvGT16 zeigte keine Enantiopräferenz bezüglich der Umsetzung von Citronellol. Die K_M -Werte für die Terpene waren vergleichbar mit denen von FaGT2 aus *F. ananassa* (100 bis 700 μM) (Lunkenbein et al., 2006) und VvGT1-3 aus *V. vinifera* (100 bis 900 μM) (Khater et al., 2012). Der k_{cat} -Wert von Geraniol lag in derselben Größenordnung wie der von CaUGT2 (0,0165 sec^{-1}) (Curcumin-UGT) (Masada et al., 2007). Die Wechselzahlen für Geraniol, Nerol und Citronellol für das Enzym UGT85B1 aus *Sorghum bicolor* waren mit 0,06 bis 0,1 sec^{-1} sechs- bis zehnmal größer, wobei die Terpenol-Glykosylierung eine Nebenaktivität dieses Enzyms darstellt. Hieraus lässt sich schließen, dass VvGT16 vermutlich keine *in planta* Terpenol-UGT-Aktivität aufweist. Interessanterweise wird VvGT16 primär in den Blüten und im späten Reifeverlauf im Roten Traminer 11-18 Gm exprimiert. Die Untersuchung des Aglykaextrakts der Beeren (später Erntezeitpunkt) und der Blüten vom Roten Traminer 11-18 Gm konnte keinen Umsatz nachweisen. Bislang sind jedoch kaum Daten über Glykoside in Blüten von Weintrauben in der Literatur verfügbar. Aus den Blüten der Rebsorten Shiraz und Chardonnay konnten die Glykoside der Flavonole Quercetin, Myricetin, Kämpferol und Isorhamnetin isoliert werden (Cordon, 2008), wobei Quercetin und Kämpferol von VvGT16 nicht glukosyliert wurden (Abbildung 33). In den Blüten vom Roten Traminer wurde vor allem Linaloyl- und Geranyl- β -O-Glukosid nachgewiesen (Stanitzek, 2013). Ein Umsatz von Linalool durch VvGT16 konnte jedoch nicht gemessen werden. Es ist durchaus möglich, dass VvGT16 Glykoside als Akzeptormolekül umsetzt. So setzt z.B. die 5GT aus *V. vinifera* Malvidin-Cyanidin-3-O-Glukosid zu einem Diglukosid um (Janvary et al., 2009). Zudem wurde nur UDP-Glukose als Donormolekül untersucht, so dass nicht auszuschließen ist, dass VvGT16 eine andere Zuckerspezifität besitzt. Eine Analyse der Blütenglykoside und eine Umsetzung alternativer Blüten-Aglykabibliotheken könnten die Identifizierung der natürlichen Substrate ermöglichen.

4.6 Gruppe H-Glykosyltransferase aus *Vitis vinifera*

VvGT15 wurde phylogenetisch der Gruppe H zugeordnet. Aus drei Rebsorten konnte die genetische Information für drei Proteinvarianten isoliert werden. VvGT15a (A179) und VvGT15c (V179) unterscheiden sich nur in einer Aminosäure. Die homologen UGT aus *A. thaliana* UGT76E2, UGT76E11, UGT76E12 und UGT76D1 können die Terpenole α -Terpineol, Linalool, Citronellol und Geraniol als Akzeptormoleküle umsetzen (Caputi et al., 2008). Zudem wurde UGT76D1 als Quercetin-O-Glykosyltransferase identifiziert (Lim et al., 2004). VvGT15 wird in der Wurzel und im Verlauf der Beerenreife exprimiert (Frotscher, 2013).

4.6.1 *In vitro* Aktivität von VvGT15 und die biochemische Charakterisierung

Das Substratspektrum von VvGT15 ist sehr eng. Von den 22 untersuchten Substraten wurden nur fünf aliphatische Verbindungen von allen drei Proteinvarianten umgesetzt, wobei die Terpenole Geraniol, Citronellol und Nerol präferiert wurden. Zusätzlich wurden auch Hexanol und Oktanol glukosyliert. Die Proteinvarianten VvGT15a und VvGT15c, deren Proteinsequenzen sich nur in einer Aminosäure unterscheiden, besitzen ein sehr ähnliches Substratspektrum, wobei VvGT15a zusätzlich Farnesol akzeptiert. Der Vergleich der beiden Sequenzen mit der strukturell untersuchten VvGT1 (Offen et al., 2006) verdeutlicht, dass die Aminosäure, in der sich VvGT15a und c unterscheiden, in einem Strukturbereich lokalisiert ist, der direkt an der Akzeptorbindung beteiligt ist. Die zusätzliche Methylgruppe sowie die höhere Hydrophobie des Valins in VvGT15c scheint die Koordination der Akzeptormoleküle zu begünstigen. In Mutationsstudien von UGT71G1 (*M. truncatula*) konnte zudem festgestellt werden, dass die Substitution verschiedener Aminosäuren in der Akzeptorbindetasche durch Alanin zu einer verringerten Aktivität führte (He et al., 2006). Diese Studie impliziert, dass sowohl die dreidimensionale Gestaltung als auch eine geeignete chemische Umgebung für die Koordination des Substrates entscheidend sind (Osmani et al., 2009). VvGT15b weist eine generelle geringere Aktivität im Vergleich zu VvGT15a und VvGT15c auf. Mithilfe des Alignments von VvGT15b mit VvGT1 (*V. vinifera*), UGT71G1 (*M. truncatula*) und UGT72B1 (*A. thaliana*) konnte verdeutlicht werden, dass zwei Aminosäuren (Position 87 und 251), in denen sich VvGT15b von VvGT15a und c unterscheiden, in Substrat-bindenden Proteinbereichen liegen. Cystein 87 liegt in einer N-terminalen α -helikalen Domäne, die zusammen mit einer loop-Region ein sehr variables Strukturelement bildet, das für die Akzeptorspezifität entscheidend ist (Bolam et al., 2007) (Mittler et al., 2007). Der Vergleich der Sequenz und Struktur von VvGT1 deutet darauf hin, dass Histidin 251 in einem Proteinbereich lokalisiert ist, der bei VvGT1 neben den Aminosäuren der PSPG-Box die Koordination des aktivierten Zuckers vermittelt. Histidin ist aufgrund seiner nukleophilen Eigenschaften in vielen Enzymklassen wie Esterasen und Serinproteasen als Bestandteil des katalytischen Zentrums wichtig für die enzymatische Aktivität (Dodson and Wlodawer, 1998). Zudem trägt VvGT15b an der Position 179 wie VvGT15a ebenfalls ein Alanin. Mithilfe von Mutagenesestudien könnte die Bedeutung der einzelnen Aminosäuren umfassender untersucht werden.

VvGT15a-c setzten interessanterweise bevorzugt das natürlich vorkommende (S)-Enantiomer von Citronellol um (Luan and Wüst, 2002), so dass aufgrund dieser Präferenz eine natürliche Funktion vermutet werden kann. Die Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen ergab, dass VvGT15a-c

bei 30 °C und pH 7,5 (100 mM Tris HCl) die höchste nachweisbare *in vitro* Aktivität gegenüber Geraniol zeigten. Das ermittelte pH-Optimum lag im Vergleich zu VvGT14 und VvGT16 im physiologischen pH-Bereich des Cytosols (Ono et al., 2010).

Die Wechselzahlen für Geraniol (VvGT15a, b: $0,1 \text{ sec}^{-1}$; VvGT15c: $0,17 \text{ sec}^{-1}$) waren drei- bis sechsmal größer im Vergleich zu den k_{cat} -Werten von Nerol und (S)-Citronellol. Die K_{M} - und k_{cat} -Werte, die für die UDP-Glukose ermittelt wurden, waren nur geringfügig höher als die von Geraniol. Die k_{cat} -Werte der drei VvGT15-Proteinvarianten bezüglich der Umsetzung von 8-Hydroxylinalool waren um den Faktor 30 bis 40 geringer als die Wechselzahl von Geraniol. Die ermittelten K_{M} -Daten sind mit denen von CaUGT2 aus *C. roseus* ($40 \mu\text{M}$) (Masada et al., 2007), VvGT1 (30 bis $40 \mu\text{M}$ für Kämpferol und Quercetin) (Offen et al., 2006) und UGT71G1 aus *M. truncatula* ($60 \mu\text{M}$) (He et al., 2006) vergleichbar. Die Glykosyltransferase UGT85B1 aus *S. bicolor* besaß für die Glukosylierung der Terpene Geraniol, Citronellol und Nerol höhere K_{M} -Werte ($130 \mu\text{M}$ bis $1,1 \text{ mM}$), während die Wechselzahlen für die Geraniol-Umsetzung durch VvGT15 und UGT85B1 ($0,1 \text{ sec}^{-1}$) vergleichbar waren (Hansen et al., 2003).

Bei der Untersuchung des Aglykaextrakts aus dem Roten Traminer 11-18 Gm (früher und später Erntetermin) konnte sowohl dünnschichtchromatographisch als auch mittels LC-MS/MS die Bildung der Geranyl-, Neryl- und Citronellyl-Glukoside bestätigt werden. VvGT15 zeigt wie VvGT14 eine ansteigende Expression im Reifeverlauf der Weinbeere (Frotscher, 2013). Die Kombination der Ergebnisse der kinetischen Analyse, die Untersuchung der Enantioselektivität sowie des Aglykaextrakts und die Genexpressionsdaten deuten darauf hin, dass VvGT15 sowohl *in vitro* als auch *in planta* eine Terpenol-UGT-Aktivität besitzt.

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe), J.T Baker/Mallinckrodt Baker (Griesheim) und Merck (Darmstadt) bezogen. Die radioaktiv markierte UDP-[U-¹⁴C]Glukose (300 mCi/mmol; 0,1 mCi/mL) wurde von American Radiolabeled Compounds (St. Louis, USA) bezogen. Die Szintillationslösung ProFlowP+ stammt von Meridian Biotechnologies Ltd (Epsom, England). Die Trauben- und Blüten-Aglykaextrakte wurden von Sarah Stanitzek (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Das genetische Material der UGT-Gene wurde von Johanna Frotscher (Hochschule Geisenheim) isoliert. Hochreines Wasser wurde durch das Wassernachbehandlungssystem Purelab Classic (Elga; Celle) produziert.

5.1.2 Bakterienstämme

Für die Durchführung dieser Arbeit wurden folgende Bakterienstämme verwendet

Escherichia coli NEB10beta (New England Biolabs; Frankfurt)

Escherichia coli DH5alpha (Invitrogen; Darmstadt)

Escherichia coli JM109 (Promega; Mannheim)

Escherichia coli BL21 (DE3) pLysS (Promega; Mannheim)

Escherichia coli RosettaTM (DE3) pLysS (Merck; Darmstadt)

5.1.3 Vektoren

In dieser Arbeit wurde der Klonierungsvektor pGEM[®]-T Easy (Promega; Mannheim) verwendet. Alle vorhandenen Gene wurden über Polymerasekettenreaktion (PCR) mit den Restriktionsschnittstellen amplifiziert und über generierte A-Überhänge in den pGEM[®]-T Easy ligiert. Die Effizienz der anschließenden Restriktion mit den Restriktionsenzymen ist im Vergleich zu der des einfachen PCR-Produktes höher.

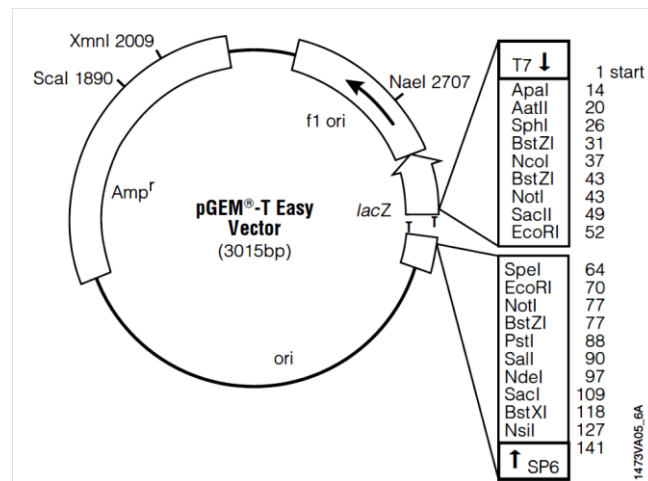


Abbildung 51: Vektorkarte von pGEMT[®] Easy. Die Darstellung wurde dem Herstellerhandbuch „pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems“ (www.promega.com; 8.07.2013) entnommen.

Für die Expression der putativen Glykosyltransferasen aus *V. vinifera* wurden die Vektoren pET29a (+) (nur VvGT12 und VvGT13) (Merck; Darmstadt) und pGEX-4T-1 (GE Healthcare; Freiburg) verwendet.

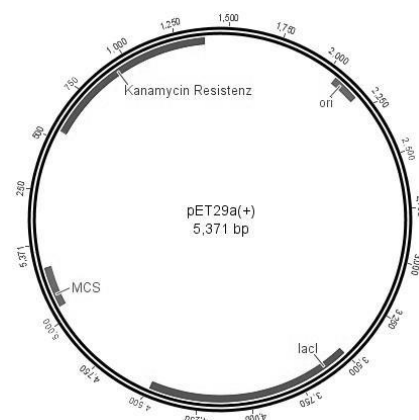


Abbildung 52: Vektorkarte von pET29a (+). Die Darstellung erfolgte mit Geneious Pro 5.5.6. Die Markierung der einzelnen Elemente wurde mithilfe der Herstellerangaben in der Abbildung farbig visualisiert.

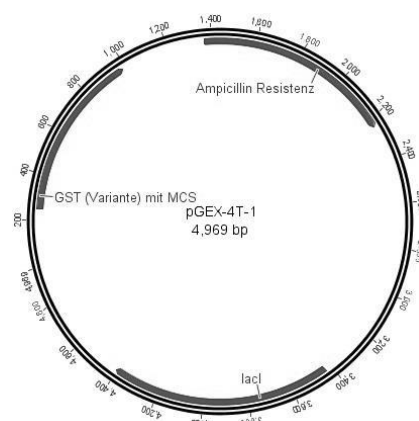


Abbildung 53: Vektorkarte von pGEX-4T-1. Die Darstellung erfolgte mit Geneious Pro 5.5.6. Die Markierung der einzelnen Elemente wurde mithilfe der Herstellerangaben in der Abbildung farbig visualisiert

5.1.4 DNA-Marker für Agarosegele

Als Größenstandard wurde der GeneRuler 1 kb DNA Ladder von ThermoFisher Scientific verwendet. Es wurden 6 μL des Standards eingesetzt.

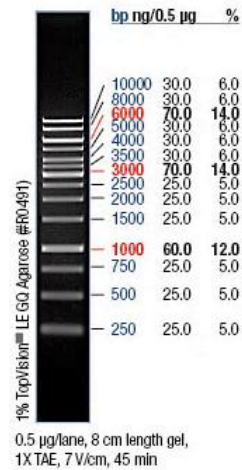


Abbildung 54: Herstellerdarstellung des verwendeten Standards GeneRuler™ 1kb DNA Ladder. Quelle: <http://www.thermoscientificbio.com/nucleic-acid-electrophoresis/generuler-1-kb-dna-ladder-250-to-10000-bp/> (5.07.2013)

5.1.5 Protein-Marker für SDS-PAGE und Western Blot

Als Größenstandard wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder von ThermoFisher Scientific verwendet. Es wurden 10 μL des Standards eingesetzt.

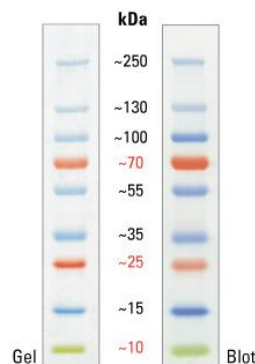


Abbildung 55: Herstellerdarstellung der verwendeten Standards PageRuler Plus Prestained Protein Ladder. Quelle: <http://www.thermoscientificbio.com/protein-electrophoresis/pageruler-plus-prestained-protein-ladder/> (19.07.2013).

5.1.6 Antibiotika

Zur Selektion der rekombinanten *E. coli*-Stämme und zur Verhinderung des Verlustes der Plasmide wurden zu allen Medien entsprechend der Vektor-codierten Resistenzen Antibiotikum in den folgenden Endkonzentrationen zugesetzt.

Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten Antibiotika.

Antibiotikum (Stammlösung)	codierendes Plasmid	Endkonzentration
Ampicillin (100 mg/ mL Wasser)	pGEX-4T-1	100 µg/mL
Chloramphenicol (34 mg/ mL Ethanol)	pLysS	22 µg/mL
Kanamycin (25 mg/ mL Wasser)	pET29a (+)	100 µg/mL

5.1.7 Enzyme

Tabelle 14: Übersicht der verwendeten Enzyme.

Enzym	Enzymname	Hersteller
DNA-Polymerase		
	<i>Taq</i> DNA-Polymerase	New England Biolabs
	<i>Phusion</i> DNA-Polymerase	ThermoFisher Scientific
Restriktionsenzyme		
	<i>NotI</i> (Fast Digest)	ThermoFisher Scientific
	<i>NdeI</i> (Fast Digest)	ThermoFisher Scientific
	<i>BamHI</i> (Fast Digest)	ThermoFisher Scientific
	<i>NcoI</i> (Fast Digest)	ThermoFisher Scientific
	<i>DpnI</i> (Fast Digest)	ThermoFisher Scientific
weitere Enzyme		
	T4 DNA Ligase	ThermoFisher Scientific
	T4 DNA Ligase	Promega
	Alkalische Phosphatase (Antikörper-assoziiert)	Sigma Aldrich

5.1.8 Primer

Tabelle 15: Übersicht der verwendeten Primer zur Klonierung von VvGT12 und VvGT13.

Primer zu Klonierung von VvGT12 und VvGT13 in pET29a (+)

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
VvGT13_fw_NcoI	GTGCCACGCGTTCCATGGCTTCACAGAATTG
VvGT13_rv_NotI	GTGCTCGAGTGCGGCCGCTGTCTTGGTTTGAT
VvGT13fw_pET_NcoI	GAGATATACCATGGCTTCACAGAATTGCGATCGGC
VvGT13rv_pET_NdeI	GTGCTCGAGTGCGGCCGCTGTCTTGGTTTGATT
VvGT12fw_pET_NdeI	GAGATATACATATGGCCTCCCACATGCAGCA
VvGT12rv_pET_NotI	TGGTGCTCGAGTGCGGCCGCTACTATTTCT

Tabelle 16: Übersicht der verwendeten Primer zur Klonierung der Glykosyltransferasen.**Primer zu Klonierung der Glykosyltransferasen in pGEX-4T-1**

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
VvGT9_fw_BamHI	CGCGGATCCATGGGGTCTGAATCAAAGCTAGTCC
VvGT9_rv_NotI	GCTTTTCCTTTTTGCGGCCGCTCAAATTTTCTTTG
VvGT10_fw_BamHI	CGCGGATCCATGGGTTCTGAATCAAAGCTAGTTC
VvGT10_rv_NotI	GCTTTTCCTTTTTGCGGCCGCTCAAATTTTGTTTG
VvGT11_fw_BamHI	CGCGGATCCATGGGATCTGAATCAAAGCTAGTTC
VvGT11_rv_NotI	GCTTTTCCTTTTTGCGGCCGCTTAAATTTTGG
VvGT7_fw_BamHI	CGCGGATCCATGGAGAGTGTTGTCTTGTATCCATCACC
VvGT7_fw_BamHI_6e	CGCGGATCCATGGGGAGTGTTGTCTTGTATCCATCACC
VvGT7_rv_NotI	TTGCGGCCGCTCATCCTGGCCTCCATGACTTGACCAG
VvGT8_fw_BamHI	CAGGGATCCATGGGGTCTCCGCATTTCTCC
VvGT8_rv_NotI	CTTTTTGCGGCCGCTCATGAACCAATGGACTCG
VvGT15_BamHI_fw	CGCGGATCCATGCCGAGGAGAGTGGTAC
VvGT15_NotI_rv	GCTTTTCCTTTTTGCGGCCGCTAGAATGAAGAG
VvGT14_BamHI_fw	CGCGGATCCATGGGTTCCATGGAGAAGCC
VvGT14_NotI_rv	TTTTCTTTTTGCGGCCGCTAGAGAAGCACTTGTTTC

Tabelle 17: Übersicht der verwendeten Primer für die zielgerichtete Mutagenese.**Primer für die zielgerichtete Mutagenese von VvGT7i und VvGT7j**

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
VvGT7_Ala-Pro_FW	GGGTAGTGCGGAGCCCACCCTCCAAGGACCCG
VvGT7_Ala-Pro_RV	CGCCTGCTCGGGTCCTTGGAGGGTGGGCTCCG
VvGT7_Leu-Ile-fw	CACTTGCCAAGATCAGCTGGAATCATTGTGAACAACCTTTGAAGCG
VvGT7_Leu-Ile-rv	GCTCTTGGTTCCAGCGCTTCAAAGGTGTTTACAATGATTCCAGCTG
VvGT7_Val-Leu-fw	GTACCGCCTCTGACATGGCGAAGCCGATACTTGACAGGGAGG
VvGT7_Val-Leu-rv	CTCATAAGCCTTATCCTCCCTGTCAAGTATCGGCTTCGCCATG

5.1.9 Kommerzielle Kits

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende kommerzielle Kits verwendet:

Isolation von Plasmid-DNA:

Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega; Mannheim)

Isolation von DNA aus einem Agarosegel:

NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel; Düren)

pGEM[®]-T Easy System:

pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega; Mannheim)

5.1.10 Puffer und Medien

Für alle Puffer und Medien wurde entweder entionisiertes VE-Wasser oder hochreines Wasser (MQ-Wasser) verwendet.

Tabelle 18: Übersicht der verwendeten Puffer und Medien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Standardpuffer	
Tris HCl Puffer (100 mM) (pH zwischen 7,0 und 9,5)	Tris-Base 12,114 g/L mit VE- Wasser auf das gewünschte Volumen auffüllen pH mit HCl einstellen Alle Puffer, die bei einem Enzymassay zum Einsatz kamen enthielten zusätzlich noch 10 mM β -Mercaptoethanol
Puffer für pH-Reihe	
Zitronensäure Puffer (pH 2,0 bis 6,0) (Lundblad and Macdonald, 2010)	Stammlösung A Stammlösung B 0,1 M Zitronensäure 0,1 M Natriumcitrat Stammlösung A und B werden in einem festgeschriebenen Verhältnis miteinander vermischt, um den gewünschten pH- Wert zu erreichen.
Tris HCl Puffer (pH 6,0 bis 10,0)	Tris-Base 12,114 g/L Der pH wird durch die Zugabe von HCl eingestellt.
Glycin-NaOH Puffer (pH 9,0 bis 12,5)	Stammlösung A Stammlösung B 0,2 M Glycin 0,2 M NaOH Stammlösung A und B werden in einem festgeschriebenen Verhältnis miteinander vermischt, um den gewünschten pH- Wert zu erreichen.
Kultivierung von <i>E. coli</i>	
LB-Medium (Bertani, 1951)	NaCl Hefeextrakt Pepton/Trypton 10g/L 5g/L 10g/L mit VE-Wasser auffüllen autoklavieren
LB-Agar	NaCl Hefeextrakt Pepton/Trypton Agar 10 g/L 5 g/L 10 g/L 15 g/L mit VE-Wasser auffüllen autoklavieren

Fortsetzung Tabelle 18: Übersicht der verwendeten Puffer und Medien.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
SOC-Medium (pH 7,0)	NaCl	0,5 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	Pepton/Trypton	20 g/L
	KCl-Lösung (250 mM)	2,5 mM
	mit VE-Wasser auffüllen pH mit NaOH einstellen autoklavieren	
	Glukose-Lösung (20%)	1,8 mL/L
	MgCl ₂ -Lösung (2M)	5 mL/L
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktosid)	Stammlösung	238 mg/mL Wasser
	Endkonzentration	0,2 mg/mL
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid)	Stammlösung	20 mg/L DMSO
	Endkonzentration	40 µg/mL Medium
Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> Zellen		
RF1 Puffer	RbCl	100 mM
	MnCl ₂ ·4 H ₂ O	50 mM
	C ₂ H ₃ KO ₂	30 mM
	CaCl ₂ ·6 H ₂ O	10 mM
	Glycerol	15%
	pH mit 0,2 M Essigsäure auf 5,8 einstellen steril filtrieren	
RF2 Puffer	RbCl	10 mM
	CaCl ₂ ·6 H ₂ O	75 mM
	MOPS	10 mM
	Glycerol	15%
	pH mit NaOH auf 7,0 einstellen steril filtrieren	
Langzeitlagerung von Organismen als Cryostock		
Glycerin für Cryostocks (pH 8,0) (Mulhardt, 2010)	Glycerin	65 mL/L
	MgSO ₄	1,2 g/L
	Tris-Base	0,3 g/L
	mit MQ-Wasser auffüllen und pH mit HCl einstellen autoklavieren	
SDS-PAGE und Western Blot		
Bradford-Lösung	Coomassie Brilliant Blue G250	100 mg/L
	Ethanol	50 mL/L
	H ₃ PO ₄	100 mL/L
	mit MQ-Wasser auf 1 L auffüllen	

Fortsetzung Tabelle 18: Übersicht der verwendeten Puffer und Medien.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Auftragepuffer (5-fach) (Laemmli Puffer) (Laemmli et al., 1970)	Tris HCl Puffer (1M, pH 6,8)	31,2 mL
	Glycin	50,5 mL
	SDS	10 g
	Spatelspitze Bromphenolblau mit VE-Wasser auf 100 mL auffüllen	
	1M DTT vor Benutzung hinzufügen	0,1 M
1M DTT-Lösung (Dithiotreitol)	DTT	154 mg
	in 1mL VE-Wasser lösen	
APS-Lösung	Ammoniumpersulfat	10%
Colloidal Coomassie Färbelösung	$Al_2(SO_4)_3 \cdot 16 H_2O$	50g/L
	in MQ-Wasser lösen	
	Ethanol	100 mL/L
	Coomassie Brilliant Blue G250	0,2g/L
	H_3PO_4	25 mL/L
	mit MQ- Wasser auffüllen	
Fixierlösung (Silberfärbung)	Ethanol	400 mL/L
	Essigsäure	100 mL/L
	mit MQ-Wasser auf 1 L auffüllen	
Wash-Lösung (Silberfärbung)	Ethanol	300 mL/L
	mit MQ-Wasser auf 1 L auffüllen	
Thiosulfat-Lösung (Silberfärbung)	$Na_2S_2O_3$	20 mg/100 L
	mit MQ-Wasser auf 100 mL auffüllen	
Silbernitrat-Lösung (Silberfärbung)	$AgNO_3$	200 mg/100 L
	mit MQ-Wasser auf 100 mL auffüllen	
Entwicklerlösung (Silberfärbung)	Na_2CO_3	3 mg/100 mL
	Formaldehydlösung (37 %)	50 µL/100 mL
	$Na_2S_2O_3$	0,4 mg/100 mL
	mit MQ-Wasser auf 100 mL auffüllen	
Stopp-Lösung (Silberfärbung)	Glycin	5g/L
	mit MQ-Wasser auf das gewünschte Volumen auffüllen	
10-fach Oberpuffer	Tris-Base	30g/L
	Glycin	144 g/L
	SDS	10 g/L
	mit VE-Wasser auf 1 L auffüllen	

Fortsetzung Tabelle 18: Übersicht der verwendeten Puffer und Medien.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Semidry-Blotting Puffer	Tris-Base	3 g/L
	Glycin	15 g/L
	Methanol	200 mL/L
Washing Puffer	Tris-Base	2,42 g/L
	NaCl	8,18 g/L
	Tween 20	1 mL/L
Detection Puffer	Tris-Base	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	3 mM
BCIP (Dinatriumsalz)	Brom-4-chlor-indolylphosphat	5% (w/v) in MQ-Wasser
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid	5% (w/v) in 70% DMF
Proteinaufreinigung		
10-fach GST-Wash/Bind Puffer	Na ₂ HPO ₄	1,22 g/200 mL
	KH ₂ PO ₄	0,4 g/200 mL
	NaCl	16,1 g/200 mL
	KCl	0,4 g/200 mL
	mit VE-Wasser auf 200 mL auffüllen dem 1-fach GST/Wash Puffer wird 10 mM β-Mercaptoethanol hinzugefügt	
10-fach GST Elution Puffer	reduziertes Glutathion	0,154 g/5 mL
	Tris HCl Puffer (1 M; pH 8,0)	2,5 mL/5 mL
	mit VE-Wasser auf 5 mL auffüllen Lagerung bei -20 °C	
8-fach His Bind Puffer	Tris-Base	9,69 g/500 mL
	NaCl	116,88 g/500 mL
	Imidazol	1,36 g/500 mL
	pH auf 7,5 einstellen mit VE-Wasser auf 500 mL auffüllen	
8-fach His Wash Puffer	Tris-Base	9,69 g/500 mL
	NaCl	116,88 g/500 mL
	Imidazol	16,33 g/500 mL
	pH auf 7,5 einstellen mit VE-Wasser auf 500 mL auffüllen	
4-fach His Elution Puffer	Tris-Base	4,84 g/500 mL
	NaCl	58,44 g/500 mL
	Imidazol	136,16,33 g/500 mL
	pH auf 7,5 einstellen mit VE-Wasser auf 500 mL auffüllen Lagerung bei 4 °C	

Fortsetzung Tabelle 18: Übersicht der verwendeten Puffer und Medien.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
NiCl-Lösung	NiCl	0,2 M
	pH auf 6,0 mit HCl einstellen	
PMSF (100 mM)	Phenylmethylsulfonylfluorid	0,17 g/ 10 mL Methanol
	Lagerung bei -20 °C	
20 % Ethanol	Ethanol	200 mL/L
	mit VE-Wasser auf 1 L auffüllen	
Agarosegelelektrophorese		
50-fach TAE Puffer (pH 8,0)	Tris-Base	242 g/L
	Essigsäure	57,1 mL/L
	EDTA (0,5 M)	100 mL/L
	mit VE-Wasser auf 1 Liter auffüllen und pH einstellen	
10-fach Ladepuffer (Orange-Dye) (pH 8,0)	Orange G	0,21 %
	EDTA	0,1 M
	Glycerin	50 %
	in RNase- und DNase-freiem Wasser lösen und pH einstellen	

5.2 Software und Internetressourcen

Bioinformatische Software

Geneious Pro 5.5.6 (www.genious.com)

VectorNTI (Testversion)

DNA STAR-Software Version 5.0 (Testversion)

Yasara View (Version 12.6.3)

PyMOL 1.2r1 (Delano Scientific Ltd.)

ChemDraw (Testversion)

Internetressourcen

SWISS Model (<http://swissmodel.expasy.org/>)

BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

RING - Residue Interaction Network Generator Version 1.4
(<http://protein.bio.unipd.it/ring/>)

HotSpot Wizard 1.7 (<http://loschmidt.chemi.muni.cz/hotspotwizard/>)

5.3 Geräte

Tabelle 19: Übersicht der verwendeten Geräte.

Gerät	Bezeichnung und Hersteller
Kultivierung von <i>E. coli</i> und Zellausschluss	
Schüttelinkubator	GFL3032 und 3033 (Gesellschaft für Labortechnik; Burgwedel)
Zentrifugen	Sigma K415 (Sigma, Osterode) Sigma 1-14 (Sigma, Osterode) Sigma 2K15 (Sigma, Osterode) Eppendorf 5415R (Eppendorf AG, Hamburg) Eppendorf MiniSpin (Eppendorf AG, Hamburg)
Reagenzglasschüttler	Vortex-Genie® 2 (Scientific Industries, Inc, Bohemia, New York, USA)
Spektralphotometer	Nicolet evolution 100 (Thermo, Cambridge, England)
Inkubator	Forma Steri-Cycle CO2 Incubator (Thermo, Cambridge, England)
sterile Werkbank	Hera Safe (Heraeus Holding GmbH, Hanau)
Wasserbad	Julabo HC5/ 7 (JULABO GmbH, Seelbach)
Ultraschallsonde	Bandelin UW2070/HD2070 (Bandelin Electronic GmbH Co. KG, Berlin)
Horizontalschüttler	Shaker DOS-10L (neoLab, Heidelberg)
Molekularbiologisches Arbeiten	
Waagen	SCALTEC SPB61 (SCALTEC Instruments GmbH, Heiligenstadt) TP 214 (Denver Instrument, Bohemia, New York, USA) Scout Pro SP U 4001 (Ohaus, Pine Brook, New Jersey, USA)
Agarosegel-Laufkammer	Elektrophoresekammer MIDI (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) Elektrophoresekammer MAXI (neoLab, Heidelberg)
UV-Transilluminator	G:BoX (Syngene, Cambridge, England)
Spannungsquelle	Consort E835 (Consort nv, Turnhout, Belgien) Consort CV245 (Consort nv, Turnhout, Belgien) BioRad PowerPac 200 (BioRad; Hercules, California, USA)
PCR-Maschinen	Primus 96 advanced (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) SensoQuest labcycler (SensoQuest GmbH, Göttingen)
Biochemisches Arbeiten	
SDS-PAGE-Kammer	MINI-Vertikal Elektrophoresesystem (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
Blotter	Semi Dry Blotter (biostep GmbH, Jahnsdorf)
Orbitalschüttler	Orbitalshaker Polymax 1040 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach)
Rotationsinkubator	Labinco Rotary Mixer L26 (Labinco BV, Breda, Niederlande)
Thermoblock	Thermomixer® comfort (Eppendorf AG, Hamburg)
Vakuum-Zentrifuge	Christ RVC 2-18 (Christ, Osterode)
Kühlthermostat	Lauda RM6 (LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO. KG, Lauda-Königshofen)
Autoradiograph	Digital Autoradiograph (EG & G Berthold, Milton Keynes, England) DAR Signal Analyzer (EG & G Berthold, Milton Keynes, England)
Flüssigszintillationszähler	Tri-Carb2800TR (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, Connecticut, USA)
Sonstige Geräte	
pH-Meter	CG 820 (Schott Geräte GmbH, Mainz)
Wasseraufbereitungsanlage	PureLab Classic (Elga Labwater; Celle)

5.4 Methoden

5.4.1 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

5.4.1.1 Anlegen von Glycerolkulturen zur Langzeitlagerung

Die Langzeitlagerung von rekombinanten Organismen erfolgte bei -80°C . Hierfür wurden $700\ \mu\text{L}$ einer Übernachtskultur mit $700\ \mu\text{L}$ sterilem Glycerol für Cryostocks (Mulhardt, 2010) gemischt und eingefroren.

5.4.1.2 Herstellung von Übernachtskulturen

Übernachtskulturen dienen dem Animpfen von Kultivierungsansätzen oder der Gewinnung von Zellmaterial für eine Plasmidisolierung. Für eine Übernachtskultur wurde steriles Medium in einem Kulturröhrchen mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit jeweils einer Einzelkolonie von einer Anzuchtplatte angeimpft. Die Inokulation erfolgte mittels einer sterilen Pipettenspitze. Die Kulturen wurden über Nacht bei $150\ \text{rpm}$ im Inkubator bei $37\ ^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

5.4.1.3 Herstellung chemokompetenter Zellen (Rubidiumchlorid- (RbCl-) Methode)

Die Herstellung chemokompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode (Hanahan, 1983). Dafür wurden zunächst $200\ \text{mL}$ LB-Medium mit einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes angeimpft und bei $37\ ^{\circ}\text{C}$ bis zum Erreichen einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ (optischen Dichte bei einer Wellenlänge von $600\ \text{nm}$) von $0,5$ angezogen. Anschließend wurde die Bakterienkultur auf Eis abgekühlt und daraufhin bei $4\ ^{\circ}\text{C}$ und $4000\ \text{rpm}$ für $20\ \text{Minuten}$ zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in $30\ \text{mL}$ vorgekühltem RF1 Puffer aufgenommen und auf Eis für mindestens $15\ \text{Minuten}$ inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert ($4000\ \text{rpm}$, $20\ \text{Minuten}$, $4\ ^{\circ}\text{C}$), das Zellpellet in $8\ \text{mL}$ eiskaltem RF2 Puffer resuspendiert und jeweils $50\ \mu\text{L}$ aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\ ^{\circ}\text{C}$ gelagert.

5.4.1.4 Hitzeschock-Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation durch Hitzeschock wurden $50\ \mu\text{L}$ chemokompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, mit $1,5\ \mu\text{L}$ Vektor-DNA bzw. $5\ \mu\text{L}$ Ligationsansatz versetzt und für $30\ \text{Minuten}$ auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock im Wasserbad bei $42\ ^{\circ}\text{C}$ für $45\ \text{Sekunden}$. Daraufhin wurden die Zellen erneut auf Eis für $2\ \text{Minuten}$ abgekühlt und mit $200\ \mu\text{L}$ SOC-Medium versetzt, um dann bei $37\ ^{\circ}\text{C}$ für eine Stunde inkubiert zu werden.

Nach der Inkubation wurde das Zellpellet durch kurzes Zentrifugieren gewonnen, der Überstand grob verworfen und das Pellet im restlichen Medium resuspendiert. Zur Selektion der transformierten Zellen wurde die Zellsuspension auf eine LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei $37\ ^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank inkubiert.

5.4.1.5 Kultivierung und Proteinexpression

Die Expression der UGT aus *V. vinifera* erfolgte in dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pLysS, wobei die genetische Information für die jeweilige GT mit N-terminalen GST-Tag auf dem Plasmid pGEX-4T-1 vorlag. Der Expressionsstamm BL21 (DE3) pLysS besitzt das Plasmid pLysS, welches die vorzeitige basale Expression des heterolog zu exprimierenden und putative toxischen Fremdgens verhindert. Die Proteinexpression wird durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Für die Kultivierung wurden wenn möglich 2 L-Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet, weil diese eine effiziente Versorgung der Zellen mit Sauerstoff gewährleisten.

Zur heterologen Proteinexpression wurde ein Kultivierungsvolumen von 1 L LB-Medium verwendet. Hierfür wurde die Hauptkultur mit 50 mL Übernachtskultur inokuliert und bis zum Erreichen einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,6 bis 0,8 bei 37 °C und 1500 rpm inkubiert. Vor der Induktion mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) wurde die Kultivierung auf 16 °C abgekühlt und anschließend über Nacht für 20 bis 24 Stunden bei 16 °C und 160 rpm geschüttelt. Am Ende der Kultivierungsdauer wurden die Zellen mittels Zentrifugation für 10 Minuten bei 4000 rpm und 4 °C pelletiert und mit GST-Bind/Wash Puffer gewaschen. Das resuspendierte Zellpellet wurde abhängig von der Proteinexpression der jeweiligen GT in zwei bis sechs 50 mL Falkons überführt und die nach erneuter Zentrifugation gewonnenen Pellets bei -80 °C bis zur Verwendung eingefroren.

Die Kultivierung und Expression der ersten UGT VvGT12- und VvGT13-Varianten wurden zudem mit C-terminalen His-Tag exprimiert. Hierbei lag die genetische Information für die UGT auf dem Plasmid pET29a (+). Aufgrund der niedrigen Expressionsrate dieser Fusionsproteine wurden diese Enzyme sowie alle weiteren UGT nur als GST-Fusionsprotein exprimiert und charakterisiert.

5.4.1.6 Zellaufschluss von *E. coli*- Zellen

Die bei -80 °C gelagerten Zellpellets wurde in GST-Bind/Wash Puffer oder im His-Binding Puffer resuspendiert und mit 1 mM PMSF, welches in Methanol gelöst vorlag, versetzt. PMSF hemmt irreversibel die bei dem Zellaufschluss unter anderem freigesetzten Serinproteasen. Diese können zum Abbau des heterolog exprimierten Proteins führen (Gold and Fahrney, 1964). Hierbei ist zu beachten, dass PMSF in wässrigen Lösungen schnell degradiert und somit erst unmittelbar vor der Zellyse der Zellsuspension zugesetzt wird. Die Zelldisruption erfolgt mithilfe von Ultraschall. Hierbei werden die Zellen durch pulsierende Ultraschallwellen (Geräteeinstellung: Leistung: 50 %, 5 Zyklen, 10 bis 20 Minuten) zerstört. Abhängig vom Zellpellet wurde der unter Eiskühlung durchgeführte Vorgang zwei- bis dreimal wiederholt. Die Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation bei 13500 rpm und 4 °C für 20 Minuten pelletiert. Der Proteinrohextrakt wurde anschließend über Affinitätschromatographie aufgearbeitet.

5.4.1.7 Glutathion-S-Transferase (GST)- Affinitätschromatographie

Das exprimierte GST-Fusionsprotein wurde aus dem Zellysat mittels manueller GST-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Hierfür wurde GST-Binding Resin (Novagen) verwendet. Dieses stellt ein poröses Material dar, welches an der Oberfläche mit Glutathion verknüpft ist, woran der GST-Tag gebunden wird. Die gezielte Elution erfolgt durch die Zugabe von reduziertem

Glutathion, welches eine höhere Affinität zu dem GST-Tag besitzt als das Resin-gebundene Glutathion.

Für die Aufreinigung wird das Zelllysate auf die Säule geladen und für mindestens eine Stunde bei 4 °C invertiert. Nach der Inkubation wurde der Durchfluss verworfen und das Resin zweimal mit 5 bis 10 mL GST Wash/Bind Puffer gewaschen. Zur Elution des Zielproteins wurde die Säule mit 300 µL GST-Elution Puffer versetzt und für mindestens 5 Minuten inkubiert. Der Elutionsschritt wurde zweimal mit 500 µL Puffer wiederholt. Die drei Eluate wurden vereinigt und bis zur Verwendung am selben Tag auf Eis gelagert.

5.4.1.8 His-Tag- Affinitätschromatographie

Die rekombinanten UGT mit C-terminalem His-Tag wurden mithilfe manueller Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Bindung erfolgte über Nickel-haltiges IMAC Resin (BioRad). Der His₆-Tag bindet reversibel an das chelatisierte Nickel. Die Elution des Fusionsproteins erfolgt durch die kompetitive Zugabe von Imidazol.

Nach dem Zellaufschluss wird der Proteinrohextrakt auf die Säule geladen und für mindestens eine Stunde bei 4 °C invertiert. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen und das Resin zweimal mit 5 bis 10 mL His-Wash Puffer gewaschen. Zur Elution des Zielproteins wurde die Säule mit 400 µL His-Elution Puffer versetzt und für mindestens 5 Minuten inkubiert. Der Elutionsschritt wurde zweimal mit 400 µL Puffer wiederholt. Die drei Eluate wurden vereinigt. Das eluierte Protein wurde aufgrund der eventuellen Enzymaktivität-hemmenden Wirkung hoher Imidazolkonzentrationen im Elutionspuffer über Konzentratorsäulen entsalzt und aufkonzentriert. Hierbei wurden die Bestandteile, die kleiner als die Membranporen des Konzentrators waren, durch die Zentrifugalkraft in einen Durchlaufbehälter transportiert, während die größeren Bestandteile wie das Zielprotein im oberen Teil des Konzentrators verblieben. Somit konnten gezielt Pufferkomponenten entfernt und das Volumen verringert werden.

5.4.2 Molekularbiologische Methoden

5.4.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem Kit Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Hierfür wurde ein Zellpellet einer 5 mL-Übernacht-Kultur verwendet. Die Isolierung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

5.4.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation der Glykosyltransferase-Gene

Die Gene der UGT wurden von Johanna Frotscher (Hochschule Geisenheim) zur Verfügung gestellt. Für die Ligation der Gene in den Expressionsvektor pGEX-4T-1 wurden zwei Restriktionserkennungssequenzen aus der multiplen Klonierungssequenz (MCS) von pGEX-4T-1 ausgewählt, die nicht in der Gensequenz der UGT vorhanden waren. Für alle UGT-Gene wurden die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Not*I verwendet. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme wurden mithilfe von Oligonukleotiden (Primern), die das Gen flankieren, an das 5'- und 3'-Ende der Gensequenz angebracht. Für die Amplifikation wurde die DNA-Polymerase *Phusion* verwendet, die eine Korrektur-Lesefunktion (proof-reading) besitzt und für die DNA-Synthese entlang

eines DNA-Matrizenstranges (DNA-Template) 15 bis 30 Sekunden für 1000 Basenpaare (bp) benötigt. Die PCR mit der *Phusion* DNA-Polymerase beginnt zunächst mit einer Initialtemperatur von 98 °C für 10 Minuten, bei der die DNA denaturiert wird und als Einzelstrang vorliegt. Die Vervielfältigung der DNA erfolgt in drei Schritten, die in zyklischer Abfolge 30- bis 35-mal wiederholt werden. Der Zyklus beginnt zunächst mit einem DNA-Denaturierungsschritt für 30 Sekunden bei 98 °C. Im zweiten Schritt wird die Temperatur für fünf Sekunden auf eine Primer-abhängige Anlagerungstemperatur (Annealing-Temperatur) herabgesenkt. Hierbei lagern sich die Primer sequenzspezifisch an die Einzelstrang-DNA an. Die Annealing-Temperatur lag zwischen 65 und 70 °C und dauerte 30 Sekunden. Im anschließenden Elongationsschritt wird die Temperatur auf 72 °C erhöht. Die *Phusion* DNA-Polymerase besitzt bei dieser Temperatur ihr Aktivitätsoptimum. Aufgrund der vom Hersteller angegebenen DNA-Synthesezeit und der durchschnittlichen Genlänge der UGT von 1500 bp, wurde die Elongationszeit auf 45 Sekunden festgelegt. Die DNA-Polymerase verlängert die DNA ausgehend vom freien 3'-DNA-Ende der Primer entlang des Einzelstranges gemäß der komplementären Basenpaarung. Im Anschluss an die Amplifikationszyklen folgt ein finaler Elongationsschritt (72 °C für 10 Minuten) und ein Lagerungsschritt bei 4 °C. Die Amplifikation wurde anschließend mithilfe eines Agarosegels verifiziert und das Amplifikat der erwarteten Größe aus dem Gel aufgereinigt.

Tabelle 20: Übersicht der Schritte einer PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	10 Minuten	1
Denaturierung	98 °C	5 Sekunden	
Annealing	65-70 °C	30 Sekunden	30-35
Elongation	72 °C	45 Sekunden	
Finale Elongation	72 °C	10 Minuten	1
Lagerung	4 °C	unbegrenzt	1

Tabelle 21: Allgemeine Zusammensetzung einer PCR.

Komponente	Menge (Einfachansatz; Gesamtvolumen: 20 µL)
5-fach GC oder HF Puffer	4 µL
dNTPs (10 mM Stammlösung)	0,4 µL
<i>forward</i> Primer (10 µM Stammlösung)	0,5 µL
<i>reverse</i> Primer (10 µM Stammlösung)	0,5 µL
Dimethylsulfoxid (DMSO)	0,6 µL
DNA-Template	0,5 µL
<i>Phusion</i> DNA-Polymerase	0,2 µL
Wasser	13,3 µL

5.4.2.3 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Die analytische Auftrennung von DNA erfolgte in 1%iger Agarosegelen im elektrischen Feld bei 130 V. Für die Herstellung der Agarosegele wurde die Agarose in 1-fach TAE Puffer durch Aufkochen gelöst und nach kurzem Abkühlen mit Ethidiumbromid (4 µL/80 mL Agaroselösung) versetzt. Die flüssige Agarose wurde auf einen Gelträger gegossen und anschließend ein Kamm eingesetzt, um die

Geltaschen zu formen. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit 5-fach Gel-Ladepuffer versetzt und die entsprechende Menge in die Taschen pipettiert. Als Referenz für die DNA-Fragmentlänge diente der GeneRuler™ 1kb (ThermoFisher Scientific), von dem 10 µL verwendet wurden. Die Visualisierung erfolgte in einer Geldokumentationskammer mithilfe eines UV-Transilluminators.

5.4.2.4 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel

Die Aufreinigung von PCR-Produkten und mit Restriktionsenzymen geschnittener DNA aus einem Agarosegel erfolgte unter Verwendung des Kits NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Die entsprechenden Banden wurden unter kurzer UV-Beleuchtung aus dem Gel mithilfe eines Skalpell ausgeschnitten und gemäß den Herstellerangaben weiter bearbeitet.

5.4.2.5 Generierung eines A-Überhanges an ein PCR-Produkt

Die Restriktion eines PCR-Produktes an den 5'- und 3'-Enden eingefügten Erkennungssequenzen verlief meist unvollständig, weil die Restriktionsenzyme eine ausgeprägte DNA-Umgebung für eine effiziente Anlagerung an die Schnittsequenz benötigen. Aus diesem Grund wurde das generierte aufgereinigte PCR-Produkt in einen Zwischenvektor, den pGEM®-T Easy (Promega), ligiert. Dieser lineare Vektor besitzt T-Überhänge. Um das Amplifikat in den Zwischenvektor zu ligieren, muss dieses A-Überhänge besitzen. Diese werden durch eine zusätzliche Inkubation des aufgereinigten PCR-Produktes mit Desoxyadenosintriphosphat (dATP) und der Taq-DNA-Polymerase generiert. Diese DNA-Polymerase besitzt die Eigenschaft, dATP an das freie 5'-Ende anzuknüpfen und somit einen A-Überhang zu bilden, welcher dann mit dem T-Überhang des pGEM®-T Easy über komplementäre Basenpaarung interagieren kann. Die Integration des PCR-Produktes in den Zwischenvektor kann über Blau-Weiß-Selektion überprüft werden.

5.4.2.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die gezielte Spaltung von DNA erfolgte mithilfe von Restriktionsenzymen, die spezifische Erkennungssequenzen erkennen und an diesen spalten. Für die Klonierung der UGT-Gene wurden die beiden Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Not*I verwendet. Beide Enzyme wurden als FastDigest-Variante (ThermoFisher Scientific) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für mindestens eine Stunde. Die Restriktion wurde im Anschluss durch die Auftragung auf ein Agarosegel überprüft und die entsprechenden Restriktionsprodukte aus dem Gel aufgereinigt.

Tabelle 22: Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes von DNA mit Restriktionsenzymen.

Komponente	Menge (Gesamtvolumen: 15 µL)
10-fach FastDigest Puffer	1,5 µL
Restriktionsenzym	je 1,75 µL
DNA (PCR-Produkt, Plasmid)	10 µL

Die Restriktion von DNA diente zudem im Folgenden der Kontrolle der Ligation des PCR-Produktes in den Vektor. Die Gene *VvGT12* und *VvGT13* wurden zudem in den pET29a (+)-Vektor über die Schnittstellen *Nde*I und *Not*I bzw. *Nco*I und *Nde*I integriert. Die exprimierten Proteine von *VvGT12* und *VvGT13* besaßen eine C-terminalen His₆-Tag.

5.4.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten erfolgte mithilfe der T4-Ligase (ThermoFisher Scientific). Hierbei lagern sich die durch die Restriktion entstandenen klebrigen Enden (sticky ends) der DNA-Fragmente zusammen, wobei die Ligase die Enden durch die Bildung einer Phosphodiester-Bindung miteinander verknüpft. Für den Ligationsansatz wurden das geschnittene Plasmid und Insert (PCR-Produkt) in Volumenverhältnis 1:3 miteinander gemischt und mit der Ligase und dem Ligationspuffer versetzt. Die Ligation erfolgte bei 4 °C über Nacht. Bei der Durchführung einer Ligation wurden stets Kontrollen mit nur ungeschnittenem Plasmid, mit nur geschnittenem Plasmid und mit Wasser angefertigt.

Tabelle 23: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes zur Integration eines Inserts in einen Vektor.

Komponente	Ligation (Gesamtvolumen: 10 µL)			
	regulärer Ansatz	Positivkontrolle	Negativkontrolle	Wasserkontrolle
10-fach Ligationspuffer	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
T4 Ligase	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
geschnittenes Plasmid	2 µL	-	-	-
geschnittenes Insert	6 µL	-	1 µL	-
ungeschnittenes Plasmid	-	1 µL	-	-
Wasser	-	7 µL	7 µL	8 µL

Nach der Inkubation über Nacht wurde der gesamte Ligationsansatz in chemokompetente *E. coli* NEB10beta-Zellen transformiert.

5.4.2.8 Durchführung einer Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR dient der Überprüfung der Anwesenheit des gewünschten Plasmides in den Transformanten durch die Amplifikation des Inserts mit spezifischen Primer. Hierfür wurden die Zellen direkt von der Agarplatte mit einer Pipettenspitze abgenommen, in einem PCR-Reaktionsgefäß manuell zerrieben und die Zellen auf einer neuen Agarplatte erneut ausgestrichen. Durch die Zerstörung der Zellen wird das Plasmid freigesetzt und dient in der anschließenden PCR als Template. Die Überprüfung der Kolonie-PCR erfolgt über Agarosegelelektrophorese. Bei der Kolonie-PCR wird anstelle der *Phusion* DNA-Polymerase die *Taq* DNA-Polymerase (New England Biolabs) verwendet, weil eine Korrektur-Lesefunktion nicht notwendig ist.

Tabelle 24: Zusammensetzung der einzelnen Komponenten einer Kolonie-PCR.

Komponente	Menge (Einfachansatz; Gesamtvolumen: 20,2 µL)
10-fach ThermoPol Puffer	2 µL
dNTPs (10 mM Stammlösung)	1 µL
<i>forward</i> Primer (10 µM Stammlösung)	1 µL
<i>reverse</i> Primer (10 µM Stammlösung)	1 µL
DNA-Template	zerstörte Zellen
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	0,2 µL
Wasser	15 µL

Tabelle 25: Übersicht des Programmes einer Kolonie-PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	30 Sekunden	
Annealing	52 °C	1,5 Minuten	25-30
Elongation	70 °C	1,5 Minuten	
Finale Elongation	70 °C	5 Minuten	1
Lagerung	4 °C	unbegrenzt	1

5.4.2.9 Zielgerichtete Mutagenese der Glykosyltransferasegene

Bei der zielgerichteten Mutagenese werden mithilfe spezifisch konstruierter Primer Basenaustausche hervorgerufen, die in der Folge eine Aminosäureveränderung erzeugen. Die Konstruktion der Primer und die Durchführung der PCR wurde gemäß dem QuikChange-Protokoll (Stratagene) durchgeführt. Zur Überprüfung der DNA-Sequenz wurden die entsprechenden Bereiche sequenziert.

5.4.2.10 Sequenzierung von DNA

Zur Kontrolle der Gensequenz von Ligationsprodukten und mutagenisierten Sequenzen wurde das Plasmid isoliert und zur Sequenzierung eingeschickt (Microsynth, MWG). Für die Sequenzierung wurden Vektor-spezifische Primer verwendet, die bei den Firmen bereits vorlagen.

5.4.3 Biochemische Methoden

5.4.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe der von M. Bradford entwickelten Methode (Bradford, 1976). Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 an die Proteine bindet und sich somit das Absorptionsmaximum von 495 nm auf 595 nm verschiebt. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm ist somit proportional zur Proteinmenge. Für die Messung wurden 100 µL der entsprechend verdünnten Proben mit 1 mL Bradfordlösung gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption der Lösung wurde anschließend bei 595 nm gemessen. Für jede neue Bradfordlösung wurde eine Kalibriergerade mit Rinderserumalbumin als Standard verwendet.

5.4.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht. Dabei lagert sich das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) an die Hitze-denaturierten Proteine an, so dass diese eine negative Nettoladung tragen und sich im elektrischen Feld zur Anode bewegen. Da die Zahl der assoziierten SDS-Moleküle proportional zum Molekulargewicht ist, trennen sich die Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht auf. Die Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgt durch den Vergleich der Laufstrecke durch das SDS-Gel

mit Proteinen, deren Größe bekannt ist. Als Proteinmarker wurde der PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific) verwendet.

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde in einem diskontinuierlichen System durchgeführt. Es wurden 10 %ige Trenngele sowie 4 %ige Sammelgele verwendet. Vor der Auftragung wurden die Proben im Verhältnis 4:1 mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 150 bis 160 V und 400 mA für etwa ein bis zwei Stunde. Die Visualisierung der Proteine erfolgte entweder mit Colloidal-Coomassie oder Silberfärbung. Für die Färbung mit Colloidal-Coomassie wurde das Trenngel zunächst gut mit Wasser gewaschen, anschließend mit der Färbelösung versetzt und über Nacht unter schütteln gefärbt. Das Colloidal-Coomassie bietet den Vorteil, dass es spezifisch die Proteinbanden färbt, während das Gel selber kaum blau wird, so dass ein Entfärben des Gels nicht notwendig ist.

Die modifizierte Silberfärbung nach Blum *et al.* (Blum *et al.*, 1987) wurde verwendet, wenn die Proteinbanden sequenziert werden sollten. Das Gel wurde hierfür über Nacht in der Fixierlösung inkubiert und anschließend dreimal für 20 Minuten mit Waschlösung gewaschen. Nach der Behandlung für 1 Minute mit der Sensitivierlösung (Thiosulfat-Lösung) und drei 20-sekündigen Waschschritten mit Wasser folgte die Inkubation mit der Färbelösung (Silbernitrat-Lösung) für eine Stunde. Nach drei weiteren Waschschritten mit Wasser wurden die Proteinbanden mithilfe der Entwicklerlösung sichtbar gemacht (5 bis 10 Minuten). Zur Beendigung der Detektion wurde das Gel zunächst erneut mit Wasser gewaschen und für fünf Minuten mit der Stopplösung inkubiert. Die zu sequenzierenden Proteinbanden wurde aus dem Gel mithilfe eines Skalpell entfernt und bis zur Untersuchung in 1 %iger Essigsäurelösung bei 4 °C gelagert.

5.4.3.3 Proteinsequenzierung

Die Proteinsequenzierung erfolgte am Lehrstuhl für Proteomik und Bioanalytik (Prof. Küster, Technische Universität München).

5.4.3.4 Western Blot

Mithilfe eines Western Blots lassen sich auf eine Membran übertragene Proteine spezifisch nachweisen. Hierbei werden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine zunächst auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Roth) übertragen, die zuvor mit 80 %igem Ethanol aktiviert wurde. Der Transfer erfolgt in Semidry-Blotting Puffer bei 15 V und 58 mA für 45 Minuten. Aufgrund der Verwendung eines gefärbten Proteinstandards, lässt sich die Übertragung der Proteine auf die Membran direkt verifizieren. Die Membran wurde nach dem Proteintransfer in Blocking-Lösung für mindestens eine Stunde inkubiert. Die heterolog exprimierten UGT besitzen alle einen N-terminalen GST-Tag, der von monoklonalen Anti-GST-Antikörper spezifisch erkannt wird. Die Bindung des Antiköpers erfolgte anschließend für eine Stunde unter Schütteln im Blocking Puffer. Danach wurde die Membran dreimal mit Washing Puffer gewaschen und mit dem Sekundäntikörper, monoklonales Anti-Mouse-IgG gekoppelt mit alkalischer Phosphatase (AP), für eine weitere Stunde inkubiert. Für die anschließende Detektion, wurde die Membran mit Detektionspuffer equilibriert und mit der Detektionslösung versetzt. Die Detektionslösung beinhaltet die beiden Detektionsreagenzien NBT und

BCIP, die von der an den sekundären Antikörper gekoppelten AP in einer Farbreaktion im Dunkeln umgewandelt wird. Die Detektionsreaktion wurde durch das Waschen mit Wasser gestoppt.

5.4.4 Analytische Methoden

Alle Enzymassays wurden mit aufgereinigtem GST-Fusionsproteinen durchgeführt.

5.4.4.1 Enzymassay mittels Radiodetektion

5.4.4.1.1 Messung der Radioaktivität mittels Szintillationsdetektor

Zur Identifizierung der Substrate wurden die aufgereinigten UGT mit verschiedenen Akzeptormolekülen und UDP-[U-¹⁴C]Glukose inkubiert. Ein Standardassay bestand aus 50 µL aufgereinigtem Enzym, 50 µL Akzeptormoleküllösung (1 mg/mL in Wasser), 0,1 µL UDP-[U-¹⁴C]Glukose (entspricht 22000 dpm) und 99,9 µL Tris HCl Puffer (100 mM, pH 7,5 mit 10 mM β-Mercaptoethanol). Die Reaktionsansätze wurden bei 30 °C für eine Stunde bzw. für 18,5 Stunden bei 150 rpm inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 µL 24 %ige Trichloressigsäurelösung (TCA) beendet. Anschließend wurde 500 µL wassergesättigtes 1-Butanol zugefügt und gut vermischt. Nach der 5-minütigen Zentrifugation bei 15300 rpm wurde die obere organische Phase vorsichtig entnommen und in einem Szintillationsröhrchen mit 2 mL Szintillationslösung gemischt. Die nicht umgesetzte markierte UDP-[U-¹⁴C]Glukose verbleibt hierbei aufgrund seiner Hydrophilie in der wässrigen Phase. Die Messung der Szintillation erfolgte für 1 Minute. Als Kontrolle diente ein mit Wasser versetzter Standardassay, der unter gleichen Bedingungen inkubiert wurde. Die Bestimmung der Substratpräferenz wurde mit dem aufgereinigtem Enzym von mindestens zwei verschiedenen Kultivierungen in Duplikaten durchgeführt.

Der Nachweis einer Enzymaktivität wurde durch die Messung der Radioaktivität in der extrahierten organischen Phase bestimmt. Die organische Phase wird hierbei mit einer Szintillationslösung vermischt, deren Komponenten durch die radioaktive Strahlung angeregt wird. Diese Anregung wird in Form von Fluoreszenzstrahlung wieder abgegeben, die wiederum von dem Szintillationsmessgerät erfasst und in „gezählte Zerfälle pro Minute“ (cpm: counts per minute) wiedergegeben wird. Die Messung von radioaktiven Substanzen gilt als sehr sensitiv, so dass bereits kleinste Mengen an radioaktiv markiertem Glykosid nachweisbar sind (Hastie et al., 2006), (Samuelsson, 1987).

5.4.4.1.2 Nachweis der Aktivität mittels Dünnschichtchromatographie

Zum Nachweis der Umsetzung der eingesetzten Terpenole wurden Enzymassays angefertigt, die über Dünnschichtchromatographie (DC) analysiert wurden. Die Enzymreaktionen setzten sich wie unter 5.4.4.1.1 beschrieben zusammen und wurden unter Protein-abhängigen Optimalbedingungen für pH-Wert und Temperatur inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden nach der Inkubationszeit von 18,5 Stunden mit TCA versetzt und mit 500 µL Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde vorsichtig entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Lösungsmittel mithilfe von Stickstoff oder in der Vakuumzentrifuge vaporisiert und das Reaktionsprodukt in 10 µL Methanol resuspendiert. Die Proben wurden im Anschluss vollständig auf die Kieselgel-DC-Platte aufgetragen. Die Migration der Produkte entlang der stationären Phase erfolgt

in einer Laufkammer, die das Laufmittel (CAW: Chloroform-Essigsäure-Wasser-Gemisch im Volumenverhältnis 50:45:5) enthielt. Das Laufmittel wandert aufgrund von Kapillarkräften entlang der festen Matrix der DC-Platte. Die Migration der zu analysierenden Proben ist abhängig von der Wechselwirkung mit der Trägermatrix und dem Laufmittel. Die DC-Platte wurde im Anschluss getrocknet und über digitale Autoradiographie vermessen. Hierbei wurde die DC-Platte in den Autoradiograph gelegt und fixiert. Die Kammer des Autoradiographs musste zuvor auf 2-6 °C abgekühlt werden, sodass das eingeleitete Trägergas Argon (Druck: 3 bar) gekühlt wurde. Die Messung der Radioaktivität erfolgte über vier Stunden. Zusätzlich zu den Proben wurde die radioaktiv markierte UDP-[U-¹⁴C]Glukose (3000 bis 5000 dpm) als Referenz mit analysiert.

5.4.4.2 Charakterisierung der heterolog exprimierten Glykosyltransferasen

5.4.4.2.1 Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen

Die Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen erfolgte für die Terpenol-umsetzenden UGT VvGT7, VvGT14, VvGT15 und VvGT16 unter Verwendung des präferierten Substrates. Zunächst wurde die Umsetzung des präferierten Substrates mit verschiedenen Mengen des aufgereinigten Enzyms und verschiedenen Inkubationszeiten bei 30 °C getestet. Die Reaktionsansätze wurden wie in 5.4.4.1.1 beschrieben pipettiert. Anhand dieser ersten Voruntersuchung wurden die Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen für Zeit, pH und Temperatur mit konstanter Proteinmenge durchgeführt.

5.4.4.2.2 Bestimmung der kinetischen Daten

Die Ermittlung der kinetischen Daten der UGT erfolgte für jedes umgesetzte Terpenol bei konstanter UDP-Glukose-Konzentration und für die UDP-Glukose bei konstanter Konzentration des präferierten Akzeptormoleküls. Die zuvor ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen wurden in der Regel auf alle von einer Glykosyltransferase akzeptierten Terpenole übertragen. Um eine angemessene UDP-Glukose-Konzentration zu erhalten, wurde radioaktiv markierte in Kombination mit nicht-markierter UDP-Glukose verwendet. Das Volumen des Reaktionsansatzes umfasste 40 µL. Die Auswertung erfolgte mittels der Solverfunktion in Microsoft Excel und der Auftragung von Lineweaver-Burk sowie Hanes-Woolf.

5.4.4.3 Nachweis der Reaktionsprodukte mittels LC-MS/MS

Für den chromatographischen Nachweis der Terpenalkohol-Glukoside wurden die Reaktionsansätze (5.4.4.1.1) mit nicht-markierter UDP-Glukose mit einer Endkonzentration von 2 bis 12,5 mM versetzt. Um einen möglichst großen Umsatz zu erhalten, wurden die Ansätze über Nacht für 20 bis 24 Stunden unter optimalen Reaktionsbedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 µL 24 %iger TCA-Lösung beendet. Die Analyse der Proben wurde von Sarah Stanitzek (Universität Bonn) durchgeführt.

5.4.4.4 Enzymassay mit Aglykaextrakt aus Trauben und Blüten

Die Terpenol-umsetzenden UGT wurden mit einem Aglykaextrakt aus Trauben (acht und 16 Wochen nach der Blüte) und Blüten inkubiert und analysiert. Das Aglykagemisch wurde von Sarah Stanitzek (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Zur Gewinnung des Extrakts wurden zunächst die Glykoside mittels Festphasen-Extraktion aus den Trauben (Rebsorten: Roter Traminer 11-18 Gm und Gelber Muskateller FR 90) isoliert. Anschließend erfolgte die Freisetzung der Aglyka durch enzymatische Hydrolyse der glykosidischen Bindung. Die Aglyka wurden anschließend durch Methyl-*tert*-butylether extrahiert (Stanitzek, 2013).

Für den Assay wurden zunächst 100 bis 150 μ M Tris HCl Puffer (100 mM, pH 7,5 oder 8,5 mit 10 mM β -Mercaptoethanol) mit 50 bis 100 μ L Aglykaextrakt vermischt und der Methyl-*tert*-butylether mittels Stickstoff vaporisiert, um eine mögliche inhibitorische Wirkung des Lösungsmittels auszuschließen. Das verringerte Volumen wurde durch die Zugabe von Puffer kompensiert. Anschließend wurden 100 μ L aufgereinigtes Enzym und 0,1 μ L UDP-[U-¹⁴C]Glukose (entspricht 22000 dpm) hinzugefügt. Bei der Durchführung des Assays für die chromatographische Analyse wurde anstelle der UDP-[U-¹⁴C]Glukose nicht-markierte UDP-Glukose mit einer Endkonzentration von 2 mM eingesetzt, wobei das Gesamtvolumen des Reaktionsansätzen nicht verändert wurde. Die Inkubation wurde nach 20 bis 24 Stunden bei 30 °C durch die Zugabe von 1 μ L 24 %ige TCA-Lösung beendet. Reaktionsansätze mit radioaktiv markierten UDP-[U-¹⁴C]Glukose wurden mittels Szintillationsdetektor und Dünnschichtchromatographie analysiert, während die Ansätze mit nicht-markierte UDP-Glukose zur weiteren Analyse an Sarah Stanitzek (Universität Bonn) geschickt wurden.

6 Literaturverzeichnis

- Aharoni, A., Jongsma, M.A., Kim, T., Ri, M., Giri, A.P., Verstappen, F.W., Schwab, W., and Bouwmeester, H.J. (2006). Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochem. Rev.* **5**, 49-58.
- Bar-Peled, M., Lewinsohn, E., Fluhr, R., and 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**, 20953-20959.
- Bayonove, C., Gunata, Y., Sapis, J., Baumes, R., Dugelay, I., and Grassin, C. (1992). Augmentation des arômes dans le vin et utilisation d'enzymes. *Rev Des Oenol Tech Vitivin Oenol* **64**, 15-18.
- Bertani, G. (1951). A Method for Detection of Mutations, Using Streptomycin Dependence in *Escherichia coli*. *Genetics* **36**, 598-611.
- Bertsch, C., Kieffer, F., Maillot, P., Farine, S., Butterlin, G., Merdinoglu, D., and Walter, B. (2005). Genetic chimerism of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay 96 is maintained through organogenesis but not somatic embryogenesis. *BMC Plant Biol.* **5**, 20.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA und DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Bolam, D.N., Roberts, S., Proctor, M.R., Turkenburg, J.P., Dodson, E.J., Martinez-Fleites, C., Yang, M., Davis, B.G., Davies, G.J., and Gilbert, H.J. (2007). The crystal structure of two macrolide glycosyltransferases provides a blueprint for host cell antibiotic immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5336-5341.
- Bowers, J.E., Dangl, G.S., Vignani, R., and Meredith, C.P. (1996). Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* **39**, 628-633.
- Bowles, D., Lim, E.K., Poppenberger, B., and Vaistij, F.E. (2006). Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 567-597.
- 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.
- Braun, P., Hu, Y., Shen, B., Halleck, A., Koundinya, M., Harlow, E., and LaBaer, J. (2002). Proteome-scale purification of human proteins from bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2654-2659.
- Brazier-Hicks, M., Offen, W.A., Gershater, M.C., Revett, T.J., Lim, E.K., Bowles, D.J., Davies, G.J., and Edwards, R. (2007). Characterization and engineering of the bifunctional *N*- and *O*-glucosyltransferase involved in xenobiotic metabolism in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20238-20243.
- Breitmaier, E. (2006). Terpenes. (Wiley. com).
- Breitmaier, E., and Jung, G. (2005). Organische Chemie. (Georg Thieme Verlag).
- Busso, D., Kim, R., and Kim, S.H. (2003). Expression of soluble recombinant proteins in a cell-free system using a 96-well format. *J Biochem Bioph Meth* **55**, 233-240.
- Campbell, J.A., Davies, G.J., Bulone, V., and Henrissat, B. (1997). A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **326 (Pt 3)**, 929-939.
- Caputi, L., Lim, E.K., and Bowles, D.J. (2008). Discovery of new biocatalysts for the glycosylation of terpenoid scaffolds. *Chem. Eur. J.* **14**, 6656-6662.
- Caputi, L., Malnoy, M., Goremykin, V., Nikiforova, S., and Martens, S. (2012). A genome-wide phylogenetic reconstruction of family 1 UDP-glycosyltransferases revealed the expansion of the family during the adaptation of plants to life on land. *Plant J.* **69**, 1030-1042.
- Cartwright, A.M., Lim, E.K., Kleanthous, C., and Bowles, D.J. (2008). A kinetic analysis of regiospecific glucosylation by two glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*: domain swapping to introduce new activities. *J. Biol. Chem.* **283**, 15724-15731.
- Castellussi, F. (2013). Worts Vitiviniculture situation in 2012. In XXXVIth World Congress of Vine ans Wine (Bukarest).
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., and Hermosín-Gutiérrez, I. (2010). Flavonol profiles of *Vitis vinifera* white grape cultivars. *J Food Comp Anal* **23**, 699-705.
- Christensen, P.L. (2000). Raisin production manual. (UCANR Publications).
- Claros, M.G., Bautista, R., Guerrero-Fernández, D., Benzerki, H., Seoane, P., and Fernández-Pozo, N. (2012). Why Assembling Plant Genome Sequences Is So Challenging. *Biology* **1**, 439-459.

- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A.C.P., Tavares, R.M., Sousa, M.J., Agasse, A., Delrot, S., and Gerós, H.** (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food*.
- Cordon, N.** (2008). The influence of viticultural treatments on the accumulation of flavonoid compounds in grapes and their contribution to wine quality. In *School of Agriculture, Food and Wine* (University of Adelaide).
- Cordonnier, R., and Bayonove, C.** (1974). Mise en evidence dans la baie de raisin, variete Muscat d'Alexandrie, de monoterpenes lies revelables par une ou plusieurs enzymes du fruit. *CR Acad Sci III* **278**, 3387-3390.
- Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J., and Henrissat, B.** (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* **328**, 307-317.
- Creasy, G.L., and Creasy, L.L.** (2009). *Grapes*. (CABI).
- Dodson, G., and Wlodawer, A.** (1998). Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 347-352.
- Ford, C.M., Boss, P.K., and 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 glucosylate anthocyanidins *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **273**, 9224-9233.
- Forneck, A.** (2011). Einflüsse auf die Qualität bei Weinreben.
- Frotscher, J.** (2013). Molekulare Charakterisierung von Glykosyltransferasen aus *Vitis vinifera*. In *Rebenzüchtung* (Hochschule Geisenheim).
- Gachon, C.M., Langlois-Meurinne, M., and Saindrenan, P.** (2005). Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends Plant Sci.* **10**, 542-549.
- Gershenson, J., and Dudareva, N.** (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 408-414.
- Gold, A.M., and Fahrney, D.** (1964). Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases. II. Formation and Reactions of Phenylmethanesulfonyl α -Chymotrypsin. *Biochemistry* **3**, 783-791.
- Griesser, M., Vitzthum, F., Fink, B., Bellido, M.L., Raasch, C., Munoz-Blanco, J., and Schwab, W.** (2008a). Multi-substrate flavonol O-glucosyltransferases from strawberry (*Fragaria x ananassa*) achene and receptacle. *J. Exp. Bot.* **59**, 2611-2625.
- Griesser, M., Hoffmann, T., Bellido, M.L., Rosati, C., Fink, B., Kurtzer, R., Aharoni, A., Muñoz-Blanco, J., and Schwab, W.** (2008b). Redirection of flavonoid biosynthesis through the down-regulation of an anthocyanidin glucosyltransferase in ripening strawberry fruit. *Plant Physiol.* **146**, 1528-1539.
- Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Baumes, R.L., and Cordonnier, R.E.** (1985). The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr.* **331**, 83-90.
- Gunata, Y.Z., Bayonove, C.L., Baumes, R.L., and Cordonnier, R.E.** (1986). Changes in free and bound fractions of aromatic components in vine leaves during development of muscat grapes. *Phytochemistry* **25**, 943-946.
- Gunata, Z., Bittour, S.M., Brillouet, J.-M., Bayonove, C., and Cordonnier, R.** (1988). Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. *Carbohydr Res* **184**, 139-149.
- Hall, D., Kim, K.H., and De Luca, V.** (2011). Molecular cloning and biochemical characterization of three Concord grape (*Vitis labrusca*) flavonol 7-O-glucosyltransferases. *Planta* **234**, 1201-1214.
- Hall, D., Yuan, X.X., Murata, J., and De Luca, V.** (2012). Molecular cloning and biochemical characterization of the UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase from Concord grape (*Vitis labrusca*). *Phytochemistry* **74**, 90-99.
- Hammarström, M., Hellgren, N., van Den Berg, S., Berglund, H., and Härd, T.** (2002). Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **11**, 313-321.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hans, J., Brandt, W., and 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 J.* **39**, 319-333.
- Hansen, E.H., Osmani, S.A., Kristensen, C., Moller, B.L., and Hansen, J.** (2009). Substrate specificities of family 1 UGTs gained by domain swapping. *Phytochemistry* **70**, 473-482.
- Hansen, K.S., Kristensen, C., Tattersall, D.B., Jones, P.R., Olsen, C.E., Bak, S., and Moller, B.L.** (2003). The *in vitro* substrate regiospecificity of recombinant UGT85B1, the cyanohydrin glucosyltransferase from *Sorghum bicolor*. *Phytochemistry* **64**, 143-151.

- Hastie, C.J., McLauchlan, H.J., and Cohen, P.** (2006). Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol. *Nat. Protoc.* **1**, 968-971.
- He, X.Z., Wang, X., and Dixon, R.A.** (2006). Mutational analysis of the *Medicago* glycosyltransferase UGT71G1 reveals residues that control regioselectivity for (iso)flavonoid glycosylation. *J. Biol. Chem.* **281**, 34441-34447.
- Heldt, H.-W., and Piechulla, B.** (2010). *Plant biochemistry*. (Academic Press).
- Herderich, M.J., and Smith, P.A.** (2005). Analysis of grape and wine tannins: Methods, applications and challenges. *Aust J of Grape Wine Res* **11**, 205-214.
- Hocquigny, S., Pelsy, F., Dumas, V., Kindt, S., Heloir, M.C., and Merdinoglu, D.** (2004). Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. *Genome* **47**, 579-589.
- Hou, B., Lim, E.K., Higgins, G.S., and Bowles, D.J.** (2004). *N*-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **279**, 47822-47832.
- Huang, C., Zhou, J., Wu, S., Shan, Y., Teng, S., and Yu, L.** (2004). Cloning and tissue distribution of the human *B3GALT7* gene, a member of the β 1,3-Glycosyltransferase family. *Glycoconjugate J* **21**, 267-273.
- Hughes, J., and Hughes, M.A.** (1994). Multiple secondary plant product UDP-glucose glucosyltransferase genes expressed in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cotyledons. *DNA Seq* **5**, 41-49.
- Isayenkova, J., Wray, V., Nimitz, M., Strack, D., and Vogt, T.** (2006). Cloning and functional characterisation of two regioselective flavonoid glucosyltransferases from *Beta vulgaris*. *Phytochemistry* **67**, 1598-1612.
- Jackson, R.G., Lim, E.K., Li, Y., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Hoggett, J., Ashford, D.A., and Bowles, D.J.** (2001). Identification and biochemical characterization of an *Arabidopsis* indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **276**, 4350-4356.
- Jackson, R.S.** (2008). *Wine science: principles and applications*. (Access Online via Elsevier).
- Jaillon, O., Aury, J.-M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., and Jubin, C.** (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**, 463-467.
- Janvary, L., Hoffmann, T., Pfeiffer, J., Hausmann, L., Topfer, R., Fischer, T.C., and Schwab, W.** (2009). A double mutation in the anthocyanin 5-O-glucosyltransferase gene disrupts enzymatic activity in *Vitis vinifera* L. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 3512-3518.
- Jin, S.H., Ma, X.M., Kojima, M., Sakakibara, H., Wang, Y.W., and Hou, B.K.** (2013a). Overexpression of glucosyltransferase UGT85A1 influences *trans*-zeatin homeostasis and *trans*-zeatin responses likely through O-glucosylation. *Planta* **237**, 991-999.
- Jin, S.H., Ma, X.M., Han, P., Wang, B., Sun, Y.G., Zhang, G.Z., Li, Y.J., and Hou, B.K.** (2013b). UGT74D1 is a novel auxin glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE* **8**, e61705.
- Jones, P., Messner, B., Nakajima, J., Schaffner, A.R., and Saito, K.** (2003). UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavonol glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **278**, 43910-43918.
- Jugde, H., Nguy, D., Moller, I., Cooney, J.M., and Atkinson, R.G.** (2008). Isolation and characterization of a novel glycosyltransferase that converts phloretin to phlorizin, a potent antioxidant in apple. *FEBS J.* **275**, 3804-3814.
- Kennedy, J.** (2002). Understanding grape berry development. *Practical Winery & Vineyard* **2002**.
- Khalifah, R.G., Rogers, J.I., and Mukherjee, J.** (1987). Interaction of the unique competitive inhibitor imidazole and related compounds with the active site metal of carbonic anhydrase: linkage between pH effects on the inhibitor binding affinity and pH effects on the visible spectra of inhibitor complexes with the cobalt-substituted enzyme. *Biochemistry* **26**, 7057-7063.
- Khater, F., Fournand, D., Vialet, S., Meudec, E., Cheynier, V., and Terrier, N.** (2012). Identification and functional characterization of cDNAs coding for hydroxybenzoate/hydroxycinnamate glucosyltransferases co-expressed with genes related to proanthocyanidin biosynthesis. *J. Exp. Bot.* **63**, 1201-1214.
- Kita, M., Hirata, Y., Moriguchi, T., Endo-Inagaki, T., Matsumoto, R., Hasegawa, S., Suhayda, C.G., and Omura, M.** (2000). Molecular cloning and characterization of a novel gene encoding limonoid UDP-glucosyltransferase in *Citrus*. *FEBS Lett.* **469**, 173-178.
- Kumar, R., Sangwan, R.S., Mishra, S., Sabir, F., and Sangwan, N.S.** (2012). *In silico* motif diversity analysis of the glycon preferentiality of plant secondary metabolic glycosyltransferases. *Plant OMICS* **5**, 200.
- Laemmli, U.K., Beguin, F., and Gujer-Kellenberger, G.** (1970). A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J. Mol. Biol.* **47**, 69-85.
- Lairson, L.L., Henrissat, B., Davies, G.J., and Withers, S.G.** (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 521-555.

- Lamorte, S.A., Gambuti, A., Genovese, A., Selicato, S., and Moio, L. (2008). Free and glycoconjugated volatiles of *V. vinifera* grape Falanghina. *Vitis* **47**, 241-243.
- Landmann, C., Fink, B., and Schwab, W. (2007). FaGT2: a multifunctional enzyme from strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits involved in the metabolism of natural and xenobiotic compounds. *Planta* **226**, 417-428.
- Lawrence, R.J., and Pikaard, C.S. (2003). Transgene-induced RNA interference: a strategy for overcoming gene redundancy in polyploids to generate loss-of-function mutations. *Plant J.* **36**, 114-121.
- Li, L., Modolo, L.V., Escamilla-Trevino, L.L., Achnine, L., Dixon, R.A., and Wang, X. (2007). Crystal structure of *Medicago truncatula* UGT85H2--insights into the structural basis of a multifunctional (iso)flavonoid glycosyltransferase. *J. Mol. Biol.* **370**, 951-963.
- Lim, E.K., Ashford, D.A., Hou, B., Jackson, R.G., and Bowles, D.J. (2004). *Arabidopsis* glycosyltransferases as biocatalysts in fermentation for regioselective synthesis of diverse quercetin glucosides. *Biotechnol. Bioeng.* **87**, 623-631.
- Lim, E.K., Li, Y., Parr, A., Jackson, R., Ashford, D.A., and Bowles, D.J. (2001). Identification of glucosyltransferase genes involved in sinapate metabolism and lignin synthesis in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **276**, 4344-4349.
- Luan, F., and Wüst, M. (2002). Differential incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into (3S)-linalool and geraniol in grape berry exocarp and mesocarp. *Phytochemistry* **60**, 451-459.
- Luan, F., Mosandl, A., Munch, A., and Wüst, M. (2005). Metabolism of geraniol in grape berry mesocarp of *Vitis vinifera* L. cv. Scheurebe: demonstration of stereoselective reduction, *E/Z*-isomerization, oxidation and glycosylation. *Phytochemistry* **66**, 295-303.
- Lundblad, R.L., and Macdonald, F. (2010). Handbook of biochemistry and molecular biology. (CRC Press Boca Raton, FL).
- Lunkenbein, S., Bellido, M., Aharoni, A., Salentijn, E.M., Kaldenhoff, R., Coiner, H.A., Munoz-Blanco, J., and Schwab, W. (2006). Cinnamate metabolism in ripening fruit. Characterization of a UDP-glucose:cinnamate glucosyltransferase from strawberry. *Plant Physiol.* **140**, 1047-1058.
- Mackenzie, P.I., Bock, K.W., Burchell, B., Guillemette, C., Ikushiro, S., Iyanagi, T., Miners, J.O., Owens, I.S., and Nebert, D.W. (2005). Nomenclature update for the mammalian UDP glucosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genom.* **15**, 677-685.
- Madina, B.R., Sharma, L.K., Chaturvedi, P., Sangwan, R.S., and Tuli, R. (2007). Purification and physico-kinetic characterization of 3 β -hydroxy specific sterol glucosyltransferase from *Withania somnifera* (L) and its stress response. *Biochim. Biophys. Acta* **1774**, 392-402.
- Makris, D.P., Kallithraka, S., and Kefalas, P. (2006). Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *J Food Comp Anal* **19**, 396-404.
- Martin, R.C., Mok, M.C., and Mok, D.W. (1999). Isolation of a cytokinin gene, ZOG1, encoding zeatin O-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 284-289.
- Masada, S., Terasaka, K., and Mizukami, H. (2007). A single amino acid in the PSPG-box plays an important role in the catalytic function of CaUGT2 (Curcumin glucosyltransferase), a Group D Family 1 glucosyltransferase from *Catharanthus roseus*. *FEBS Lett.* **581**, 2605-2610.
- Mateo, J.J., and Jimenez, M. (2000). Monoterpenes in grape juice and wines. *J. Chromatogr.* **881**, 557-567.
- Mateo, J.J., Gentilini, N., Huerta, T., Jimenez, M., and Di Stefano, R. (1997). Fractionation of glycoside precursors of aroma in grapes and wine. *J. Chromatogr.* **778**, 219-224.
- Miller, K.D., Guyon, V., Evans, J.N., Shuttleworth, W.A., and 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.* **274**, 34011-34019.
- Mittler, M., Bechthold, A., and Schulz, G.E. (2007). Structure and action of the C-C bond-forming glucosyltransferase UrdGT2 involved in the biosynthesis of the antibiotic urdamycin. *J. Mol. Biol.* **372**, 67-76.
- Modolo, L.V., Li, L., Pan, H., Blount, J.W., Dixon, R.A., and Wang, X. (2009). Crystal structures of glucosyltransferase UGT78G1 reveal the molecular basis for glycosylation and deglycosylation of (iso)flavonoids. *J. Mol. Biol.* **392**, 1292-1302.
- Moraga, A.R., Mozos, A.T., Ahrazem, O., and Gomez-Gomez, L. (2009). Cloning and characterization of a glucosyltransferase from *Crocus sativus* stigmas involved in flavonoid glycosylation. *BMC Plant Biol.* **9**, 109.
- Morris, A.L., MacArthur, M.W., Hutchinson, E.G., and Thornton, J.M. (1992). Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* **12**, 345-364.
- Mulhardt, C. (2010). Molecular biology and genomics. (Academic Press).

- Mullins, M.G., Bouquet, A., and Williams, L.E. (1992). Biology of the grapevine. (Cambridge University Press).
- Nagashima, S., Tomo, S., Orihara, Y., and Yoshikawa, T. (2004). Cloning and characterization of glucosyltransferase cDNA from *Eucalyptus perriniana* cultured cells. *Plant Biotechnol.* **21**, 343-348.
- Noble, M.A., Gul, S., Verma, C.S., and Brocklehurst, K. (2000). Ionization characteristics and chemical influences of aspartic acid residue 158 of papain and caricain determined by structure-related kinetic and computational techniques: multiple electrostatic modulators of active-centre chemistry. *Biochem. J.* **351 Pt 3**, 723-733.
- Offen, W., Martinez-Fleites, C., Yang, M., Kiat-Lim, E., Davis, B.G., Tarling, C.A., Ford, C.M., Bowles, D.J., and Davies, G.J. (2006). Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification. *EMBO J.* **25**, 1396-1405.
- Ono, E., Homma, Y., Horikawa, M., Kunikane-Doi, S., Imai, H., Takahashi, S., Kawai, Y., Ishiguro, M., Fukui, Y., and Nakayama, T. (2010). Functional differentiation of the glucosyltransferases that contribute to the chemical diversity of bioactive flavonol glycosides in grapevines (*Vitis vinifera*). *Plant Cell* **22**, 2856-2871.
- Osmani, S.A., Bak, S., and Moller, B.L. (2009). Substrate specificity of plant UDP-dependent glucosyltransferases predicted from crystal structures and homology modeling. *Phytochemistry* **70**, 325-347.
- Poppenberger, B., Fujioka, S., Soeno, K., George, G.L., Vaistij, F.E., Hiranuma, S., Seto, H., Takatsuto, S., Adam, G., Yoshida, S., and Bowles, D. (2005). The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15253-15258.
- Prinz zur Lippe, G. (2013). Weinbau & Kellerwirtschaft.
- Radomska-Pandya, A., Czernik, P.J., Little, J.M., Battaglia, E., and Mackenzie, P.I. (1999). Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab. Rev.* **31**, 817-899.
- Raines, R.T., McCormick, M., Van Oosbree, T.R., and Mierendorf, R.C. (2000). The S-Tag fusion system for protein purification. *Method Enzymol* **326**, 362-376.
- Rapp, A. (1992). Aromastoffe des Weines. *Chem unserer Zeit* **26**, 273-284.
- Riaz, S., Garrison, K.E., Dangl, G.S., Boursiquot, J.-M., and Meredith, C.P. (2002). Genetic divergence and chimerism within ancient asexually propagated winegrape cultivars. *J Am Soc Hortic Sci* **127**, 508-514.
- Rivas, F., Parra, A., Martinez, A., and Garcia-Granados, A. (2013). Enzymatic glycosylation of terpenoids. *Phytochem. Rev.*, 1-13.
- Ross, J., Li, Y., Lim, E., and Bowles, D.J. (2001). Higher plant glucosyltransferases. *Genome Biol* **2**, REVIEWS3004.
- Samuelsson, B.E. (1987). [50] Glucosyltransferase assay. *Methods Enzymol.* **138**, 567-575.
- Sawada, S., Suzuki, H., Ichimaida, F., Yamaguchi, M.A., Iwashita, T., Fukui, Y., Hemmi, H., Nishino, T., and Nakayama, T. (2005). UDP-glucuronic acid:anthocyanin glucuronosyltransferase from red daisy (*Bellis perennis*) flowers. Enzymology and phylogenetics of a novel glucuronosyltransferase involved in flower pigment biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **280**, 899-906.
- Scheich, C., Sievert, V., and Bussow, K. (2003). An automated method for high-throughput protein purification applied to a comparison of His-tag and GST-tag affinity chromatography. *BMC Biotechnol.* **3**, 12.
- Sefton, M., Francis, L., I., and Williams, P. (1994). Free and Bound Volatile Secondary Metabolites of *Vitis vinifera* Grape cv. Sauvignon Blanc. *J. Food Sci.* **59**, 142-147.
- Shao, H., He, X., Achnine, L., Blount, J.W., Dixon, R.A., and Wang, X. (2005). Crystal structures of a multifunctional triterpene/flavonoid glycosyltransferase from *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **17**, 3141-3154.
- Smith, D.B., and Johnson, K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione-S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
- Stanitzek, S. (2013). Funktionelle Charakterisierung der Glykosyltransferasen in *Vitis vinifera*-Analytik von freien Monoterpenalkoholen und Monoterpen- β -D-glukosiden sowie die funktionelle Charakterisierung potentieller Monoterpenyl-Glykosyltransferasen. In *Bioanalytik (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn)*.
- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biot* **60**, 523-533.
- This, P., Lacombe, T., and Thomas, M.R. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends Genet.* **22**, 511-519.

- Thomas, M.R., Cain, P., and Scott, N.S.** (1994). DNA typing of grapevines: A universal methodology and database for describing cultivars and evaluating genetic relatedness. *Plant Mol. Biol.* **25**, 939-949.
- Ugliano, M., and Moio, L.** (2008). Free and hydrolytically released volatile compounds of *Vitis vinifera* L. cv. Fiano grapes as odour-active constituents of Fiano wine. *Anal. Chim. Acta* **621**, 79-85.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, D.A., Cestaro, A., Pruss, D., Pindo, M., FitzGerald, L.M., Vezzulli, S., and Reid, J.** (2007). A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLOS ONE* **2**, e1326.
- Vogt, T., and Jones, P.** (2000). Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci.* **5**, 380-386.
- Voirin, S.G., Baumes, R.L., Sapis, J.C., and Bayonove, C.L.** (1992). Analytical methods for monoterpene glycosides in grape and wine. II. Qualitative and quantitative determination of monoterpene glycosides in grape. *J. Chromatogr.* **595**, 269-281.
- Walls, D., and Loughran, S.T.** (2011). Tagging Recombinant Proteins to Enhance Solubility and Aid Purification. In *Protein Chromatography*, D. Walls and S.T. Loughran, eds (Humana Press), pp. 151-175.
- Wang, X.** (2009). Structure, mechanism and engineering of plant natural product glycosyltransferases. *FEBS Lett.* **583**, 3303-3309.
- Waterhouse, A.L., and Lamuela-Raventós, R.M.** (1994). The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries. *Phytochemistry* **37**, 571-573.
- Williams, P.J., Strauss, C.R., Wilson, B., and Massy-Westropp, R.A.** (1982a). Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes and wines. *Phytochemistry* **21**, 2013-2020.
- Williams, P.J., Strauss, C.R., Wilson, B., and Massy-Westropp, R.A.** (1982b). Studies on the hydrolysis of *Vitis vinifera* monoterpene precursor compounds and model monoterpene. β -D glucosides rationalizing the monoterpene composition of grapes. *J. Agricult Food Chem* **30**, 1219-1223.
- Williams, P.J., Strauss, C.R., Wilson, B., and Massy-Westropp, R.A.** (1982c). Use of C_{18} reversed-phase liquid chromatography for the isolation of monoterpene glycosides and nor-isoprenoid precursors from grape juice and wines. *J. Chromatogr.* **235**, 471-480.
- Willits, M.G., Giovanni, M., Prata, R.T., Kramer, C.M., De Luca, V., Steffens, J.C., and Graser, G.** (2004). Bio-fermentation of modified flavonoids: an example of *in vivo* diversification of secondary metabolites. *Phytochemistry* **65**, 31-41.
- Winkler, A.J.** (1962). *General viticulture*. (Univ of California Press).
- Witte, S., Moco, S., Vervoort, J., Matern, U., and Martens, S.** (2009). Recombinant expression and functional characterisation of regiospecific flavonoid glucosyltransferases from *Hieracium pilosella* L. *Planta* **229**, 1135-1146.
- Woo, H.H., Jeong, B.R., Hirsch, A.M., and Hawes, M.C.** (2007). Characterization of *Arabidopsis* AtUGT85A and AtGUS gene families and their expression in rapidly dividing tissues. *Genomics* **90**, 143-153.
- Yonekura-Sakakibara, K., and Hanada, K.** (2011). An evolutionary view of functional diversity in family 1 glycosyltransferases. *Plant J.* **66**, 182-193.

7 Anhang

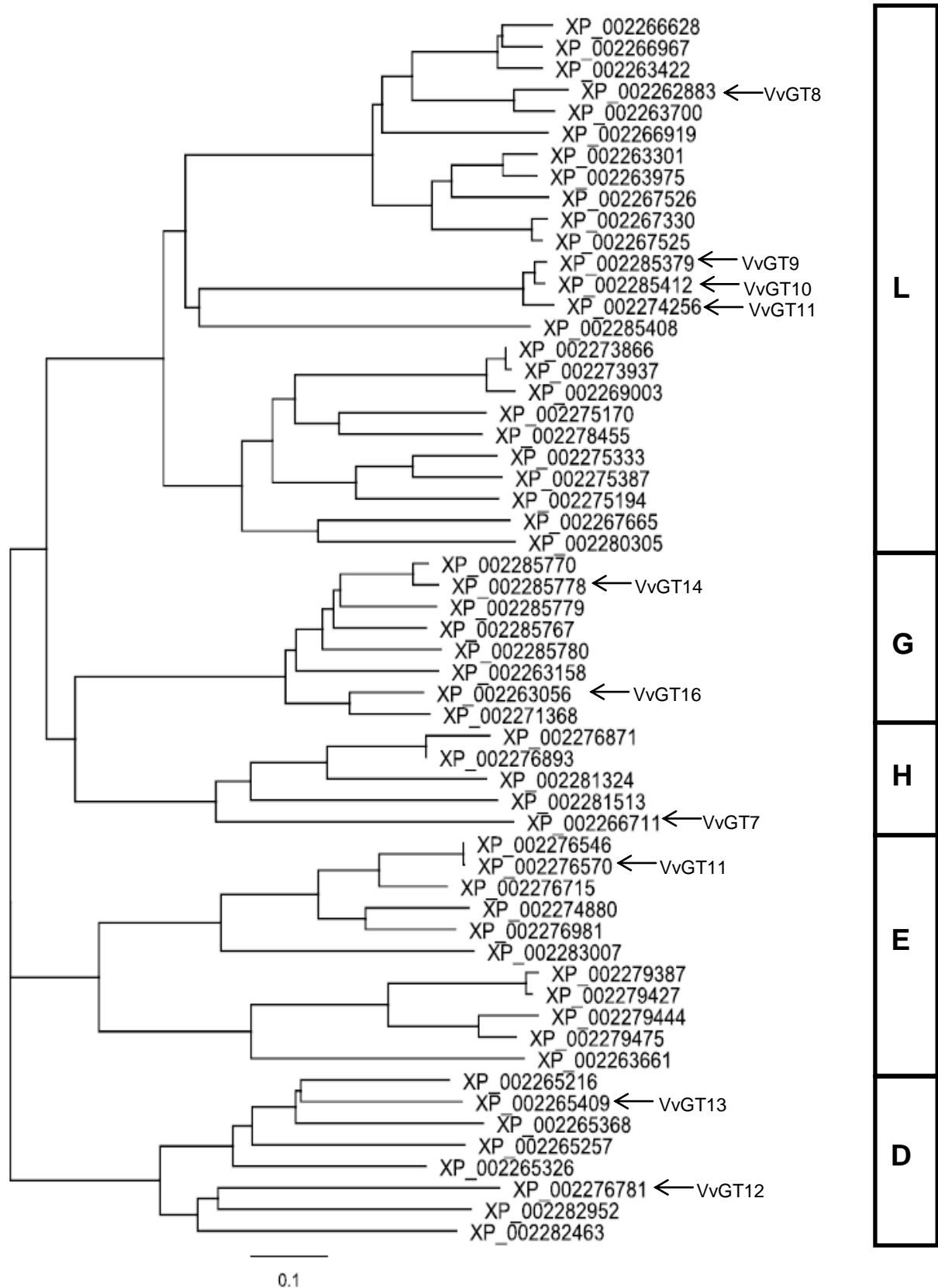




Abbildung 56: Phylogenetische Analyse der 57 putativen VvGT-Sequenzen. Der phylogenetische Baum wurde nach der *neighbor joining* Methode in Geneious Pro 5.5.6 erstellt. Die Sequenzen lassen sich in die Glykosyltransferase-Gruppen D, E, H, G und L einteilen (siehe Box).

Tabelle 26: Relative spezifischen Aktivitäten sowie Standardabweichungen der VvGT7i- und VvGT7j-Mutanten gegenüber den getesteten Substraten. Die relative spezifische Aktivität [%] bezieht sich auf die höchste spezifische Aktivität, die beim Umsatz von Nerol durch VvGT7g ermittelt wurde.



	VvGT7g	VvGT7i	VvGT7i-A317P	VvGT7i-L210i-A317P	VvGT7i-V186L-A317P	VvGT7i-V186L-L210i-A317P	VvGT7j	VvGT7j-A317P	VvGT7j-L210j-A317P	VvGT7j-V186L-A317P	VvGT7j-V186L-L210j-A317P
Citronellol	45 ± 17	0	1	14 ± 0,3	13 ± 0	48 ± 1	0	0	0	0	20 ± 4
Geraniol	32 ± 9	0	0	4 ± 0	4 ± 0	19 ± 4	0	0	0	0	0
8-Hydroxylinalool	1 ± 0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Linalool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nerol	100 ± 0,8	4 ± 1	0	22 ± 0,3	22 ± 0	78 ± 0,1	0	0	5 ± 0,7	5 ± 0,8	27 ± 0,4
Terpineol	0	0	0	0	0	1 ± 0	0	0	0	0	0
Cyanidin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kämpferol	1 ± 1,7	0	1 ± 0	1 ± 0	0	0	0	0	0	0	20 ± 1
Pelargonidin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Quercetin	9 ± 7	0	0	0	0	4 ± 0,6	0	0	0	0	8 ± 0,1
Benzylalkohol	19 ± 3	0	4 ± 0,6	4 ± 0,6	4 ± 0,7	10 ± 0,4	0	6 ± 1	0	0	9 ± 1
Phenylethanol	20 ± 18	0	0	0	1 ± 0	0	0	0	0	0	0
Eugenol	40 ± 0,1	10 ± 8	6 ± 0	10 ± 1	12 ± 0	12 ± 1,4	0	0	0	0	13 ± 0
Farnesol	0	0	3 ± 0,9	0	0	0	0	4 ± 0,2	0	0	3 ± 0,9
Hexanol	6 ± 0,5	0	0	0	0	5 ± 0,3	0	0	0	0	0
Oktanol	6 ± 0,2	0	0	0	0	3 ± 0,2	0	0	0	0	0
Mandelonitril	4 ± 0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-Methyl-2-butenol	6 ± 0,3	0	0	0	0	0	0	5 ± 0,9	0	0	5 ± 0
3-Methyl-3-butenol	3 ± 0,4	0	0	0	0	0	0	4 ± 0,8	0	0	0
<i>cis</i> 3-Hexenol	8 ± 0,5	0	0	0	1 ± 0	4 ± 0,5	0	0	0	0	0
<i>trans</i> 2-Hexenol	11 ± 1,2	0	0	1 ± 0	0	6 ± 0,2	0	0	0	0	0


 : 5-10 %
 : 11-50 %

 : 51-80 %
 : > 80 %

Tabelle 27: Relative spezifischen Aktivitäten sowie Standardabweichungen Proteinvarianten von VvGT7 gegenüber den getesteten Substraten. Die relative spezifische Aktivität [%] bezieht sich auf die höchste spezifische Aktivität, die beim Umsatz von Nerol durch VvGT7g ermittelt wurde.

	VvGT7a	VvGT7b	VvGT7c	VvGT7d	VvGT7e	VvGT7f	VvGT7g	VvGT7h	VvGT7i	VvGT7j	Leervektor
Citronellol	48 ± 6	67 ± 17	73 ± 3	71 ± 0	71 ± 1	33 ± 23	45 ± 17	10 ± 6	2 ± 0	0	0
Geraniol	27 ± 9	51 ± 28	60 ± 1	37 ± 8	32 ± 12	19 ± 11	32 ± 9	6 ± 3	0	0	0
8-Hydroxylinalool	1 ± 0	5 ± 0	4 ± 3	3 ± 1	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 0	0	0	0	0
Linalool	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nerol	70 ± 4	99 ± 5	91 ± 0	90 ± 3	76 ± 1	72 ± 12	100 ± 1	54 ± 1	4 ± 1	0	0
Terpineol	0	1 ± 2	0	0	1 ± 1	2 ± 0	0	1 ± 0	0	0	0
Cyanidin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kämpferol	1 ± 0	4 ± 6	3 ± 4	1 ± 0	2 ± 2	2 ± 0	1 ± 2	0	0	0	1
Pelargonidin	0	0	0	0	0	2 ± 2	0	0	0	0	0
Quercetin	4 ± 1	17 ± 15	17 ± 9	11 ± 0	6 ± 6	14 ± 12	9 ± 7	1 ± 0	0	0	0
Benzylalkohol	15 ± 1	21 ± 8	23 ± 6	11 ± 5	22 ± 3	9 ± 0	19 ± 3	2 ± 1	1 ± 0	1 ± 1	0
Phenylethanol	4 ± 0	5 ± 3	2 ± 2	5 ± 0	5 ± 0	3 ± 1	20 ± 18	1 ± 0	0	0	0
Eugenol	16 ± 7	38 ± 14	46 ± 1	43 ± 9	40 ± 9	26 ± 20	40 ± 0	23 ± 3	10 ± 8	0	0
Farnesol	2 ± 0	1 ± 1	0	1 ± 0	0	2 ± 1	0	0	1 ± 0	1 ± 1	0
Hexanol	5 ± 0	2 ± 0	1 ± 0	5 ± 0	4 ± 0	4 ± 1	6 ± 1	3 ± 0	0	0	0
Oktanol	1 ± 0	6 ± 0	5 ± 0	4 ± 1	5 ± 1	3 ± 3	6 ± 0	1 ± 0	0	0	0
Mandelonitril	3 ± 1	2 ± 3	0	3 ± 0	2 ± 1	3 ± 0	4 ± 0	1 ± 1	0	0	0
3-Methyl-2-butenol	3 ± 0	5 ± 1	4 ± 0	4 ± 0	6 ± 1	4 ± 1	6 ± 0	1 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	0
3-Methyl-3-butenol	2 ± 1	3 ± 0	2 ± 1	2 ± 0	2 ± 1	2 ± 0	3 ± 0	0	0	0	0
<i>cis</i> 3-Hexenol	4 ± 0	5 ± 2	4 ± 0	4 ± 1	5 ± 0	3 ± 1	8 ± 1	1 ± 1	0	0	0
<i>trans</i> 2-Hexenol	8 ± 2	8 ± 1	8 ± 0	7 ± 1	8 ± 0	5 ± 1	11 ± 1	4 ± 0	0	0	0

 : 5-10 %
 : 11-50 %

 : 51-80 %
 : > 80 %

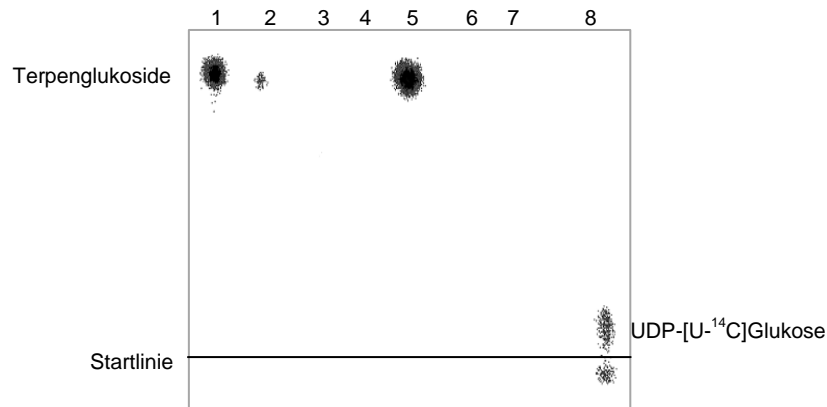


Abbildung 57: Dünnschichtchromatographie der Umsetzung der Terpene mit VvGT7b. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mittels Autoradiographen über vier Stunden. (1) Citronellol, (2) Geraniol, (3) 8-Hydroxylinalool, (4) Linalool, (5) Nerol, (6) α -Terpineol, (7) Leerkontrolle ohne Substrat und (8) UDP-[U- 14 C]Glukose.

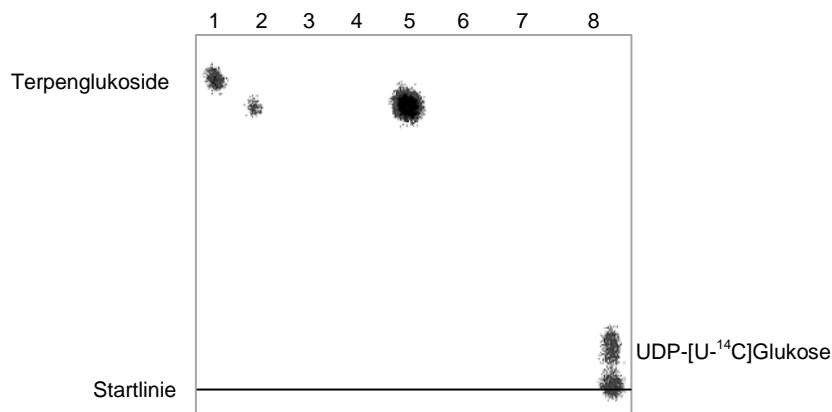


Abbildung 58: Dünnschichtchromatographie der Umsetzung der Terpene mit VvGT7b. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mittels Autoradiographen über vier Stunden. (1) Citronellol, (2) Geraniol, (3) 8-Hydroxylinalool, (4) Linalool, (5) Nerol, (6) α -Terpineol, (7) Leerkontrolle ohne Substrat und (8) UDP-[U- 14 C]Glukose.

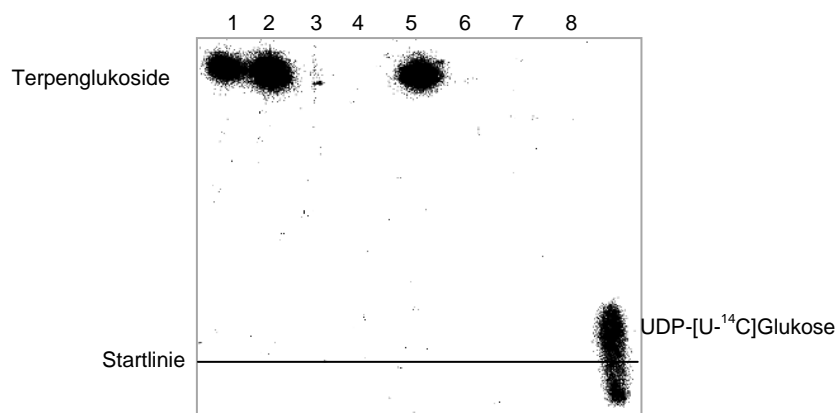


Abbildung 59: Dünnschichtchromatographie der Umsetzung der Terpene mit VvGT15b. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mittels Autoradiographen über vier Stunden. (1) Citronellol, (2) Geraniol, (3) 8-Hydroxylinalool, (4) Linalool, (5) Nerol, (6) α -Terpineol, (7) Leerkontrolle ohne Substrat und (8) UDP-[U- 14 C]Glukose.

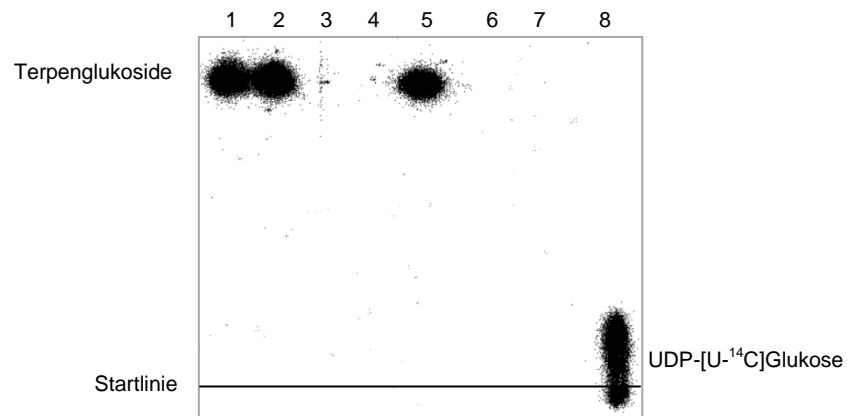


Abbildung 60: Dünnschichtchromatographie der Umsetzung der Terpene mit VvGT15c. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mittels Autoradiographen über vier Stunden. (1) Citronellol, (2) Geraniol, (3) 8-Hydroxylinalool, (4) Linalool, (5) Nerol, (6) α -Terpineol, (7) Leerkontrolle ohne Substrat und (8) UDP-[U-¹⁴C]Glukose.

1	MXSVLYPSXMGHLISNVLECKLILKXCHSPSIFITIFIPYNTGSTAPYLARVSSITISITPHHLPITSLDLSFSSPHRTIAFLLELNPNHIOALVSISSNNSVRLIIVDXECTAALVAAGLNIXFYFFFTSCACCLASFLYLPPIHQQTKTSK	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	
Consensus Identity																		
WG77a	EEVVLVPSXMGHLISNVLECKLILKXCHSPSIFITIFIPYNTGSTAPYLARVSSITISITPHHLPITSLDLSFSSPHRTIAFLLELNPNHIOALVSISSNNSVRLIIVDXECTAALVAAGLNIXFYFFFTSCACCLASFLYLPPIHQQTKTSK	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	
WG77b	EEVVLVPSXMGHLISNVLECKLILKXCHSPSIFITIFIPYNTGSTAPYLARVSSITISITPHHLPITSLDLSFSSPHRTIAFLLELNPNHIOALVSISSNNSVRLIIVDXECTAALVAAGLNIXFYFFFTSCACCLASFLYLPPIHQQTKTSK	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	
WG77c	EEVVLVPSXMGHLISNVLECKLILKXCHSPSIFITIFIPYNTGSTAPYLARVSSITISITPHHLPITSLDLSFSSPHRTIAFLLELNPNHIOALVSISSNNSVRLIIVDXECTAALVAAGLNIXFYFFFTSCACCLASFLYLPPIHQQTKTSK	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	
WG77d	EEVVLVPSXMGHLISNVLECKLILKXCHSPSIFITIFIPYNTGSTAPYLARVSSITISITPHHLPITSLDLSFSSPHRTIAFLLELNPNHIOALVSISSNNSVRLIIVDXECTAALVAAGLNIXFYFFFTSCACCLASFLYLPPIHQQTKTSK	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	
WG77e	EEVVLVPSXMGHLISNVLECKLILKXCHSPSIFITIFIPYNTGSTAPYLARVSSITISITPHHLPITSLDLSFSSPHRTIAFLLELNPNHIOALVSISSNNSVRLIIVDXECTAALVAAGLNIXFYFFFTSCACCLASFLYLPPIHQQTKTSK	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	
WG77f	EEVVLVPSXMGHLISNVLECKLILKXCHSPSIFITIFIPYNTGSTAPYLARVSSITISITPHHLPITSLDLSFSSPHRTIAFLLELNPNHIOALVSISSNNSVRLIIVDXECTAALVAAGLNIXFYFFFTSCACCLASFLYLPPIHQQTKTSK	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	
WG77g	EEVVLVPSXMGHLISNVLECKLILKXCHSPSIFITIFIPYNTGSTAPYLARVSSITISITPHHLPITSLDLSFSSPHRTIAFLLELNPNHIOALVSISSNNSVRLIIVDXECTAALVAAGLNIXFYFFFTSCACCLASFLYLPPIHQQTKTSK	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	
WG77h	EEVVLVPSXMGHLISNVLECKLILKXCHSPSIFITIFIPYNTGSTAPYLARVSSITISITPHHLPITSLDLSFSSPHRTIAFLLELNPNHIOALVSISSNNSVRLIIVDXECTAALVAAGLNIXFYFFFTSCACCLASFLYLPPIHQQTKTSK	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	
WG77i	EEVVLVPSXMGHLISNVLECKLILKXCHSPSIFITIFIPYNTGSTAPYLARVSSITISITPHHLPITSLDLSFSSPHRTIAFLLELNPNHIOALVSISSNNSVRLIIVDXECTAALVAAGLNIXFYFFFTSCACCLASFLYLPPIHQQTKTSK	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	
WG77j	EEVVLVPSXMGHLISNVLECKLILKXCHSPSIFITIFIPYNTGSTAPYLARVSSITISITPHHLPITSLDLSFSSPHRTIAFLLELNPNHIOALVSISSNNSVRLIIVDXECTAALVAAGLNIXFYFFFTSCACCLASFLYLPPIHQQTKTSK	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	
Consensus Identity	DLNTHHIDGLPVPASMAKPIIDRDKAYELVWNSHLPSAGIUNTFEALPRVAVTILDGLCVLDGPTXDFICIGPLIADDRSXXXGGCGGCGGSGGIPDCITWLESOPKRSVLFICFGLSIFSEEQKELAVGLERSCORFLWVRSXSKDPSR	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
WG77a	DLNTHHIDGLPVPASMAKPIIDRDKAYELVWNSHLPSAGIUNTFEALPRVAVTILDGLCVLDGPTXDFICIGPLIADDRSXXXGGCGGCGGSGGIPDCITWLESOPKRSVLFICFGLSIFSEEQKELAVGLERSCORFLWVRSXSKDPSR	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
WG77b	DLNTHHIDGLPVPASMAKPIIDRDKAYELVWNSHLPSAGIUNTFEALPRVAVTILDGLCVLDGPTXDFICIGPLIADDRSXXXGGCGGCGGSGGIPDCITWLESOPKRSVLFICFGLSIFSEEQKELAVGLERSCORFLWVRSXSKDPSR	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
WG77c	DLNTHHIDGLPVPASMAKPIIDRDKAYELVWNSHLPSAGIUNTFEALPRVAVTILDGLCVLDGPTXDFICIGPLIADDRSXXXGGCGGCGGSGGIPDCITWLESOPKRSVLFICFGLSIFSEEQKELAVGLERSCORFLWVRSXSKDPSR	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
WG77d	DLNTHHIDGLPVPASMAKPIIDRDKAYELVWNSHLPSAGIUNTFEALPRVAVTILDGLCVLDGPTXDFICIGPLIADDRSXXXGGCGGCGGSGGIPDCITWLESOPKRSVLFICFGLSIFSEEQKELAVGLERSCORFLWVRSXSKDPSR	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
WG77e	DLNTHHIDGLPVPASMAKPIIDRDKAYELVWNSHLPSAGIUNTFEALPRVAVTILDGLCVLDGPTXDFICIGPLIADDRSXXXGGCGGCGGSGGIPDCITWLESOPKRSVLFICFGLSIFSEEQKELAVGLERSCORFLWVRSXSKDPSR	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
WG77f	DLNTHHIDGLPVPASMAKPIIDRDKAYELVWNSHLPSAGIUNTFEALPRVAVTILDGLCVLDGPTXDFICIGPLIADDRSXXXGGCGGCGGSGGIPDCITWLESOPKRSVLFICFGLSIFSEEQKELAVGLERSCORFLWVRSXSKDPSR	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
WG77g	DLNTHHIDGLPVPASMAKPIIDRDKAYELVWNSHLPSAGIUNTFEALPRVAVTILDGLCVLDGPTXDFICIGPLIADDRSXXXGGCGGCGGSGGIPDCITWLESOPKRSVLFICFGLSIFSEEQKELAVGLERSCORFLWVRSXSKDPSR	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
WG77h	DLNTHHIDGLPVPASMAKPIIDRDKAYELVWNSHLPSAGIUNTFEALPRVAVTILDGLCVLDGPTXDFICIGPLIADDRSXXXGGCGGCGGSGGIPDCITWLESOPKRSVLFICFGLSIFSEEQKELAVGLERSCORFLWVRSXSKDPSR	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
WG77i	DLNTHHIDGLPVPASMAKPIIDRDKAYELVWNSHLPSAGIUNTFEALPRVAVTILDGLCVLDGPTXDFICIGPLIADDRSXXXGGCGGCGGSGGIPDCITWLESOPKRSVLFICFGLSIFSEEQKELAVGLERSCORFLWVRSXSKDPSR	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
WG77j	DLNTHHIDGLPVPASMAKPIIDRDKAYELVWNSHLPSAGIUNTFEALPRVAVTILDGLCVLDGPTXDFICIGPLIADDRSXXXGGCGGCGGSGGIPDCITWLESOPKRSVLFICFGLSIFSEEQKELAVGLERSCORFLWVRSXSKDPSR	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
Consensus Identity	EFLLAPDPDLSLDDGFLDRTERGDKVKSWAPOAVLNHASVCGVFTHCGWNSVLEAVCAQVPMVAWPLYARQFNRVAVVREMKLAFPMRESERGFVTADEVKRVRELMEXKCGXNTLRURIIMAXKEAARTAHSDGGSSRTALTLLVKSWPQ+	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
WG77a	EFLLAPDPDLSLDDGFLDRTERGDKVKSWAPOAVLNHASVCGVFTHCGWNSVLEAVCAQVPMVAWPLYARQFNRVAVVREMKLAFPMRESERGFVTADEVKRVRELMEXKCGXNTLRURIIMAXKEAARTAHSDGGSSRTALTLLVKSWPQ+	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
WG77b	EFLLAPDPDLSLDDGFLDRTERGDKVKSWAPOAVLNHASVCGVFTHCGWNSVLEAVCAQVPMVAWPLYARQFNRVAVVREMKLAFPMRESERGFVTADEVKRVRELMEXKCGXNTLRURIIMAXKEAARTAHSDGGSSRTALTLLVKSWPQ+	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
WG77c	EFLLAPDPDLSLDDGFLDRTERGDKVKSWAPOAVLNHASVCGVFTHCGWNSVLEAVCAQVPMVAWPLYARQFNRVAVVREMKLAFPMRESERGFVTADEVKRVRELMEXKCGXNTLRURIIMAXKEAARTAHSDGGSSRTALTLLVKSWPQ+	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
WG77d	EFLLAPDPDLSLDDGFLDRTERGDKVKSWAPOAVLNHASVCGVFTHCGWNSVLEAVCAQVPMVAWPLYARQFNRVAVVREMKLAFPMRESERGFVTADEVKRVRELMEXKCGXNTLRURIIMAXKEAARTAHSDGGSSRTALTLLVKSWPQ+	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
WG77e	EFLLAPDPDLSLDDGFLDRTERGDKVKSWAPOAVLNHASVCGVFTHCGWNSVLEAVCAQVPMVAWPLYARQFNRVAVVREMKLAFPMRESERGFVTADEVKRVRELMEXKCGXNTLRURIIMAXKEAARTAHSDGGSSRTALTLLVKSWPQ+	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
WG77f	EFLLAPDPDLSLDDGFLDRTERGDKVKSWAPOAVLNHASVCGVFTHCGWNSVLEAVCAQVPMVAWPLYARQFNRVAVVREMKLAFPMRESERGFVTADEVKRVRELMEXKCGXNTLRURIIMAXKEAARTAHSDGGSSRTALTLLVKSWPQ+	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
WG77g	EFLLAPDPDLSLDDGFLDRTERGDKVKSWAPOAVLNHASVCGVFTHCGWNSVLEAVCAQVPMVAWPLYARQFNRVAVVREMKLAFPMRESERGFVTADEVKRVRELMEXKCGXNTLRURIIMAXKEAARTAHSDGGSSRTALTLLVKSWPQ+	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
WG77h	EFLLAPDPDLSLDDGFLDRTERGDKVKSWAPOAVLNHASVCGVFTHCGWNSVLEAVCAQVPMVAWPLYARQFNRVAVVREMKLAFPMRESERGFVTADEVKRVRELMEXKCGXNTLRURIIMAXKEAARTAHSDGGSSRTALTLLVKSWPQ+	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
WG77i	EFLLAPDPDLSLDDGFLDRTERGDKVKSWAPOAVLNHASVCGVFTHCGWNSVLEAVCAQVPMVAWPLYARQFNRVAVVREMKLAFPMRESERGFVTADEVKRVRELMEXKCGXNTLRURIIMAXKEAARTAHSDGGSSRTALTLLVKSWPQ+	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
WG77j	EFLLAPDPDLSLDDGFLDRTERGDKVKSWAPOAVLNHASVCGVFTHCGWNSVLEAVCAQVPMVAWPLYARQFNRVAVVREMKLAFPMRESERGFVTADEVKRVRELMEXKCGXNTLRURIIMAXKEAARTAHSDGGSSRTALTLLVKSWPQ+	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500

Abbildung 61: Sequenzalignement der 10 Proteinsequenzen von VvGT7a-j. Die Positionen, an denen sich die Sequenzen unterscheiden, sind fett und in schwarz markiert. Oberhalb des Sequenzalignments ist die Consensus-Sequenz wiedergegeben. Außerdem ist die Nummerierung der Sequenzen angezeigt. Das Alignment wurde mit Geneious Pro 5.5.6 erstellt.

1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140
Consensus	ME-SPHFLLVTFPAQGHINPALQFAKHMIRTCGAEVSAFATSVSAHRRMAKRPNLQEGLVFPFSDGYYDCFKSSDDIQQYMSIKRGCSETLREIIVRNSDEGRPFTCIVHTLLVPPWAAARVARGLVVPPYALLWNEPATVLDIYTYFF													
WGt8a	ME-SPHFLLVTFPAQGHINPALQFAKHMIRTCGAQVSAFATSVSAHRRMAKRPNLQEGLVFPFSDGYYDCFKSSDDIQQYMSIKRGCSETLREIIVRNSDEGRPFTFIIVHTLLVPPWAAARVARGLVVPPYALLWNEPATVLDIYTYFF													
WGt8b	ME-SPHFLLVTFPAQGHINPALQFAKHMIRTCGAEVSAFATSVSAHRRMAKRPNLQEGLVFPFSDGYYDCFKSSDDIQQYMSIKRGCSETLREIIVRNSDEGRPFTCIIVHTLLVPPWAAARVARGLVVPPYALLWNEPATVLDINITYFF													
WGt8c	ME-SPHFLLVTFPAQGHINPALQFAKHMIRTCGAEVSAFATSVSAHRRMAKRPNLQEGLVFPFSDGYYDCFKSSDDIQQYMSIKRGCSETLREIIVRNSDEGRPFTCIIVHTLLVPPWAAARVARGLVVPPYALLWNEPATVLDIYTYFF													
WGt8d	ME-SPHFLLVTFPAQGHINPALQFAKHMIRTCGAEVSAFATSVSAHRRMAKRPNLQEGLVFPFSDGYYDCFKSSDDIQQYMSIKRGCSETLREIIVRNSDEGRPFTCIIVHTLLVPPWAAARVARGLVVPPYALLWNEPATVLDIYTYFF													
Consensus	MGYDAFRNLSNEPTCSIELPALPLSSRDLPSEFLVNSNAYTFPLPMLQEQLEALNQETMPKVLVNSFDALTEALKAVDKLHLIGICPLVPSAYLNSKDPDSTSFGGDLFGGSDDYTHEWLNPKKSVVNVVSGSISVLSKTKQ													
WGt8a	MGYDAFRNLSNEPTCSIELPALPLSSRDLPSEFLVNSNAYTFPLPMLHQLEALNQETMPKVLVNSFDALTEALKAVDKLHLIGICPLVPSAYLNSKDPDSTSFGGDLFGGSDDYTHEWLNPKKSVVNVVSGSISVLSKTKQ													
WGt8b	MGYDAFRNLSNEPTCSIELPALPLSSRDLPSEFLVNSNAYTFPLPMLQEQLEALNQETMPKVLVNSFDALTEALKAVDKLHLIGICPLVPSAYLNSKDPDSTSFGGDLFGGSDDYTHEWLNPKKSVVNVVSGSISVLSKTKQ													
WGt8c	MGYDAFRNLSNEPTCSIELPALPLSSRDLPSEFLVNSNAYTFPLPMLQEQLEALNQETMPKVLVNSFDALTEALKAVDKLHLIGICPLVPSAYLNSKDPDSTSFGGDLFGGSDDYTHEWLNPKKSVVNVVSGSISVLSKTKQ													
WGt8d	MGYDAFRNLSNEPTCSIELPALPLSSRDLPSEFLVNSNAYTFPLPMLQEQLEALNQETMPKVLVNSFDALTEALKAVDKLHLIGICPLVPSAYLNSKDPDSTSFGGDLFGGSDDYTHEWLNPKKSVVNVVSGSISVLSKTKQ													
Consensus	KEEIIARGLDCCQPFLLWIRAPENGEEVKEEDKLSRBELEKGMIVPWCQSQIEVLTHPSLGCFFVSHCCWNSTLRSLSVSCVPPVAFQWADQGTNAKLIEDIWKIGIRVIVNEEGIVESDEIKRCLLEIARCGCVKCEBEMKQNAE													
WGt8a	KEEIIARGLDCCQPFLLWIRAPENGEEVKEEDKLSRBELEKGMIVPWCQSQIEVLTHPSLGCFFVSHCCWNSTLRSLSVSCVPPVAFQWADQGTNAKLIEDIWKIGIRVIVNEEGIVESDEIKRCLLEIARCGCVKCEBEMKQNAE													
WGt8b	KEEIIARGLDCCQPFLLWIRAPENGEEVKEEDKLSRBELEKGMIVPWCQSQIEVLTHPSLGCFFVSHCCWNSTLRSLSVSCVPPVAFQWADQGTNAKLIEDIWKIGIRVIVNEEGIVESDEIKRCLLEIARCGCVKCEBEMKQNAE													
WGt8c	KEEIIARGLDCCQPFLLWIRAPENGEEVKEEDKLSRBELEKGMIVPWCQSQIEVLTHPSLGCFFVSHCCWNSTLRSLSVSCVPPVAFQWADQGTNAKLIEDIWKIGIRVIVNEEGIVESDEIKRCLLEIARCGCVKCEBEMKQNAE													
WGt8d	KEEIIARGLDCCQPFLLWIRAPENGEEVKEEDKLSRBELEKGMIVPWCQSQIEVLTHPSLGCFFVSHCCWNSTLRSLSVSCVPPVAFQWADQGTNAKLIEDIWKIGIRVIVNEEGIVESDEIKRCLLEIARCGCVKCEBEMKQNAE													
Consensus	KWKNLARAEAVDGGSSDMLKGFVD EVGQCCNESIGS*	440	450	460	470									
WGt8a	KWKNLARAEAVDGGSSDMLKGFVD EVGQCCNESIGS*													
WGt8b	KWKNLARAEAVDGGSSDMLKGFVD EVGQCCNESIGS*													
WGt8c	KWKNLARAEAVDGGSSDMLKGFVD EVGQCCNESIGS*													
WGt8d	KWKNLARAEAVDGGSSDMLKGFVD EVGQCCNESIGS*													

Abbildung 62: Sequenzalignment der 4 Proteinsequenzen von VvGt8a-d. Die Positionen, an denen sich die Sequenzen unterscheiden, sind fett und in schwarz markiert. Oberhalb des Sequenzalignments ist die Consensus-Sequenz wiedergegeben. Außerdem ist die Nummerierung der Sequenzen angezeigt. Das Alignment wurde mit Geneious Pro 5.5.6 erstellt.

Consensus	10	20	30	40	50	60	70	80
WT9a	10	20	30	40	50	60	70	80
WT9b	10	20	30	40	50	60	70	80
Consensus	90	100	110	120	130	140	150	160
WT9a	90	100	110	120	130	140	150	160
WT9b	90	100	110	120	130	140	150	160
Consensus	170	180	190	200	210	220	230	240
WT9a	170	180	190	200	210	220	230	240
WT9b	170	180	190	200	210	220	230	240
Consensus	250	260	270	280	290	300	310	320
WT9a	250	260	270	280	290	300	310	320
WT9b	250	260	270	280	290	300	310	320
Consensus	330	340	350	360	370	380	390	400
WT9a	330	340	350	360	370	380	390	400
WT9b	330	340	350	360	370	380	390	400
Consensus	410	420	430	440	450	460	470	480
WT9a	410	420	430	440	450	460	470	480
WT9b	410	420	430	440	450	460	470	480

Abbildung 63: Sequenzalignment der 2 Proteinsequenzen von VvGT9a und b. Die Positionen, an denen sich die Sequenzen unterscheiden, sind fett und in schwarz markiert. Oberhalb des Sequenzalignments ist die Consensus-Sequenz wiedergegeben. Außerdem ist die Nummerierung der Sequenzen angezeigt. Das Alignment wurde mit Geneious Pro 5.5.6 erstellt.

```

140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260
Consensus MASHHQHPHFLVPLMSQSHLIPFTDMAKLLAARGIAVTIIITPNAIRFQTIIDQAIHSHNLNIQFIPLPFCQQAQGLPQCENMDSIPSPDLKKQFFLASSMLQQPLENLLGHLPPPPSCIIASVCLPWTR
WGT12a MASHHQHPHFLVPLMSQSHLIPFTDMAKLLAARGIAVTIIITPNAIRFQTIIDQAIHSHNLNIQFIPLPFCQQAQGLPQCENMDSIPSPDLKKQFFLASSMLQQPLENLLGHLPPPPSCIIASVCLPWTR
WGT12b MASHHQHPHFLVPLMSQSHLIPFTDMAKLLAARGIAVTIIITPNAIRFQTIIDQAIHSHNLNIQFIPLPFCQQAQGLPQCENMDSIPSPDLKKQFFLASSMLQQPLENLLGHLPPPPSCIIASVCLPWTR
WGT12c MASHHQHPHFLVPLMSQSHLIPFTDMAKLLAARGIAVTIIITPNAIRFQTIIDQAIHSHNLNIQFIPLPFCQQAQGLPQCENMDSIPSPDLKKQFFLASSMLQQPLENLLGHLPPPPSCIIASVCLPWTR
270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390
Consensus DVAVFKIPWLVFHGISCFLLCGKNIARSDVLKSAADSEPFVPGMDDKIEFTKAQLPFGFQPSDDGSGFVEKREATAILAQGVVNSFEDLEPNYLLEYKLVNKKVWCIGPVSLCNKHSDDKFGKGNKT
WGT12a DVAVFKIPWLVFHGISCFLLCGKNIE:SDVLKSAADSEPFVPGMDDKIEFTKAQLPFGFQPSDDGSGFVEKREATAILAQGVVNSFEDLEPNYLLEYKLVNKKVWCIGPVSLCNKHSDDKFGKGNKT
WGT12b DVAVFKIPWLVFHGISCFLLCGKNIARSDVLKSAADSEPFVPGMDDKIEFTKAQLPFGFQPSDDGSGFVEKREATAILAQGVVNSFEDLEPNYLLEYKLVNKKVWCIGPVSLCNKHSDDKFGKGNKT
WGT12c DVAVFKIPWLVFHGISCFLLCGKNIARSDVLKSAADSEPFVPGMDDKIEFTKAQLPFGFQPSDDGSGFVEKREATAILAQGVVNSFEDLEPNYLLEYKLVNKKVWCIGPVSLCNKHSDDKFGKGNKT
270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390
Consensus SIDENQCLKWLDNRKPKSVIYACFGLCHFSSTQLEIGLGLASNRPFVWIIRQSDCSFRIEHWLLEERYEERIKGRGLIIRGWAQVLIILSHPAAGCFLTHSCWNSTIRAIKSCVPMITWPMFAEQFYNE
WGT12a SIDENQCLKWLDNRKPKSVIYACFGLCHFSSTQLEIGLGLASNRPFVWIIRQSDCSFRIEHWLLEERYEERIKGRGLIIRGWAQVLIILSHPAAGCFLTHSCWNSTIRAIKSCVPMITWPMFAEQFYNE
WGT12b SIDENQCLKWLDNRKPKSVIYACFGLCHFSSTQLEIGLGLASNRPFVWIIRQSDCSFRIEHWLLEERYEERIKGRGLIIRGWAQVLIILSHPAAGCFLTHSCWNSTIRAIKSCVPMITWPMFAEQFYNE
WGT12c SIDENQCLKWLDNRKPKSVIYACFGLCHFSSTQLEIGLGLASNRPFVWIIRQSDCSFRIEHWLLEERYEERIKGRGLIIRGWAQVLIILSHPAAGCFLTHSCWNSTIRAIKSCVPMITWPMFAEQFYNE
400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 498
Consensus KLVVQVLRIGVRIQVIVQWCEEEKAGALVKNQIKEAVDKLMDGKKEGERRERARKLGEAKHAEVGGSSHLNNTLLIQDIMEQVWNGPTKEIV*
WGT12a KLVVQVLRIGVRIQVIVQWCEEEKAGALVKNQIKEAVDKLMDGKKEGERRERARKLGEAKHAEVGGSSHLNNTLLIQDIMEQVWNGPTKEIV*
WGT12b KLVVQVLRIGVRIQVIVQWCEEEKAGALVKNQIKEAVDKLMDGKKEGERRERARKLGEAKHAEVGGSSHLNNTLLIQDIMEQVWNGPTKEIV*
WGT12c KLVVQVLRIGVRIQVIVQWCEEEKAGALVKNQIKEAVDKLMDGKKEGERRERARKLGEAKHAEVGGSSHLNNTLLIQDIMEQVWNGPTKEIV*

```

Abbildung 64: Sequenzalignment der 3 Proteinsequenzen von VvGT12a bis c. Die Positionen, an denen sich die Sequenzen unterscheiden, sind fett und in schwarz markiert. Oberhalb des Sequenzalignments ist die Consensus-Sequenz wiedergegeben. Außerdem ist die Nummerierung der Sequenzen angezeigt. Das Alignment wurde mit Geneious Pro 5.5.6 erstellt.

1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120																																																		
Consensus	MASQ	CDRLPHFVLLPHLALGHLIPMIDIAKLLAQHGCVVITTPVNAAGLTTIIDRAVDSCLR	IQLLQVPPSPVEAGLPGCESMDRLPSRDLFRNXLICIGMLKQPVEXLDELQPRVSCIAD																																																											
WGT13a	MASQ	CDRLPHFVLLPHLALGHLIPMIDIAKLLAQHGCVIVTVITTPVNAAGLTTIIDRAVDSCLR	IQLLQVPPSPVEAGLPGCESMDRLPSRDLFRNLLIGIGMLKQPVENLFDLQPRVSCIAD																																																											
WGT13b	MASQ	CDRLPHFVLLPHLALGHLIPMIDIAKLLAQHGCVVTVITTPVNAAGLTTIIDRAVDSCLR	IQLLQVPPSPVEAGLPGCESMDRLPSRDLFRNLLIGIGMLKQPVEXLFDLQPRVSCIAD																																																											
WGT13c	MASQ	CDRLPHFVLLPHLALGHLIPMIDIAKLLAQHGCVIVTVITTPVNAAGLTTIIDRAVDSCLR	IQLLQVPPSPVEAGLPGCESMDRLPSRDLFRNLLIGIGMLKQPVENLFDLQPRVSCIAD																																																											
Consensus	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250																																																	
Consensus	KNLV	WTDTDIARRFQIPRLVFDGISCFSLCTHNLHVKVHEKVS	EGEPFVVPGLPDRIELTRAQLPGAVNTGGTELE	EMRNQIRAEALAAAYGVVNTFEELPAYVKEFRKVRG	XKVV	CVG	PVSLC																																																							
WGT13a	KNLV	WTDTDIARRFQIPRLVFDGISCFSLCTHNLHVKVHEKVS	EGEPFVVPGLPDRIELTRAQLPGAVNTGGIN	LR	EMRNQIRAEALAAAYGVVNTFEELPAYVKEFRKVRG	D	KVV	CVG	PVSLC																																																					
WGT13b	KNLV	WTDTDIARRFQIPRLVFDGISCFSLCTHNLHVKVHEKVS	EGEPFVVPGLPDRIELTRAQLPGAVNTGGID	LR	EMRNQIRAEALAAAYGVVNTFEELPAYVKEFRKVRG	H	XV	CVG	PVSLC																																																					
WGT13c	KNLV	WTDTDIARRFQIPRLVFDGISCFSLCTHNLHVKVHEKVS	EGEPFVVPGLPDRIELTRAQLPGAVNTGGID	LR	EMRNQIRAEALAAAYGVVNTFEELPAYVKEFRKVRG	D	KVV	CVG	PVSLC																																																					
Consensus	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370																																																		
Consensus	HKEN	KDKAERGNKASID	EKKCFNWLDSXFPSSVYACLSLSRLTPQLMHELGLALEASNR	PF	IWA	IK	EK	KN	QAQ	ELEK	IL	ED	CG	F	M	E	R	T	R	G	L	L	I	R	G	W	A	P	Q	V	L	I	L	S	H	P	A	I	G	G	F	L	T	H	C	G	W	N	S	T	L	E	G									
WGT13a	HKEN	KDKAERGNKASID	EKKCFNWLDSXFPSSVYACLSLSRLTPQLMHELGLALEASNR	PF	IWA	IK	EK	KN	QAQ	ELEK	IL	ED	CG	F	M	E	R	T	R	G	L	L	I	R	G	W	A	P	Q	V	L	I	L	S	H	P	A	I	G	G	F	L	T	H	C	G	W	N	S	T	L	E	G									
WGT13b	HKEN	KDKAERGNKASID	EKKCFNWLDSXFPSSVYACLSLSRLTPQLMHELGLALEASNR	PF	IWA	IK	EK	KN	QAQ	ELEK	IL	ED	CG	F	M	E	R	T	R	G	L	L	I	R	G	W	A	P	Q	V	L	I	L	S	H	P	A	I	G	G	F	L	T	H	C	G	W	N	S	T	L	E	G									
WGT13c	HKEN	KDKAERGNKASID	EKKCFNWLDSXFPSSVYACLSLSRLTPQLMHELGLALEASNR	PF	IWA	IK	EK	KN	QAQ	ELEK	IL	ED	CG	F	M	E	R	T	R	G	L	L	I	R	G	W	A	P	Q	V	L	I	L	S	H	P	A	I	G	G	F	L	T	H	C	G	W	N	S	T	L	E	G									
Consensus	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	495																																																	
Consensus	VCAG	VPMITWPLFAEQFYNEKFFVQVLR	ICVVRVGAFFAVKWC	EE	EK	FC	VV	LKR	EV	VE	KAI	EQ	L	M	E	E	G	V	E	G	Q	ERR	KR	AR	E	L	G	E	M	A	K	R	A	M	E	E	G	G	S	S	Y	L	N	M	T	L	L	I	Q	D	I	M	Q	V	T	C	N	Q	T	K	T	*
WGT13a	VCAG	VPMITWPLFAEQFYNEKFFVQVLR	ICVVRVGAFFAVKWC	EE	EK	FC	VV	LKR	EV	VE	KAI	EQ	L	M	E	E	G	V	E	G	Q	ERR	KR	AR	E	L	G	E	M	A	K	R	A	M	E	E	G	G	S	S	Y	L	N	M	T	L	L	I	Q	D	I	M	Q	V	T	C	N	Q	T	K	T	*
WGT13b	VCAG	VPMITWPLFAEQFYNEKFFVQVLR	ICVVRVGAFFAVKWC	EE	EK	FC	VV	LKR	EV	VE	KAI	EQ	L	M	E	E	G	V	E	G	Q	ERR	KR	AR	E	L	G	E	M	A	K	R	A	M	E	E	G	G	S	S	Y	L	N	M	T	L	L	I	Q	D	I	M	Q	V	T	C	N	Q	T	K	T	*
WGT13c	VCAG	VPMITWPLFAEQFYNEKFFVQVLR	ICVVRVGAFFAVKWC	EE	EK	FC	VV	LKR	EV	VE	KAI	EQ	L	M	E	E	G	V	E	G	Q	ERR	KR	AR	E	L	G	E	M	A	K	R	A	M	E	E	G	G	S	S	Y	L	N	M	T	L	L	I	Q	D	I	M	Q	V	T	C	N	Q	T	K	T	*

Abbildung 65: Sequenzalignment der 3 Proteinsequenzen von VvGT13a bis c. Die Positionen, an denen sich die Sequenzen unterscheiden, sind fett und in schwarz markiert. Oberhalb des Sequenzalignments ist die Consensus-Sequenz wiedergegeben. Außerdem ist die Nummerierung der Sequenzen angezeigt. Das Alignment wurde mit Geneious Pro 5.5.6 erstellt.

1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150		
Consensus	MG	SHD	E	P	H	A	V	C	I	F	P	A	G	H	I		
WGT14b	MG	SHE	E	P	H	A	V	C	I	F	P	A	G	H	I		
WGT14c	MG	SHE	E	P	H	A	V	C	I	F	P	A	G	H	I		
WGT14a	MG	SHE	E	P	H	A	V	C	I	F	P	A	G	H	I		
WGT14b	MG	SHE	E	P	H	A	V	C	I	F	P	A	G	H	I		
WGT14c	MG	SHE	E	P	H	A	V	C	I	F	P	A	G	H	I		
Consensus	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	
WGT14b	XG	FT	P	L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
WGT14c	XG	FT	P	L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
WGT14a	XG	FT	P	L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
WGT14b	XG	FT	P	L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
WGT14c	XG	FT	P	L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Consensus	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	474
WGT14b	HQ	ST	L	M	L	E	P	D	L	S	G	E	S	A	I	L	P
WGT14c	HQ	ST	L	M	L	E	P	D	L	S	G	E	S	A	I	L	P
WGT14a	HQ	ST	L	M	L	E	P	D	L	S	G	E	S	A	I	L	P
WGT14b	HQ	ST	L	M	L	E	P	D	L	S	G	E	S	A	I	L	P
WGT14c	HQ	ST	L	M	L	E	P	D	L	S	G	E	S	A	I	L	P

Abbildung 66: Sequenzalignment der 3 Proteinsequenzen von VvGT14a bis c. Die Positionen, an denen sich die Sequenzen unterscheiden, sind fett und in schwarz markiert. Oberhalb des Sequenzalignments ist die Consensus-Sequenz wiedergegeben. Außerdem ist die Nummerierung der Sequenzen angegeben. Das Alignment wurde mit Geneious Pro 5.5.6 erstellt.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120																																																																																																											
Consensus	M	P	R	R	V	L	V	P	C	F	Q	C	H	I	N	P	H	L	Q	L	G	A	I	L	H	S	R	G	F	S	I	V	A	H	T	Q	Y	N	S	P	D	P	S	N	H	P	D	F	S	F	L	P	I	D	D	G	L	S	D	C	G	N	F	A	S	L	N	L	V	L	A	A	N	V	N	C	S	P	L	R	E	X	L	A	E	K	Q	E	H	G	D	I	A	C	I	I	H	D	I	T	H	Y	F	A	E	A	V	A	N	H	L	K	V	P	S	I	N			
WGT15a	M	P	R	R	V	L	V	P	C	F	Q	C	H	I	N	P	H	L	Q	L	G	A	I	L	H	S	R	G	F	S	I	V	A	H	T	Q	Y	N	S	P	D	P	S	N	H	P	D	F	S	F	L	P	I	D	D	G	L	S	D	C	G	N	F	A	S	L	N	L	V	L	A	A	N	V	N	C	S	P	L	R	E	X	L	A	E	K	Q	E	H	G	D	I	A	C	I	I	H	D	I	T	H	Y	F	A	E	A	V	A	N	H	L	K	V	P	S	I	N			
WGT15b	M	P	R	R	V	L	V	P	C	F	Q	C	H	I	N	P	H	L	Q	L	G	A	I	L	H	S	R	G	F	S	I	V	A	H	T	Q	Y	N	S	P	D	P	S	N	H	P	D	F	S	F	L	P	I	D	D	G	L	S	D	C	G	N	F	A	S	L	N	L	V	L	A	A	N	V	N	C	S	P	L	R	E	X	L	A	E	K	Q	E	H	G	D	I	A	C	I	I	H	D	I	T	H	Y	F	A	E	A	V	A	N	H	L	K	V	P	S	I	N			
WGT15c	M	P	R	R	V	L	V	P	C	F	Q	C	H	I	N	P	H	L	Q	L	G	A	I	L	H	S	R	G	F	S	I	V	A	H	T	Q	Y	N	S	P	D	P	S	N	H	P	D	F	S	F	L	P	I	D	D	G	L	S	D	C	G	N	F	A	S	L	N	L	V	L	A	A	N	V	N	C	S	P	L	R	E	X	L	A	E	K	Q	E	H	G	D	I	A	C	I	I	H	D	I	T	H	Y	F	A	E	A	V	A	N	H	L	K	V	P	S	I	N			
Consensus	L	V	T	S	N	V	S	T	T	I	A	H	N	A	F	P	S	L	E	K	G	H	I	P	Q	G	S	T	L	H	D	V	P	E	L	H	P	L	R	F	K	D	L	P	I	S	R	I	G	D	L	E	X	F	Q	I	L	V	N	M	T	K	K	F	S	P	I	I	W	N	T	M	D	C	L	R	Q	S	S	L	T	Q	R	Q	Q	L	Q	V	P	F	F	I	G	P	L	H	K	L	A	P	P	S	S	S	S	L	L	E	E	D	S	S	C	I	T					
WGT15a	L	V	T	S	N	V	S	T	T	I	A	H	N	A	F	P	S	L	E	K	G	H	I	P	Q	G	S	T	L	H	D	V	P	E	L	H	P	L	R	F	K	D	L	P	I	S	R	I	G	D	L	E	X	F	Q	I	L	V	N	M	T	K	K	F	S	P	I	I	W	N	T	M	D	C	L	R	Q	S	S	L	T	Q	R	Q	Q	L	Q	V	P	F	F	I	G	P	L	H	K	L	A	P	P	S	S	S	L	L	E	E	D	S	S	C	I	T						
WGT15b	L	V	T	S	N	V	S	T	T	I	A	H	N	A	F	P	S	L	E	K	G	H	I	P	Q	G	S	T	L	H	D	V	P	E	L	H	P	L	R	F	K	D	L	P	I	S	R	I	G	D	L	E	X	F	Q	I	L	V	N	M	T	K	K	F	S	P	I	I	W	N	T	M	D	C	L	R	Q	S	S	L	T	Q	R	Q	Q	L	Q	V	P	F	F	I	G	P	L	H	K	L	A	P	P	S	S	S	L	L	E	E	D	S	S	C	I	T						
WGT15c	L	V	T	S	N	V	S	T	T	I	A	H	N	A	F	P	S	L	E	K	G	H	I	P	Q	G	S	T	L	H	D	V	P	E	L	H	P	L	R	F	K	D	L	P	I	S	R	I	G	D	L	E	X	F	Q	I	L	V	N	M	T	K	K	F	S	P	I	I	W	N	T	M	D	C	L	R	Q	S	S	L	T	Q	R	Q	Q	L	Q	V	P	F	F	I	G	P	L	H	K	L	A	P	P	S	S	S	L	L	E	E	D	S	S	C	I	T						
Consensus	W	L	D	F	X	S	P	K	S	V	I	V	S	W	G	S	L	A	C	M	D	A	K	D	L	A	E	V	A	W	G	L	A	N	S	N	Q	P	F	L	W	V	R	P	G	S	V	R	G	S	Q	W	I	E	Q	L	P	E	T	F	M	D	T	V	G	E	R	C	H	I	V	K	W	A	P	Q	K	E	V	L	G	H	R	A	V	G	F	W	S	H	C	G	W	N	S	T	L	E	S	I	S	E	G	V	P	M	I	C	R	F	Y	S	G	D	Q	R	V	N	T	R
WGT15a	W	L	D	F	X	S	P	K	S	V	I	V	S	W	G	S	L	A	C	M	D	A	K	D	L	A	E	V	A	W	G	L	A	N	S	N	Q	P	F	L	W	V	R	P	G	S	V	R	G	S	Q	W	I	E	Q	L	P	E	T	F	M	D	T	V	G	E	R	C	H	I	V	K	W	A	P	Q	K	E	V	L	G	H	R	A	V	G	F	W	S	H	C	G	W	N	S	T	L	E	S	I	S	E	G	V	P	M	I	C	R	F	Y	S	G	D	Q	R	V	N	T	R
WGT15b	W	L	D	F	X	S	P	K	S	V	I	V	S	W	G	S	L	A	C	M	D	A	K	D	L	A	E	V	A	W	G	L	A	N	S	N	Q	P	F	L	W	V	R	P	G	S	V	R	G	S	Q	W	I	E	Q	L	P	E	T	F	M	D	T	V	G	E	R	C	H	I	V	K	W	A	P	Q	K	E	V	L	G	H	R	A	V	G	F	W	S	H	C	G	W	N	S	T	L	E	S	I	S	E	G	V	P	M	I	C	R	F	Y	S	G	D	Q	R	V	N	T	R
WGT15c	W	L	D	F	X	S	P	K	S	V	I	V	S	W	G	S	L	A	C	M	D	A	K	D	L	A	E	V	A	W	G	L	A	N	S	N	Q	P	F	L	W	V	R	P	G	S	V	R	G	S	Q	W	I	E	Q	L	P	E	T	F	M	D	T	V	G	E	R	C	H	I	V	K	W	A	P	Q	K	E	V	L	G	H	R	A	V	G	F	W	S	H	C	G	W	N	S	T	L	E	S	I	S	E	G	V	P	M	I	C	R	F	Y	S	G	D	Q	R	V	N	T	R
Consensus	Y	I	S	H	V	W	K	V	G	L	E	S	D	E	L	E	R	V	E	X	E	R	A	V	R	L	M	V	D	C	E	G	E	E	M	R	Q	R	A	H	E	L	K	E	K	V	X	I	C	T	S	E	G	C	S	N	R	A	L	K	E	L	V	E	Y	I	S	S	F	*																																																		
WGT15a	Y	I	S	H	V	W	K	V	G	L	E	S	D	E	L	E	R	V	E	X	E	R	A	V	R	L	M	V	D	C	E	G	E	E	M	R	Q	R	A	H	E	L	K	E	K	V	X	I	C	T	S	E	G	C	S	N	R	A	L	K	E	L	V	E	Y	I	S	S	F	*																																																		
WGT15b	Y	I	S	H	V	W	K	V	G	L	E	S	D	E	L	E	R	V	E	X	E	R	A	V	R	L	M	V	D	C	E	G	E	E	M	R	Q	R	A	H	E	L	K	E	K	V	X	I	C	T	S	E	G	C	S	N	R	A	L	K	E	L	V	E	Y	I	S	S	F	*																																																		
WGT15c	Y	I	S	H	V	W	K	V	G	L	E	S	D	E	L	E	R	V	E	X	E	R	A	V	R	L	M	V	D	C	E	G	E	E	M	R	Q	R	A	H	E	L	K	E	K	V	X	I	C	T	S	E	G	C	S	N	R	A	L	K	E	L	V	E	Y	I	S	S	F	*																																																		

Abbildung 67: Sequenzalignment der 3 Proteinsequenzen von WGT15a bis c. Die Positionen, an denen sich die Sequenzen unterscheiden, sind fett und in schwarz markiert. Oberhalb des Sequenzalignments ist die Consensus-Sequenz wiedergegeben. Außerdem ist die Nummerierung der Sequenzen angezeigt. Das Alignment wurde mit Geneious Pro 5.5.6 erstellt.