

Lehrstuhl für Zierpflanzenbau der Technischen Universität München

# Genetik und Enzymologie der Bildung außergewöhnlicher Anthocyanidin-Muster in Blüten höherer Pflanzen

**Dipl. Biol. Univ. Tarek Elsherif**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. **D. R. Treutter**

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. **G. Forkmann**

2. Univ.-Prof. Dr. **W. Horn**, emeritiert

Die Dissertation wurde am 31.05.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau am 04.07.2000 angenommen.

„.....Hast du nicht gesehen, dass Allah Wasser vom Himmel herniedersendet? Dann bringen Wir damit Früchte mit mannigfachen Farben hervor; und in den Bergen sind weiße und rote, verschiedenfarbige und rabenschwarze Schichten [27]. Und bei Mensch und Tier und Vieh (gibt es) auch verschiedene Farben. Wahrlich, nur die Wissenden unter Seinen Dienern fürchten Allah. Wahrlich, Allah ist Erhaben, Allverzeihend [28].“

[Heiliger Quran 35:27-28]

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَمِنَ النَّاسِ وَالْدَّوَابِّ وَالْأَنْعَامِ	أَلْقَرْنَا أَنزَلَ اللَّهُ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ
مُخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ، كَذَلِكَ إِنَّمَا يَخْشَى اللَّهَ	ثَمَرَاتٍ مُّخْتَلِفًا أَلْوَانُهَا وَمِنَ الْجِبَالِ جُدَدٌ بَيْضٌ
مِنَ عِبَادِهِ الْعُلَمَاءُ إِنَّكَ اللَّهُ عَزِيزٌ غَفُورٌ ﴿٢٨﴾	وَحُمْرٌ مُّخْتَلِفٌ أَلْوَانُهَا وَغَرَابِيبُ سُودٌ ﴿٢٧﴾

{ سورة فاطر الآية ٢٧، ٢٨ }

„.....See you not that Allâh sends down water (rain) from the sky, and We produce therewith fruits of varying colours, and among the mountains are streaks white and red, of varying colours and (others) very black [27]. And of men and *Ad-Dawâb* (moving living creatures, beasts, etc.), and cattle, in like manner of various colours. It is only those who have knowledge among His slaves that fear Allâh. Verily, Allâh is All-Mighty, Oft-Forgiving [28].“

[Holy Quran 35:27-28]

# Inhaltsverzeichnis

<b><i>Inhaltsverzeichnis</i></b> .....	<b>3</b>
<b><i>Abkürzungen</i></b> .....	<b>6</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1. Blütenfarbstoffe</b> .....	<b>7</b>
<b>1.2. Struktur der Flavonoide</b> .....	<b>9</b>
<b>1.3. Biosynthese der Flavonoide</b> .....	<b>10</b>
1.3.1. Vorstufen der Flavonoidbiosynthese .....	10
1.3.2. Enzyme des Flavonoidbiosynthesewegs .....	11
1.3.2.1. Chalkonsynthase (CHS) .....	13
1.3.2.2. Chalkonisomerase (CHI) .....	14
1.3.2.3. Flavanon 3-Hydroxylase (FHT) .....	15
1.3.2.4. Flavonoid 3'- bzw. 3`5`-Hydroxylase (F3`-/F3`5`H).....	15
1.3.2.5. Flavonolsynthase (FLS).....	16
1.3.2.6. Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR) .....	17
1.3.2.7. Anthocyanidinsynthase (ANS) .....	18
1.3.2.8. Flavonoid-3-O-Glukosyltransferase (FGT) .....	19
<b>1.4. Außergewöhnliche Anthocyanidin-Muster</b> .....	<b>20</b>
1.4.1. Fehlen des Pelargonidin-Typs .....	21
1.4.2. Entstehung von Mischtypen .....	22
1.4.3. Ungewöhnliche Dominanzverhältnisse .....	22
<b>1.5. Ziel der Arbeit</b> .....	<b>23</b>
1.5.1. Enzymologie der Flavonoidbiosynthese bei <i>Rosa hybrida</i> .....	23
1.5.2. Enzymologie der Flavonoidbiosynthese bei <i>Cyclamen</i> .....	24
1.5.3. Enzymologie der Flavonoidbiosynthese bei <i>Euphorbia pulcherrima</i> .....	24
1.5.4. Enzymologie der Flavonoidbiosynthese bei <i>Anagallis</i> .....	24
1.5.5. Enzymologie der Flavonoidbiosynthese bei <i>Papaver orientale</i> .....	25
<b>2. Materialien</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1. Verwendete Chemikalien</b> .....	<b>26</b>
<b>2.2. Verwendete Geräte</b> .....	<b>27</b>
<b>2.3. Pflanzenmaterial</b> .....	<b>27</b>
2.3.1. <i>Rosa</i> -Hybriden .....	28
2.3.2. <i>Cyclamen persicum</i> .....	28
2.3.3. <i>Euphorbia pulcherrima</i> (Weihnachtssterne) .....	29
2.3.4. <i>Anagallis</i> .....	29
2.3.5. <i>Papaver orientale</i> (Mohn) .....	30
<b>3. Methoden</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1. Inhaltsstoffanalyse</b> .....	<b>31</b>
3.1.1. Gewinnung des Rohextrakts .....	31
3.1.2. Hydrolyse der glykosidischen Inhaltsstoffe .....	31

3.1.3. Chromatographie .....	32
3.1.3.1. HPLC .....	32
3.1.3.2. Dünnschichtchromatographie .....	32
<b>3.2. Synthese der (<sup>14</sup>C)-markierten Substrate .....</b>	<b>33</b>
3.2.1. Gewinnung von Enzymextrakten .....	33
3.2.1.1. Zusammensetzung des Expressionsmediums .....	33
3.2.1.2. Enzymexpression in E. coli - Kulturen .....	33
3.2.1.3. Aufschließen der Zellen .....	34
3.2.2. Enzymatische Synthese der Substrate .....	34
3.2.2.1. ( <sup>14</sup> C)-Naringenin-Synthese .....	34
3.2.2.2. ( <sup>14</sup> C)-Eriodictyol-Synthese .....	35
3.2.2.3. ( <sup>14</sup> C)-Dihydrokämpferol Synthese .....	35
3.2.2.4. ( <sup>14</sup> C)-Dihydroquercetin-Synthese .....	36
<b>3.3. Enzympräparationen .....</b>	<b>36</b>
3.3.1. Präparation des Rohextraktes (Methode A) .....	37
3.3.2. Präparation des Rohextraktes (Methode B) .....	37
3.3.3. Präparation des Rohextraktes (Methode C) .....	37
3.3.4. Präparation des Rohextraktes (Methode D) .....	38
3.3.5. Gelfiltration des Rohextraktes .....	38
3.3.6. Mikrosomenpräparation .....	38
<b>3.4. Standardenzymansätze .....</b>	<b>39</b>
3.4.1. CHS Standard Test .....	39
3.4.2. CHI Standard Test .....	39
3.4.3. FHT Standard-Test .....	40
3.4.4. F3`H bzw. F3`5`H Standard-Test .....	40
3.4.5. DFR Standard-Test .....	41
3.4.6. FLS Standard-Test .....	41
<b>3.5. Parameterabhängigkeit .....</b>	<b>42</b>
3.5.1. pH-Abhängigkeit .....	42
3.5.2. Proteinlinearität .....	43
3.5.3. Temperatur-Abhängigkeit .....	43
3.5.4. Zeitlinearität .....	43
<b>3.6. Proteinbestimmung .....</b>	<b>43</b>
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1. Rosa-Hybriden .....</b>	<b>44</b>
4.1.1. Untersuchung der Flavonoide der Rosen .....	44
4.1.2. Abhängigkeit des Anthocyantyps vom Blütenstadium .....	46
4.1.3. Enzymologie der Flavonoidbiosynthese bei Rosen .....	47
4.1.3.1. Nachweis der CHS .....	48
4.1.3.2. Temperaturoptimum der CHS .....	49
4.1.3.3. Zeitlinearität der CHS .....	50
4.1.3.4. Proteinlinearität der CHS .....	51
4.1.3.5. pH-Abhängigkeit der CHS .....	52
4.1.3.6. Substratspezifität der CHS .....	53
4.1.3.7. Nachweis und Substratspezifität der FHT .....	57
4.1.3.8. 2-Oxoglutarat-Abhängigkeit der FHT-Aktivität .....	58
4.1.3.9. Nachweis und Substratspezifität der DFR .....	59
4.1.3.10. Die F3`H bei Rosen .....	60

<b>4.2. Cyclamen persicum .....</b>	<b>62</b>
4.2.1. Untersuchung der Flavonoide der Cyclamen .....	62
4.2.2. Enzymologie der Flavonoidbiosynthese.....	62
4.2.2.1. Nachweis, Substratspezifität und pH-Abhängigkeit der CHS .....	63
4.2.2.2. Die gelben Cyclamen und der potentielle CHI Block .....	65
4.2.2.3. Nachweis, Substratspezifität und pH-Abhängigkeit der FHT .....	66
4.2.2.4. Nachweis, Substratspezifität und Lokalisierung der F3`H .....	68
4.2.2.5. Nachweis und Substratspezifität der F3`5`H.....	69
4.2.2.6. Nachweis, Substrat- und Gewebespezifität der FLS .....	70
4.2.2.7. Nachweis und Substratspezifität der DFR.....	71
4.2.2.8. Gewebespezifische Expression der DFR.....	72
<b>4.3. Weitere Pflanzengattungen.....</b>	<b>73</b>
4.3.1. Euphorbia pulcherrima .....	73
4.3.1.1. Flavonoide der Weihnachtssterne.....	73
4.3.1.2. Enzymologie der Flavonoidbiosynthese.....	73
4.3.1.2.1. Nachweis und Substratspezifität der CHS .....	74
4.3.1.2.2. pH-Abhängigkeit der CHS .....	75
4.3.1.2.3. Nachweis und Substratspezifität der FHT .....	76
4.3.1.2.4. Nachweis und Substratspezifität der F3`H .....	77
4.3.1.2.5. Nachweis und Substratspezifität der DFR.....	78
4.3.2. Anagallis .....	79
4.3.2.1. Untersuchung der Flavonoide bei Anagallis .....	79
4.3.2.2. Enzymologie der Flavonoidbiosynthese.....	80
4.3.2.2.1. Nachweis und Substratspezifität der CHS .....	80
4.3.2.2.2. Nachweis und Substratspezifität der FHT .....	81
4.3.2.2.3. Nachweis und Substratspezifität der DFR.....	82
4.3.3. Papaver orientale .....	83
4.3.3.1. Untersuchung der Flavonoide bei Papaver orientale .....	83
4.3.3.2. Enzymologie der Flavonoidbiosynthese.....	84
4.3.3.2.1. Nachweis und Substratspezifität der CHS.....	84
4.3.3.2.2. Nachweis, 2-Oxoglutarat-Abhängigkeit, Substrat- und Gewebespezifität der FHT.....	85
4.3.3.2.3. Nachweis, Substrat- und Gewebespezifität der DFR .....	86
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>87</b>
<b>6. Literatur .....</b>	<b>97</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>106</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>108</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>110</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>111</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>112</b>
<b>C.V.....</b>	<b>113</b>

# Abkürzungen

ANS	Anthocyanidinsynthase
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin
CAW	Laufmittel (Chloroform:Essigsäure:H <sub>2</sub> O)
CHI	Chalkonisomerase
CHS	Chalkonsynthase
CoA	CoenzymA
Cy	Cyanidin
DC	Dünnschichtchromatographie
DFR	Dihydroflavonol 4-Reduktase
DHK	Dihydrokämpferol
DHM	Dihydromyricetin
DHQ	Dihydroquercetin
Dp	Delphinidin
dpm	Zersetzung pro Minute
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGME	Ethylenglykolmonomethylether
Eri	Eriodictyol
EtOAc	Ethylacetat
FGT	UDPG-Flavonoid-3-O-Glukosyltransferase
F3`H	Flavonoid 3`-Hydroxylase
F3`5`H	Flavonoid 3`5`-Hydroxylase
FHT	Flavanon 3-Hydroxylase
FLS	Flavonolsynthase
HE	Hydrolysierter Extrakt
HPLC	High pressure liquid chromatography
Km	Kämpferol
KPi	Kaliumphosphatpuffer
MeOH	Methanol
Mv	Malvidin
My	Myricetin
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
Nar	Naringenin
PEG	Polyethylenglykol
Pn	Päonidin
Pg	Pelargonidin
PHF	Pentahydroxyflavanon
Qu	Quercetin
RE	Rohextrakt
TFA	Trifluoressigsäure
THC	Tetrahydroxychalkon
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UDPG	Uridin-5`-diphospho-Glukose

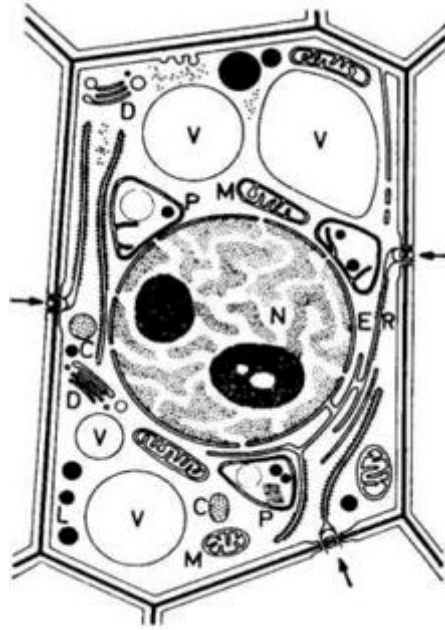
# 1. Einleitung

Der Name Anthocyan stammt aus dem Griechischen und bedeutet wörtlich **Blumenblau**. 1835 verwendete MARQUARDT dieses Wort, um eine chemische Verbindung zu beschreiben, die in Blüten als blaues Pigment fungiert. Erst später erkannte man, dass nicht nur violette und blaue, sondern purpurrote, scharlachrote, rote, hellrote und orange Färbungen – und zwar nicht nur von Blüten, sondern auch von Früchten, Wurzeln und Blättern – durch Pigmente entstehen, die chemisch gesehen dem ursprünglichen „Blumenblau“ ähnelten. Aufgrund ihrer chemischen Struktur und ihres Biosynthesewegs werden die Anthocyane heute zu den Flavonoiden gezählt und stellen eine bedeutende Untergruppe dieser Verbindungen dar. Flavonoidverbindungen spielen im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel eine besondere Rolle. Schätzungsweise machen Flavonoide und ihrer Derivate circa 2 % vom gesamten Kohlenstoff aus, der durch die pflanzliche Photosynthese gebunden wird. Dies sind nicht weniger als  $1 \times 10^9$  Tonnen pro Jahr (1).

Flavonoide sind am auffälligsten in den Blüten akkumuliert. Dort fungieren sie als Blütenfarbstoffe. Durch die Färbung der Blüten werden Insekten und Vögel angelockt, die für die Bestäubung und Verbreitung von Samen sorgen und somit den Fortbestand der Art sichern. Sie bestimmen den Geschmack vieler pflanzlicher Produkte und sind wegen der Färbung von Blüten und Gehölzen für den Menschen auch von großem ästhetischen Wert. Ferner spielen sie als Strahlungs- (2), Infektions-, Fraßschutz (3) und möglicherweise als Phytohormone eine besondere Rolle (4).

## 1.1. Blütenfarbstoffe

Färbungen in den Pflanzen entstehen in der Regel durch die Kombination verschiedenster Pigmente, die in Chromoplasten oder Zellvakuolen akkumuliert sind (Abb. 1). Ihrem chemischen Aufbau nach können diese Pigmente zu einigen wenigen Gruppen klassifiziert werden. Die bedeutendsten sind die Flavonoide, die trotz ihres philologischen Ursprungs (flavus=gelb) ein breites Farbspektrum von gelb und orange bis hin zu rot und blau abdecken und die Carotinoide, die für eine Vielzahl von gelben, orangen und roten Tönen verantwortlich sind. Weitere Gruppen sind Chlorophyll, das für grüne Töne verantwortlich ist, Chinone, die gelbe und rote Farbtöne verursachen und Betalaine, die gelbe, rote und purpurne Färbung hervorrufen.



**Abb. 1:** Stark schematisiertes Bild einer Pflanzenzelle. Flavonoide liegen als wasser- bzw. zellsaftlösliche Pigmente in den Vakuolen (V) fast aller vakuolären Pflanzen vor.

Biologisch gesehen besteht die Funktion der Blütenfarbstoffe an erster Stelle in der Anlockung von Bienen, Schmetterlingen und anderen Bestäubern. Ihnen wird schon von weitem durch den Farbkontrast (Blüte / Hintergrund) das Vorhandensein von Futterquellen signalisiert. Somit funktioniert eine gerechte Zusammenarbeit. Nektar aus der Blüte für die Bestäuber auf der einen, und Garantie des Fortbestandes durch die Bestäuber für die Pflanzenart auf der anderen Seite. Die Beziehung Bienenaktivität - Blumenfarbe wurde bereits im Jahr 1793 von SPRENGEL studiert (5). Hier ist aber zu erwähnen, dass der Bestäuber die Blütenfarbe anders wahrnimmt als der Mensch. Insekten, aber auch Vögel können ein Farbmuster aus einer dem Menschen weiß erscheinenden Blume wahrnehmen (6). In anderen Worten, weiß ist nicht gleich weiß hinsichtlich der weißen Blüte.

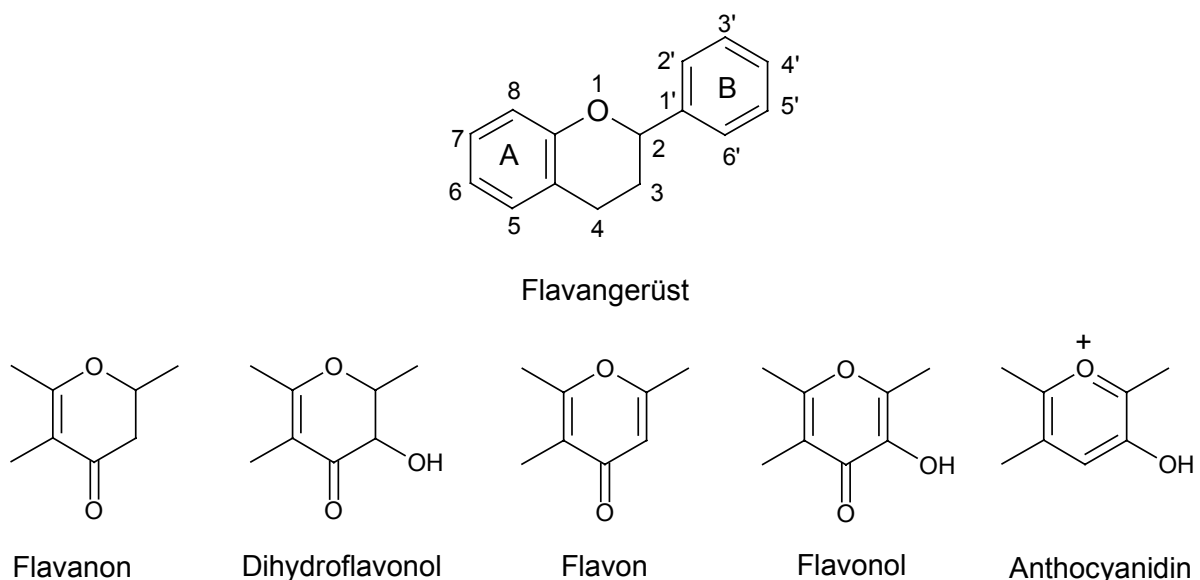
Wissenschaftler beschäftigen sich mehr und mehr mit der Bildung sogenannter "Honigmale", das sind **Wegweiser**, die die Bestäuber ins Zentrum der Blüte zu Sexualorganen und Nektar führen sollen. Sie entstehen durch lokale Pigmentkonzentration bzw. gezielte Pigmentverteilung, die zu einer bestimmten Musterbildung führt. Sie können für das menschliche Auge sichtbar sein, wie z.B. bei *Digitalis purpurea*. Häufiger sind sie aber nur für Insekten aufgrund deren unterschiedlichen Wahrnehmungsbereichs erkennbar. In diesem Fall spielen meistens die Zwischenprodukte des Anthocyanbiosynthesewegs, wie Flavone oder Flavonole, die nur im UV-Bereich Licht absorbieren, eine besondere Rolle (7,8). Ferner wurde nach der Bestäubung in vielen Pflanzenarten eine Verschiebung der Blütenfarbe festgestellt. Man nimmt an, dass hier Ethylen eine Rolle spielt (9).



## 1.2. Struktur der Flavonoide

Eingehende genetische, chemische und enzymologische Untersuchungen und vor allem Untersuchungen mit isotoopenmarkierten Vorstufen des Biosynthesewegs führten dazu, dass die Flavonoide als die bestuntersuchte Stoffklasse des Sekundärstoffwechsels angesehen werden kann. Die Tatsache, dass die Flavonoide eine strukturell einheitliche Gruppe darstellen, vereinfachte ihre Untersuchungen gegenüber anderen sekundären Pflanzenstoffen wie z.B. den Alkaloiden beträchtlich.

Die chemische Struktur der Flavonoide lässt sich vom C15-Gerüst des Flavans ableiten. Die Einteilung in verschiedene Klassen erfolgt nach dem Oxidationszustand des zentralen Pyranrings. Die wichtigsten Flavonoidklassen sind die Flavanone, Dihydroflavonole, Flavone, Flavonole und Anthocyanidine (Abb. 2).



**Abb. 2:** das Flavan-Grundgerüst und die wichtigsten Flavonoidklassen.

Modifikationen innerhalb einer Flavonoidklasse führen zu einer Vielzahl von Verbindungen. Heute kennt man die Struktur von über 4000 verschiedenen Flavonoiden. Die üblichen Modifikationsarten sind Hydroxylierung, Methylierung, Glykosylierung und Acylierung. Hydroxylierung und Methylierung finden hauptsächlich am B-Ring, insbesondere in der 3'- und 5'-Position, statt. Glykosylierung bzw. Acylierung einer vorhandene Glykosylgruppe bevorzugen hingegen die 3-Position des Heterozyklus und die 5- bzw. 7-Position des A-Rings. Bei der Glykosylierung bzw. der Acylierung ist durch die Auswahl zwischen verschiedenen Zucker- bzw. Acylgruppen eine große Anzahl an Modifikationsmöglichkeiten gegeben. Diese Anzahl erhöht sich nochmals durch weitere Glykosylierung an bereits vorhandenen Zuckermolekülen und nicht direkt am Flavonoidgerüst.

Aufgrund ihrer Verbreitung und ihres mengenmäßigen Vorkommens werden Anthocyanidine, Flavone und Flavonole häufig als major flavonoids bezeichnet. Die anderen Flavonoidklassen sowie die biosynthetisch nahe verwandten Chalkone, Dihydrochalkone und Aurone werden in der Literatur zu den minor flavonoids zusammengefasst (4).

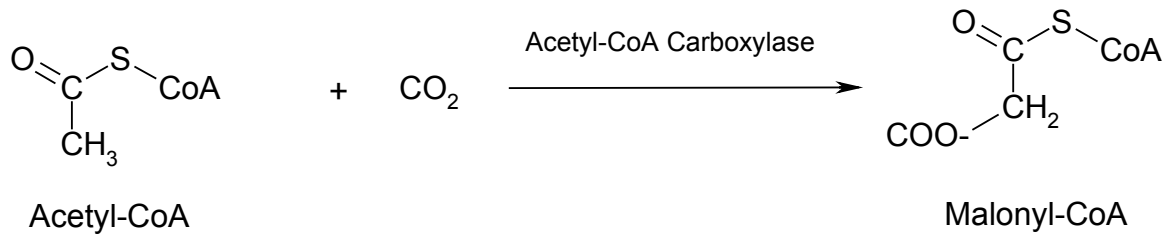
### *1.3. Biosynthese der Flavonoide*

Aufgrund der Analyse der Substitutionsmuster des A- und B-Rings kam Sir ROBINSON bereits im Jahr 1921 zu dem Schluss, dass die Flavonoide biogenetisch aus einer C<sub>6</sub>- und einer C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-Einheit aufgebaut sein müssen. Dieses grundsätzliche Erkenntnis wurde 1953 von BIRCH und DONOVAN um die Theorie erweitert, dass die Biosynthese von einer p-Hydroxyzimtsäure und drei Acetateinheiten ausgeht und dass als Intermediat eine Polyketosäure gebildet wird. Ausführliche Untersuchungen mit isotope markierten Vorstufen gaben Aufschluss sowohl über die Bausteine der Flavonoide als auch über den biogenetischen Zusammenhang der einzelnen Flavonoidklassen. Um jedoch genaue Kenntnis über Art, Reihenfolge und Regulation der einzelnen Biosyntheseschritte zu erhalten, war es erforderlich, die dafür verantwortliche Enzyme nachzuweisen und zu charakterisieren.

In den letzten Jahrzehnten wurden beachtliche Fortschritte gemacht (10). Der Einsatz von <sup>14</sup>C-markierten Substrate sowie die Verwendung von Zell-Suspensionskulturen waren wesentliche Faktoren, die dazu beigetragen haben. Erst in den letzten zwanzig Jahren wurden die Zellsuspensionskulturen als Enzymquelle mehr und mehr durch Blütenblätter genetisch definierter Genotypen ersetzt. Dadurch konnten die vorliegenden Ergebnisse genetischer Untersuchungen für die Aufklärung der Flavonoidbiosynthese eingesetzt werden.

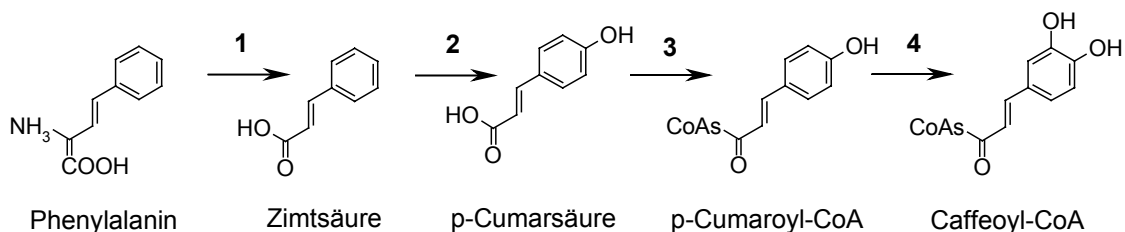
#### *1.3.1. Vorstufen der Flavonoidbiosynthese*

Das Grundgerüst der Flavonoide (Abb. 2) wird durch die Kondensation zweier Substrate, Malonyl-CoA und eines entsprechenden p-Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester, p-Cumaroyl-CoA oder Caffeoyle-CoA gebildet. Die Biosynthese des Malonyl-CoA erfolgt aus Acetyl-CoA und CO<sub>2</sub> durch das Enzym Acetyl-CoA Carboxylase (Abb. 3).



**Abb. 3:** Synthese von Malonyl-CoA aus Acetyl-CoA durch Acetyl-CoA Carboxylase.

Die Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester sind nicht nur die Vorstufen der Flavonoide, sondern auch einer Reihe anderer Sekundärstoffwechselstoffe wie Lignin, Stilbene, Amide und Ester. Bei den meisten dieser Verbindungen geht die Biosynthese von p-Cumaroyl-CoA aus, das im **Zimtsäureweg** aus der Aminosäure Phenylalanin gebildet wird (Abb. 4).



**Abb. 4:** Biosynthese der Hydroxyzimtsäureester. **1:** Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL), **2:** Cinnamat 4-Hydroxylase (C4H), **3:** p-Cumarat-CoA-Ligase (4CL), **4:** p-Cumaroyl-CoA-Hydroxylase (CC3H).

Wie die Abbildung 4 zeigt, wird Phenylalanin mit Hilfe vom Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) durch Abspaltung der Aminogruppe in die *trans*-Zimtsäure umgewandelt. In weiterer Folge kommt es zur Einführung einer Hydroxylgruppe an der Position 4 durch das Enzym Cinnamat 4-Hydroxylase (C4H) und es bildet sich die p-Cumarsäure, welche mit Hilfe vom p-Cumarat-CoA-Ligase in p-Cumaroyl-CoA umgewandelt wird. Caffeoyl-CoA entsteht durch die Hydroxylierung von p-Cumaroyl-CoA an der Position 3 mit Hilfe vom p-Cumaroyl-CoA 3-Hydroxylase.

### 1.3.2. Enzyme des Flavonoidbiosynthesewegs

Ein Überblick des gesamten Flavonoidbiosynthesewegs ist in Abbildung 5 aufgezeichnet. Das ist auch eine Übersicht der an der Biosynthese der Flavonoide beteiligten Enzyme sowie der Reaktionsschritte, die von ihnen katalysiert werden. Anschließend erfolgt eine detaillierte Beschreibung dieser Enzyme.

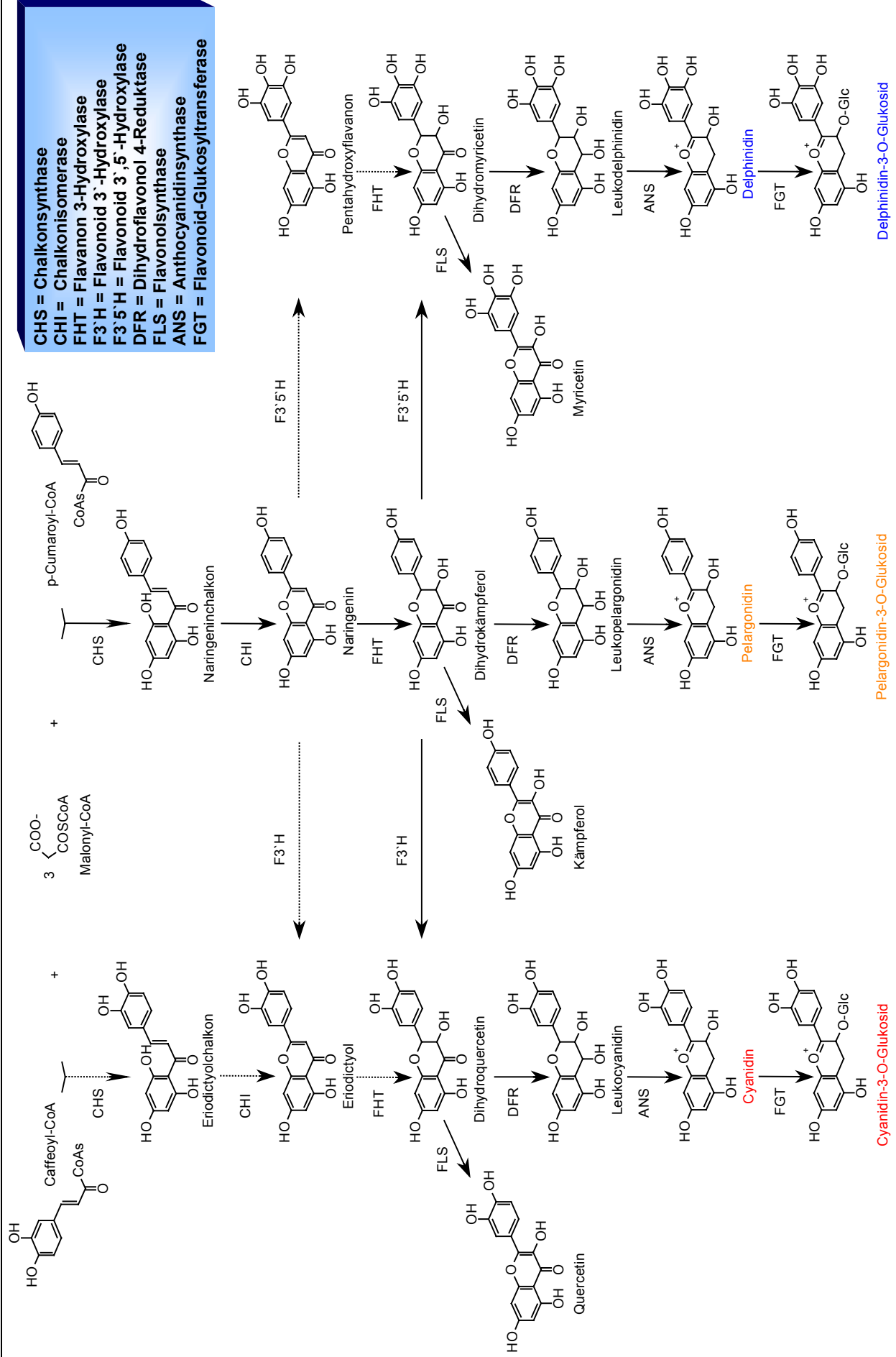
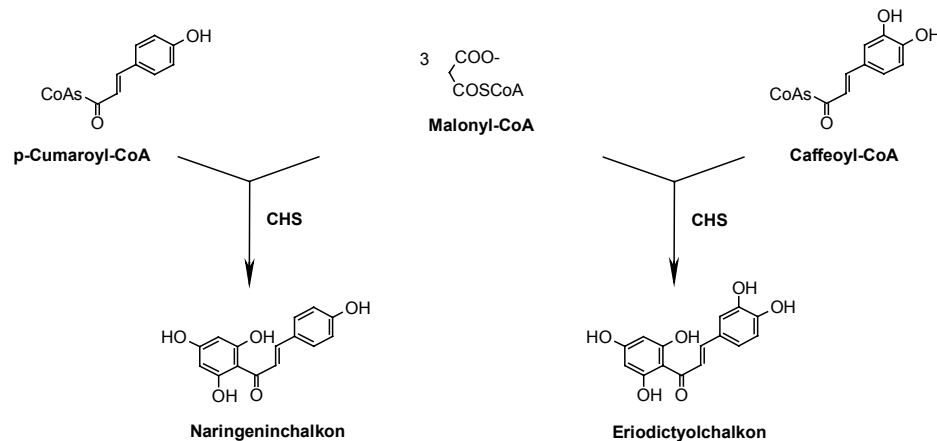


Abb. 5: Der für viele Pflanzenarten gültige Biosyntheseweg der Anthocyane: ( —————> Hauptweg, .....> Nebenweg).

### 1.3.2.1. Chalkonsynthase (CHS)



**Abb. 6:** Die CHS-Reaktion mit der Bildung von Chalkone.

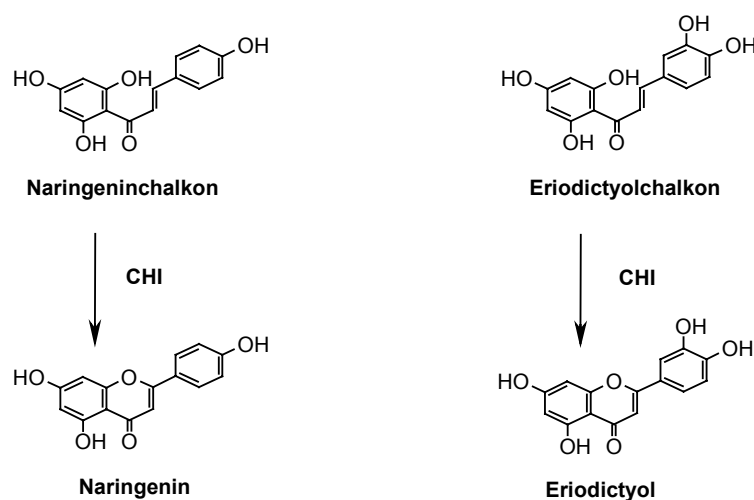
Die Chalkonsynthase ist das Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese (Abb. 6). Sie katalysiert die Kondensation von drei Molekülen Malonyl-CoA mit einem Molekül p-Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester zum Chalkon. Die CHS wurde erstmals im Jahr 1972 von KREUZALER und HAHLBROCK nachgewiesen (11) und später näher charakterisiert (12,13).

Die Substratspezifität der CHS spielt automatisch eine besondere Rolle für den gesamten Verlauf des Biosynthesewegs. Bei vielen Pflanzenarten akzeptiert die CHS neben p-Cumaroyl-CoA auch Caffeoyl-CoA als Substrat (14,15). Die Frage, welcher Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester das natürliche Substrat darstellt, wurde eingehend bei vielen Pflanzenarten studiert. Alle bisherige Untersuchungen, in denen äquimolare Mengen der Hydroxyzimtsäure-CoA-Estern angeboten wurden, zeigten, dass die CHS p-Cumaroyl-CoA als Substrat bevorzugt. Daraus folgt, dass p-Cumaroyl-CoA das natürliche Substrat der CHS ist und das entstehende Chalkon im B-Ring lediglich an der Position 4 eine OH-Gruppe besitzt. Flavonoide mit weiteren Hydroxylgruppen im B-Ring dürften diese also einem zusätzlichen Biosyntheseschritt zu einem späteren Zeitpunkt verdanken.

Seit dem ersten Nachweis der CHS im Jahr 1972 durch KREUZALER und HAHLBROCK, wurde die CHS vieler Pflanzenarten untersucht, so dass über Struktur, Enzymmechanismus, Substratspezifität und genetische Kontrolle umfangreiches Wissen vorhanden ist. In den letzten Jahren wurden die Expression und Regulation der CHS-Aktivität in Zusammenhang mit Blütenentwicklung, Verletzungen, Pathogenangriff und Stressfaktoren auf biochemischer und molekularbiologischer Ebene intensiv studiert (16).

Während man früher die Meinung vertrat, dass sich innerhalb des Genoms einer Pflanze nur ein Struktur-Gen der CHS befindet, konnte inzwischen durch Enzymreinigung- und Southernblot-Analysen das Vorhandensein verschiedener CHS-Gene innerhalb einer Pflanzenart nachgewiesen werden. Die Genprodukte unterscheiden sich voneinander unter anderem im Molekulargewicht und im isoelektrischen Punkt (17,18,19,20).

### 1.3.2.2. Chalkonisomerase (CHI)



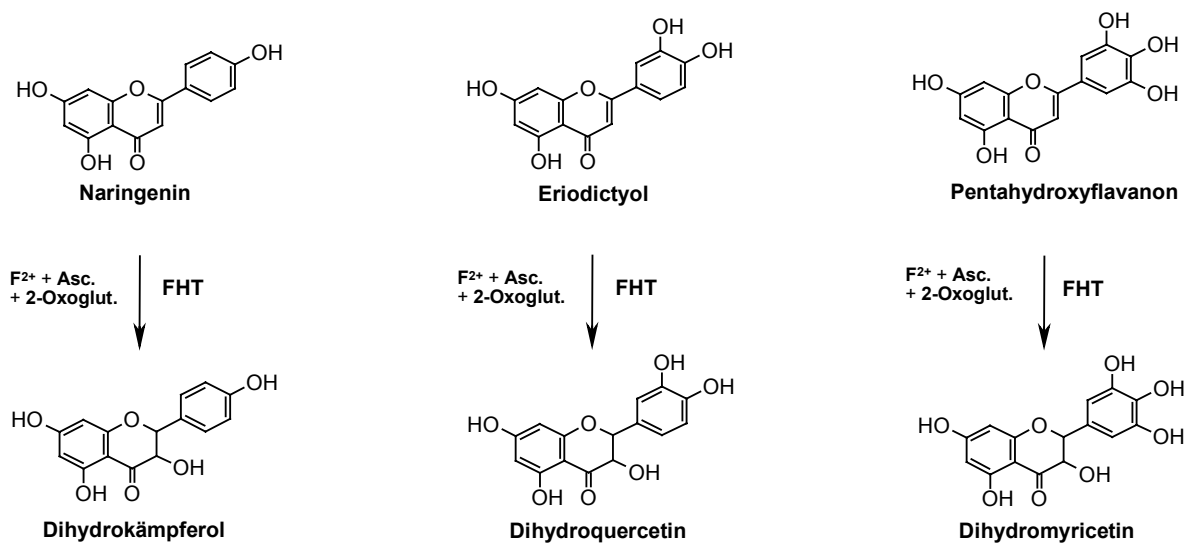
**Abb. 7:** Die CHI-Reaktion mit der Umsetzung von Chalkone in die Flavanone.

Die Chalkone werden von der CHI stereospezifisch in die 2S-Flavanone umgewandelt (21,22,23). Die nachfolgenden Enzyme können ausschließlich 2S-Flavanone als Substrate nutzen. In Zellen, in denen aus genetischen Gründen keine CHI-Aktivität vorhanden ist, können die 6'-Hydroxychalkone auch chemisch isomerisieren (spontane Isomerisierung). Dabei bildet sich jedoch ein Gemisch aus 2S- und 2R-Flavanonen, das von den nachfolgenden Enzymen nur zum Teil weiter verwendet werden kann. Die stereospezifisch falsche Form reichert sich in den Zellen an. Die gelbe Farbe von Blüten, die CHI nicht besitzen, ist auf die Akkumulierung von 6'-Hydroxychalkonen zurückzuführen (21,23,24).

Die Chalkonisomerasen der Petunie (25) und der Sojabohne (26) wurden bis zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt. Eine teilweise Reinigung der CHI wurde aus Zellkulturen von *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max.* und *Medicago sativa* (27) erzielt. Die CHI dieser Pflanzen liegen als Monomere vor und besitzen ein Molekulargewicht zwischen 24 000 und 29 000 Dalton. Untersuchungen an *Petunia hybrida* ergaben, dass in den verschiedenen Pflanzenteilen unterschiedliche CHI-Formen vorkommen (25).

### 1.3.2.3. Flavanon 3-Hydroxylase (FHT)

Die Flavanone werden von mehreren Enzymen als Substrate genutzt. Die Flavanon 3-Hydroxylase (FHT) katalysiert die stereospezifische 3  $\beta$ -Hydroxylierung der 2S-Flavanone zu den entsprechenden 2R,3R-Dihydroflavonolen (Abb. 8). Als Cofaktoren benötigt die FHT 2-Oxoglutarat,  $\text{Fe}^{+2}$  und Ascorbat. Das Enzym wurde daher als eine 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase klassifiziert (28,29,30,31).

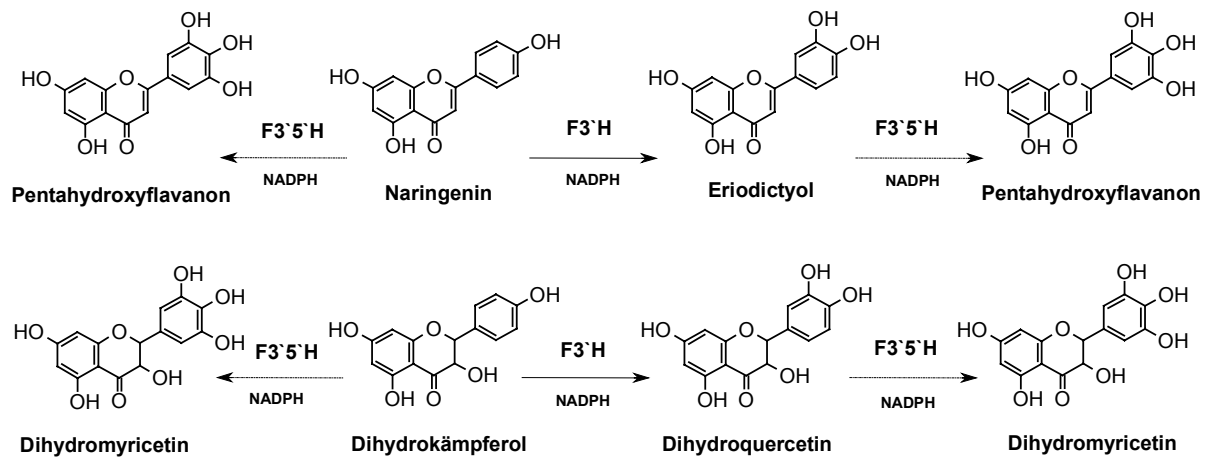


**Abb. 8:** Die FHT-Reaktion. Als Cofaktoren dienen 2-Oxoglutarat,  $\text{Fe}^{+2}$  und Ascorbat.

Das Enzym wurde erstmals in Enzymextrakten aus *Matthiola incana* (28) nachgewiesen und später näher charakterisiert (32,33). Die FHT liegt als Dimer vor. Das durch SDS-Elektrophorese bestimmte Molekulargewicht betrug 41 000 Dalton. Ein cDNA Klon der FHT aus Petunie wurde ebenfalls isoliert und charakterisiert (34).

### 1.3.2.4. Flavonoid 3`- bzw. 3`5`-Hydroxylase (F3`-/F3`5`H)

Flavonoidderivate mit einem 3`,4`-Hydroxylierungsmuster können auf zwei Wegen gebildet werden. Wie bereits erwähnt akzeptiert die CHS vieler Pflanzenarten außer p-Cumaroyl-CoA auch Caffeoyl-CoA als Substrat (14,15). Es kommt in Kombination mit der CHI zur Bildung von Eriodictyol (Abb. 6 und 7). Meist ist aber p-Cumaroyl-CoA der bevorzugte Precursor für alle substituierten Flavonoide. Es kommt erst zu einer Hydroxylierung des B-Rings an den Positionen 3` bzw. 3` und 5` durch die Flavonoid 3`-Hydroxylase (F3`H) bzw. Flavonoid 3`,5`-Hydroxylase (F3`5`H). Diese Enzyme können sowohl die Flavanone als auch die Dihydroflavonole als Substrate nutzen und überführen sie in die mehrfach hydroxylierten Verbindungen (16).



**Abb. 9:** Die F3`H- bzw. F3`5`H-Reaktionen und die möglichen Substrate.

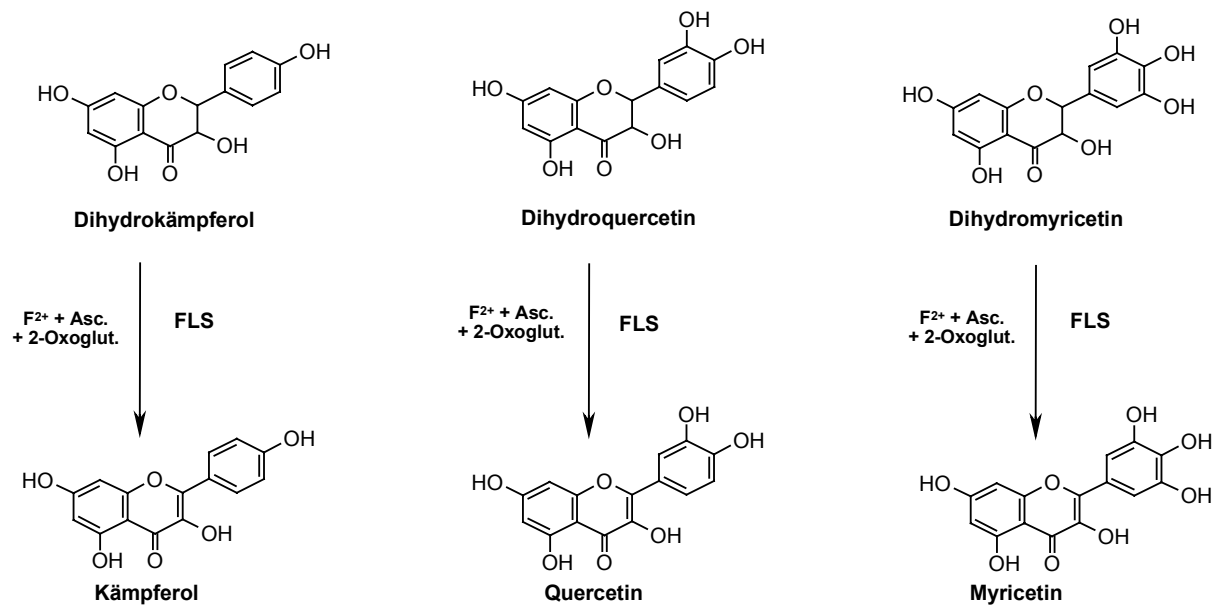
Bei beiden Hydroxylasen handelt es sich um mikrosomal gebundene Oxidoreduktasen, die NADPH als Cofaktor benötigen (15). Später wurden sie als Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen identifiziert (35). P450-Cytochrome sind Proteine, die als prosthetischen Teil eine Hämgruppe enthalten, deren reduzierte Form einen Komplex mit Kohlenmonoxid bildet, welcher durch Absorption von Licht mit der Wellenlänge 450 nm wieder zerstört wird (36,37). Sie werden durch eine Vielzahl von synthetischen Hemmstoffen wie z.B. Tetcyclacis, Ancymidol, BAS 110 W, BAS 111 W oder LAB 150 978 spezifisch gehemmt (35,38).

Aufgrund bestimmter Eigenschaften wie ihrer Membranassoziation und ihrer in einer Zelle vorhandenen, geringen Menge ist diese Enzymklasse meist schwer zu untersuchen.

### 1.3.2.5. Flavonolsynthase (FLS)

Die Flavonole gehören zu den in der Natur weit verbreiteten Flavonoiden. Die physiologische Funktion der Flavonole ist vielfältig und noch nicht vollständig erforscht. Sie fungieren beispielsweise bei Tomaten-, Tabak- und Baumwollpflanzen als Fraßabwehrstoffe, da sie die Larvenentwicklung bestimmter Schadschmetterlinge stark einschränken. Als Blütenfarbstoffe sind sie zwar nicht gleich bedeutend wie die Anthocyane, sie leisten aber dennoch einen wichtigen Beitrag, entweder als gelbe Blütenpigmente oder als Copigmentierung für die Anthocyane. Die drei häufigsten Flavonole sind Kämpferol, Quercetin und Myricetin. Die FLS katalysiert die Umwandlung der Dihydroflavonole zu den entsprechenden Flavonolen (Abb. 10). Aufgrund der Abhängigkeit der FLS-Reaktion von 2-Oxoglutarat, F<sup>+2</sup>-Ionen und Ascorbat, zählt sie wie die FHT zu den Dioxygenasen.



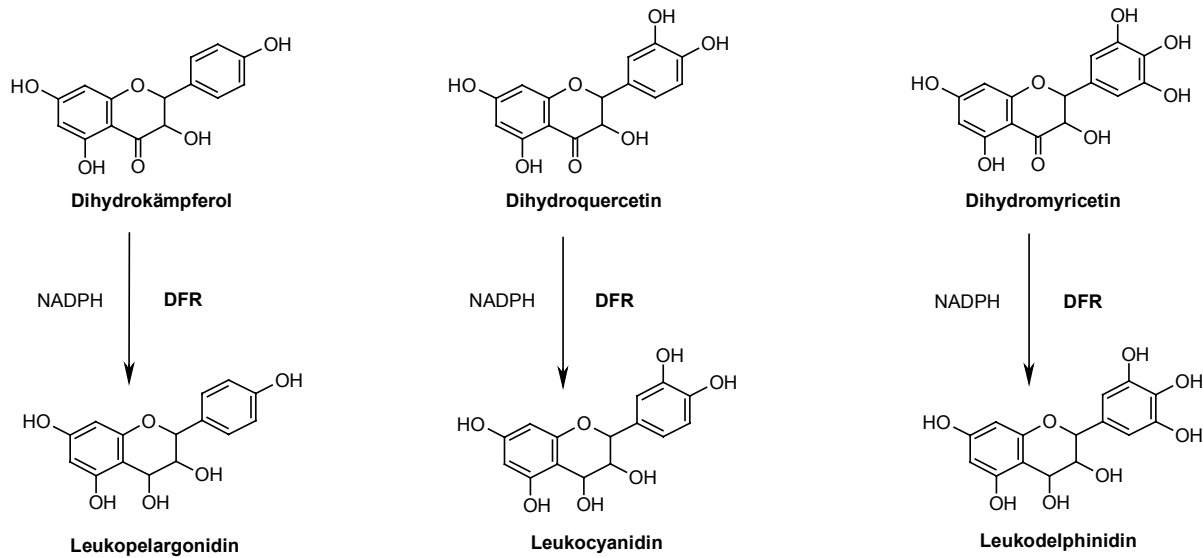


**Abb. 10:** Die FLS-Reaktion und die Synthese der Flavonole.

Sie wurde erstmals mit Enzympräparationen aus einer mit UV-Licht induzierten Petersilienzellkultur charakterisiert (29). Später gelang der Nachweis dieses Enzyms auch in Blütenextrakten von *Matthiola incana* (39), *Petunia hybrida* (40) und in Enzympräparationen aus den Antheren von *Tulipa* (41). In den letzten Jahren wurde auch die FLS der Edelnelke (*Dianthus caryophyllus*) charakterisiert (42).

### 1.3.2.6. Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR)

Die DFR katalysiert die stereospezifische Reduktion von 2R, 3R-Dihydroflavonolen zu den entsprechenden Flavan-2,3-Trans-2,4-Cis-Diolen, die auch aufgrund der Farblosigkeit als Leukoanthocyanidine bezeichnet werden (Abb. 11). DFR-Aktivität wurde erstmals in Enzympräparationen von *Pseudotsuga*-Zellkulturen, im Zusammenhang mit der Biosynthese der Catechine und Proanthocyanidine demonstriert (43). Erst später wurde in Proteinextrakten aus *Matthiola* gezeigt, dass die DFR auch für die Biosynthese der Anthocyane verantwortlich ist (44). Die wichtige Rolle der DFR in der Anthocyanbiosynthese wurde bestätigt, als die DFR-Aktivität in Blütenextrakten vieler Pflanzenarten nachgewiesen werden konnte (45,46,47).



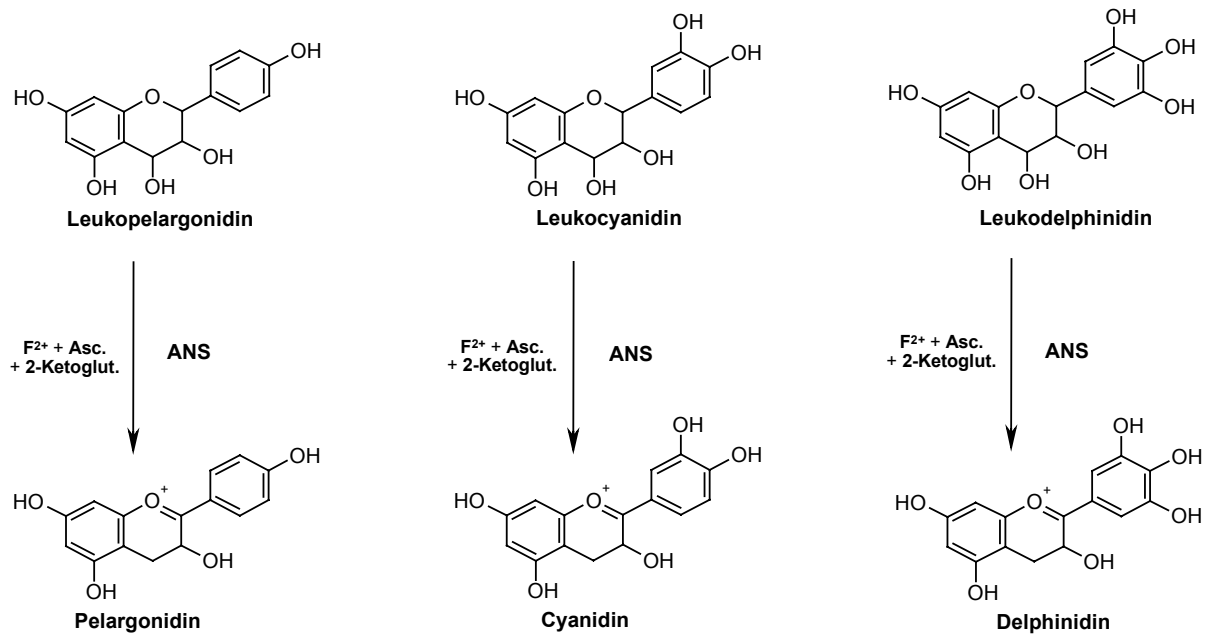
**Abb. 11:** Die DFR-Reaktion mit den verschiedenen Substraten.

DFR aus Dahlie-Blüten wurde bis zur Homogenität aufgereinigt und weiter charakterisiert (47). Das Enzym benötigt NADPH als Cofaktor und katalysiert den Transfer des pro-S-Wasserstoffatoms von NADPH zum Substrat. Das Protein besitzt ein Molekulargewicht von 41 000 Dalton.

Alle bisher nachgewiesene DFR-Enzyme weisen eine hohe Substratspezifität zu den jeweiligen Dihydroflavonolen auf, in einem Muster, was mehr oder weniger den vorhandenen Anthocyanidinen entspricht. So akzeptiert z.B. die DFR von *Petunia hybrida* nur Dihydroquercetin oder Dihydromyricetin als Substrat, jedoch nicht Dihydrokämpferol. Entsprechend findet man sowohl Cyanidin- als auch Delphinidin-, aber keine Pelargonidinderivate in den Blüten der Petunie (48). Auf diesen Kenntnissen basierte die Einführung eines Mais DFR-Gens in *Petunia hybrida*, das für ein DFR-Enzym kodiert, welches Dihydrokämpferol ebenfalls akzeptiert (49).

### 1.3.2.7. Anthocyanidinsynthese (ANS)

Die Leukoanthocyanidine sind die unmittelbaren Vorstufen für die Anthocyanidine (Abb. 12). Lange Zeit konnte diese Tatsache nur durch Supplementations-Experimente bewiesen werden. Man fütterte geeignete Mutanten, die Anthocyane nicht synthetisieren können, mit Leukoanthocyanidinen. Diese Pflanzen konnten dann Anthocyane bilden (40,50). *In vitro* konnte man diese Umsetzung jedoch aufgrund der hohen Instabilität der Leukoanthocyanidine nicht nachweisen.



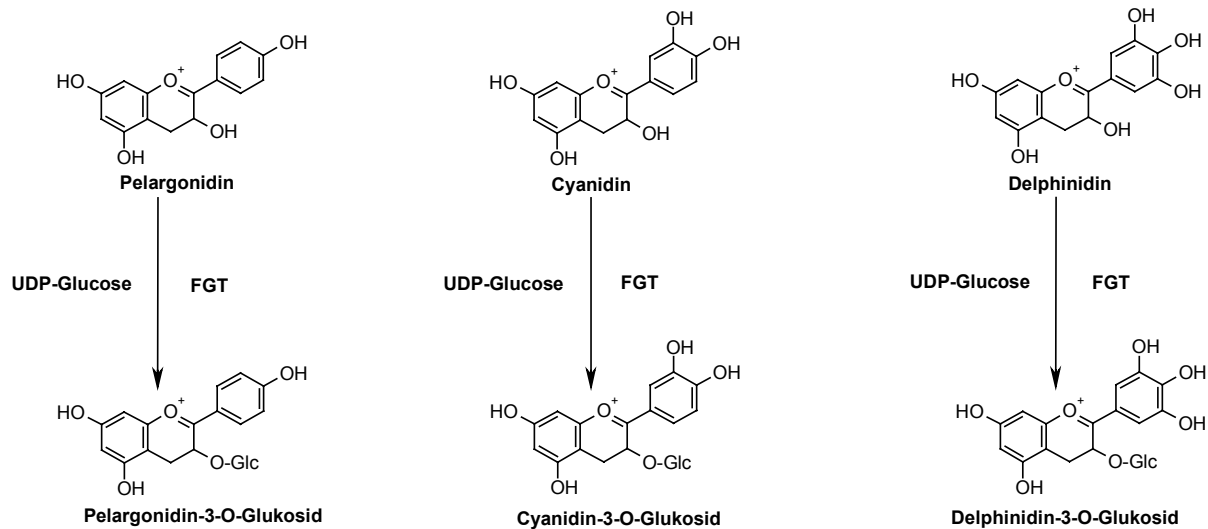
**Abb. 12:** Die ANS-Reaktion und die Synthese der Anthocyanidine.

Vor kurzem berichteten SAITO *et al.* über den ersten Nachweis der ANS-Aktivität *in vitro* (51). Eine aus einem cDNA-Klon von *Perilla frutescens* gewonnene ANS soll in Anwesenheit von 2-Oxoglutarat,  $F^{+2}$  und Ascorbat, gefolgt mit Ansäuerung durch HCl, die Umsetzung von Leukoanthocyanidinen zu den entsprechenden Anthocyanidinen katalysieren. Die Entstehung von  $CO_2$  aus 2-Oxoglutarat und die Oxidation der Leukoanthocyanidine zu den Anthocyanidinen wurde mit Hilfe der HPLC nachgewiesen. Dementsprechend klassifizierte er die ANS als eine 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase.

### 1.3.2.8. Flavonoid-3-O-Glukosyltransferase (FGT)

Die Glykosylierung der Flavonoide im allgemeinen ist ein wichtiger Modifikationsschritt im Biosyntheseweg. Dadurch kommt es einerseits zu einer Erhöhung der Wasserlöslichkeit des Moleküls, andererseits ist die Glykosylierung die Grundvoraussetzung für die nachfolgende Acylierung des Zuckerrests mit organischen Säuren.

Für die Anthocyane ist die Glykosylierung ein essentieller Bestandteil der Biosynthese, da die gebildeten Anthocyanidine chemisch instabil sind. Erst durch die Übertragung eines Zuckerrests auf die Hydroxylgruppe der Position 3 kommt es zur Bildung der unter physiologischen Bedingungen stabilen Anthocyane. Bei vielen Pflanzen findet man als Anthocyane Anthocyanidin-3-O-Glukosidderivate. Die UDP-Glukose-Flavonoid 3-O-Glukosyltransferase (FGT) katalysiert diese Reaktion (Abb. 13).



**Abb. 13:** Die FGT-Reaktion und der letzte Schritt in der Anthocyanbiosynthese.

FGT-Enzymaktivität wurde erstmals im Jahr 1968 in Proteinextrakten aus Samen bei *Zea mays* gezeigt (52). Erst später wurde das Enzym in Enzympräparationen zahlreicher Pflanzenarten nachgewiesen (53,54,55). Neben den Anthocyanidinen akzeptiert die FGT auch Flavonole als Substrate und wandelt diese in Gegenwart von UDP-Glucose in Flavonol-3-O-Glucoside um.

## 1.4. Außergewöhnliche Anthocyanidin-Muster

Die wichtigsten, in der Natur vorkommenden Anthocyanidine unterscheiden sich durch den Grad der Hydroxylierung bzw. Methoxylierung des B-Rings. Wir können davon ausgehen, dass das Substitutionsmuster des B-Rings in der Regel auf der Flavonoidebene festgelegt wird (56). Die CHS nutzt im wesentlichen p-Cumaroyl-CoA als Substrat für die Synthese des Flavonoid-Grundgerüsts (Abb. 2). Das entstandene Naringeninchalkon wird in Abwesenheit der oben genannten Hydroxylasen des B-Rings (Abs. 1.3.2.4.) in das Anthocyanidin Pelargonidin (Pg) überführt. Ist dagegen die Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H) aktiv, entsteht statt Pelargonidin Cyanidin (Cy), und wenn die 3',5'-Hydroxylase aktiv ist, wird Delphinidin (Dp) gebildet. Die Hydroxylasen wirken auf Flavanon- oder meist Dihydroflavonolebene, nicht aber auf Anthocyanebene (56).

Die Aktivität der B-Ring Hydroxylasen steht unter genetischer Kontrolle. Enzymaktivität ist nur vorhanden, wenn dominante Allele am betreffenden Locus vorliegen. Das heißt im Falle der B-Ring-Hydroxylierung aber auch, dass Delphinidin-Synthese dominant ist über die von Pelargonidin und Cyanidin und Cy-Synthese dominant ist über die von Pelargonidin (14,28,30,57,58,59).

Jahrzehntelange und umfangreiche Untersuchungen zur Biosynthese und Genetik der Anthocyane erlaubten nicht nur die Aufklärung allgemein gültiger Regeln, sondern führten auch zur Aufdeckung einiger Besonderheiten. Sie betreffen vor allem die Art und Zahl der in Pflanzen synthetisierten Anthocyanidintypen sowie deren Dominanzverhältnisse zueinander. Einige dieser Besonderheiten werden im folgenden kurz erläutert:

### 1.4.1. Fehlen des Pelargonidin-Typs

Es gibt eine Reihe von Pflanzengattungen, die Cyanidin- oder Delphinidinderivate synthetisieren, nicht aber Derivate von Pelargonidin, des einfachsten Anthocyanidins. Dazu gehören vor allem verschiedene Vertreter der *Solanaceae* (z.B. Petunien, Ziertabak, Tomaten), aber auch Cyclamen und Chrysanthemen.

Eingehende Untersuchungen an Petunien haben gezeigt, dass für das Fehlen des Pelargonidin-Typs die ungewöhnliche Substratspezifität der DFR verantwortlich ist. In der Regel akzeptiert die DFR Dihydrokämpferol (DHK), Dihydroquercetin (DHQ) und Dihydromyricetin (DHM) als Substrate, wodurch im weiteren Verlauf der Biosynthese die Anthocyanidine Pelargonidin, Cyanidin und Delphinidin entstehen. Die Petunien-DFR akzeptiert jedoch nur DHQ und DHM als Substrate. DHK wird nicht umgesetzt und damit die Synthese von Pelargonidin unterbunden. Aufgrund dieses Wissens konnte bereits 1987 durch Transformation eines DFR-Gens mit geeigneter Substratspezifität in die Petunie der Pelargonidin-Typ auf gentechnischem Weg erzeugt werden (49).

Während auch bei Ziertabak und Tomaten eine abweichende Substratspezifität der DFR die Ursache für das Fehlen des Pelargonidin-Typs zu sein scheint, kommt dafür bei Chrysanthemen eher eine ungewöhnlich hohe und durch Mutation nicht ausschaltbare Aktivität der F3`H in Frage. Möglicherweise verfügt die Chrysantheme über mehrere, gleichzeitig exprimierte F3`H-Gene im Genom. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass die CHS bei der Synthese des Flavonoid-Grundgerüsts neben p-Cumaroyl-CoA (Pelargonidin-Substitutionsmuster) verstärkt auch Caffeoyl-CoA (Cyanidin-Substitutionsmuster) als Substrat nutzt (Abb. 6).

Für Cyclamen liegen bisher keine enzymologische Untersuchungen zur Flavonoid-Biosynthese vor. Es gibt daher auch keinerlei Anhaltspunkte für die Ursache des Fehlens des Pelargonidin-Typs.

### 1.4.2. Entstehung von Mischtypen

Bei einigen Pflanzengattungen sind nicht nur Anthocyane eines Anthocyanidin-Typs in den Blüten enthalten, sondern Mischungen von Pelargonidin-, Cyanidin- und Delphinidin-Derivate, die zusätzlich auch noch in methylierter Form wie z.B. Päonidin (Pn), Petunidin (Pt) und Malvidin (Mv) auftreten können. Linien mit nur einem Anthocyanidin-Typ treten – wenn überhaupt – nur selten auf.

So enthalten beispielsweise viele Rosen- und Gerberasorten Mischungen aus Pelargonidin- und Cyanidin-Derivaten. In Sommerastern treten in allen Linien neben Pelargonidin- und/oder Delphinidin-Derivaten stets auch Cyanidin-Derivate auf. Die Blüten von Cyclamen, Hyazinthen, Pelargonien und Tulpen enthalten oft auch komplizierte Mischung von Derivaten der verschiedensten Anthocyanidine. Das Auftreten von Anthocyanidin-Mischungen ist nicht auf Blüten beschränkt. So enthalten beispielsweise die rotgefärbten Brakteen von Weihnachtssternen immer Pelargonidin- und Cyanidin-Derivate.

Als Erklärung für das gleichzeitige Auftreten verschiedener Anthocyanidin-Typen bietet sich eine ungenügende bzw. zeitlich begrenzte Aktivität der B-Ring-Hydroxylasen bzw. –Methylasen an. Es gibt aber auch Hinweise darauf (Gerbera, Rosen, Pelargonien, Cyclamen), dass insbesondere für die CHS und die DFR mehrere Gene vorliegen, die entwicklungs- und gewebespezifisch ausgeprägt werden und zudem zu Enzymen mit unterschiedlicher Substratspezifität führen (16).

### 1.4.3. Ungewöhnliche Dominanzverhältnisse

Wie oben bereits näher ausgeführt (Abs. 1.4.), ist in der Regel die Synthese von Anthocyanidinen mit höherer Substitution des B-Rings dominant. Es gibt jedoch einige interessante Ausnahmen. So ist schon länger bekannt, dass in *Papaver rhoeas* (und anderen Mohn-Arten) die Synthese von Pelargonidin dominant über die von Cyanidin ist. Die genetische Kontrolle erfolgt durch das dominante Allel des Gens F, das gleichzeitig auch eine Intensivierung der Anthocyansynthese bewirkt.

Eine dominante Pelargonidin-Synthese ist auch für *Impatiens balsamina* beschrieben (Gen H). Bei *Verbena hybrida* gibt es dagegen eine Allelserie Pd, P und p, die das Auftreten von Pelargonidin, Delphinidin und wiederum Pelargonidin kontrolliert. Die vom Allel Pd kontrollierte Pelargonidin-Synthese ist dominant über die vom Allel P kontrollierte Delphinidin-Synthese. Rezessive Allele (pp) des Gens P führen – wie üblich - zur Synthese von Pelargonidin.

Bei *Anagallis* ist die Synthese von Pelargonidin dominant über die von Malvidin. Da die Synthese von Delphinidin-Derivaten die Voraussetzung für die Methylierung zu Malvidinderivaten ist, dürfte auch hier hauptsächlich die B-Ring-Hydroxylierung in 3`- und 5`-Position betroffen sein.

In allen hier kurz geschilderten Fällen ist unbekannt, ob für die ungewöhnlichen Dominanzverhältnisse die Aktivität der Enzyme der B-Ring-Hydroxylierung oder aber andere Enzyme der Anthocyanbiosynthese (z.B. Substratspezifität und/oder Expressionsverlauf der CHS bzw. der DFR) verantwortlich sind.

## 1.5. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Aufklärung der Biosynthese ungewöhnlicher bzw. komplizierter Anthocyanidin-Muster mit Hilfe gezielter enzymologischer Untersuchungen an chemogenetisch definiertem Pflanzenmaterial. Davon wurde ein wesentlicher Beitrag zum Verständnis der Entwicklungs- und Gewebespezifischen Expression und Regulation bestimmter Flavonoidgene und zu Fragen der Aktivität und Substratspezifität der entsprechenden Enzyme erwartet. Im Vordergrund steht dabei die Klärung der folgenden Probleme:

### 1.5.1. Enzymologie der Flavonoidbiosynthese bei *Rosa hybrida*

Um einen sachlichen Überblick über die Anthocyanbiosynthese bei Rosen zu schaffen, muss erst ein erfolgreicher Nachweis der Enzyme, die für die einzelnen Schritte des Biosynthesewegs verantwortlich sind, abgeschlossen werden. Obwohl genügend Informationen der klassischen Genetik bei den Rosen hinsichtlich der Vererbung der Blütenfarbe vorhanden sind (74), ist bisher kein Nachweis von Enzymen bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollten, falls eine erfolgreiche enzymologische Analyse gelänge, die Enzyme des Biosynthesewegs der Anthocyane nachgewiesen werden. Im Vordergrund steht die Aufklärung der Frage, weshalb es neben reinen Pelargonidin- und Cyanidin-Typen oft Mischtypen bei den Rosen gibt.

### **1.5.2. Enzymologie der Flavonoidbiosynthese bei *Cyclamen***

Wie bei den Rosen ist auch bei *Cyclamen* bisher kein Nachweis der Enzyme des Anthocyanbiosynthesewegs bekannt. Hier soll an erster Stelle das Fehlen des Pelargonidin-Typs enzymologisch untersucht werden, denn in keiner der geprüften Linien treten Pelargonidinderivate auf. Auch auf der Ebene der Proanthocyanidine sind nur Derivate von Procyanidin und Prodelphinidin nachweisbar. Möglicherweise akzeptiert die DFR – wie bei Petunien – DHK nicht als Substrat.

Anschließend soll die Musterbildung in den Blütenblattspreite und Basalfleck (Auge) untersucht werden. Da das *Auge* und die *Spreite* oft unterschiedliche Anthocyane und andere Flavonoide enthalten, muss eine gewebespezifische Expression einiger Flavonoenzyme vorliegen, wobei der Aktivität der DFR, der F3`H und der F3`5`H offenbar eine entscheidende Rolle zukommt. Die unterschiedliche Verteilung von Flavonolen in den Blüten lässt auch auf eine Beteiligung der Flavonolsynthese (FLS) und deren gewebespezifische Expression schließen.

### **1.5.3. Enzymologie der Flavonoidbiosynthese bei *Euphorbia pulcherrima***

Auch bei *Euphorbia pulcherrima* (Weihnachtssterne) ist bisher kein Nachweis für die Enzyme der Anthocyanbiosynthese bekannt. Nach der Etablierung des erhofften Nachweises, soll die Frage aufgeklärt werden, warum in den Brakteen ausschließlich Mischungen von Pelargonidin- und Cyanidin-Derivaten gebildet werden, deren Verhältnis zueinander etwas variieren kann.

### **1.5.4. Enzymologie der Flavonoidbiosynthese bei *Anagallis***

Auch bei *Anagallis* ist bisher kein Nachweis für die Enzyme der Anthocyanbiosynthese bekannt. Nach der Etablierung des erhofften Nachweises der Enzyme der Anthocyanbiosynthese soll diese Frage der ungewöhnliche Dominanz der Pelargonidin-Synthese über die von Malvidin aufgeklärt werden. Im Vordergrund steht die Substratspezifität der CHS bzw. der DFR.



### ***1.5.5. Enzymologie der Flavonoidbiosynthese bei Papaver orientale***

Blütenblätter von *Papaver orientale* besitzen eine scharlachrote Spreite und einen dunkelroten Basalfleck. Die Entstehung dieses Farbmuster soll im Hinblick auf die Substratspezifität der Enzyme der Flavonoidbiosynthese geklärt werden.

## 2. Materialien

### 2.1. *Verwendete Chemikalien*

Acetonitril	Roth
Agar	Fluka
Ampicillin	Böhringer Mannheim
Bradford Reagenz	Sigma
BSA	Fluka
Butanol	Merck
Caffeoyl-CoA	Chemikaliensammlung des Instituts
Chloroform	Merck
DC-Dünnschichtplatten	Schleicher und Schüll
	Merck
Dihydrokämpferol	Chemikaliensammlung des Instituts
Dihydroquercetin	Roth
Dowex 1x2	Merck
EDTA	Sigma
EGME	Sigma
FeSO <sub>4</sub>	Merck
Eriodictyol	Roth
Essigsäure	Roth
Ethylacetat	Merckl
Glycerin	Merck
HCl	Roth
Hefeextrakt	Merck
HEPES	Merck
IPTG	Sigma
Isoamylalkohol	Merck
Kämpferol	Roth
Kanamycin	Gibco
2-Oxoglutarat	Sigma
Magnesium Chlorid	Merck
Malonyl-CoA	Sigma
( <sup>14</sup> C)-Malonyl-CoA	American Radiolabeled Chemicals
Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Merck
Myricetin	Roth
NADPH	Sigma
Naringenin	Roth
Natriumascorbat	Sigma
p-Cumaroyl-CoA	Chemikaliensammlung des Instituts
Polyethylenglykol	Sigma
Polyvinylpolypyrrolidon	Fluka

Quercetin	Roth
Saccharose	Merck
Sephadex G50	Pharmacia
Stickstoff (flüssig und atmosphärisch)	Linde
Tetacyclacis	Chemikaliensammlung des Instituts
Tetrahydroxychalkon	Chemikaliensammlung des Instituts
TFA	Merck
Tris	Merck
Trypsin	Sigma

## 2.2. *Verwendete Geräte*

Autoklav	Heraeus
Biofuge A	Heraeus
HPLC	Kontron Instruments - Eching
BAS 1000 Imaging Analyzer	Raytest
Inkubationsschüttler	Eppendorf
pH-Meter	Eppendorf
Rotor	Sorvall RC 5B plus
Kühlzentrifuge	Beckmann
Spektralphotometer	LKB Biochrom 4060– Pharmacia
Speed Vac	Bachofer

## 2.3. *Pflanzenmaterial*

In die Untersuchungen wurden die oben genannten Pflanzengattungen einbezogen. Der Anbau der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus und auf dem Versuchsfeld des Lehrstuhls. Für die Inhaltsstoffanalyse wurden im allgemeinen Blüten verwendet, die sich in einer späten Entwicklungsphase befinden. Dagegen wurden für die enzymologischen Untersuchungen Knospen und Blüten verwendet, die sich in früheren Entwicklungsstadien befanden.

Alle Pflanzen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, standen bei optimaler Temperatur an Tropfbewässerung zusammen im Gewächshaus des Versuchsbetriebs in Dürnast.

Aufgrund langjähriger Kreuzungsexperimente am Lehrstuhl standen von einigen Pflanzengattungen definierte Genotypen zur Verfügung.

### 2.3.1. *Rosa-Hybriden*

Alle Rosensorten, die in dieser Arbeit verwendet wurden, stammten von der Firma Kordes – Hamburg und wurden im Versuchsbetrieb des Lehrstuhls kultiviert bzw. weiterkultiviert.

### 2.3.2. *Cyclamen persicum*



**Abb. 14:** Cyclamen in verschiedenen Mustern und Farben.

Die gelben Cyclamen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, stammten von der Firma Sahin (Holland), alle anderen Cyclamenlinien aus dem Zuchtmaterial des Lehrstuhls.

### 2.3.3. *Euphorbia pulcherrima* (Weihnachtssterne)



**Abb. 15:** Weihnachtsstern, mit roten Brakteen.

Alle Weihnachtssterne, die in dieser Arbeit verwendet wurden, stammten von der Firma Fischer – Hillscheid und wurden im Versuchsbetrieb des Lehrstuhls kultiviert bzw. weiterkultiviert.

### 2.3.4. *Anagallis*



**Abb. 16:** Anagallispflanzen.

Die zwei Pflanzen der blauen Sorte *Anagallis monelli* 'Sky Lover' und der orangen Sorte *Anagallis tenella* 'Sunrise' wurden von der Firma Westhoff – Südlohn-Oeding freundlicherweise zur Verfügung gestellt und im Versuchsbetrieb des Lehrstuhls weiterkultiviert.

### 2.3.5. *Papaver orientale* (Mohn)



**Abb. 17:** *Papaver orientale*. Außen: scharlachorange. Innen: dunkel-rot.

Die die in dieser Arbeit verwendete Mohnblüten, wurden auf einem nahgelegenen Feld gepflückt und bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  schockgefroren.

## 3. Methoden

### 3.1. *Inhaltsstoffanalyse*

Die Inhaltsstoffanalyse und Identifizierung der in den Petalen enthaltenen Flavonoide wurde unter Anwendung von Standardmethoden durchgeführt (60,61).

#### 3.1.1. *Gewinnung des Rohextrakts*

Zur Herstellung von anthocyanfreien Extrakten (Zwischenprodukte), wurden Petalen (junge Knospen und Blüten) im Verhältnis von 1:40 (g/ml) in Ethylacetat überführt und anschließend bei 4 °C im Dunkeln für mindestens 24 h extrahiert.

Zur Herstellung von anthocyanhaltigen Extrakten wurden Petalen (voll aufgeblühte Blüten) im Verhältnis von 1:40 (g/ml) in 1%iger Methanol/HCl überführt und anschließend bei 4 °C im Dunkeln für mindestens 24 h extrahiert.

Die gewonnene Extrakte können eventuell, um klaren Überstand zu erhalten, kurz zentrifugiert und anschließend hydrolysiert oder direkt chromatographiert werden.

#### 3.1.2. *Hydrolyse der glykosidischen Inhaltsstoffe*

Der klare Überstand der Rohextrakte wurde einer sauren Hydrolyse unterzogen. Im Verhältnis von 1:1 wurden 200 µl Rohextrakt mit 200 µl 2N HCl gemischt und für 15 min (Zwischenprodukte) oder für 1 h (Anthocyane) bei 95 °C inkubiert.

Die Zwischenprodukte wurden mit 200 µl EtOAc extrahiert. Anthocyanidine (Aglyca = zuckerfrei) wurden mit 3 Tropfen *iso*-Amylalkohol extrahiert, wenn Phasentrennung nicht erkennbar war, wurde wenig Wasser dazugegeben und entweder direkt auf Dünnschichtplatten aufgetragen und chromatographiert oder bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

### 3.1.3. Chromatographie

#### 3.1.3.1. HPLC

Die HPLC wurde in dieser Arbeit ausschließlich benutzt, um die Anthocyantypen einer Vielzahl von Rosensorten zu identifizieren. Dazu wurden die methanolischen Extrakte der Blüten eingeeengt und jeweils in 100 µl reinem MeOH wiederaufgenommen. 20 µl wurden mit Hilfe einer Säule (CC 125/4 Nucleosil 100-5 C18, Firma Macherey-Nagel, Düren) in der HPLC (Kontron Instruments, Eching) analysiert. Als Elutionssystem diente **A**: 10 % Acetonitril, 0,2 % TFA in H<sub>2</sub>O bidest. und **B**: 25 % Acetonitril, 20 % Essigsäure in H<sub>2</sub>O bidest. Anhand der Retentionszeiten der entsprechenden Vergleichsubstanzen wurden die Art und Menge der vorhandenen Anthocyane mit der Software (KromaSystem 2000, Version 1.30) ausgewertet.

#### 3.1.3.2. Dünnschichtchromatographie

Die Chromatographie erfolgte auf vorgefertigten Cellulose-Dünnschicht-Platten (Firma Merck bzw. Schleicher und Schüll). Folgende Laufmittel wurden eingesetzt:

BAW:	<i>n</i> -Butanol : Essigsäure : H <sub>2</sub> O	(6:1:2)
CAW:	Chloroform : Essigsäure : H <sub>2</sub> O	(50:45:5)
15 % HOAc:	Essigsäure : H <sub>2</sub> O	(15:85)
30 % HOAc:	Essigsäure : H <sub>2</sub> O	(30:70)
Forestal:	Essigsäure : HCl : H <sub>2</sub> O	(30:3:10)

Die durchschnittliche R<sub>f</sub>-Werte der für diese Arbeit relevanten Flavonoide in verschiedenen Laufmitteln sind in der Tabelle 1 dargestellt:

Substanz	BAW	CAW	15 % HOAc	30 % HOAc	Forestal
Nar	92	90	41	61	91
Eri	87	67	35	54	81
PHF	-	29	-	48	74
DHK	90	73	59	70	86
DHQ	85	33	56	67	79
DHM	-	11	-	62	71
Km	87	64	06	-	-
Qu	75	30	03	08	41
LPg	-	18	-	-	-
LCy	-	5	-	-	-
Pg	-	-	-	-	20
Cy	-	-	-	-	11

**Tab. 1:** R<sub>f</sub>-Werte (x 100) der Flavonoide in verschiedenen Laufmitteln auf DC-Platten.



## 3.2. Synthese der ( $^{14}\text{C}$ )-markierten Substrate

Die Synthese von radioaktiv markierten Substraten erfolgte enzymatisch mit Hilfe von Enzympräparationen aus CHS bzw. FHT Klon in *E. coli*. Die Klone wurden kultiviert und zur Expression der jeweiligen Enzyme induziert und anschließend ihre Zellwände aufgeschlossen. Die frisch aufgeschlossenen Zellen dienten als Enzymquelle für CHS bzw. FHT bei den Synthesen von ( $^{14}\text{C}$ )-markierten Substraten Naringenin, Eriodictyol, Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin. Ca. 24 bis 42 Enzymansätze wurden in der Regel parallel durchgeführt, um genügende Mengen an Substrate als Vorrat für die enzymologischen Arbeiten herzustellen.

### 3.2.1. Gewinnung von Enzymextrakten

#### 3.2.1.1. Zusammensetzung des Expressionsmediums

10 g Trypsin, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl wurden in einem Liter Wasser gelöst. Nach Zugabe von 4 ml 50 %igem Glycerin und 1 ml 1 mol  $\text{MgSO}_4$  wurde der pH mit KOH auf 7,5 eingestellt und die Lösung 30 min bei 121 °C im Autoklav sterilisiert. Zu der abgekühlten Nährlösung wurden 10 mg Ampicillin und 205 mg Kanamycin zugegeben. Das fertige Medium war im Kühlschrank ca. eine Woche haltbar.

#### 3.2.1.2. Enzymexpression in *E. coli* - Kulturen

3 ml Expressionsmedium wurden mit 300  $\mu\text{l}$  Stammkultur beimpft und über Nacht in Epprovetten am Inkubationsschüttler bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 ml Expressionsmedium in einem 300 ml Erlenmyerkolben mit 1 ml der Übernachtskultur beimpft und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert bis die Extinktion bei 600 nm den Wert von 0,5 erreicht hatte. Anschließend wurde dem Medium 1mmol IPTG zugegeben und die Temperatur auf 28 °C abgesenkt. Nach 3 Stunden wurde wiederum die Extinktion bei 600 nm gemessen. Wenn die OD den Wert 1 erreicht hat, wurden die Zellen geerntet und in Eppendorfreaktionsgefäßen portioniert. Die Zellen wurden entweder sofort zur weiteren Bearbeitung verwendet oder mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt. Die Zellen waren dort mehrere Monate haltbar.

### 3.2.1.3. *Aufschließen der Zellen*

Jeweils 1 OD Bakteriensediment wurden in 80 µl 0,2 mol Tris-HCl Puffer + 1 mmol EDTA, pH 6,5 im Eppendorfreaktionsgefäß suspendiert, 10 µg Lysozym gelöst in 10 µl H<sub>2</sub>O dazugegeben und 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Dabei wurde der Ansatz alle 5 min gut durchgeschüttelt. Anschließend wurde das Gemisch 10 min bei 4 °C und 10 000 x g zentrifugiert. Der Überstand enthielt nun den Enzymextrakt. Dieser kann direkt zur Synthese verwendet werden oder nach Zusatz von 10 %igem Glycerin mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt werden. Die Enzymextrakte sind so für mehrere Monate haltbar.

### 3.2.2. *Enzymatische Synthese der Substrate*

Enzymatische Synthesen von Naringenin, Eriodictyol, Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin wurden regelmäßig durchgeführt, um die nötigen (<sup>14</sup>C)-markierten Substrate für die enzymologischen Arbeiten bereitzustellen.

#### 3.2.2.1. (<sup>14</sup>C)-Naringenin-Synthese

Der Enzymansatz enthielt in einem Volumen von 200 µl:

- 5 µl (<sup>14</sup>C)-Malonyl-CoA (2,4 nmol; 110 000 dpm oder 1850 Bq, gemischt 1:1 mit 2,4 nmol kaltem Malonyl-CoA)
- 5 µl p-Cumaroyl-CoA (1 nmol)
- 5 µl CHI-Enzymextrakt (aus Petersilie Zellkultur)
- 75 µl CHS Enzymextrakt
- 110 µl 0,1 mol KPi pH 7,5

Das Reaktionsgemisch wurde kurz zentrifugiert, 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend zweimal mit je 200 µl Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum eingeeengt. Um die Ausbeute an Naringenin zu quantifizieren, wurden 5, 10 und 15 µl mit den Referenzsubstanzen auf einer Dünnschicht-Celluloseplatte aufgetragen. Nach Entwicklung in CAW wurde die Platte unter dem Abzug über Nacht bis zur vollständigen Trockene stehen gelassen. Zum Exponieren der Radioaktivität diente die FujiX BAS Imaging Platte. Nach ca. 1 Stunde wurde die Platte mit Hilfe vom BAS 1000 Imaging Analyser gelesen und mit dem gelieferten Tina Programm ausgewertet.

### 3.2.2.2. ( $^{14}\text{C}$ )-Eriodictyol-Synthese

Der Enzymansatz enthielt in einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$ :

- 5  $\mu\text{l}$  ( $^{14}\text{C}$ )-Malonyl-CoA (2,4 nmol; 110 000 dpm oder 1850 Bq, gemischt 1:1 mit 2,4 nmol kaltem Malonyl-CoA)
- 5  $\mu\text{l}$  Caffeooyl-CoA (1 nmol)
- 5  $\mu\text{l}$  CHI-Enzymextrakt (aus Petersilie Zellkultur)
- 75  $\mu\text{l}$  CHS Enzymextrakt
- 110  $\mu\text{l}$  0,1 mol KPi, pH 6,0

Das Reaktionsgemisch wurde kurz zentrifugiert, 60 min bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend zweimal mit je 200  $\mu\text{l}$  Ethylacetat extrahiert. Die weitere Bearbeitung erfolgte wie unter Abschnitt 3.2.2.1. beschrieben.

### 3.2.2.3. ( $^{14}\text{C}$ )-Dihydrokämpferol Synthese

Der Enzymansatz enthielt in einem Volumen von 150  $\mu\text{l}$ :

- 3,64 nmol ( $^{14}\text{C}$ )-Naringenin (10 000 dpm oder 168 Bq)
- 10  $\mu\text{l}$  FHT Enzymextrakt
- 10  $\mu\text{l}$   $\text{FeSO}_4$  (10 nmol)
- 10  $\mu\text{l}$  Na-Ascorbat (1 nmol)
- 10  $\mu\text{l}$  2-Oxoglutarat (50 nmol)
- 100  $\mu\text{l}$  0,1 mol Tris-HCl, pH 7,5

Das in Ethylacetat gelöste ( $^{14}\text{C}$ )-Naringenin wurde in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und in einem Vakuumexsikkator bis zur Trockene eingedampft. Anschließend wurde das Substrat in der oben genannten Menge von Tris-HCl aufgenommen, die restliche Komponente des Enzymtestansatzes dazugegeben und anschließend kurz zentrifugiert. Das Reaktionsgemisch wurde bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach 20 min wurden 10  $\mu\text{l}$  2-Oxoglutarat dazugegeben und weiter bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach weiteren 40 min wurde das gebildete Dihydrokämpferol zweimal mit je 200  $\mu\text{l}$  Ethylacetat extrahiert. Die weitere Bearbeitung erfolgte wie unter Abschnitt 3.2.2.1. beschrieben.

### 3.2.2.4. ( $^{14}\text{C}$ )-Dihydroquercetin-Synthese

Der Enzymansatz enthielt in einem Volumen von 150  $\mu\text{l}$ :

- 3,64 nmol ( $^{14}\text{C}$ )-Eriodictyol (10 000 dpm oder 168 Bq)
- 10  $\mu\text{l}$  FHT Enzymextrakt
- 10  $\mu\text{l}$   $\text{FeSO}_4$  (10 nmol)
- 10  $\mu\text{l}$  Na-Ascorbat (1 nmol)
- 10  $\mu\text{l}$  2-Oxoglutarat (50 nmol)
- 100  $\mu\text{l}$  0,1 mol Tris-HCl, pH 7,0

Das in Ethylacetat gelöste ( $^{14}\text{C}$ )-Eriodictyol wurde in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und in einem Vakuumexsikkator bis zur Trockene eingedampft. Anschließend wurde das Substrat in der oben genannten Menge von Tris-Puffer aufgenommen, die restliche Komponente des Enzymtestansatzes dazugegeben, und anschließend kurz zentrifugiert. Das Reaktionsgemisch wurde bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach 20 min wurden 10  $\mu\text{l}$  2-Oxoglutarat dazugegeben und weiter bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach weiteren 40 min wurde das gebildete Dihydroquercetin zweimal mit je 200  $\mu\text{l}$  Ethylacetat extrahiert. Die weitere Bearbeitung erfolgte wie unter Abschnitt 3.2.2.1. beschrieben.

## 3.3. Enzympräparationen

Zunächst musste geprüft werden, inwieweit die an unserem Lehrstuhl etablierten Extraktionsmethoden auf das hier verwendete Pflanzenmaterial übertragbar sind. Zudem erforderte die Vielfältigkeit der Pflanzen, die sich sowohl in ihrem physiologischen Verhalten als auch der Qualität und Quantität ihrer phenolischen Inhaltsstoffe erheblich voneinander unterscheiden, einen für jede Pflanze individuell erstellten Aufschluss der Enzyme. So wurden die Molarität, die Menge und Art des Puffers im Verhältnis zum Petalengewicht, der Zusatz von BSA zum Extraktionspuffer, der Anteil des PVPP bzw. PEG und insbesondere die Menge des Ionenaustauschers Dowex 1x2 (200 - 400 mesh) zur Entfernung der phenolischen und niedermolekularen Inhaltsstoffe jeweils Individuell angepasst.

Alle Schritte der Präparation erfolgten bei 4  $^{\circ}\text{C}$ . Zur Präparation des Rohextraktes wurden frische oder, wo dies möglich war, in flüssigem Stickstoff eingefrorene Petalen verwendet. Im folgenden werden alle Aufarbeitungsmethoden beschrieben, die zur Aufbereitung von Enzymextrakten aller untersuchten Pflanzen verwendet worden sind.

### ***3.3.1. Präparation des Rohextraktes (Methode A)***

Zur Gewinnung des Rohextrakts wurden Petalen mit Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) im Verhältnis von 1:1 mit flüssigem Stickstoff in vorgekühltem Mörser homogenisiert. Anschließend wurde das pulverförmige Homogenat mit der 10 fachen Menge an Extraktionspuffer (0,1 mol KPi pH 7,5 + 1,5 % PEG 1500 + 10 % Saccharose + 100 mmol Na-Ascorbat) gemischt. Das Homogenat wurde in Corex Röhrchen überführt und 20 min in Sorvall Rotor bei 4 °C und 10 000 x g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in einem Falconröhrchen mit der gleichen Menge wie das Ausgangsmaterial der Blüten an Dowex 1x2 15 min auf Eis langsam gerührt und anschließend 5 min bei 4 °C und 10 000 x g zentrifugiert. Der resultierende Überstand diente in der Regel als Enzymquelle.

### ***3.3.2. Präparation des Rohextraktes (Methode B)***

In vorgekühltem Mörser wurden 1 g Petalen mit 1 g PVPP in 10 ml Extraktionspuffer (0,1 mol KPi pH 7,5 + 1,5 % PEG + 13 % Saccharose + 25 mmol CaCl<sub>2</sub> + 200 mmol Na-Ascorbat + 50 mmol Cystein + 0,1 % Dieca + 5 mmol EDTA + 0,5 mmol BSA) homogenisiert. Dem Homogenat wurde 1 g Dowex 1x2 zugegeben und 10 min auf Eis langsam gerührt. Anschließend wurde das Homogenat in Corex Röhrchen überführt und 20 min bei 4 °C und 10 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Glaswolle filtriert und in Eppendorfgefäßen portioniert. Der klare Überstand diente als Enzymquelle und wurde entweder direkt zur enzymologischen Untersuchung verwendet oder bei -70 °C aufbewahrt.

### ***3.3.3. Präparation des Rohextraktes (Methode C)***

Zur Gewinnung des Rohextrakts wurden 1 g Petalen + 1 g PVPP + 1 g Dowex 1x2 in flüssigem Stickstoff in vorgekühltem Mörser zerkleinert und anschließend mit 10 ml Extraktionspuffer (0,1 mol Tris-HCl pH 7,0 + 1,5 % PEG + 10 Saccharose + 25 mmol CaCl<sub>2</sub> + 200 mmol Na-Ascorbat) homogenisiert. Das Homogenat wurde dann auf Eis 10 min vorsichtig gerührt und durch Mullbinde in Corex Röhrchen überführt und anschließend 20 min bei 4 °C und 10 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals kurz zentrifugiert, in kleinen Eppendorfreaktionsgefäßen portioniert und entweder direkt verwendet oder bei -70 °C schockgefroren.

### 3.3.4. *Präparation des Rohextraktes (Methode D)*

In einem vorgekühlten Mörser wurden die Blüten mit Quarzsand, Dowex 1x2 und Puffer in den folgenden Mengenverhältnissen homogenisiert:

- 1 g Blüten
- 0,5 g Quarzsand
- 0,5 g Dowex 1x2 (mesh size 200-400; equilibriert in 0,1 mol KPi pH 8,0)
- 6 ml Homogenisationspuffer (0,1 mol KPi pH 8,0 + 14 mmol  $\beta$ -Mercaptoethanol)

Das Homogenat wurde in Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Der Überstand der ersten Zentrifugation (5 min bei 10 000 x g) wurde abgehoben und nochmals zentrifugiert. Ist der Überstand noch nicht klar, schloss sich eine dritte Zentrifugation an. Der klare Überstand diente als Enzymquelle.

### 3.3.5. *Gelfiltration des Rohextraktes*

Zur Abtrennung von phenolischen Pflanzeninhaltsstoffen und anderen niedermolekularen Substanzen – was besonders für die FHT und die DFR öfter von großer Bedeutung war - wurde der Rohextrakt über Sephadex G-50 filtriert. Als Säulen dienten dabei Pasteurpipetten, die mit einem Bettvolumen von 1 ml befüllt und mit 5 ml Puffer equilibriert wurden. 450  $\mu$ l des bei der Zentrifugation gewonnenen Überstands wurde auf die Säulen aufgetragen und die Enzymfraktion mit weiteren 450  $\mu$ l Puffer eluiert. Der Puffer war den jeweiligen Erfordernissen des Enzymtests angepasst. Das Eluat wurde entweder unmittelbar nach der Gelfiltration für den Versuch eingesetzt oder sofort mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und in der Tiefkühltruhe bei  $-70$  °C gelagert.

### 3.3.6. *Mikrosomenpräparation*

Zum Nachweis der Membran-gebundenen Enzyme Flavonoid 3'- bzw. 3',5'-Hydroxylase wurde der Rohextrakt einer Mikrosomenpräparation unterzogen. Der gewonnene Überstand des Rohextrakts wurde mit einer wässrigen 1 mol  $MgCl_2$  Lösung versetzt, so dass eine Endkonzentration von 30 mmol erreicht wurde. Nach vorsichtigem Schwenken wurde die Lösung 10 min auf Eis stehen gelassen und anschließend 20 min bei 4 °C und 17 000 x g zentrifugiert. Das mikrosomale Pellet wurde zweimal vorsichtig mit 5 ml gekühltem 0,1 mol KPi Puffer gewaschen und in einem Glashomogenisator mit 4 ml 0,1 mol KPi Puffer homogenisiert. Anschließend wurde die mikrosomale Fraktion portioniert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-70$  °C in der Tiefkühltruhe gelagert.

## 3.4. Standardenzymansätze

### 3.4.1. CHS Standard Test

Der Enzymansatz enthielt in einem Volumen von 200  $\mu$ l:

- 5  $\mu$ l Malonyl-CoA (0,7 nmol, 110 000 dpm oder 1850 Bq)
- 5  $\mu$ l Cumaroyl-CoA bzw. Caffeoyl-CoA (i nmol)
- x  $\mu$ l Rohextrakt (5 - 50  $\mu$ g)
- 190 – x  $\mu$ l 0,1 mol KPi, pH 7,5 (für Cumaroyl-CoA) bzw. pH 6,0 (für Caffeoyl-CoA)

Nach dem Pipettieren aller Komponenten wurde der Enzymtest durch eine kurze Zentrifugation gestartet und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde das resultierende Flavanon mit 200  $\mu$ l EtOAc extrahiert. Die organische Phase wurde dann mit den Referenzsubstanzen auf Dünnschicht-Celluloseplatten aufgetragen. Nach Entwicklung in CAW wurde die Platte unter dem Abzug über Nacht bis zur vollständigen Trockene stehen gelassen. Zum Exponieren der Radioaktivität diente die FujiX BAS Imaging Platte. Nach ca. 1 Stunde wurde die Platte mit Hilfe vom BAS 1000 Imaging Analyser gelesen und mit dem Tina Programm ausgewertet.

### 3.4.2. CHI Standard Test

Die CHI-Aktivität wurde nach HAHLBROCK *et al.* (62) photometrisch gemessen.

Der Enzymansatz enthielt 100–200  $\mu$ l Rohextrakt bzw. 20  $\mu$ l CHI-Enzymsuspension (aus *Petersilie*-Zellkultur) und 0,1 mol KPi Puffer pH 8,0 bis zu einem Gesamtvolumen von 1,7 ml. Die Reaktion wurde mit 20  $\mu$ l Chalkonlösung (4 mg THC/ml EGME) gestartet. Die Abnahme des Chalkons wurde mit einem Spektralphotometer bei 385 nm gegen eine Referenzküvette (ohne Chalkon) aufgezeichnet. Als Maß für die Geschwindigkeit der Isomerisierung diente die Abnahme des eingesetzten Chalkon, das zum Flavanon umgesetzt wird. Um die spontane Isomerisierung auszugleichen, wurde zu jeder Versuchsreihe die Rate dieser nichtenzymatischen Isomerisierung im Puffer ohne Enzym gemessen. Aus der Differenz von Gesamtumsatz und nichtenzymatischer Reaktion wurde die Rate des enzymkatalysierten Umsatzes bestimmt. THC hat unter den gewählten Testbedingungen ein Absorptionsmaximum bei 385 nm (63).

### 3.4.3. FHT Standard-Test

Der Enzymansatz enthielt in einem Volumen von 200 µl:

- 0,3 nmol (<sup>14</sup>C)-Naringenin bzw. (<sup>14</sup>C)-Eriodictyol (5000 dpm oder 84 Bq)
- 10 µl FeSO<sub>4</sub> (10 nmol)
- 10 µl 2-Oxoglutarat (50 nmol)
- 10 µl Na-Ascorbat (1 µmol)
- x µl Rohextrakt (5 - 50 µg)
- 170-x µl 0,1 mol Tris-HCl Puffer, pH 7,0

Das in EtOAc gelöste (<sup>14</sup>C)-Naringenin bzw. (<sup>14</sup>C)-Eriodictyol wurde in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und die Lösung in einem Vakuumexsikkator bis zur Trockene eingedampft. Anschließend wurde das Substrat mit dem Puffer aufgenommen, der Rohextrakt zugegeben und die Reaktion durch Zugabe der Cofaktoren gestartet. Das Gemisch wurde 30 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde das resultierende Dihydroflavonol mit 200 µl EtOAc extrahiert. Die weitere Bearbeitung erfolgte wie unter Abschnitt 3.4.1. beschrieben.

### 3.4.4. F3`H bzw. F3`5`H Standard-Test

Der Enzymansatz enthielt in einem Volumen von 200 µl:

- 0,3 nmol (<sup>14</sup>C)-Nar bzw. (<sup>14</sup>C)-DHK (5000 dpm oder 84 Bq)
- 20 µl NADPH (0,1 mmol)
- x µl mikrosomale Fraktion (10-50 µg)
- 180-x µl 0,1 mol KPi, pH 7,5

Das in EtOAc gelöste (<sup>14</sup>C)-Naringenin bzw. (<sup>14</sup>C)-Dihydrokämpferol wurde in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und die Lösung in einem Vakuumexsikkator bis zur Trockene eingedampft. Anschließend wurde das Substrat mit dem Puffer aufgenommen, die mikrosomale Fraktion zugegeben und die Reaktion durch Zugabe der NADPH-Lösung gestartet. Das Gemisch wurde 30 min mit geöffnetem Gefäßdeckel bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde das resultierende Flavanon bzw. Dihydroflavonol mit 200 µl EtOAc extrahiert. Die weitere Bearbeitung erfolgte wie unter Abschnitt 3.4.1. beschrieben.



### 3.4.5. DFR Standard-Test

Der Enzymansatz enthielt in einem Volumen von 200 µl:

- 0,3 nmol ( $^{14}\text{C}$ )-DHK bzw. ( $^{14}\text{C}$ )-DHQ (5000 dpm oder 84 Bq)
- 20 µl NADPH (1 mmol)
- x µl Rohextrakt (10 - 50 µg)
- 180-x µl 0,1 mol KPi, pH 7,5

Das in EtOAc gelöste ( $^{14}\text{C}$ )-Dihydrokämpferol bzw. ( $^{14}\text{C}$ )-Dihydroquercetin wurde in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und die Lösung in einem Vakuumexsikkator bis zur Trockene eingedampft. Anschließend wurde das Substrat mit dem Puffer aufgenommen, der Rohextrakt zugegeben und die Reaktion durch Zugabe der NADPH-Lösung gestartet. Das Gemisch wurde 45 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde das resultierende Leukopelargonidin bzw. Leukocyanidin mit 200 µl EA extrahiert. Die weitere Bearbeitung erfolgte wie unter Abschnitt 3.4.1. beschrieben.

### 3.4.6. FLS Standard-Test

Der Enzymansatz enthielt in einem Volumen von 200 µl:

- 0,3 nmol ( $^{14}\text{C}$ )-DHK bzw. ( $^{14}\text{C}$ )-DHQ (5000 dpm oder 84 Bq)
- 10 µl  $\text{FeSO}_4$  (10 nmol)
- 10 µl 2-Oxoglutarat (50 nmol)
- 10 µl Na-Ascorbat (1 µmol)
- x µl Rohextrakt (10 - 50 µg)
- 170-x µl 0,1 mol Tris-HCl Puffer, pH 7,0

Das in EtOAc gelöste ( $^{14}\text{C}$ )-Dihydrokämpferol bzw. ( $^{14}\text{C}$ )-Dihydroquercetin wurde in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und die Lösung in einem Vakuumexsikkator bis zur Trockene eingedampft. Anschließend wurde das Substrat mit dem Puffer aufgenommen, der Rohextrakt zugegeben und die Reaktion durch Zugabe der Cofaktoren gestartet. Das Gemisch wurde 30 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde das resultierende Flavonol mit 200 µl EtOAc extrahiert. Die weitere Bearbeitung erfolgte wie unter Abschnitt 3.4.1. beschrieben.

## 3.5. Parameterabhängigkeit

Um die optimalen Testbedingungen für einige Enzyme zu ermitteln, die bei den untersuchten Pflanzen erstmalig nachgewiesen wurden, wurde die Abhängigkeit der Enzymaktivität von verschiedenen Parametern geprüft.

### 3.5.1. pH-Abhängigkeit

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde Kaliumphosphatpuffer (KPi) von pH 5,8 bis 8,0 verwendet. Die optimierten Testbedingungen setzten je nach Pflanze und Enzym einen Enzymzusatz von 10-80  $\mu\text{l}$  voraus. Dieses hätte auch bei einem Gesamtvolumen des Reaktionsgemisches von 200  $\mu\text{l}$  den pH-Wert des zu testenden Puffers verschoben. Zur Ermittlung des pH-Optimums wurden deshalb für alle Pflanzen Testbedingungen gewählt, welche eine pH-Verschiebung durch die zugegebene Enzymlösung und die Substrate bzw. die Kosubstrate ausschließen, aber dennoch einen genügend hohen Umsatz garantieren. Die Konzentration des Kaliumphosphatpuffers wurde erhöht auf 0,2 mol und die Enzymmenge wurde so klein wie möglich gehalten.

Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung des eingesetzten Puffers und die entsprechenden pH-Werte. **Puffer A** war 1 mol  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  und **Puffer B** war 1 mol  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Der resultierende Puffer wurde im Verhältnis von 1:5 mit bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt, um auf die gewünschte Konzentration von 0,2 mol zu kommen.

pH-Wert	Puffer A in ml	Puffer B in ml
5,8	4,0	46,0
6,0	6,15	43,85
6,2	9,25	40,75
6,4	13,25	36,75
6,6	18,75	31,25
6,8	24,5	25,5
7,0	30,5	19,5
7,2	36,0	14,0
7,4	40,5	9,5
7,6	43,5	6,5
7,8	45,75	4,25
8,0	47,35	2,65

**Tab. 2:** Zusammensetzung des eingesetzten Puffers und die entsprechenden pH-Werte.

### ***3.5.2. Proteinlinearität***

Für die Überprüfung der Proteinlinearität wurden Ansätze mit steigenden Mengen von 5-50 µg Rohextrakt für 30 min inkubiert, wobei das Testvolumen durch Variation der Puffermenge konstant gehalten wurde.

### ***3.5.3. Temperatur-Abhängigkeit***

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums wurde die Reaktion mit 20 µg Proteinextrakt in 0,1 mol KPi Puffer, pH 7,5 für 30 min bei verschiedenen Temperaturen zwischen 4 °C - 70 °C durchgeführt.

### ***3.5.4. Zeitlinearität***

Zur Ermittlung der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Zeit wurden Enzymansätze mit 20 µg Proteinextrakt zwischen 0 und 60 min bei 30 °C inkubiert, wobei die Ansätze mit den längeren Inkubationszeiten immer früher gestartet wurden und somit die Reaktion aller Ansätze gleichzeitig gestoppt werden konnte.

## ***3.6. Proteinbestimmung***

Der Proteingehalt der Enzymextrakte wurde nach der Methode von BRADFORD bestimmt (63). Als Standard diente Rinderserumalbumin. Die Messung erfolgte mit Hilfe vom Spektralphotometer (LKB Biochrom 4060– Pharmacia).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Rosa-Hybriden

#### 4.1.1. Untersuchung der Flavonoide der Rosen

Da in der Literatur für eine große Zahl von Rosen-Sorten genaue Angaben zu Flavonoiden fehlen, mussten eigene Recherchen durchgeführt werden, um reine Cy- bzw. reine Pg-Typen zu identifizieren. Anhand von Blütenfarben und genetischer Abstammung einiger Sorten von Rosen wurden mehr als 30 Sorten ausgewählt, die die gesuchte Voraussetzung erfüllen könnten. In der Tabelle 3 sind einige solche Sorten aufgelistet, die aufgrund ihrer Blütenfarbe und ihrer Abstammung Pelargonidin-Typen sein könnten:

Name	Farbe	Eltern
Lady Rose	Lachs (lachsrot-lachsorange)	Träumerei x Sämling
Ave Maria	Lachs (lachsorange)	Sonia Meiland x Sämling
Alexander	Rot (zinnober-lachsziegelrot)	Super Star x (Ann Elisabeth x Allgold)
Königin der Rosen	Orange (innen: lachsorange, außen: gelbrosa)	Super Star x Kordes Perfecta
Träumerei	Lachs (lachsorange-lachsrosa)	Königin der Rosen x Sämling
Patricia Hyde	Lachsrosa	Ann Elisabeth x Red Dandy
Super Star	Lachs (intensiv lachsorange)	(Gloria Dei x Sämling) x (Alpenglühen x Sämling)
Königin Beatrix	Orange (innen: lachsorange-kupfrig, außen: goldgelb)	Patricia x Sämling
Anabell	Lachs (lachsorange, Rand dunkler)	Königin der Rosen x Zorina
Marina	Orange	Königin der Rosen x Sämling

**Tab. 3:** Potentielle Pelargonidin-Typen bei Rosen.

Zur Bestimmung des Anthocyantyps wurden 4 g Blüten in 40 ml 1 %iger methanolischer Salzsäure 48 h bei 4 °C extrahiert. Die Proben wurden sowohl mit Hilfe des Spektralphotometers und der Dünnschichtchromatographie als auch mit der HPLC untersucht. Nachfolgend ist eine Tabelle mit den Angaben des Anthocyan-Verhältnisses (Cy/Pg) für eine große Zahl von Rosensorten zusammengestellt:

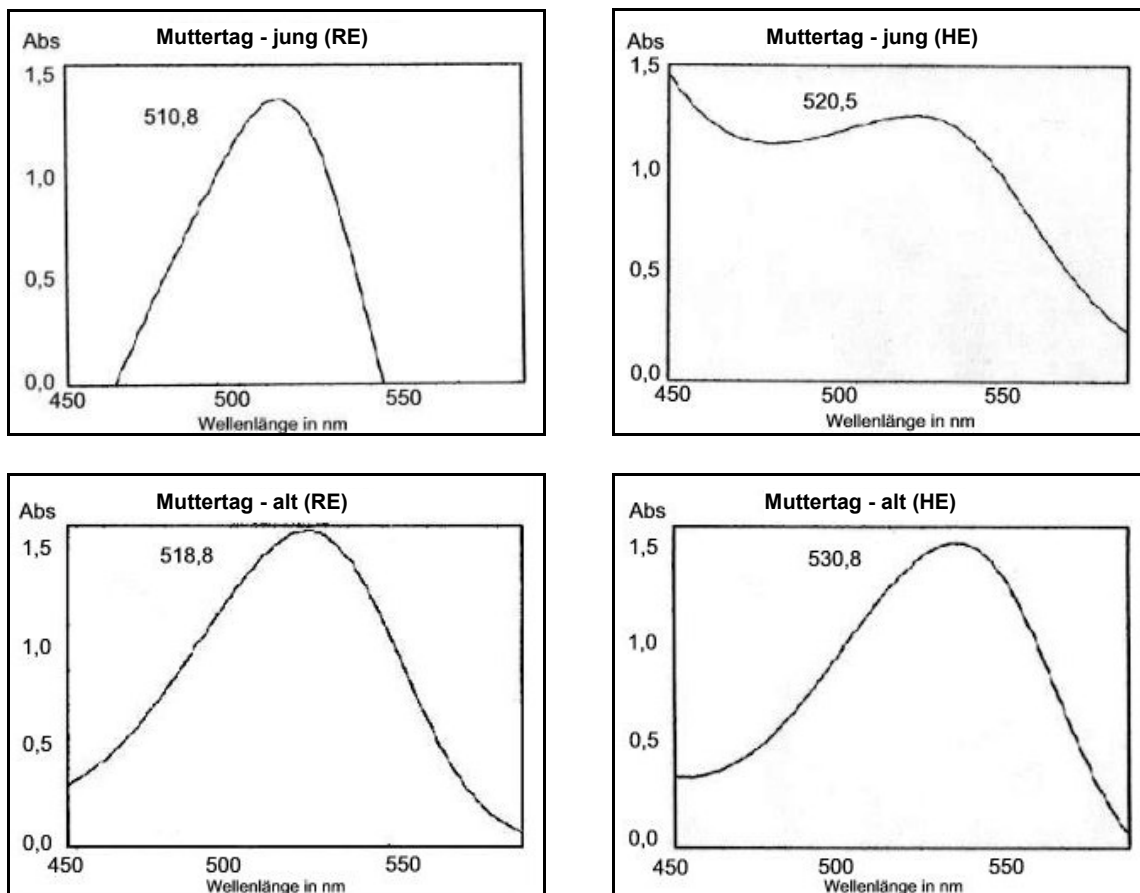
Name	% vom Gesamtgehalt		Name	% vom Gesamtgehalt	
	Cy	Pg		Cy	Pg
Domstadt Fulda	45,05	54,95	<b>Patricia Hyde</b>	<b>0</b>	<b>100</b>
Lady Rose	10,14	89,86	Kordes Sondermeldung	54,46	45,54
<b>Ave Maria</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	Baby Château	97,47	2,53
Feuerzauber	41,44	58,56	Nordlicht	56,14	43,86
Paderborn	32,12	67,88	Super Star	12,38	87,62
Kordes Brillant	23,81	76,19	Starina	26,25	73,75
Lydia	44,52	55,48	Montana	66,23	33,77
Harkness Alexander	9,73	90,27	Prominent	27,91	72,09
<b>Königin der Rosen</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	Alexandra	74,06	25,94
Träumerei	17,96	82,04	<b>Königin Beatrix</b>	<b>0</b>	<b>100</b>
Duftwolke	50,40	49,60	<b>Anabell</b>	<b>0</b>	<b>100</b>
Chorus	58,01	41,99	Marina	5,23	94,77
Uwe Seeler	38,48	61,52	Zwergenfee	52,20	47,80
Rosi Mittermaier	27,95	72,05	<b>Crimson Glory</b>	<b>100</b>	<b>0</b>
Orange Juwel	8,18	91,82	Kardinal	94,10	5,90
Freude	56,17	43,83	Muttertag	69,74	30,26

**Tab. 4:** HPLC Untersuchung der Blüteninhaltsstoffe verschiedener Rosensorten. Die Sorten mit nur einem Anthocyantyp sind Fett gedruckt.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch eine weiße Rosensorte untersucht, die keine Anthocyane bildet. Analyse der EtOAc-Blütenextrakte ergab jedoch, dass 'Reinweiß' hauptsächlich Kämpferol als Flavonoid beinhaltet. Weder Quercetin noch Dihydroquercetin wurden dabei festgestellt. Das weist darauf hin, das 'Reinweiß' ein potentieller Pelargonidin-Typ ist.

### 4.1.2. Abhängigkeit des Anthocyantyps vom Blütenstadium

'Muttertag' – eine rote Rosensorte – wird in der Literatur ebenfalls als reiner Pg-Typ beschrieben (65). Diese Sorte wurde auf Anthocyane sowohl mit der Dünnschichtchromatographie als auch mit dem Spektralphotometer untersucht. Zunächst wurden die voll aufgeblühten Blüten verwendet, um die Extrakte herzustellen. Chromatographie dieser Extrakte zeigte aber immer einen größeren Anteil an Cyanidin als Pelargonidin, was auch mit dem Spektralphotometer immer bestätigt wurde. Die HPLC-Analyse zeigte auch ein Cy:Pg Verhältnis um 70:30 (Tab. 4). Da dieser Befund mit dem in der oben genannten Publikation (65) erwähnten Angaben nicht übereinstimmte, wurde vermutet, dass 'Muttertag' ihren Anthocyantyp während ihre Blütenentwicklung eventuell von Pelargonidin zu Cyanidin verschiebt. Deshalb wurden die Art und die Menge der Anthocyane in 'Muttertag' sowohl mit jungen Knospen als auch mit voll aufgeblühten Blüten nochmals geprüft. Abbildung 18 zeigt als Ergebnis dieser Untersuchung, dass junge Knospen hauptsächlich Pg, während ältere Blüten hauptsächlich Cy als Anthocyan vorweisen. Pg und Cy haben bei den gewählten Bedingungen als Glukoside ein Absorptionsmaximum bei 509 bzw. 524 nm (RE) und als Aglyca 520 bzw. 535 nm (HE).



**Abb. 18:** Spektrum der Anthocyanextrakte bei 'Muttertag' während der Blütenentwicklung in Rohextrakten (RE) und hydrolysierter Extrakten (HE).

### 4.1.3. *Enzymologie der Flavonoidbiosynthese bei Rosen*

Im Rahmen früherer Untersuchungen zur Anthocyanbiosynthese wurde in den 80er und 90er Jahren immer wieder versucht, die wichtigsten Flavonoenzyme auch in Blütenextrakten von Rosen nachzuweisen, allerdings ohne jeden Erfolg. Die Ausgangssituation für enzymologische Arbeiten an Rosen war somit zu Beginn dieser Arbeit relativ ungewiss.

Zunächst wurde mit vielfältiger Variation der am Lehrstuhl etablierten Aufarbeitungs- und Enzymassaymethoden versucht, wenigstens einige der Flavonoenzyme bei Rosen nachzuweisen. Variationen bei den Aufarbeitungsmethoden umfassten die Verwendung von verschiedenen Blütenstadien, unterschiedliche Extraktionspuffer, variable pH-Werte des eingesetzten Puffers, variable Dowex 1x2- bzw. PVPP-Mengen und eine Reihe von stabilisierenden Zusätzen beim Aufschluss des Blütenmaterials, wie z.B. BSA,  $\beta$ -Mercaptoethanol und einige Proteaseinhibitoren. Variationen bei den Assaymethoden betrafen die Verwendung von verschiedenen Enzymtestpuffern, variablen pH-Werten des eingesetzten Puffers, verschiedenen Inkubationszeiten und Temperaturen etc. Alle Anstrengungen blieben jedoch ohne Erfolg.

Der Grund dafür stellte sich bei genaueren Analyse der Blüteninhaltsstoffe heraus. Rosenblüten weisen einen relativ hohen Gehalt an Gerbstoffen wie Gallussäure auf. Diese Stoffe bilden offenbar beim Aufschluss der Zellen mit den Proteinen Komplexe und inaktivieren damit die Enzyme.

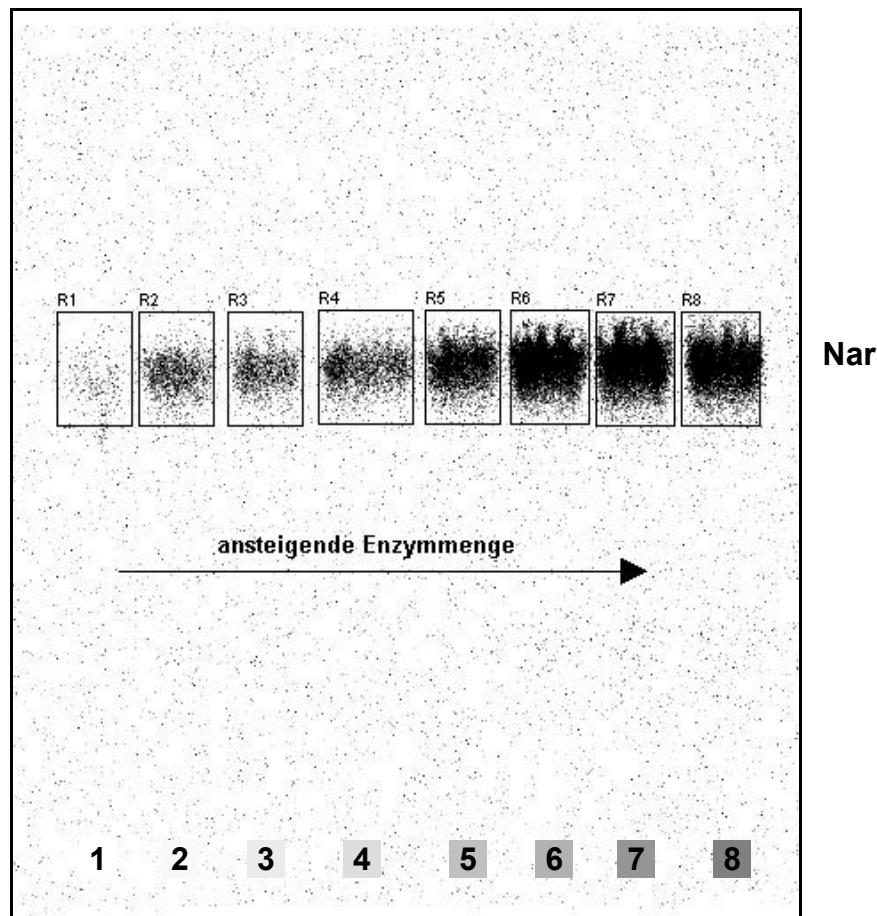
Es war deshalb eine Aufarbeitungsmethode erforderlich, die diese negative Interaktion zwischen Gerbstoffen und Proteinen minimiert bzw. verhindert. Ein Studium der einschlägigen Literatur ergab, dass in letzter Zeit geeignete Methoden zum Nachweis von Flavonoenzymen aus verschiedenen Geweben von Gehölzen mit hohem Gerbstoffgehalt entwickelt worden waren (66).

Diese Methoden basieren auf der Verwendung von Polyethylenglykol (PEG) und anderen Zusatzstoffen. Nach Anpassung an die Verhältnisse der Rose konnte mit Hilfe dieser Aufarbeitungsmethode die Aktivität der CHS, der FHT und der DFR in Blütenextrakten nachgewiesen werden. Damit waren die Voraussetzungen für weiterführende Untersuchungen geschaffen.

Im folgenden werden die Ergebnisse aller enzymologischen Analysen an den Rosen ausführlich dargestellt.

### 4.1.3.1. Nachweis der CHS

Die CHS der Rosen konnte sowohl mit der Aufarbeitungsmethode A bzw. B (siehe Methoden) extrahiert werden. Weder bei der extrahierten Proteinmenge noch bei der CHS-Aktivität konnte ein großer Unterschied der beiden Methoden festgestellt werden. Abbildung 19 zeigt ein Chromatogramm eines CHS-Tests mit p-Cumaroyl-CoA als Substrat und ansteigender Proteinmenge aus Blütenextrakten von 'Kardinal'.

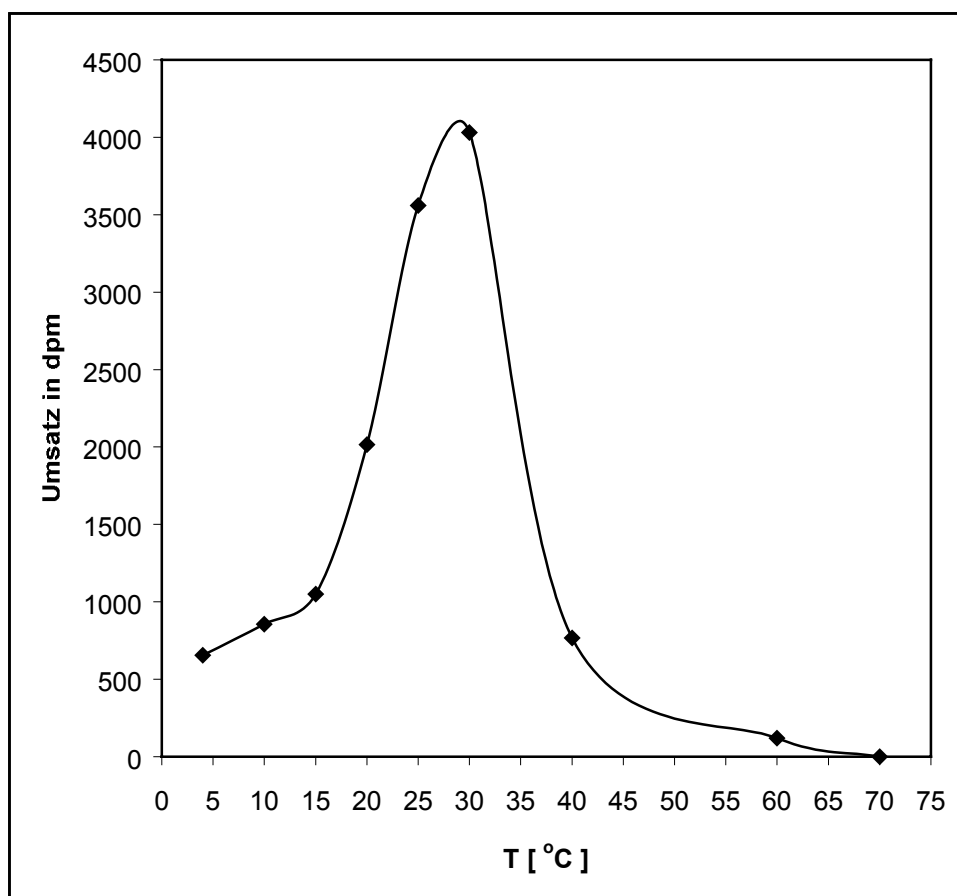


**Abb. 19:** Ein CHS-Test bei Rosen mit p-Cumaroyl-CoA als Substrat und ansteigender Proteinmenge. 1: 5 µg, 2: 10 µg, 3: 15 µg, 4: 20 µg, 5: 25 µg, 6: 30 µg, 7: 35 µg und 8: 40 µg. R1-R8: Naringenin als Produkt der CHS-Reaktion.



#### 4.1.3.2. Temperaturoptimum der CHS

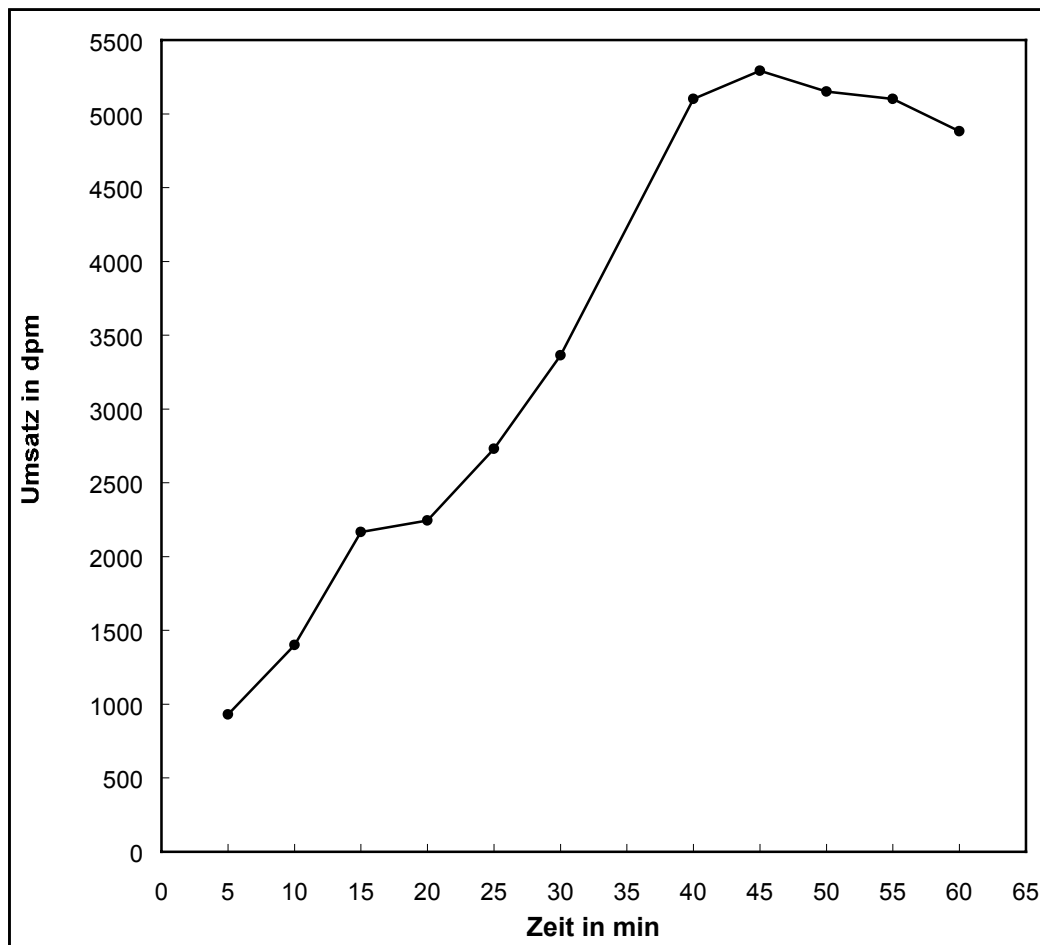
Zur Ermittlung des Temperaturoptimums der CHS-Reaktion bei Rosen wurden 20 µg Protein aus Blütenextrakten von 'Kardinal' in 0,1 mol KPi pH 7,5 mit Malonyl-CoA und p-Cumaroyl-CoA als Substrate bei Temperaturen von 4 °C bis 70 °C für 30 min inkubiert. Die höchste Enzymaktivität der CHS wurde bei 30 °C beobachtet. Es erfolgte jedoch ein rapider Abstieg der CHS-Aktivität bei höheren Temperaturen als 30 °C (Abb. 20).



**Abb. 20:** Abhängigkeit der CHS-Enzymaktivität von der Inkubationstemperatur mit p-Cumaroyl-CoA als Substrat bei Rosen.

#### 4.1.3.3. Zeitlinearität der CHS

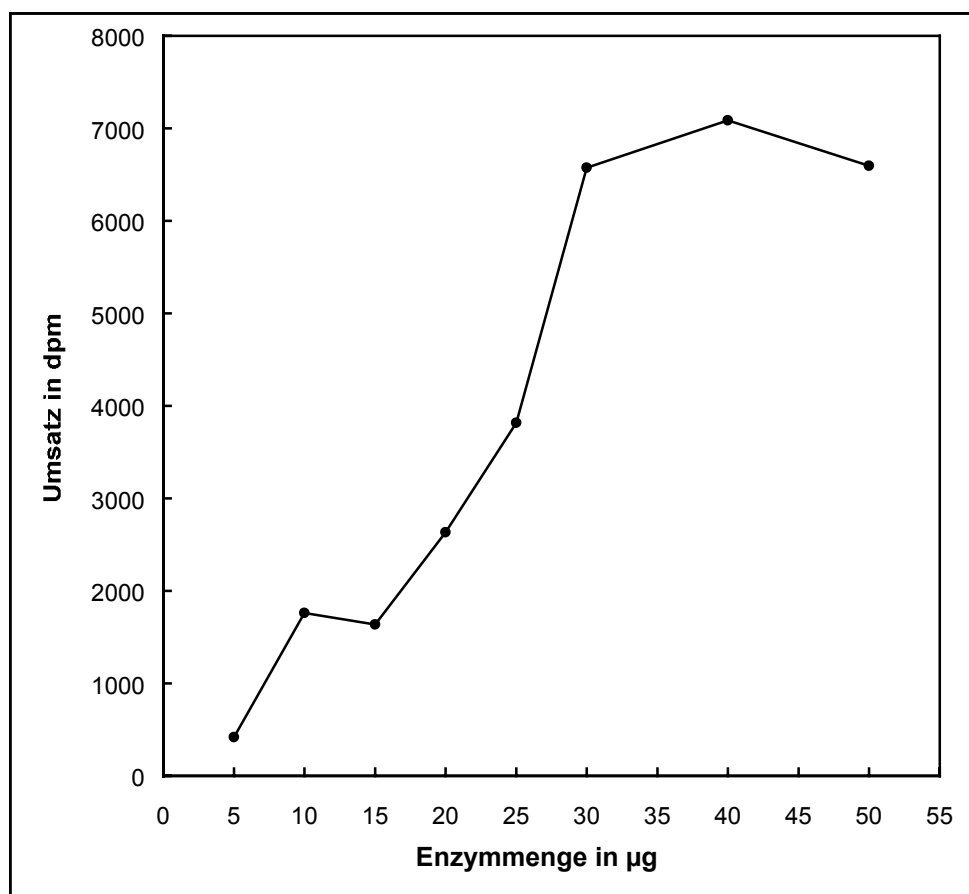
Zur Ermittlung der Linearität der CHS-Reaktion bei Rosen wurden 20 µg Proteinextrakt aus 'Kardinal' in 0,1 mol KPi pH 7,5 mit den Substraten Malonyl-CoA und p-Cumaroyl-CoA bei 30 °C inkubiert. Nach 40 min Inkubationszeit wurde kein weiterer Anstieg des Umsatzes beobachtet (Abb. 21).



**Abb. 21:** Die Abhängigkeit der CHS-Aktivität von der Reaktionszeit mit p-Cumaroyl-CoA als Substrat bei Rosen.

#### 4.1.3.4. Proteinlinearität der CHS

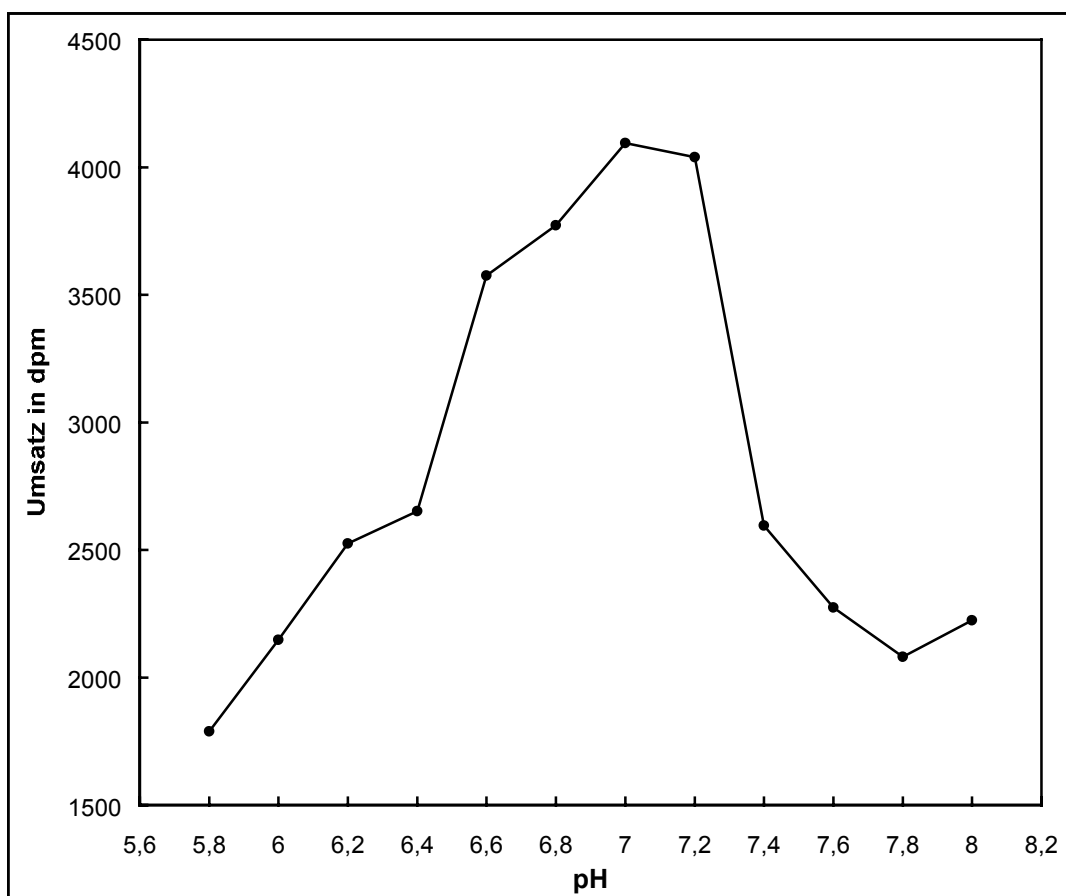
Zur Überprüfung der Linearität der CHS-Reaktion in bezug auf die Proteinmenge, wurden 5-50  $\mu\text{g}$  Proteinextrakt aus 'Kardinal' in 0,1 mol KPi pH 7,5 bei 30 °C mit den Substraten Malonyl-CoA und p-Cumaroyl-CoA für 30 min inkubiert. Die Linearität der CHS-Reaktion wurde bis ca. 30  $\mu\text{g}$  Protein beobachtet (Abb. 22). Um den Einfluss der Blütenentwicklung auszugleichen, wurde für diesen Test eine Mischung von Knospen aus mehreren Blütenstadien verwendet.



**Abb. 22:** Abhängigkeit der CHS-Aktivität von der Proteinmenge mit p-Cumaroyl-CoA als Substrat bei Rosen.

#### 4.1.3.5. pH-Abhängigkeit der CHS

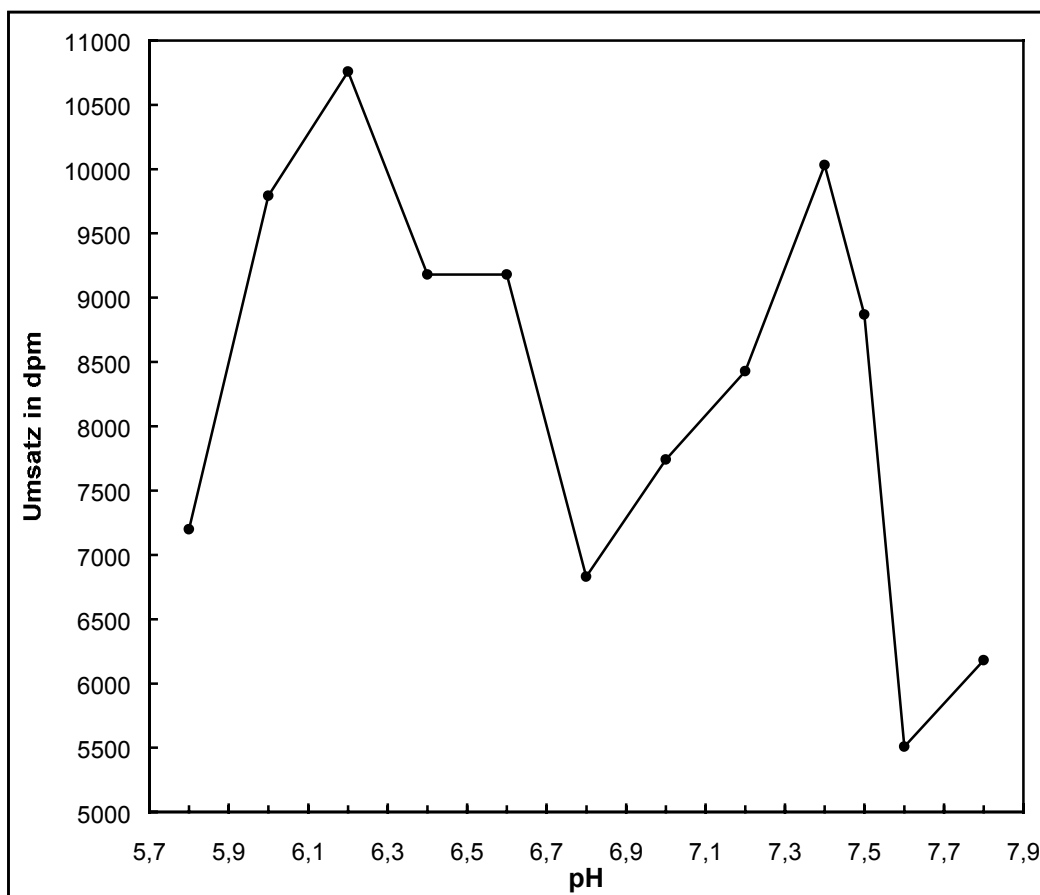
Zur Ermittlung des pH-Optimums der CHS-Reaktion bei Rosen wurden 10 µg Proteinextrakt aus 'Kardinal' in 0,2 mol KPi mit verschiedenen pH Werten (pH 5,8 bis pH 8,0) bei 30 °C für 30 min inkubiert. Ein pH-Optimum bei dem pH-Wert 7,0 wurde festgestellt (Abb. 23).



**Abb. 23:** pH-Abhängigkeit der CHS-Reaktion mit p-Cumaroyl-CoA als Substrat bei Rosen.

#### 4.1.3.6. Substratspezifität der CHS

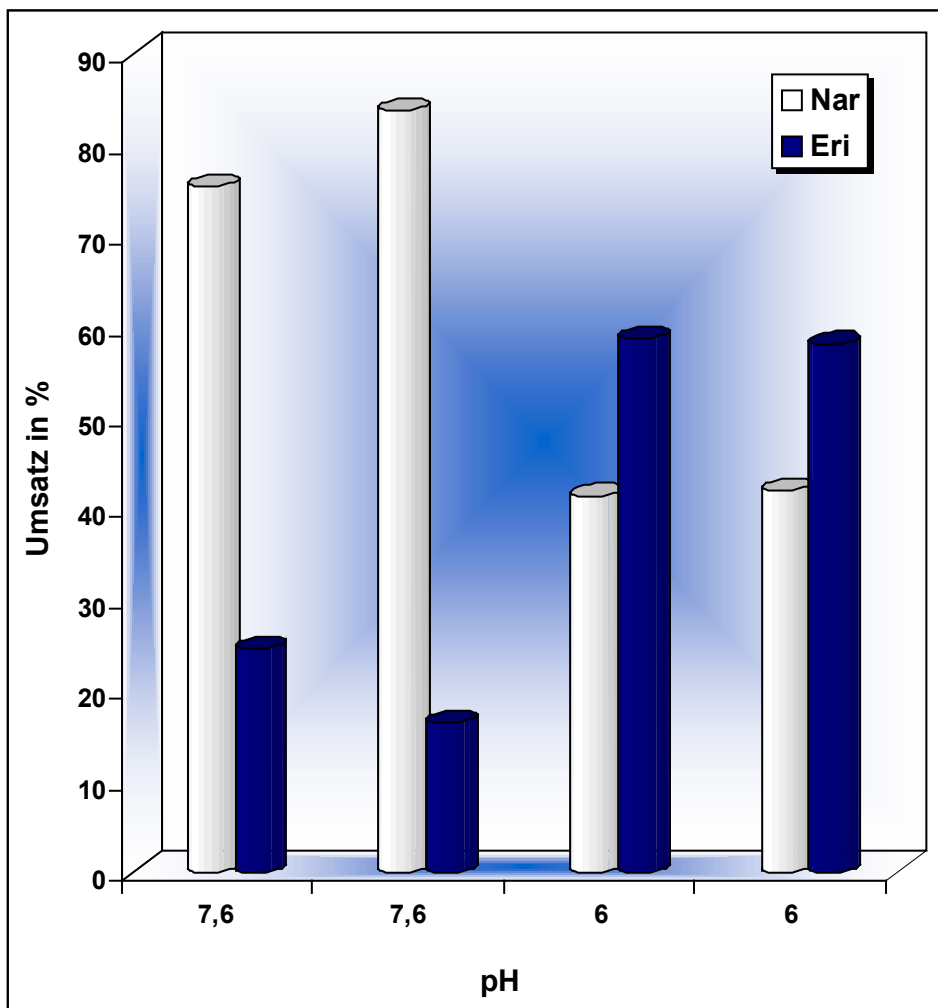
Neben p-Cumaroyl-CoA wurde auch Caffeoyl-CoA als Substrat bei verschiedenen pH-Werten geprüft. Mit Caffeoyl-CoA als Substrat wurde Eriodictyol als Produkt identifiziert. Die CHS-Reaktion mit Caffeoyl-CoA als Substrat verhielt sich relativ ungewöhnlich. Die Auswertung von mehreren Wiederholungen ergab zwei pH-Optima: Eines bei 6,2 und das andere bei 7,4 (Abb. 24). Da die Enzymansätze immer doppelt ausgeführt worden sind, kann man experimentelle Fehler ausschließen. Vorhandensein zweier pH Optima für die CHS mit Caffeoyl-CoA als Substrat könnte ein Hinweis auf die Anwesenheit zweier CHS-Enzyme bei den Rosen sein.



**Abb. 24:** pH Abhängigkeit der CHS-Reaktion mit Caffeoyl-CoA als Substrat bei Rosen.

Zur Ermittlung der Substratspezifität der CHS-Reaktion bei Rosen wurden 10 µg Proteinextrakt aus 'Kardinal' mit den Substraten p-Cumaroyl-CoA oder Caffeoyl-CoA in einem Ansatz in 0,2 mol KPi mit unterschiedlichen pH-Werten bei 30 °C für 30 min inkubiert.

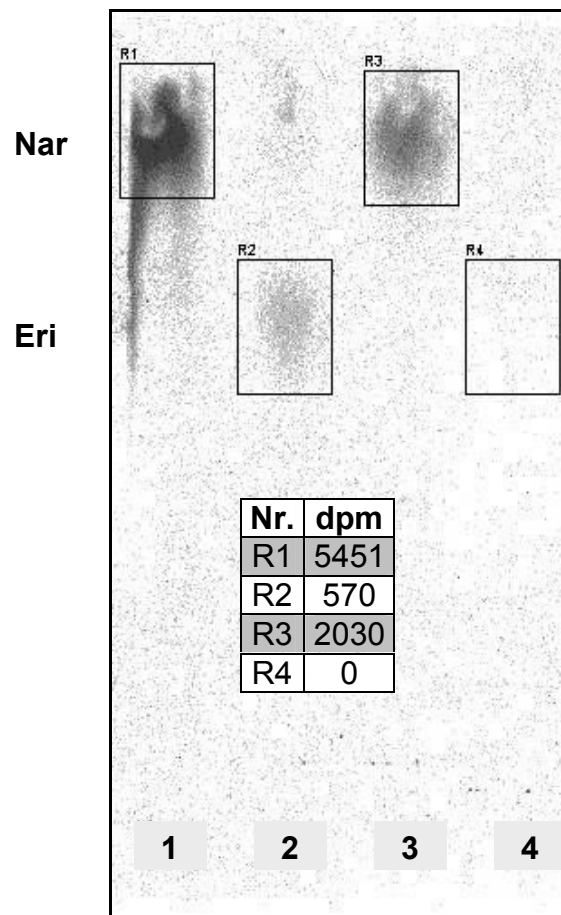
Die Substratspezifität der CHS bei Rosen zeigte ein überraschendes Ergebnis. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, akzeptiert die CHS in der Regel p-Cumaroyl-CoA als Substrat. Die Nutzung von Caffeoyl-CoA als Substrat ist bisher nur in wenigen Pflanzen dokumentiert. Die Abbildung 25 zeigt die Substratspezifität der CHS mit Proteinextrakten aus 'Kardinal' bei 2 unterschiedlichen pH Werten.



**Abb. 25:** Substratspezifität der CHS-Aktivität bei unterschiedlichen pH-Werten im Konkurrenzversuch. In Weiß: Umsatz der CHS-Reaktion mit Malonyl-CoA und p-Cumaroyl-CoA als Substrate (Nar), in Blau: Umsatz mit Malonyl-CoA und Caffeoyl-CoA als Substrate (Eri) aufgezeichnet.

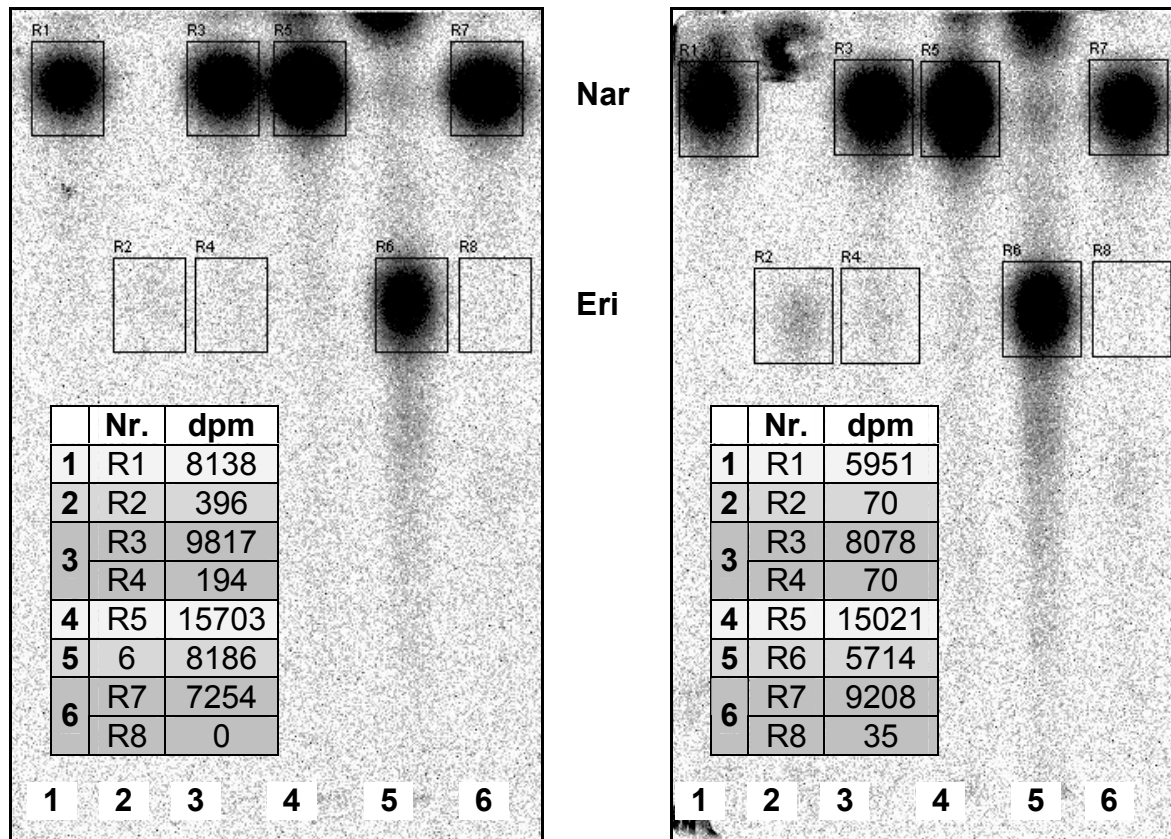
Die CHS akzeptiert bei höheren pH-Werten immer mehr p-Cumaroyl-CoA als Caffeoyl-CoA, bei niedrigeren pH-Werten immer mehr Caffeoyl-CoA als p-Cumaroyl-CoA als Substrat.

Im Vergleich zwischen der rot-gefärbten 'Kardinal' und der Sorte 'Reinweiß', zeigte die CHS der beiden Linien unterschiedliche Substratspezifität. Während die CHS von 'Kardinal' p-Cumaroyl-CoA und Caffeooyl-CoA als Substrate akzeptiert, wird von der CHS aus 'Reinweiß' nur p-Cumaroyl-CoA umgesetzt (Abb. 26).



**Abb. 26:** CHS-Test mit der rot-gefärbten 'Kardinal' (1 und 2) und 'Reinweiß' (3 und 4). Mit p-Cumaroyl-CoA (1 und 3) bzw. Caffeooyl-CoA (2 und 4) als Substrate. R1,R3: Naringenin und R2,R4: Eriodictyol als Produkt der CHS-Reaktionen.

Es wurde auch ein Vergleich der Substratspezifität der CHS-Aktivität zwischen 'Königin der Rosen' – einem reinen Pg-Typ – und 'Crimson Glory' – einem reinen Cy-Typ durchgeführt. Abbildung 27 zeigt ein Chromatogramm dieser Enzymtests. Während bei 'Crimson Glory', die CHS bei pH 6,0 und auch bei pH 7,5 des eingesetzten Enzymtestpuffers sowohl p-Cumaroyl-CoA als auch Caffeooyl-CoA als Substrate akzeptiert, setzt sie kaum Caffeooyl-CoA bei 'Königin der Rosen' in Eriodictyol um. Im Konkurrenzversuch wurde bei 'Crimson Glory' und zwar bei den beiden pH-Werten - Spur 6 - keine Caffeooyl-CoA genutzt.



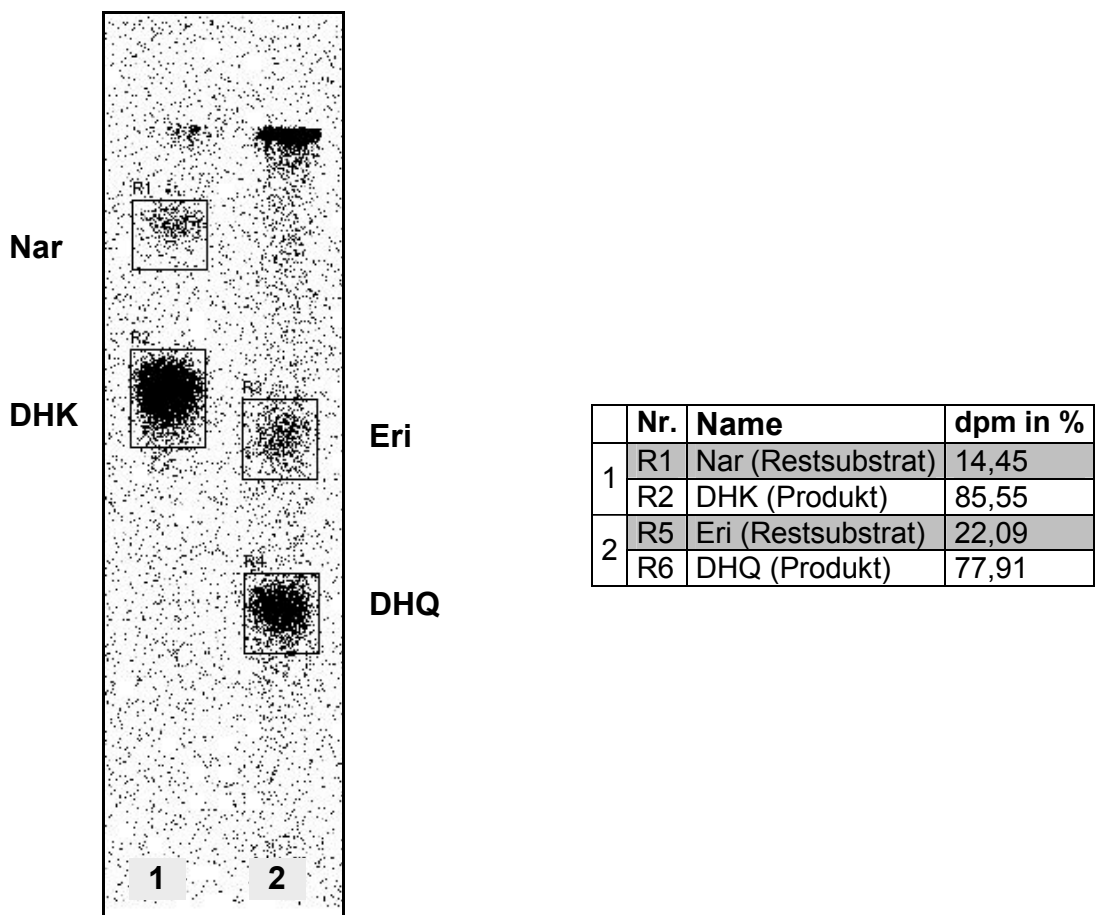
**Abb. 27:** CHS-Reaktion im Vergleich zwischen 'Königin der Rosen' (1-3) und 'Crimson Glory' (4-6). 1,4 mit ausschließlich p-Cumaroyl-CoA, 2,5 mit ausschließlich Caffeooyl-CoA und 3,6 mit beiden Substraten. Das linke Chromatogramm zeigt einen Test mit pH 6,0 und das rechte mit pH 7,5.



#### 4.1.3.7. Nachweis und Substratspezifität der FHT

Die FHT der Rosen wurde sowohl mit der Aufarbeitungsmethode A als auch mit der Aufarbeitungsmethode C erfolgreich nachgewiesen. Allerdings war die FHT-Enzymaktivität im Test leicht höher, wenn die Blütenextrakte mit der Aufarbeitungsmethode C gewonnen wurden. Es erfolgte auch eine Gelfiltration des Rohextraktes durch Sephadex G-50 um die Niedermolekularen Substanzen zu entfernen. Zum Nachweis der FHT-Aktivität wurden 20 µg Proteinextrakt aus 'Kardinal' mit Naringenin bzw. Eriodictyol und den Cofaktoren  $F^{2+}$ , Na-Ascorbat und 2-Oxoglutarat in 0,1 mol Tris-HCl Puffer pH 7,0 bei 25 °C für 30 min inkubiert.

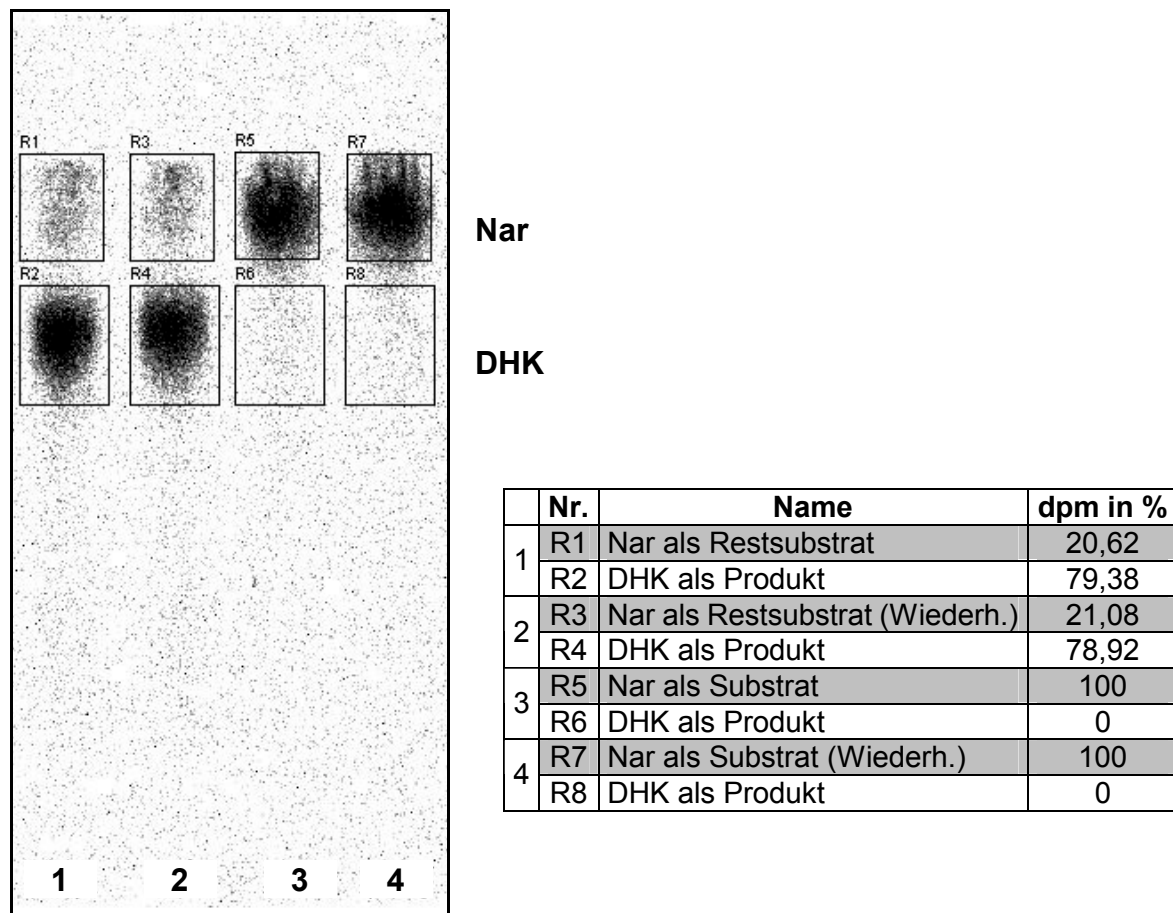
Die FHT bei den Rosen akzeptiert sowohl Naringenin als auch Eriodictyol als Substrate und setzt diese zu den entsprechenden Dihydroflavonolen, Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin, um (Abb. 28).



**Abb. 28:** FHT-Reaktion mit Naringenin (1) und Eriodictyol (2) als Substrate bei Rosen. R1: Naringenin (Restsubstrat), R2: Dihydrokämpferol als Produkt, R3: Eriodictyol (Restsubstrat) und R4: Dihydroquercetin als Produkt.

#### 4.1.3.8. 2-Oxoglutarat-Abhängigkeit der FHT-Aktivität

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die FHT ein 2-Oxoglutarat-abhängiges Enzym. Daher wird sie durch den spezifischen Inhibitor Prohexadion-Ca competitiv gehemmt. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit dem Kosubstrat 2-Oxoglutarat, bindet Prohexadion-Ca an die Bindungsstelle des ursprünglichen Kosubstrats. Das führt dazu, dass die FHT nicht mehr aktiv ist. Abbildung 29 zeigt ein FHT-Test (in 2 facher Wiederholung). 20 µg Proteinextrakt aus 'Kardinal' wurden mit Naringenin als Substrat und den Cofaktoren bzw. mit dem Inhibitor Prohexadion-Ca und den Cofaktoren in 0,1 mol Tris-HCl Puffer pH 7,0 für 30 min bei 25 °C inkubiert. Die Hemmung durch den spezifischen Inhibitor Prohexadion-Ca ist in Abbildung 29 dargestellt.

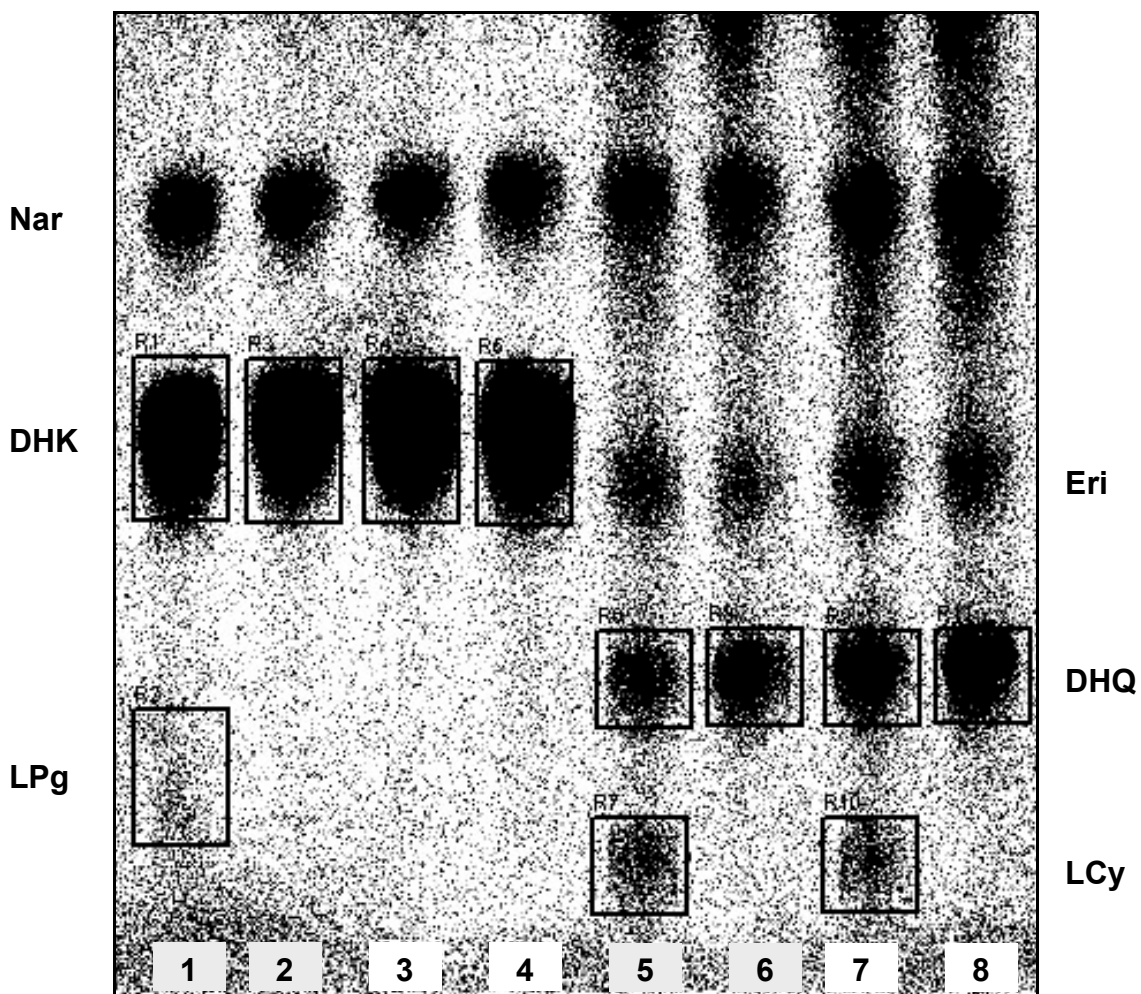


**Abb. 29:** FHT-Doppeltest bei Rosen. 1,2: mit Naringenin als Substrat und allen Cofaktoren. 3,4: wie 1 und 2, jedoch zusätzlich mit dem Enzyminhibitor Prohexadion-Ca in einer Konzentration von 1 mmol im Test. R1,R3,R5 und R7: Naringenin als Restsubstrat bzw. Substrat, R2,R4: Dihydrokämpferol, R6,R8: Kein DHK-Synthese bei Zugabe des Inhibitors.

#### 4.1.3.9. Nachweis und Substratspezifität der DFR

Die DFR der Rosen war ausschließlich mit der Aufarbeitungsmethode A nachweisbar. Eine Gelfiltration durch Sephadex G-50 war auch eine Voraussetzung für einen erfolgreichen Nachweis der DFR-Aktivität. Dazu wurden 30 µg Proteinextrakt mit dem jeweiligen Substrat und 1 mmol NADPH als Cofaktor in 0,1 mol KPi Puffer pH 7,5 für 45 min bei 30 °C inkubiert.

Die DFR der Rosen spielt anscheinend wie die CHS eine wichtige Rolle bei der Entscheidung, welcher Anthocyantyp in Erscheinung treten wird. Deshalb wurden 2 Rosensorten ausgewählt, mit denen ein DFR-Test gleicher Bedingungen ausgeführt wurde, um zu sehen, wie sich die DFR in dem jeweiligen Typ verhält. 'Crimson Glory' enthält 100 % Cy und 'Königin der Rosen' enthält 100 % Pg. Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse dieses Tests. Während die DFR von 'Königin der Rosen' beide Substrate umsetzen kann, wird nur DHQ durch die DFR von 'Crimson Glory' als Substrat akzeptiert.

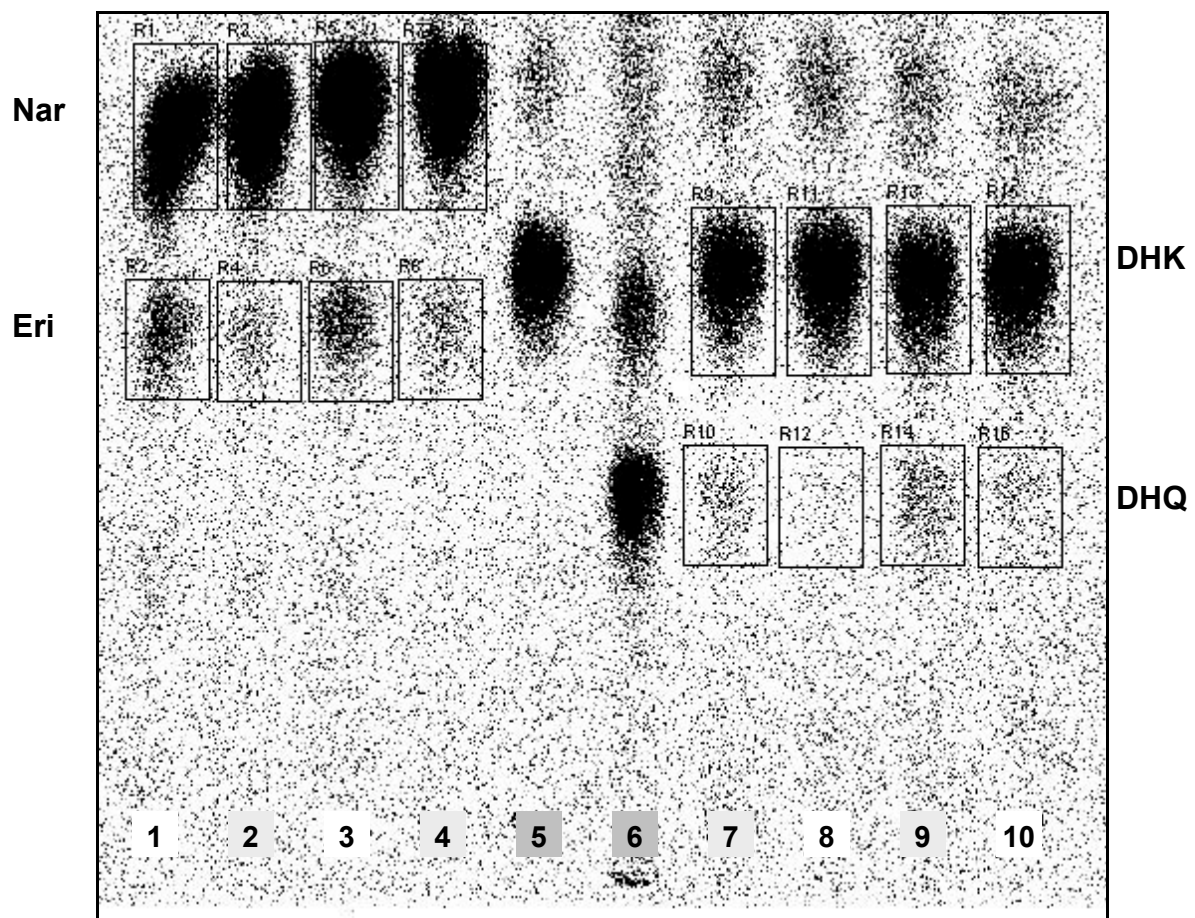


**Abb. 30:** Chromatogramm eines DFR-Tests mit 'Königin der Rosen' (1,2 und 5,6) und 'Crimson Glory' (3,4 und 7,8). Mit DHK (1-4) bzw. DHQ (5-8) als Substrat. 1,3,5,7: mit NADPH als Cofaktor. 2,4,6,8: ohne NADPH. Nar und Eri sind Restsubstrate aus den DHK- bzw. DHQ-Synthesen



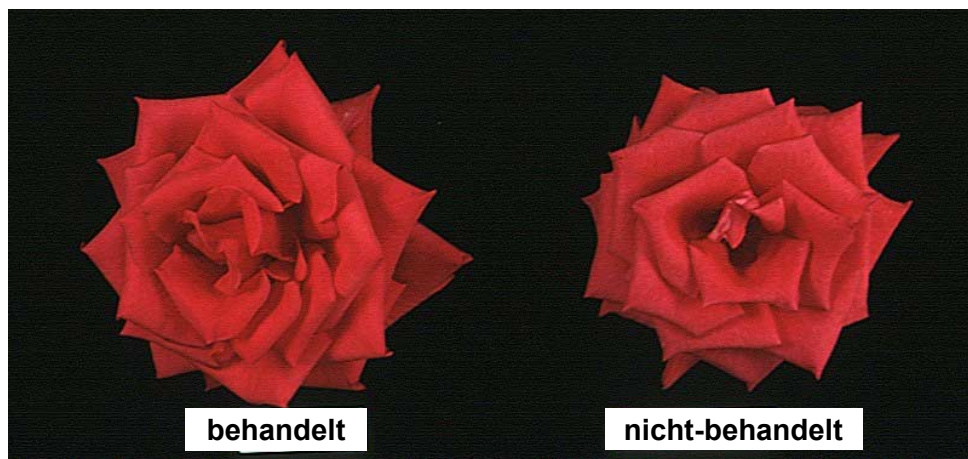
### 4.1.3.10. Die F3`H bei Rosen

F3`H der Rosen war mit keiner Extraktionsmethode nachzuweisen. Auch die verschiedensten Variationen der Enzymtestbedingungen führten zu keinem Nachweis der F3`H-Aktivität bei Rosen. Weder in reinen Cy-Typen oder in reinen Pg-Typen noch in Mischtypen konnte dieses Enzym nachgewiesen werden. Es wurde vermutet, dass die Rosen zwar F3`H-Aktivität haben können, jedoch das Enzym unter einer intrazellulärer Hemmung vorliegt. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde ein Test durchgeführt, bei dem die Wirkung der Rosenextrakte auf die aktive F3`H der Cyclamen geprüft wurde. Die Abbildung 31 zeigt einen F3`H-Test mit 20 µg Proteinextrakt aus der Cyclamenlinie 21, einmal ohne und einmal mit 20 µg Proteinextrakt aus der Rosensorte Kardinal mit Nar bzw. DHK als Substrate und 0,1 mmol NADPH in 0,1 mol KPi Puffer, pH 7,5, für 45 min bei 30 °C. Dieser Test zeigt eine Hemmung der F3`H-Aktivität bei Cyclamen von 50 % durch den Zusatz von Rosenextrakt. Da die Enzymsätze doppelt durchgeführt wurden, kann man experimentelle Fehler ausschließen.



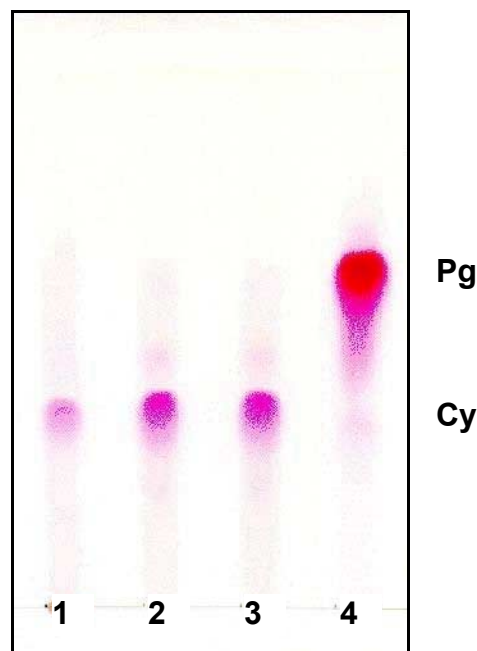
**Abb. 31:** Ein F3`H-Doppeltest mit Nar (1-4) und DHK (7-10) als Substrate. 1,3 und 7,9: mit nur Cyclamenextrakt. 2,4 und 8,10: Extraktmischung aus Rosen und Cyclamen. 5,6: DHK bzw. DHQ als Vergleichsubstanzen. 1,3 und 2,4 bzw. 7,9 und 8,10 sind jeweils Wiederholungen des gleichen Tests.

Um die Anwesenheit einer F3`H-Aktivität jedoch wenigstens indirekt nachzuweisen, wurden Blüten von 'Crimson Glory' - einem reinen Cyanidin-Typ – mit Tetcyclacis besprüht. Tetcyclacis ist ein spezifischer Inhibitor für die F3`H. Blüten von 'Crimson Glory', die noch geschlossen waren, wurden mit 1 mmol Tetcyclacis-Lösung 5 mal im Abstand von 2 Tagen besprüht. Nach Aufblühen der behandelten und nicht-behandelten Blüten wurden sie geschnitten, fotografiert und die Inhaltsstoffe der beiden extrahiert und chromatographiert.



**Abb. 32:** 'Crimson Glory'. Links ist die mit Tetcyclacis behandelte voll aufgeblühte Blüte. Rechts ist die Kontrolle.

Abbildung 32 zeigt ein Photo der beiden Blüten. Vom optischen her merkt man keine Farbverschiebung zwischen der behandelten und der nicht-behandelten Blüten. Dies wurde durch die Chromatographie der hydrolysierten Anthocyanextrakte bestätigt (Abb. 33).



**Abb. 33:** Chromatographie der Inhaltsstoffe der beiden Blüten in Abb. 31. 1,4: Cy bzw. Pg als Vergleichsubstanze. 2: die mit Tetcyclacis behandelte 'Crimson Glory'. 3: die Kontrolle.

## 4.2. *Cyclamen persicum*

### 4.2.1. *Untersuchung der Flavonoide der Cyclamen*

Die Flavonoide der Cyclamen wurden in einer Diplomarbeit am Lehrstuhl ausführlich analysiert (67). Aus diesem Sortiment wurden in der vorliegenden Arbeit die folgenden Linien bearbeitet (Tab. 5). Zusätzlich wurde eine gelbe Cyclamensorte einbezogen (24).

Bezeichnung	Blütenfarbe	Inhaltsstoffe
<b>4</b>	Hellrosa mit Auge	Cy (2), Dp (1), Mv (2)
<b>5</b>	Violett mit Auge	Pn (2), Dp (1), Mv (1)
<b>12</b>	Reinweiß	LCy (2), LDp (1)
<b>16</b>	Weiß mit Auge	Mv (2)
<b>21</b>	Rot mit Auge	Cy (3), Pn (5), Mv (3)
<b>25</b>	Reinweiß	LDp (2)
<b>Winter Sun</b>	Gelb	Isosalipurposid

**Tab. 5:** Flavonoide der in der vorliegenden Arbeit verwendete Cyclamenlinien. 1: in Spuren, 2: schwach, 3: mittel, 4: stark und 5: sehr stark auf der Chromatographie Platten sichtbar.

### 4.2.2. *Enzymologie der Flavonoidbiosynthese*

Wie bei den Rosen ist bisher ebenso bei Cyclamen kein Nachweis der Enzyme des Anthocyanbiosynthesewegs bekannt. Auch bei Cyclamen gab es zunächst erhebliche Schwierigkeiten beim Nachweis der Flavonoidenzyme in Blütenextrakten. Mit den für vielen Pflanzenarten etablierten und als bestens geeignet befundenen Präparationsmethoden war es nicht möglich, auch nur eines der Enzyme nachzuweisen.

Erst die inzwischen für Rosen ausgearbeitete Enzympräparation führte zum Erfolg. Mit dieser Aufarbeitungsmethode konnten die löslichen Enzyme CHS, CHI, FHT, DFR und FLS sowie die membrangebundenen Cytochrom P450-Enzyme F3`H und F3`5`H nachgewiesen und zum Teil näher charakterisiert werden.

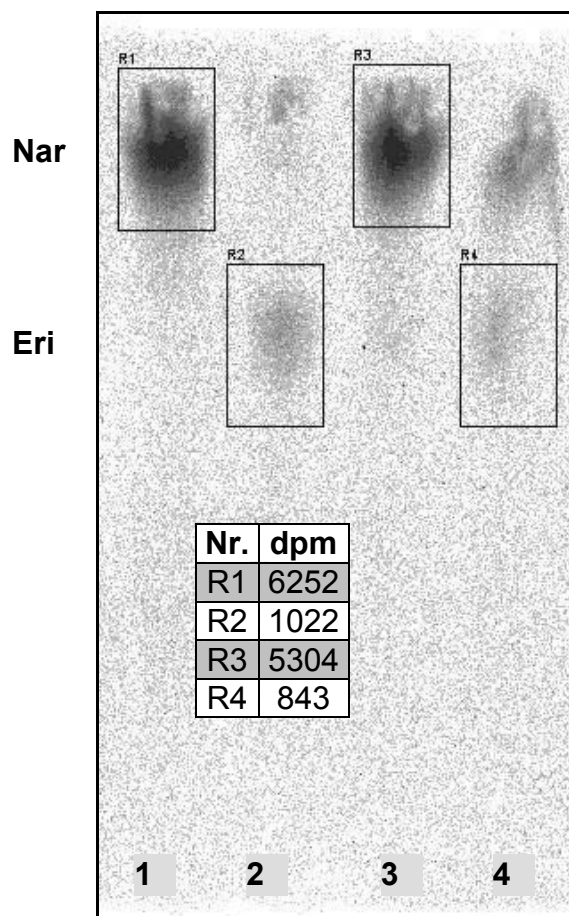
Im folgenden sind die Nachweise der Flavonoidenzyme und die nähere Charakterisierung der einzelnen Schritte des Biosynthesewegs bei Cyclamen ausführlich dargestellt.



### 4.2.2.1. Nachweis, Substratspezifität und pH-Abhängigkeit der CHS

Die CHS der Cyclamen konnte mit Aufarbeitungsmethode A bzw. B, nicht aber mit Aufarbeitungsmethode C bzw. D nachgewiesen werden. PEG scheint für einen erfolgreichen Nachweis absolut notwendig zu sein. Außerdem scheint KPi der optimale Extraktionspuffer für die CHS zu sein. In einem Vergleich zwischen verschiedenen Puffern, war die Aktivität der CHS am höchsten, wenn KPi als Extraktionspuffer eingesetzt wurde. Die CHS war auch in fast allen Knospenstadien aktiv. Deshalb wurde in der Regel zum Nachweis der CHS-Aktivität eine Mischung von Knospen aus verschiedenen Entwicklungsstadien verwendet.

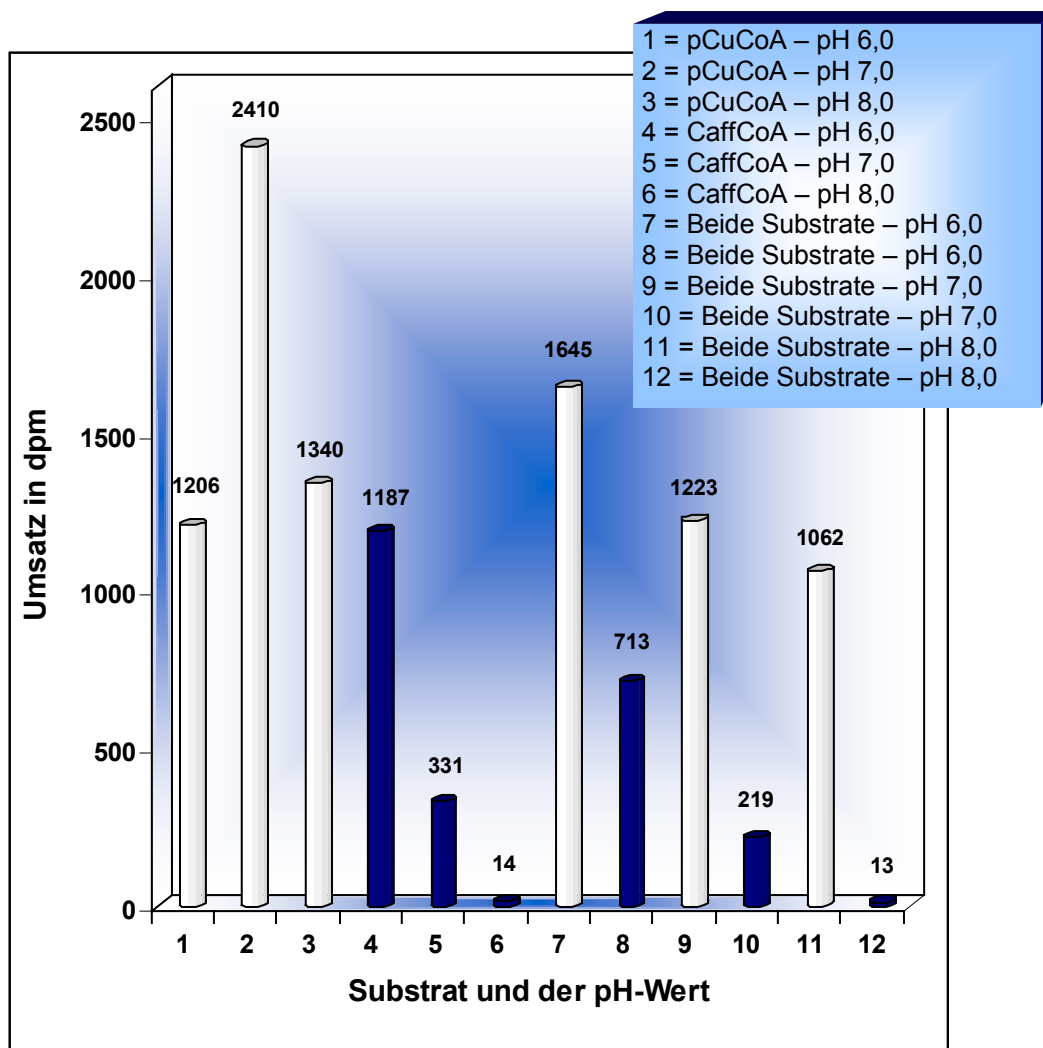
Zum Nachweis der CHS-Aktivität wurden 20 µg Proteinextrakt aus der rot gefärbten Blüten der Linie 21 bzw. der weiß gefärbten Blüten der Linie 12 in 0,1 mol KPi pH 7,5 mit p-Cumaroyl-CoA bzw. Caffeoyl-CoA bei 30 °C für 30 min inkubiert. Wie das Chromatogramm in Abbildung 34 zeigt, akzeptiert die CHS bei beiden Linien sowohl p-Cumaroyl-CoA als auch Caffeoyl-CoA als Substrate.



**Abb. 34:** CHS-Enzymreaktion mit Extrakten aus der Cyclamenlinie 21 (1,2) und der Cyclamenlinie 12 (3,4) mit p-Cumaroyl-CoA (1,3) und Caffeoyl-CoA (2,4) als Substrat.

Die CHS der Cyclamen akzeptiert p-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA. Jedoch wird immer p-Cumaroyl-CoA unabhängig vom pH-Wert des eingesetzten Enzymtestpuffers bevorzugt. Im Unterschied zu den Rosen, wurde bei niedrigen pH-Werten auch keine Bevorzugung von Caffeoyl-CoA beobachtet.

Die ersten 6 Säulen in der Abbildung 35 zeigen die Aktivität der CHS, wenn sie nur mit einem Substrat inkubiert wurde. Die letzten 6 Säulen zeigen die Aktivität, wenn die CHS mit beiden Substraten – p-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA - in einem Ansatz inkubiert wurde.

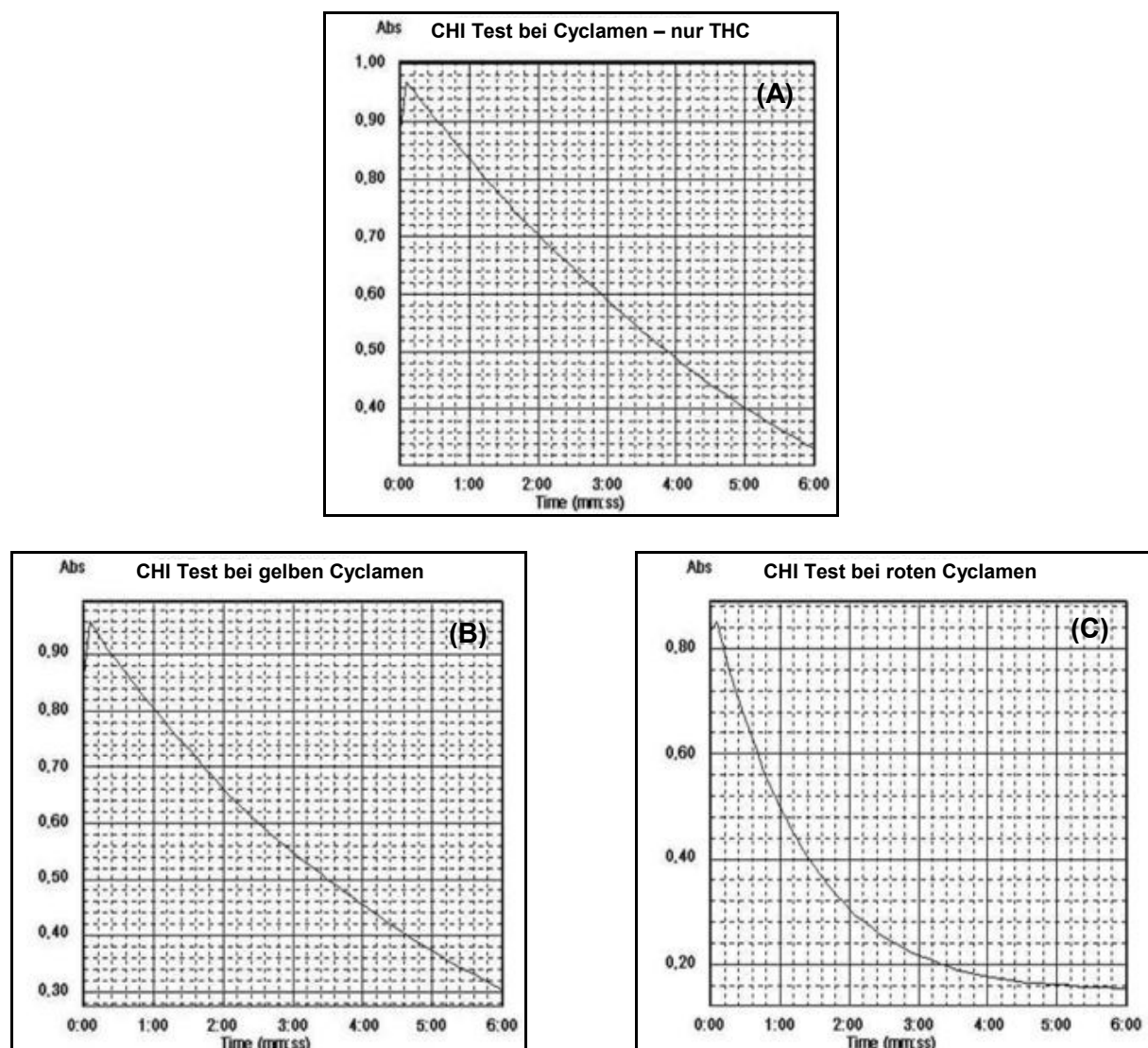


**Abb. 35:** Die pH-Abhängigkeit der Substratspezifität der CHS bei Cyclamen. In Weiß ist die Bildung von Naringenin und in Blau ist die Bildung von Eriodictyol dargestellt.



#### 4.2.2.2. Die gelben Cyclamen und der potentielle CHI Block

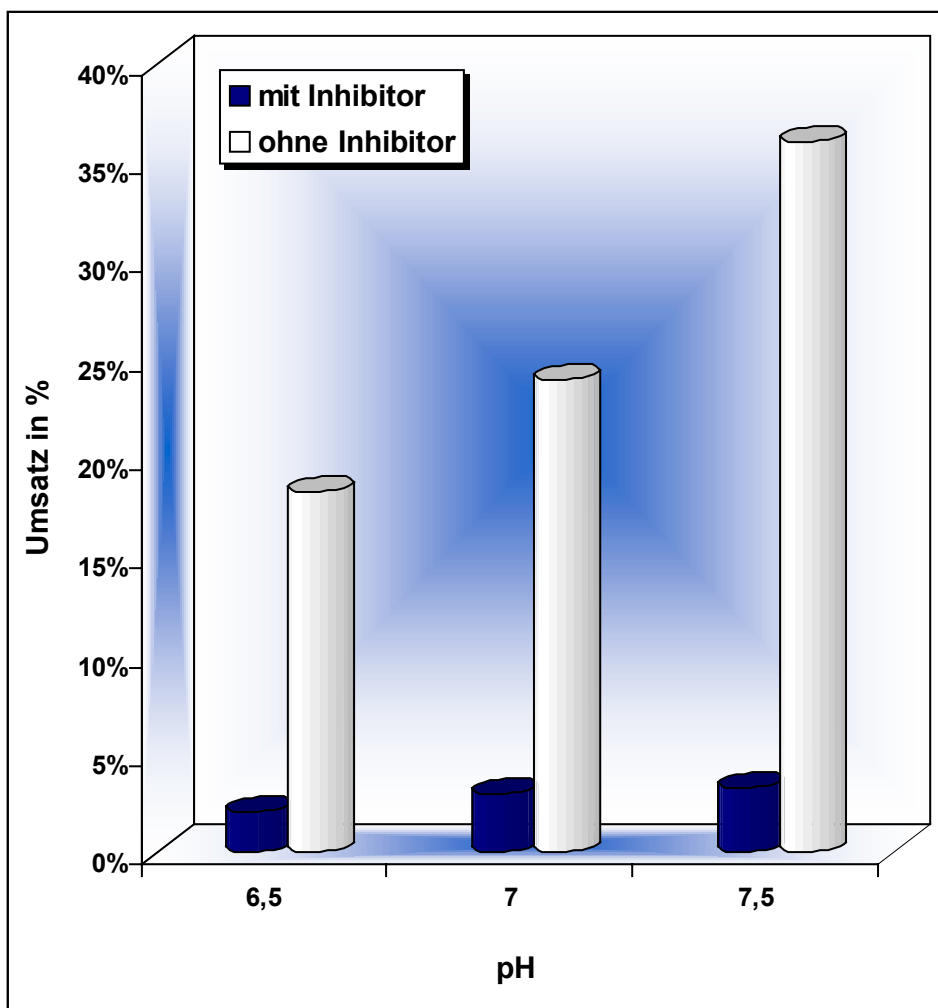
Die gelb-blühenden Cyclamen reichern in den Blüten Naringeninchalkon-2`-Glukosid (Isosalipurposid) an. Diese Anreicherung ist höchstwahrscheinlich auf einen Ausfall der CHI-Aktivität zurückzuführen. Bisher ist es aber nicht gelungen, diese Tatsache enzymologisch nachzuweisen. Abbildung 36 zeigt den Nachweis der CHI-Aktivität in roten Cyclamen (C) und den Ausfall der CHI-Aktivität bei den gelben Cyclamen (B). Proteinextrakte wurden aus Blüten der gelben und der roten Linien mit Aufarbeitungsmethode A gewonnen. Der CHI Enzymtest wurde wie in der Literatur (26) durchgeführt. Die CHS, die FHT und die DFR der gelben Cyclamen wurden nachgewiesen.



**Abb. 36:** CHI-Reaktion bei gelben Cyclamen. (A) zeigt die spontane (nicht-enzymatische) Isomerisierung von Tetrahydrochalkon (THC) zu Naringenin. Extrakte gelber Cyclamen (B) zeigen ein identisches Verhalten wie bei der spontanen Isomerisierung. Proteinextrakte aus der roten Linie 21 (C) weisen deutliche CHI-Aktivität auf.

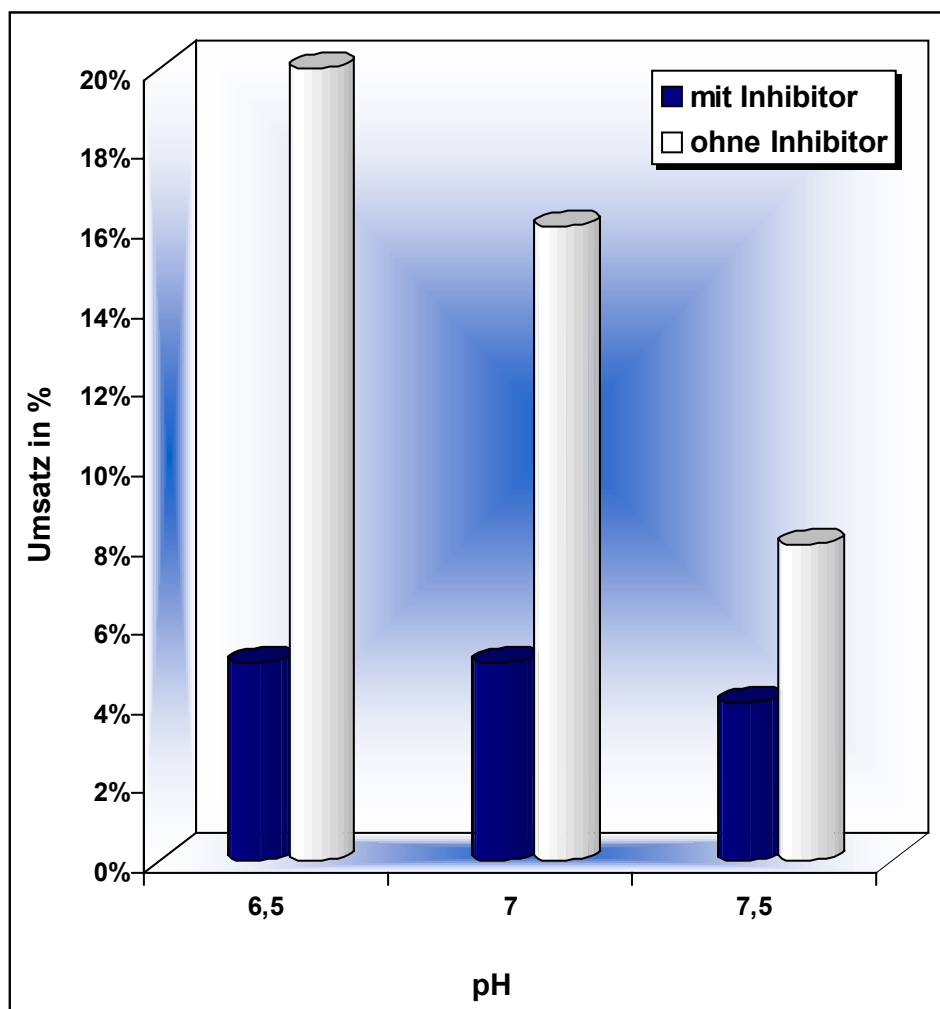
### 4.2.2.3. Nachweis, Substratspezifität und pH-Abhängigkeit der FHT

FHT der Cyclamen wurde sowohl mit Aufarbeitungsmethode A bzw. C nachgewiesen. Eine Gelfiltration des Rohextraktes durch Sephadex G-50 ist insofern wichtig, damit die niedermolekularen Verbindungen und Substanzen entfernt werden können. So zeigte sich z.B. FHT-Aktivität in einem Test mit Proteinextrakten, die nicht einer Gelfiltration unterzogen worden waren, auch wenn keine Kosubstrate im Test zugegeben wurden. Für eine quantitative Analyse scheint also eine Gelfiltration im Falle der FHT notwendig zu sein. Die FHT von Cyclamen akzeptiert sowohl Naringenin als auch Eriodictyol als Substrate und setzt diese zu Dihydrokämpferol bzw. Dihydroquercetin um. In Abbildung 37 bzw. 38 ist die Auswertung von Enzymtests mit 20 µg Proteinextrakt aus Blüten der roten Cyclamenlinie 21 dargestellt. Es wurde festgestellt, dass die Substratspezifität vom pH-Wert des Enzymansatzes abhängt. Ferner wurde die Abhängigkeit der FHT-Aktivität von 2-Oxoglutarat durch den spezifischen Inhibitor Prohexadion-Ca gezeigt.



**Abb. 37:** FHT-Test mit Naringenin als Substrat mit verschiedenen pH-Werten. Mit und ohne Prohexadion-Ca.

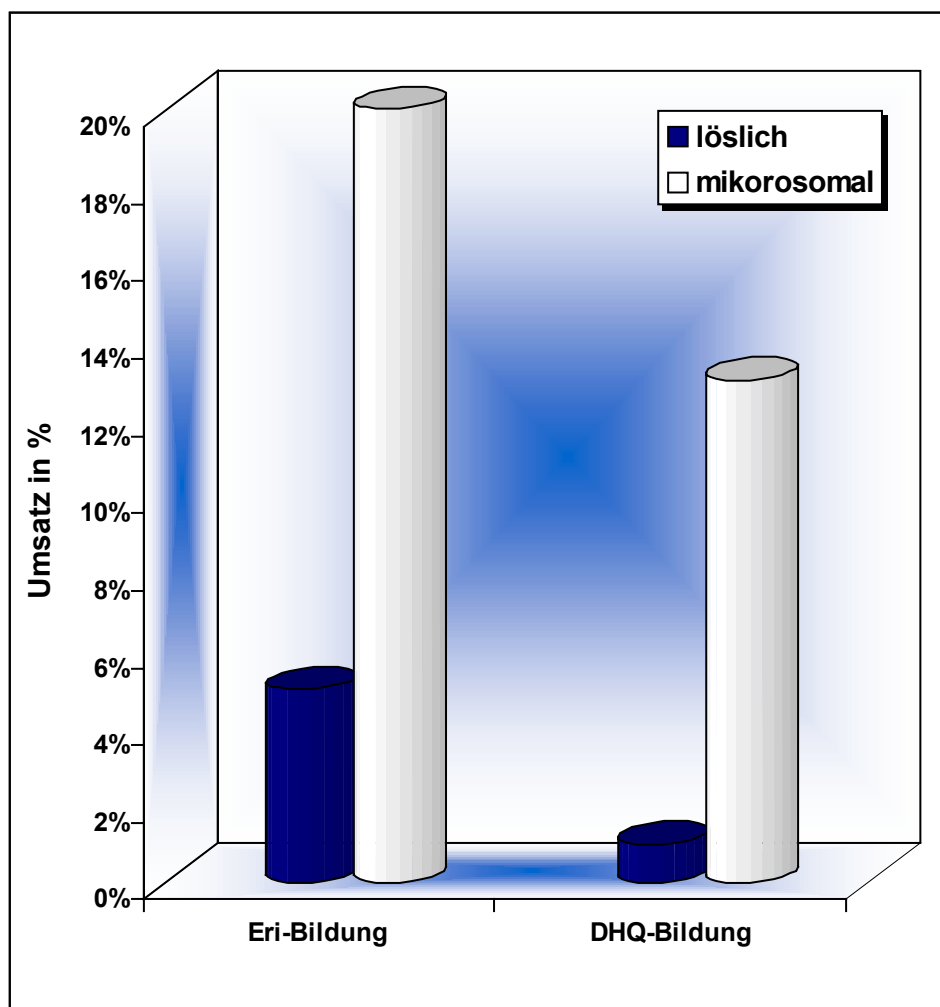
Die FHT bei Cyclamen wurde erwartungsgemäß als ein 2-Oxoglutarat-abhängiges-Enzym nachgewiesen. Prohexadion-Ca, der spezifische Inhibitor für 2-Oxoglutarat abhängige Enzyme, vermindert bei allen Enzymansätzen die FHT-Aktivität sehr drastisch. In dem Ansatz war eine Prohexadion-Ca Konzentration von 1 mmol. In der Abbildung 37 ist die Umsetzung von Naringenin zu Dihydrokämpferol bei verschiedenen pH-Werten durch die FHT dargestellt. Während die FHT der roten Cyclamen Naringenin am höchsten bei dem pH-Wert 7,5 und am niedrigsten bei dem pH Wert 6,5 umsetzt (Abb. 37), setzt sie Eriodictyol zu Dihydroquercetin am niedrigsten bei dem pH Wert 7,5 und am höchsten bei dem pH Wert 6,5 um. Prohexadion-Ca hemmt erwartungsgemäß die Reaktion (Abb. 38).



**Abb. 38:** FHT-Test mit Eriodictyol als Substrat mit verschiedenen pH Werten. Mit und ohne Prohexadion-Ca, der spezifische Inhibitor für 2-Oxoglutarat-abhängige Enzyme.

#### 4.2.2.4. Nachweis, Substratspezifität und Lokalisierung der F3`H

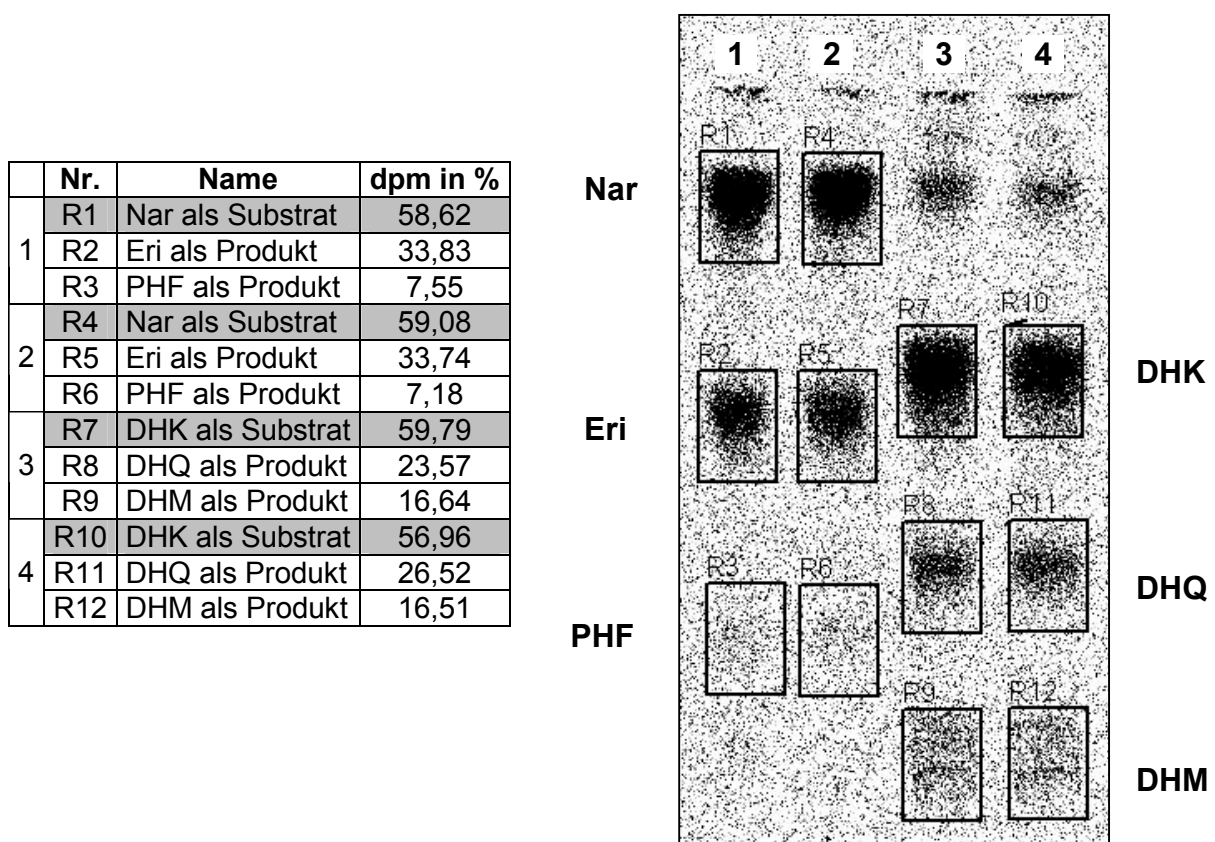
Eine erfolgreiche Extraktion der F3`H der Cyclamen wurde mit Hilfe der Aufarbeitungsmethode A erzielt. Die F3`H der Cyclamen wurde sowohl mit Naringenin als auch mit Dihydrokämpferol als Substrate nachgewiesen. In der Abbildung 39 ist die Auswertung eines F3`H Tests mit 25 µg Proteinextrakt aus der Linie 21 dargestellt. Im Vergleich zum Rohextrakt enthielt die mikrosomale Präparation die vierfache F3`H-Enzymaktivität mit Naringenin und die dreizehnfache F3`H-Enzymaktivität mit Dihydrokämpferol. Die F3`H zeigte auch eine Präferenz zu Naringenin als Dihydrokämpferol (Abb. 39).



**Abb. 39:** Nachweis, Substratspezifität und Lokalisierung der F3`H bei Cyclamen. Links ist die F3`H-Aktivität mit Nar als Substrat (Eri-Bildung). Rechts ist die Aktivität mit DHK als Substrat (DHQ-Bildung). F3`H-Aktivität ist mit beiden Substraten höher in der mikrosomalen Fraktion (Blau) als im Rohextrakt (Weiß).

#### 4.2.2.5. Nachweis und Substratspezifität der F3`5`H

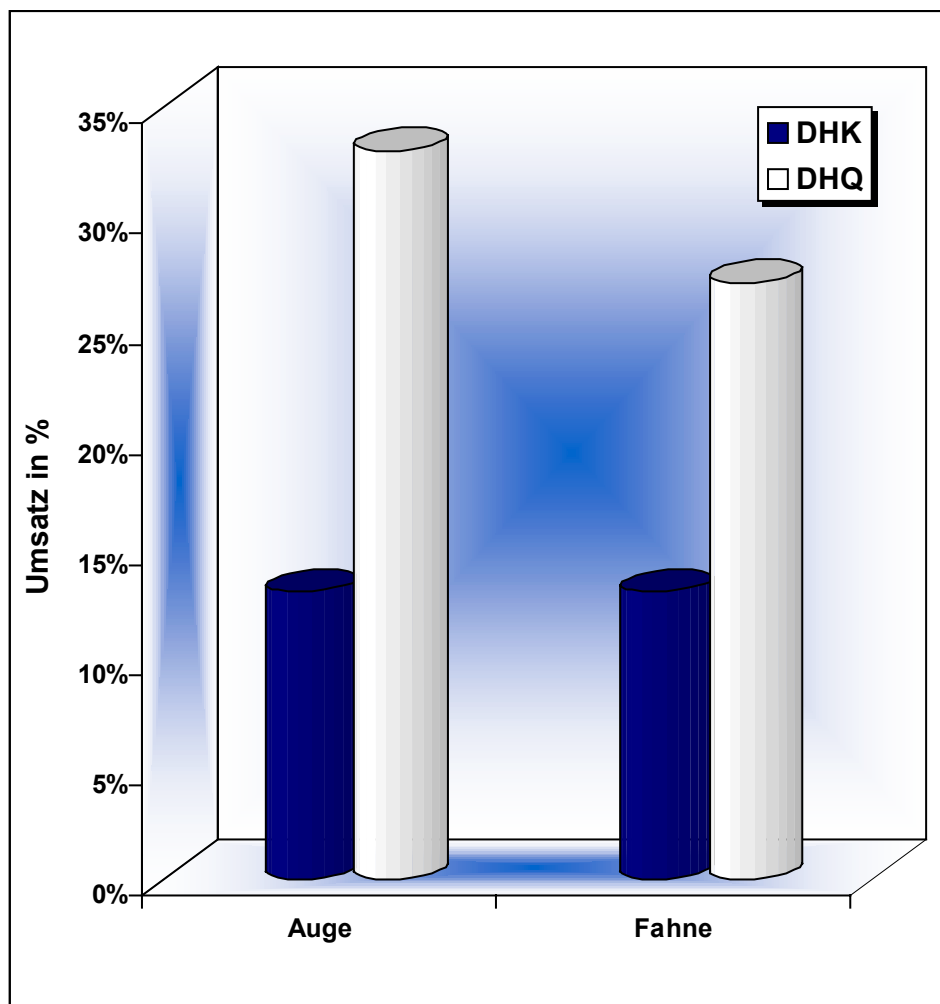
Abbildung 40 zeigt ein Chromatogramm eines Enzymtests mit 20 µg Proteinextrakt aus mikrosomaler Präparation der Cyclamenlinie 25, die F3`5`H und höchstwahrscheinlich aber auch F3`H besitzt. Der Enzymtest erfolgte in 0,1 mol KPi pH 7,5 mit 0,1 mmol NADPH als Cofaktor. Inkubationszeit betrug 45 min bei 30 °C. Sowohl Naringenin (Nar) als auch Dihydrokämpferol (DHK) dienen der F3`5`H als Substrate, die zu Eriodictyol (Eri) und Pentahydroxyflavanon (PHF) bzw. zu Dihydroquercetin (DHQ) und Dihydromyricetin (DHM) umgesetzt werden.



**Abb. 40:** F3`H- bzw. F3`5`H-Doppeltest bei Cyclamen. 1 und 2 mit Naringenin als Substrat. 3 und 4 mit Dihydrokämpferol als Substrat.

#### 4.2.2.6. Nachweis, Substrat- und Gewebespezifität der FLS

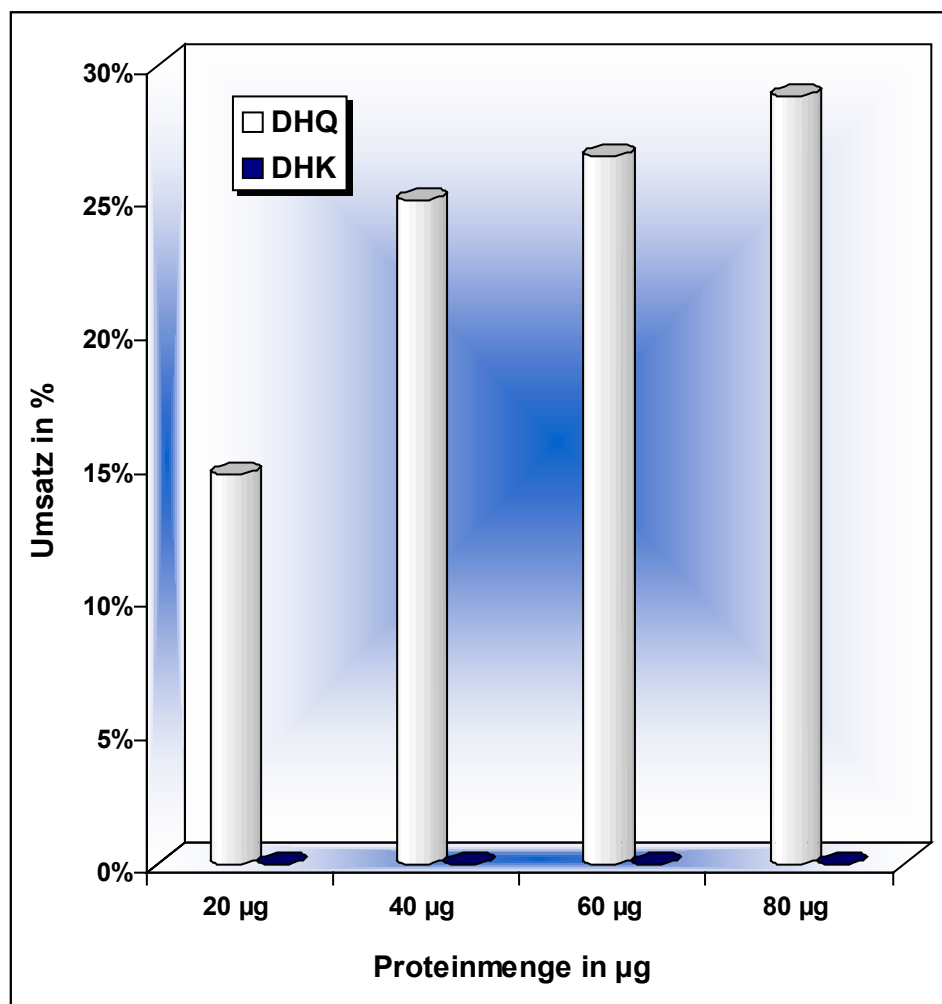
Um die unterschiedliche Verteilung der Flavonoide in den Blüten mancher Cyclamenlinien zu untersuchen, wurden zwei Aufarbeitungen für die Spreite und für das Auge der Linie 4 (Hellrosa mit Auge) auf die FLS-Aktivität getestet. Proteinextrakte aus Knospenmischung verschiedener Blütenstadien wurden durch die Aufarbeitungsmethode C mit anschließender Gelfiltration gewonnen. Im Test lag 20 µg Protein mit allen Cofaktoren in 0,1 mol Tris-HCl-Puffer pH 7,0 vor. Inkubationszeit betrug 30 min bei 25 °C. Bezüglich der FLS-Aktivität wurde kein großer Unterschied zwischen der Spreite und dem Auge festgestellt. Dihydrokämpferol wird im gleichen Verhältnis in der Spreite wie im Auge umgesetzt. Dihydroquercetin wird leicht mehr in der Spreite umgesetzt als im Auge (Abb. 41).



**Abb. 41:** Die FLS-Aktivität mit Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin als Substrate im Auge und in der Blütenblatt-Spreite der Cyclamenlinie 4.

#### 4.2.2.7. Nachweis und Substratspezifität der DFR

Pelargonidinderivate fehlen in den Blüten aller bisher untersuchten Cyclamen. Deshalb sollte geprüft werden, woran es liegt, dass Cyclamensorten nicht in der Lage sind, Pelargonidinderivate zu synthetisieren. Proteinextrakte der Linie 21 wurden durch die Aufarbeitungsmethode A gewonnen und anschließend durch Sephadex G-50 filtriert. 30 µg Protein wurden dann mit beiden Substraten Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin in 0,1 mol KPi pH 7,5 mit 1 mmol NADPH als Cofaktor bei 30 °C für 45 min inkubiert. Abbildung 42 zeigt die Substratspezifität der DFR mit DHQ und DHK als Substrate. Die DFR von Cyclamen akzeptiert auch bei hohen Enzymmengen DHK nicht als Substrat.



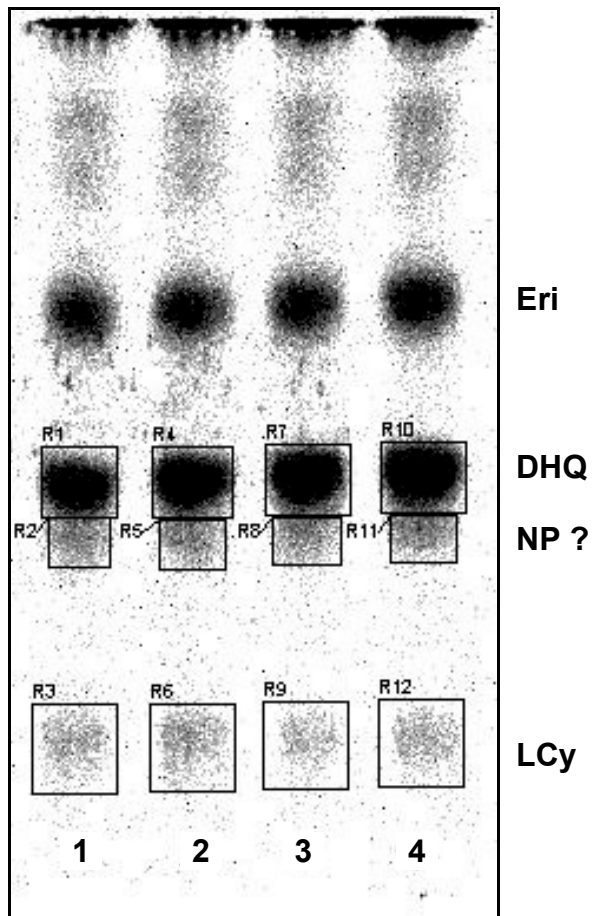
**Abb. 42:** DFR von Cyclamen kann Dihydroquercetin, aber kein Dihydrokämpferol umsetzen.



#### 4.2.2.8. Gewebespezifische Expression der DFR

In einem Vergleich der DFR-Enzymaktivität zwischen der Spreite und dem Auge bei der Cyclamenlinie 4 (Hellrosa mit Auge), wurde ein großer Unterschied in der DFR-Aktivität festgestellt. DFR-Aktivität im Auge ist fast 2-Fach höher als die in der Spreite. Ein Nebenprodukt entsteht bei allen Reaktionen, was auf der DC-Platte knapp unter DHQ lag (Abb. 43).

	Nr.	Name	% in dpm
1	R1	DHQ	67,53
	R3	LCy	21,41
2	R4	DHQ	67,05
	R6	LCy	20,15
3	R7	DHQ	76,01
	R9	LCy	11,21
4	R10	DHQ	77,01
	R12	LCy	11,32
	R2,R5,R8,R11	NP ?	ca. 12 %



**Abb. 43:** DFR-Doppeltest mit der Cyclamenlinie 4 (Hellrosa mit Auge). 1 und 2 mit Auge-Proteinextrakt, 3 und 4 mit Spreite-Proteinextrakt. Eri ist Restsubstrat aus der DHQ-Synthese



## 4.3. Weitere Pflanzengattungen

### 4.3.1. *Euphorbia pulcherrima*

#### 4.3.1.1. Flavonoide der Weihnachtssterne

Eine frühere Diplomarbeit am Lehrstuhl (68) hat sich genauer mit Analysen der Inhaltsstoffe einer großen Zahl von Weihnachtssternen beschäftigt. Dabei wurde festgestellt, dass rote Brakteen von *Euphorbia pulcherrima* (Weihnachtssternen) immer eine Mischung aus Pelargonidin- und Cyanidderivaten aufweisen. Lediglich das Verhältnis zueinander variiert von einer Sorte zu anderen. In dieser Arbeit wurde eine Sorte von Weihnachtssternen Namens 'Angelika' verwendet. Brakteen dieser Sorte haben eine hellrote Farbe und ein Pg/Cy Verhältnis von weniger als 1.

#### 4.3.1.2. Enzymologie der Flavonoidbiosynthese

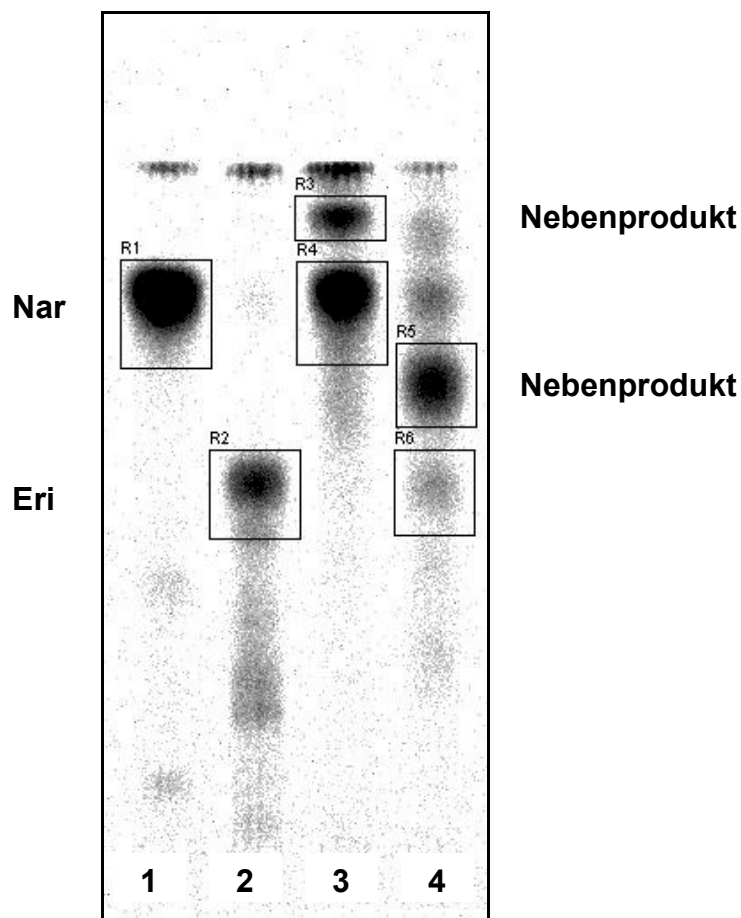
Enzymologische Nachweise der Flavonoidbiosynthese fehlten bisher bei Weihnachtssternen. So wurde zunächst mit etablierten Aufarbeitungsmethoden versucht, die Enzymaktivität von Enzymen der Flavonoidbiosynthese nachzuweisen. Damit konnte aber kein Erfolg erzielt werden. Auch die verschiedensten Variationen bei diesen Methoden brachten kein Durchbruch.

Erst mit der für die Rosen ausgearbeiteten Extraktionsmethode konnten die löslichen Enzyme CHS, FHT und DFR sowie das membrangebundene Enzym F3`H nachgewiesen werden. Für die CHS war die Aufarbeitungsmethode A bzw. Aufarbeitungsmethode B gleich gut. Für die FHT war die Aufarbeitungsmethode A bzw. C geeignet um die Aktivität in den Brakteen nachzuweisen. Eine Gelfiltration war auch notwendig um die niedermolekularen Substanzen zu entfernen. So ergab z.B. ein FHT Enzymtest ohne Gelfiltration messbare Aktivität auch wenn keine Kosubstrate im Test vorlagen. Für die DFR war nur die Aufarbeitungsmethode A mit anschließender Gelfiltration erfolgreich um Aktivität nachzuweisen. Für die F3`H war auch nur die Aufarbeitungsmethode A mit anschließender mikrosomale Anreicherung geeignet für einen erfolgreichen Nachweis der Aktivität.

Im folgenden sind die Ergebnisse der Enzymnachweise der Flavonoidbiosynthese bei Weihnachtsstern ausführlich dargestellt.

#### 4.3.1.2.1. Nachweis und Substratspezifität der CHS

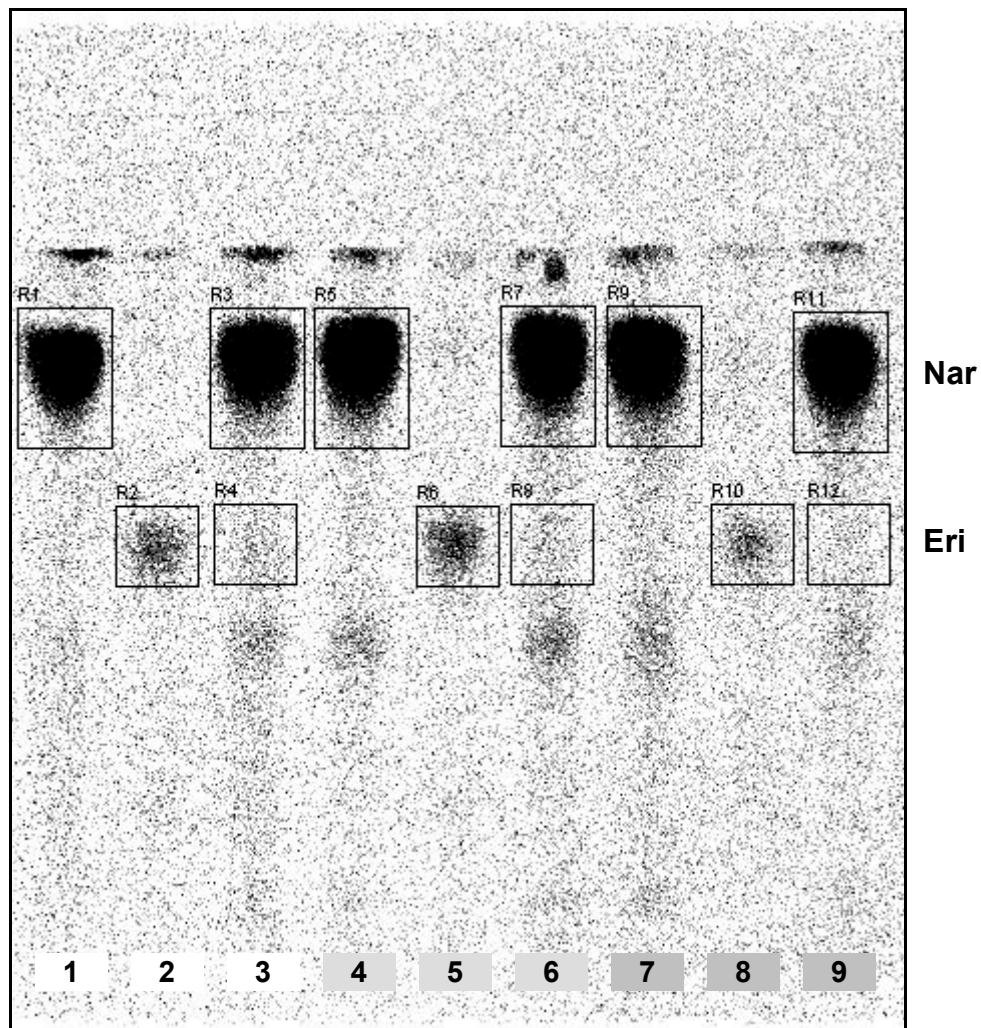
Für den Nachweis der CHS-Aktivität wurden 20 µg Protein aus Brakteenextrakt mit den Substraten p-Cumaroyl-CoA bzw. Caffeoyl-CoA in 0,1 mol KPi Puffer pH 7,0 bei 30 °C für 30 min inkubiert. Im Vergleich zwischen 2 Extraktionsmethoden wurde festgestellt, dass PEG eine sehr wichtige Rolle als Zusatzstoff spielt. Wie in der Abbildung 44 dargestellt ist, entstehen Nebenprodukte in hoher Konzentrationen, im Falle von Caffeoyl-CoA sogar mehr als das Hauptprodukt, wenn PEG bei der Extraktion nicht zugegeben wurde (Abb. 44, Spur 3 und 4).



**Abb. 44:** Ein CHS-Test bei Euphorbien mit zwei verschiedenen Extraktionsmethoden. 1 und 3: mit p-Cumaroyl-CoA, 2 und 4 mit Caffeoyl-CoA als Substrate. 1 und 2: mit Aufarbeitungsmethode A. 3 und 4 mit Aufarbeitungsmethode D. Nebenprodukte (R3 und R5) entstehen nur mit der Extraktionsmethode D.

#### 4.3.1.2.2. pH-Abhängigkeit der CHS

Die CHS bei Euphorbien zeigte ein pH-Optimum bei pH 7,0 sowohl für das Substrat p-Cumaroyl-CoA als auch für das Substrat Caffeoyl-CoA. Im Konkurrenzversuch, bei dem beide Substrate in äquimolaren Mengen im Testansatz vorlagen, bevorzugte die CHS immer p-Cumaroyl-CoA als Substrat. Bei niedrigeren pH-Werten wurde Caffeoyl-CoA besser akzeptiert als bei höheren pH-Werten (Abb. 45).



**Abb. 45:** pH-Abhängigkeit der CHS bei Euphorbien. 1-3: mit pH 6,0. 4-6: mit pH 7,0. 7-9: mit pH 8,0. 1,4,7: mit ausschließlich p-Cumaroyl-CoA als Substrat. 2,5,8: mit ausschließlich Caffeoyl-CoA als Substrat. 3,6,9: mit beiden Substraten in äquimolaren Mengen.

#### 4.3.1.2.3. Nachweis und Substratspezifität der FHT

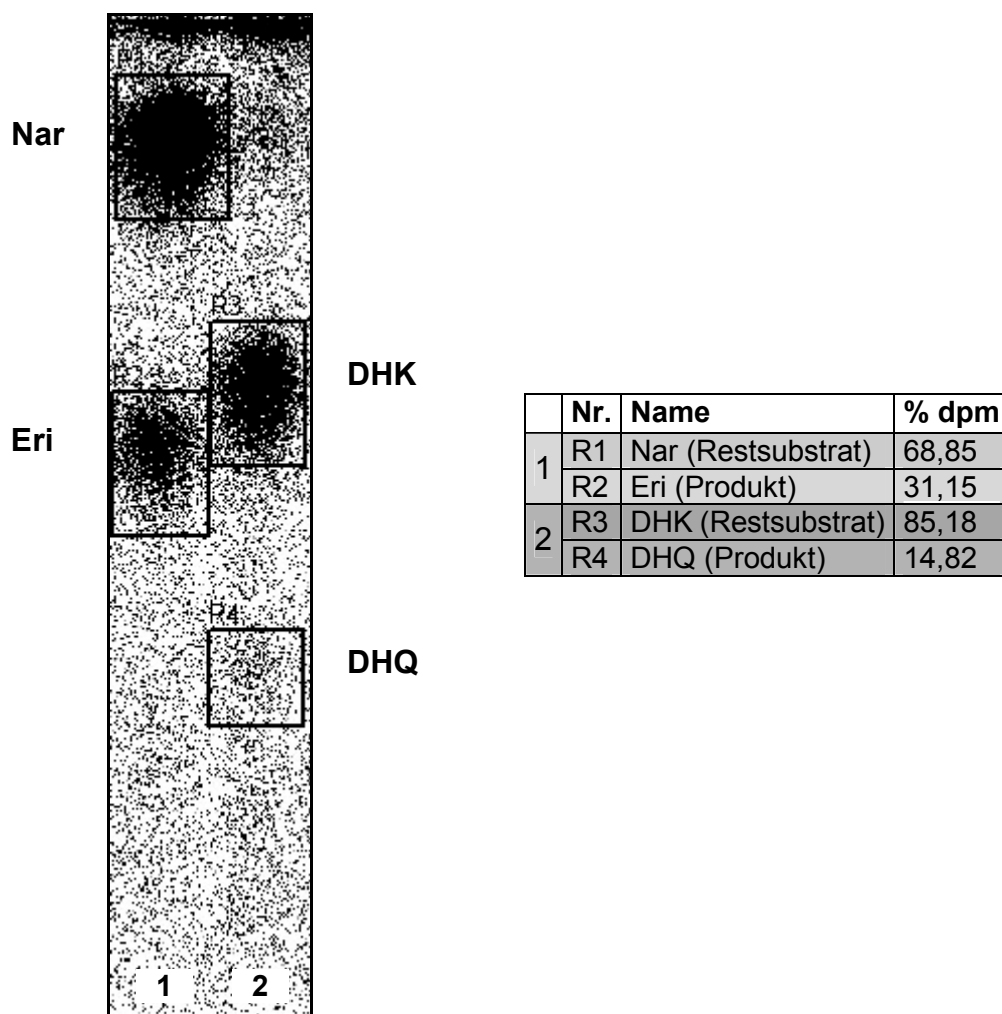
Bei der Aufarbeitung der Brakteen von Euphorbien für die FHT-Tests, wurde etwas Interessantes festgestellt. Wenn dem Aufarbeitungspuffer PEG zugegeben wurde, entstand in einem Test mit Naringenin als Substrat Dihydrokämpferol als Produkt einer FHT-Aktivität. Verwendete man kein PEG im Aufarbeitungspuffer, entstanden aus Naringenin als Substrat Eriodictyol und Dihydroquercetin als Produkte einer FHT- und F3`H-Aktivität. Mit Eriodictyol als Substrat entstand in beiden Fällen kein Produkt. Das heißt die FHT von Euphorbien scheint nur Naringenin als Substrat zu akzeptieren (Tab. 6).

Test	Name	% dpm
1	Nar (Restsubstrat)	95,69
	DHK (Produkt)	4,31
2	Nar (Restsubstrat)	94,58
	DHK (Produkt)	5,42
1	Nar (Restsubstrat)	90,12
	Eri (Produkt)	5,79
	DHQ (Produkt)	4,09
2	Nar (Restsubstrat)	90,45
	Eri (Produkt)	5,26
	DHQ (Produkt)	4,29

**Tab. 6:** FHT-Doppeltest mit Naringenin als Substrat bei Euphorbien, wobei 1 und 2 mit PEG als Zusatz im Aufarbeitungspuffer , 3 und 4 ohne PEG.

#### 4.3.1.2.4. Nachweis und Substratspezifität der F3`H

F3`H von Euphorbien konnte nur mit Aufarbeitungsmethode A nachgewiesen werden. Anreicherung der Mikrosomen durch MgCl<sub>2</sub> Präzipitation war ebenso notwendig. Im Test lag 20 µg Protein aus der mikrosomalen Fraktion mit 0,1 mmol NADPH vor. Die Inkubation erfolgte im 0,1 mol KPi Puffer pH 7,5 bei 25 °C für 45 min mit geöffnetem Reaktionsgefäßdeckel. F3`H bei Euphorbien akzeptiert sowohl Naringenin als auch Dihydrokämpferol als Substrate und setzt sie zu Eriodictyol bzw. Dihydroquercetin um (Abb. 46), wobei Naringenin eindeutig das bessere Substrat zu sein scheint.

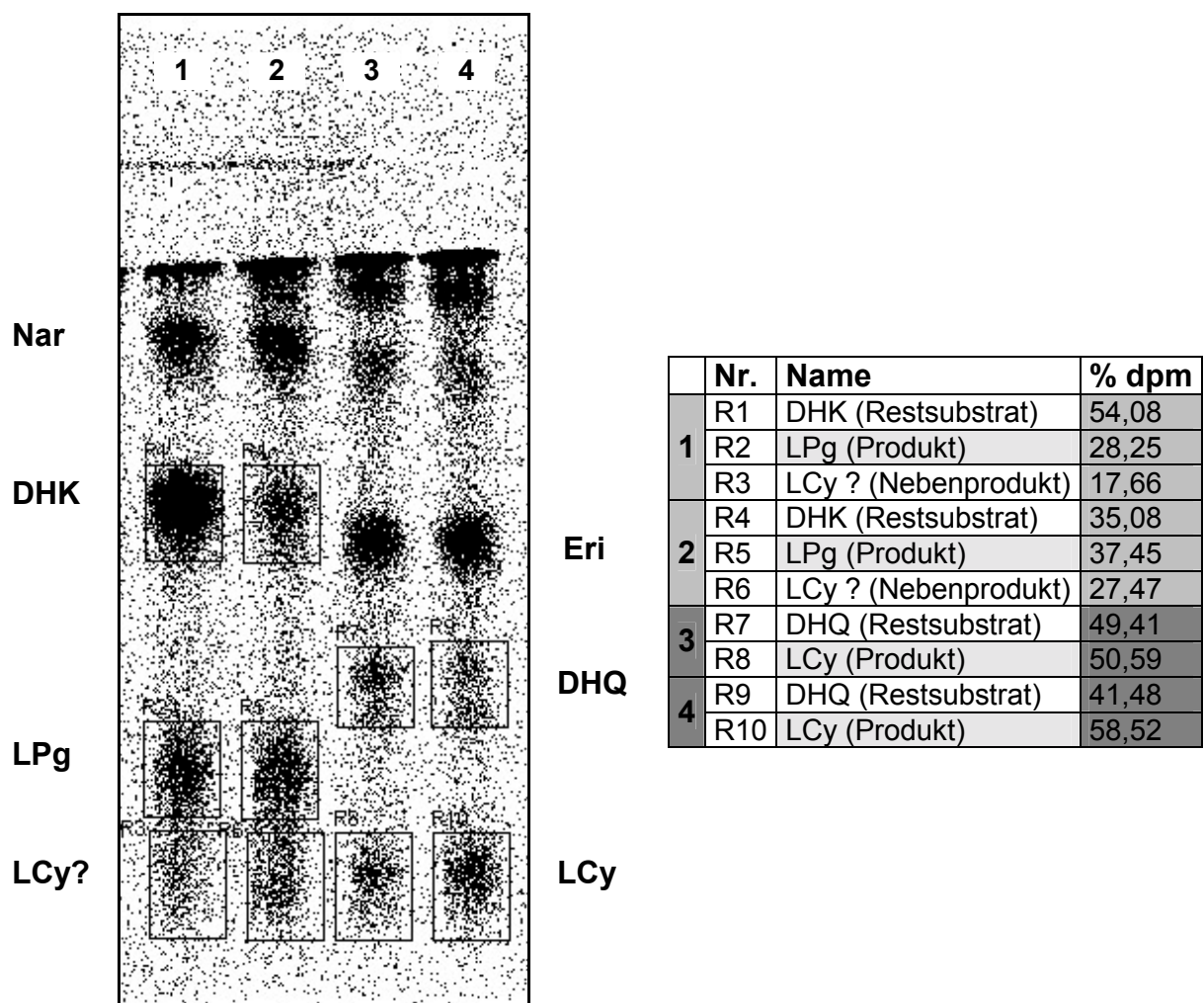


**Abb. 46:** F3`H-Test bei Euphorbien. Die F3`H-Aktivität mit Naringenin (1) als Substrat ist höher als mit Dihydrokämpferol (2).



#### 4.3.1.2.5. Nachweis und Substratspezifität der DFR

Die DFR konnte mit Aufarbeitungsmethode A und einer anschließenden Gelfiltration des Rohextraktes durch Sephadex G-50 nachgewiesen werden. 30 µg Brakteen-Extrakt wurden mit 1 mmol NADPH als Cofaktor im 0,1 mol KPi pH 7,5 bei 30 °C für 45 min inkubiert. Die DFR von Euphorbien akzeptiert Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin als Substrate und setzt sie in fast gleicher Menge in die entsprechenden Leukoanthocyanidine LPg bzw. LCy um (Abb. 47). Mit DHK als Substrat entstand in beiden Wiederholungen ein Nebenprodukt, das auf der Höhe von LCy (R3 und R6) auf der DC-Platten lag.

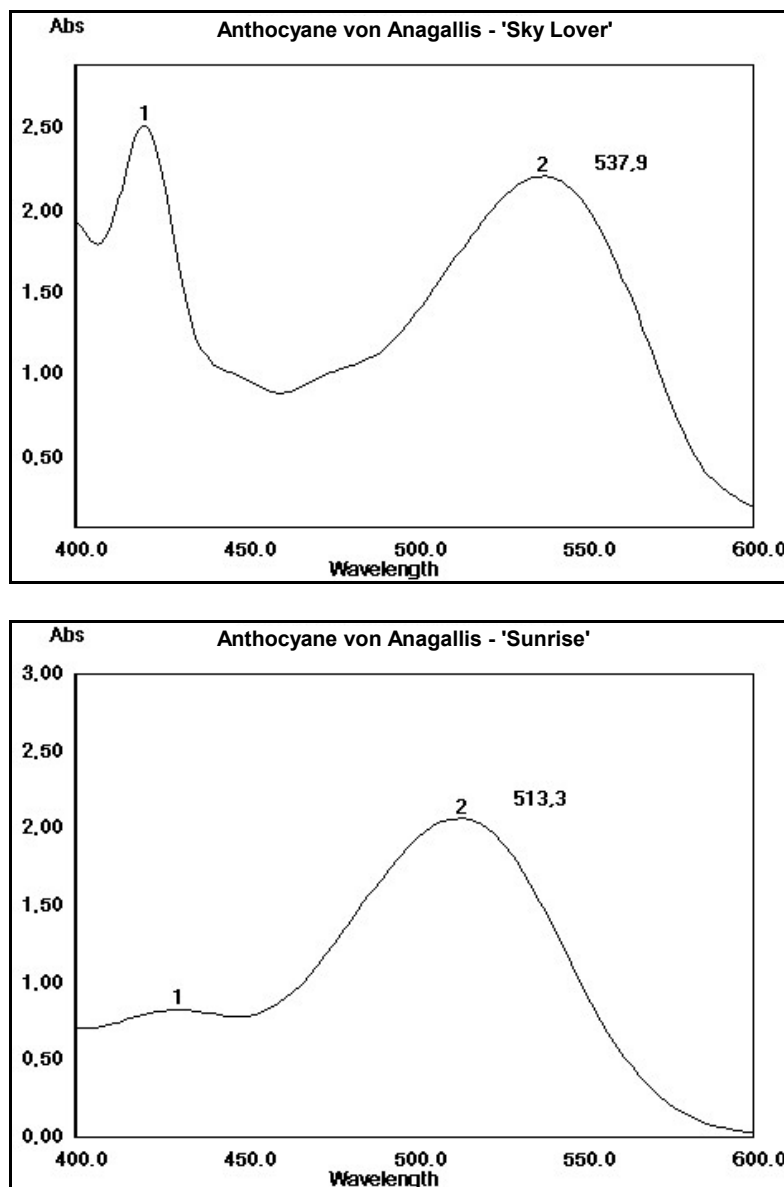


**Abb. 47:** DFR-Doppelttest bei Euphorbien. 1 und 2 mit DHK, 3 und 4 mit DHQ als Substrate. 1,3 mit 0,1 mmol NADPH, 2,4 mit 1 mmol NADPH. R3,R6 sind Nebenprodukte, die auf der Höhe von LCy laufen und bei den Test mit DHK als Substrat entstehen. Reste von Nar bzw. Eri stammen aus der Substratsynthese.

## 4.3.2. Anagallis

### 4.3.2.1. Untersuchung der Flavonoide bei Anagallis

In diese Arbeit wurden zwei Anagallis-Sorten, die blau-blühende Sorte *Anagallis monelli* 'Sky Lover' und die orangrot-blühende Sorte *Anagallis tenella* 'Sunrise' einbezogen. Die DC-Analyse von Blütenextrakten beider Sorten ergab, dass die 'Sky Lover' fast nur Malvidinderivate und die 'Sunrise' fast nur Pelargonidinderivate in den Blüten enthält. Spektralanalysen betätigte diese Ergebnisse, wie es in Abbildung 48 gezeigt wird.



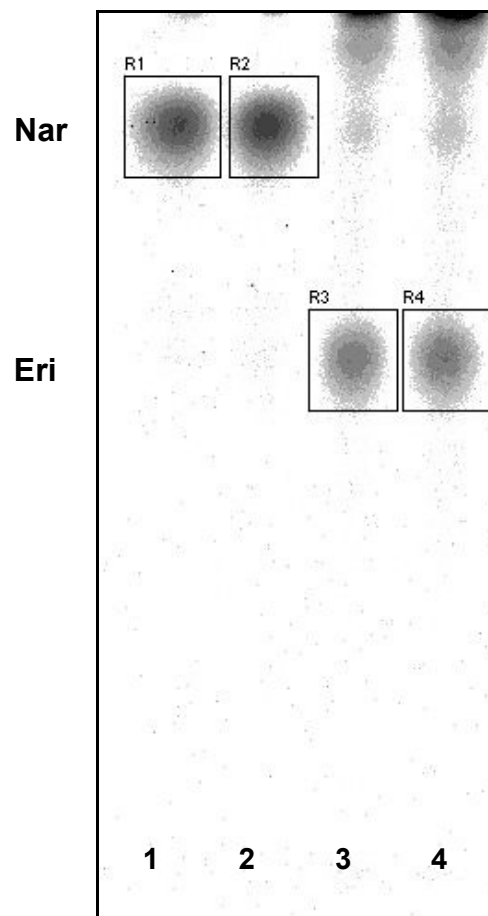
**Abb. 48:** Absorptionsspektrum der Anthocyane in Blüten von 'Sky Lover' (Oben) und 'Sunrise' (Unten). Bei den gewählten Testbedingungen haben Pg-Derivate ein Absorptionsmaximum bei ca. 510 nm, Mv-Deivate bei 536 nm.

### 4.3.2.2. Enzymologie der Flavonoidbiosynthese

Auch bei *Anagallis* ist bisher kein Enzymnachweis für den Flavonoidbiosyntheseweg bekannt. Erst mit der Aufarbeitungsmethode A war es möglich die löslichen Enzyme CHS, FHT und DFR nachzuweisen. Alle Versuche F<sup>3</sup>H-Aktivität - sowohl bei 'Sky Lover' als auch bei 'Sunrise' - nachzuweisen blieben jedoch ohne Erfolg. Im folgenden sind die Ergebnissen der CHS-, FHT- und DFR-Enzymnachweise ausführlich dargestellt.

#### 4.3.2.2.1. Nachweis und Substratspezifität der CHS

Zum Nachweis der CHS bei *Anagallis*, wurden 20 µg Protein aus Blütenextrakte der Sorte 'Sunrise' und der Sorte 'Sky Lover' mit p-Cumaroyl-CoA bzw. Caffeoyl-CoA für 30 min bei 30 °C in 0,1 mol KPi Puffer, pH 7,0 inkubiert. Sowohl die CHS der 'Sunrise' als auch der 'Sky Lover' akzeptieren p-Cumaroyl-CoA bzw. Caffeoyl-CoA als Substrate (Abb. 50).

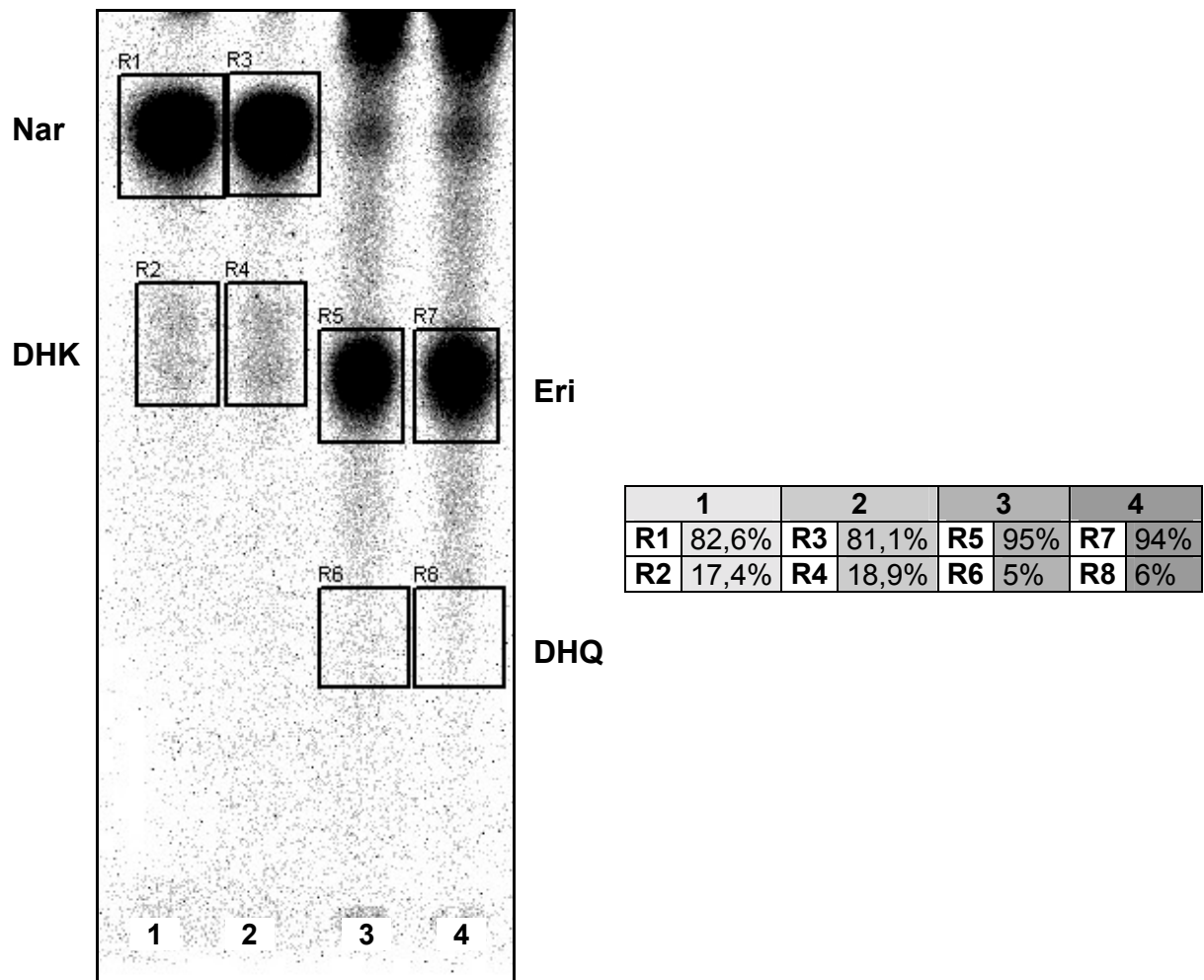


**Abb. 49:** CHS-Test bei *Anagallis*. 1,2: mit p-Cumaroyl-CoA, 3,4: mit Caffeoyl-CoA als Substrate. 1 und 3: bei 'Sunrise'. 2 und 4: bei 'Sky Lover'.



#### 4.3.2.2.2. Nachweis und Substratspezifität der FHT

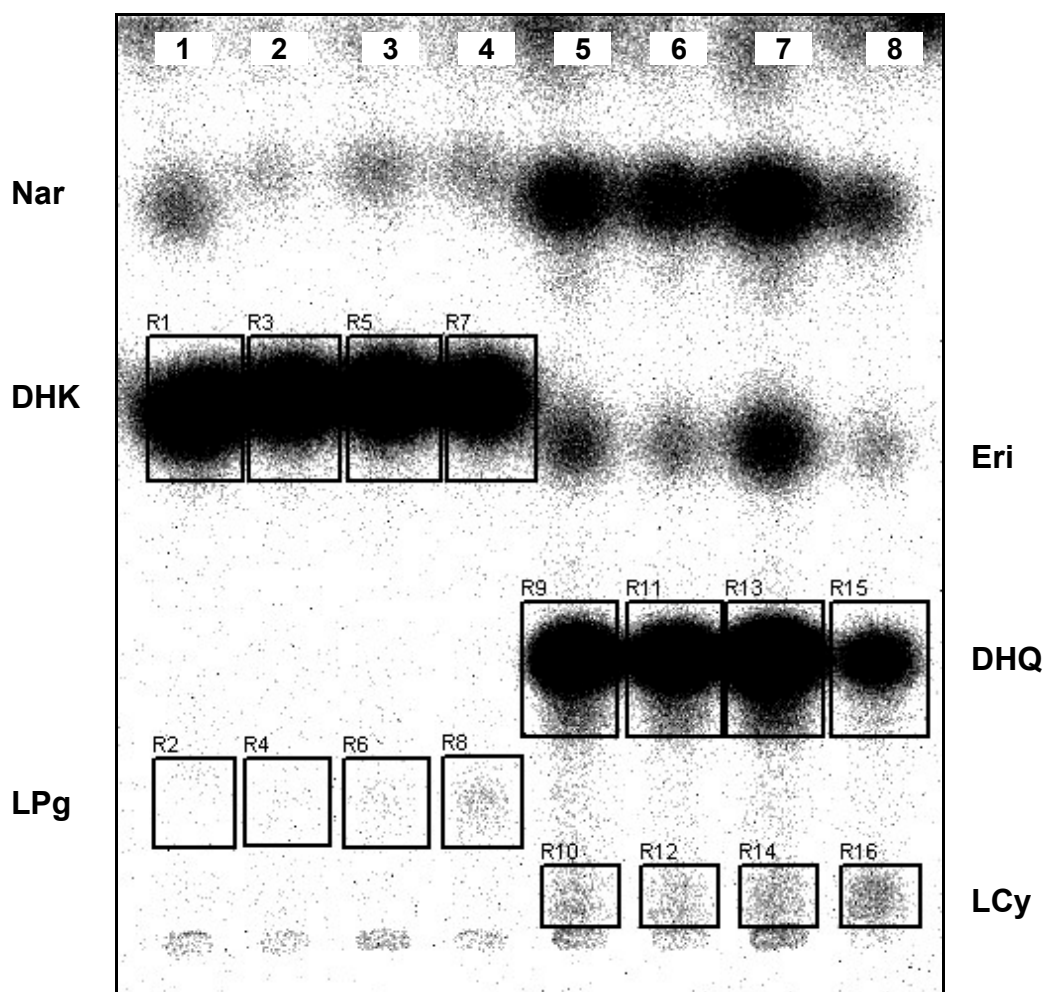
Zum Nachweis der FHT von *Anagallis* wurden 25 µg Protein mit den Substraten Naringenin bzw. Eriodictyol und den Kosubstraten  $F^{2+}$ , Na-Ascorbat und 2-Oxoglutarat in 0,1 mol Tris-HCl Puffer pH 7,0 bei 25 °C für 30 min inkubiert. Abbildung 50 zeigt, dass für die FHT Naringenin gegenüber Eriodictyol das bessere Substrat ist. Zwischen 'Sunrise' und 'Sky Lover' wurde Keim Unterschied festgestellt.



**Abb. 50:** FHT-Test bei *Anagallis*. 1 und 2: mit Naringenin, 3 und 4: mit Eriodictyol als Substrate. 1 und 3: bei 'Sunrise'. 2 und 4: bei 'Sky Lover'.

#### 4.3.2.2.3. Nachweis und Substratspezifität der DFR

Zum Nachweis der DFR dienen Blütenextrakte, die mit Aufarbeitungsmethode A gewonnen und durch Sephadex G-50 filtriert wurden. Im Test lagen 30 µg Protein mit 1 mmol NADPH als Cofaktor in 0,1 mol KPi Puffer pH 7,5 vor. Die Inkubation erfolgte für 45 min bei 30 °C. Die Substratspezifität der DFR könnte der Grund für die Bildung von entweder Pg- oder Mv-Derivaten sein. Abbildung 51 zeigt das Chromatogramm zum Nachweis und die Substratspezifität der DFR bei 'Sunrise' und 'Sky Lover'. Während die DFR der 'Sunrise' sowohl Dihydrokämpferol als auch Dihydroquercetin als Substrate akzeptiert, wird von der DFR aus 'Sky Lover' nur DHQ genutzt.



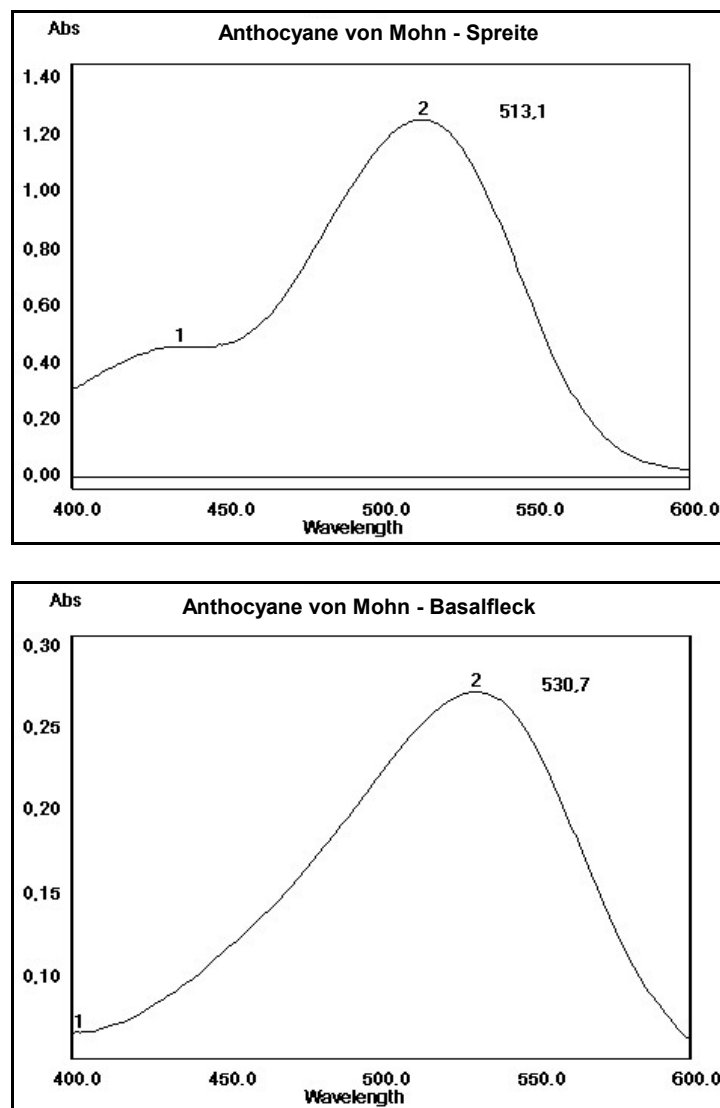
<b>R1</b>	<b>R3</b>	<b>R5</b>	<b>R7</b>	<b>R9</b>	<b>R11</b>	<b>R13</b>	<b>R15</b>
99,37	99,49	91,98	89,25	91,93	92,34	94,22	83,37
<b>R2</b>	<b>R4</b>	<b>R6</b>	<b>R8</b>	<b>R10</b>	<b>R12</b>	<b>R14</b>	<b>R16</b>
0,63	0,51	8,02	10,75	8,07	7,66	5,78	16,63

**Abb. 51:** DFR-Doppeltest bei Anagallis. 1-4: mit Dihydrokämpferol, 5-8: mit Dihydroquercetin als Substrate. 1,2 und 5,6: bei 'Sky Lover'. 3,4 und 7,8: bei 'Sunrise'. Nar und Eri sind Restsubstrate aus den DHK- bzw. DHQ-Synthesen.

### 4.3.3. *Papaver orientale*

#### 4.3.3.1. Untersuchung der Flavonoide bei *Papaver orientale*

Blüten von *Papaver orientale* (Mohn) haben orange-gefärbte Spreiten mit dunkelroten Basalflecken. DC-Analysen von Extrakten beider Geweben zeigten, dass die Spreite hauptsächlich Pg- und wenig Cy-Derivate enthält, während das Auge ausschließlich Cyanidinderivate aufweist. Abbildung 52 zeigt die Absorptionsspektren der Rohextrakten beider Gewebe. Oben ist das Spektrum der Spreiten von Mohnblüten mit einem Absorptionsmaximum bei 513,1 nm aufgezeichnet. Unten ist das Spektrum von MeOH/HCl-Extrakten aus Basalflecken derselben Blüten mit einem Absorptionsmaximum bei 530,7 nm dargestellt.

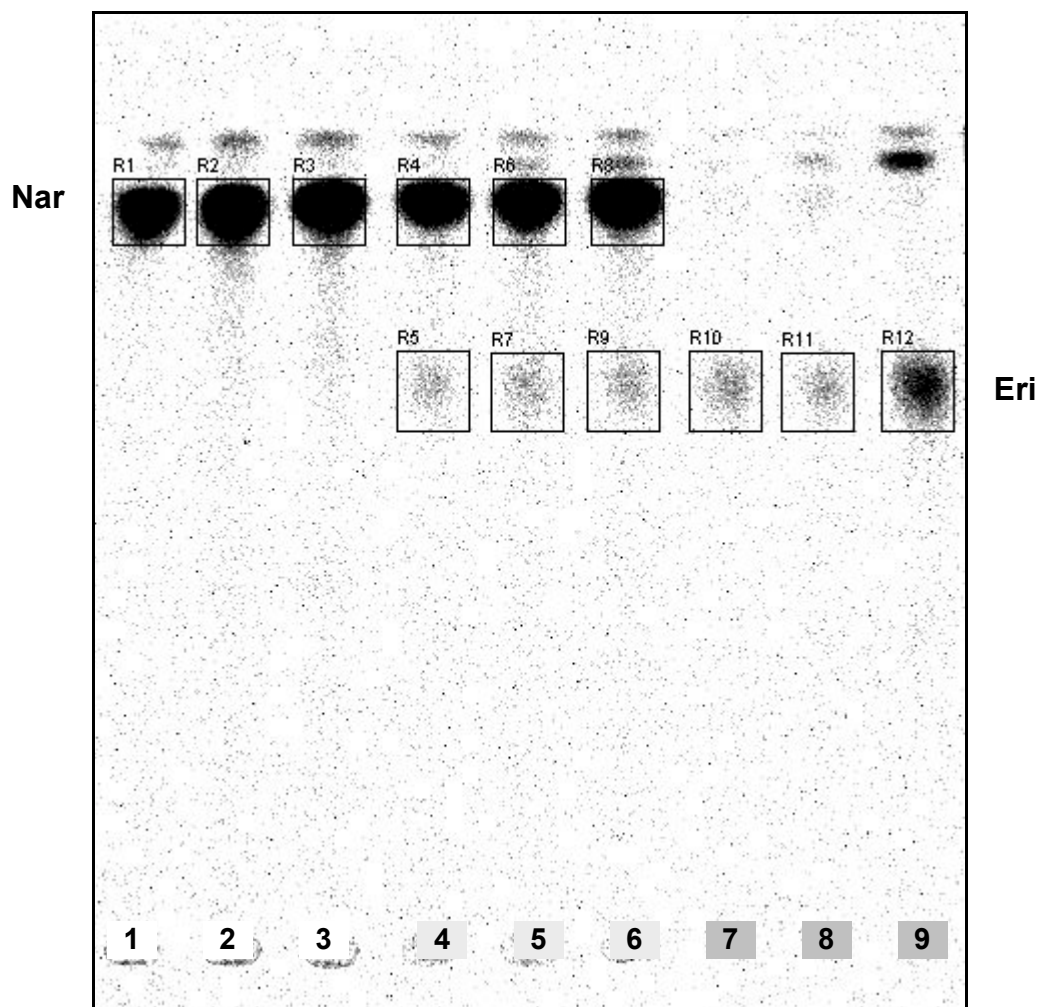


**Abb. 52:** Spektrum der Anthocyane in Mohnblüten. Oben ist der Spektrum der Spreite und unten ist vom Basalfleck dargestellt.

### 4.3.3.2. Enzymologie der Flavonoidbiosynthese

#### 4.3.3.2.1. Nachweis und Substratspezifität der CHS

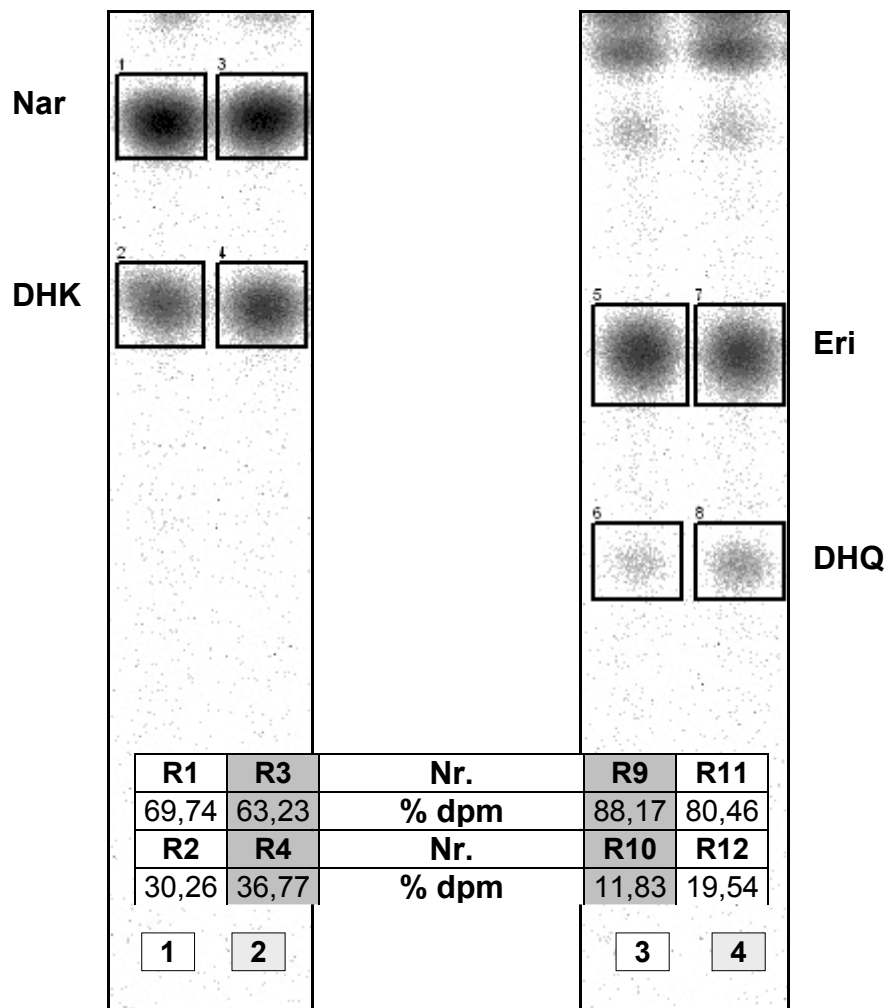
Zum Nachweis der CHS bei Mohn wurden die gesamten Blütenblätter mit Hilfe von Aufarbeitungsmethode D extrahiert. Im Test wurden Proteinextrakte in ansteigender Menge mit p-Cumaroyl-CoA bzw. Caffeoyl-CoA als Substrate in 0,1 mol KPi Puffer pH 7,5 bei 30 °C für 30 min inkubiert. CHS bei Mohn akzeptiert sowohl p-Cumaroyl-CoA als auch Caffeoyl-CoA als Substrate und setzt sie in Naringenin bzw. Eriodictyol um (Abb. 53).



**Abb. 53:** CHS-Test bei Mohn. 1-3: ausschließlich mit p-Cumaroyl-CoA als Substrat, 4-6: mit p-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA in äquimolaren Mengen als Substrate. 7-9: ausschließlich mit Caffeoyl-CoA als Substrat. 1,4,7: mit 10 µg-, 2,5,8: mit 15 µg- und 3,6,9: mit 20 µg Protein.

#### 4.3.3.2.2. Nachweis, 2-Oxoglutarat-Abhängigkeit, Substrat- und Gewebespezifität der FHT

Die FHT wurde ebenfalls mit der Aufarbeitungsmethode D nachgewiesen. Im Test wurden 25 µg Protein aus Extrakten der Spreiten bzw. des Basalflecks mit Naringenin bzw. Eriodictyol als Substrate und den Cofaktoren bzw. mit dem Inhibitor Prohexadion-Ca in 0,1 mol Tris-HCl Puffer pH 7,0 bei 25 °C für 30 min inkubiert. Die FHT beider Geweben nutzen sowohl Nar als auch Eri als Substrate. Die 2-Oxoglutarat-Abhängigkeit der FHT-Aktivität wurde auch nachgewiesen. Der spezifische Inhibitor Prohexadion-Ca hemmt die FHT-Aktivität mit beiden Substraten. In Abbildung 54 ist der Nachweis, die Substratspezifität und die Gewebespezifität der FHT bei Mohn dargestellt.



**Abb. 54:** FHT-Test bei Mohn. 1,2: mit Naringenin als Substrat und 3,4: mit Eriodictyol als Substrat. 1,3: mit dem Spreitenextrakt. 2,4: mit dem Augenextrakt.

#### 4.3.3.2.3. Nachweis, Substrat- und Gewebespezifität der DFR

Zum Nachweis der DFR-Aktivität bei Mohn wurden 30 µg Protein aus Sephadex G-50 Extrakten der Spreite bzw. des Basalflecks mit den Substraten Dihydrokämpferol bzw. Dihydroquercetin und 1 mmol NADPH als Cofaktor in 0,1 mol KPi Puffer pH 7,5 bei 30 °C für 45 min inkubiert.

Tabelle 5 und 6 zeigen DFR-Doppeltests mit den Substraten Dihydrokämpferol bzw. Dihydroquercetin bei den zwei Geweben. Die DFR der Spreite nutzt DHK als Substrat um Leukopelargonidin zu synthetisieren, während die DFR aus dem Auge kaum DHK in LPg umsetzt (Tab. 5). Im Gegensatz dazu, wird DHQ im Auge von der DFR gut in LCy umgesetzt, während es in der Spreite kaum umgesetzt wird (Tab. 6)

Gewebe	Test	Name	% dpm
Spreite	1	Nar (Restsubstrat)	26,64
		DHK (Substrat)	59,96
		LPg (Produkt)	<b>13,40</b>
Spreite	2	Nar (Restsubstrat)	27,01
		DHK (Substrat)	58,28
		LPg (Produkt)	<b>14,71</b>
Auge	1	Nar (Restsubstrat)	27,36
		DHK (Substrat)	69,56
		LPg (Produkt)	<b>3,08</b>
Auge	2	Nar (Restsubstrat)	27,04
		DHK (Substrat)	70,44
		LPg (Produkt)	<b>2,52</b>

**Tab. 7:** DFR-Doppeltest bei Mohn mit DHK als Substrat.

Gewebe	Test	Name	% dpm
Auge	1	Eri (Restsubstrat)	24,60
		DHQ (Substrat)	59,06
		LCy (Produkt)	<b>16,34</b>
Auge	2	Eri (Restsubstrat)	23,79
		DHQ (Substrat)	58,41
		LCy (Produkt)	<b>17,80</b>
Spreite	1	Eri (Restsubstrat)	24,96
		DHQ (Substrat)	72,85
		LCy (Produkt)	<b>2,19</b>
Spreite	2	Eri (Restsubstrat)	24,12
		DHQ (Substrat)	74,16
		LCy (Produkt)	<b>1,72</b>

**Tab 8:** DFR-Doppeltest bei Mohn mit DHQ als Substrat.



## 5. Diskussion

Flavonoide sind eine große Familie der Sekundärstoffwechselprodukte, die bei Pflanzen weit verbreitet und an vielen Prozessen beteiligt sind. Anthocyane, eine Unterklasse der Flavonoide, sind die Hauptpigmente in Blüten und Früchten, wo sie zur Anlockung von Insekten und Vögel dienen. Die Anthocyanbiosynthese ist bei vielen Pflanzenarten weitgehend erforscht. Einige Struktur- und Regulator-Gene dieses Biosynthesewegs sind bereits kloniert und ihr gewebe- und entwicklungspezifische Expression ist studiert worden (69,70). Ausführliche Untersuchungen mit isotoopenmarkierten Vorstufen gaben Aufschluss sowohl über die Bausteine der Flavonoide als auch über den biogenetischen Zusammenhang der einzelnen Flavonoidklassen. Um jedoch genaue Kenntnis über Art, Reihenfolge und Regulation der einzelnen Biosyntheseschritte zu erhalten, war es erforderlich, die dafür verantwortliche Enzyme nachzuweisen und zu charakterisieren. In den letzten Jahrzehnten wurden beachtliche Fortschritte gemacht (10). Der Einsatz von <sup>14</sup>C-markierten Substraten sowie die Verwendung von Zellsuspensionskulturen waren wesentliche Faktoren, die dazu beigetragen haben. Erst in den letzten zwanzig Jahren wurden die Zellsuspensionskulturen als Enzymquelle mehr und mehr durch Blütenblätter genetisch definierter Genotypen ersetzt (71). Dadurch konnten die vorliegenden Ergebnisse genetischer Untersuchungen gezielt für die Aufklärung der Flavonoidbiosynthese eingesetzt werden.

Die chemogenetischen und biochemischen Untersuchungen an einem breiten Pflanzenmaterial haben den für viele Pflanzengattungen gültigen, **regulären** Weg der Anthocyanbiosynthese aufgezeigt, sie haben aber auch dazu geführt, dass Ausnahmen aufgedeckt werden konnten. Sie betreffen vor allem die Art und Zahl der in Pflanzen synthetisierten Anthocyanidintypen sowie deren Dominanzverhältnisse zueinander. Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Biosynthese ungewöhnlicher bzw. komplizierter Anthocyanidin-Muster mit Hilfe gezielter enzymologischer Untersuchungen an einem chemogenetisch definierten Pflanzenmaterial. Man erwartet sich davon einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der entwicklungs- und gewebespezifischen Expression und Regulation bestimmter Flavonoidgenen und zu Fragen der Aktivität und Substratspezifität der entsprechenden Enzyme.

### Rosa-Hybriden

Die erste Pflanzengattung, die in dieser Arbeit untersucht wurde, war *Rosa hybrida*. Garten- und Wildrosen besitzen drei strukturell verschiedenen Farbstoffgruppen, und zwar Chlorophylle, Carotinoide und Flavonoide (eingeschlossen Anthocyane). Für Rosenblütenfarben sind Anthocyane bedeutsamer als Carotinoide, denn ihre Lichtabsorption umfasst einen größeren Teil des spektralen Bereichs. Analytische Untersuchungen an Anthocyanen aus Rosen begannen bereits 1915 mit der klassischen Arbeit von WILLSTÄTTER und NOLAN über die Isolierung von Cyanin aus getrockneten 'flores rosae gallicae rubae' (72).

1929 wurde zum erstenmal Pelargonidin aus der neuen, scharlachroten Sorte 'Gloria Mundi' isoliert (73), danach folgten 1961 Päonidin aus *R. rugosa* und ihren Hybriden (74). Bezeichnend ist das Fehlen von Delphinidinderivaten bei Rosen, die Grundlage für blaue Färbungen. Über systematische analytische Untersuchungen an Hunderten von Hybriden und Spezies der Rosen berichteten YOPKOI *et al.* ausführlich (75). Um so erstaunlicher ist es, dass die Enzymologie der Biosynthese der Anthocyane bei Rosen bis heute noch nicht untersucht wurde. Kein einziger Nachweis der in der Flavonoidbiosynthese beteiligten Enzyme ist bisher bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollten, falls eine erfolgreiche enzymologische Analyse gelänge, die Enzyme des Anthocyanbiosynthesewegs näher charakterisiert werden. Im Vordergrund stand die Frage, wie entstehen reine Pelargonidin- und reine Cyanidin-Typen, aber auch Mischtypen bei den Rosen. Zunächst wurden viele Rosensorten auf ihre Anthocyane geprüft, um reine Pg-, reine Cy- und Mischtypen zu identifizieren. Die Sorte 'Muttertag', die in der Literatur als reiner Pg-Typ beschrieben wurde (65), wies nach eigenen DC- und HPLC-Analysen überraschenderweise immer einen hohen Cy-Anteil auf. Eine Untersuchung der Anthocyane während der Blütenentwicklung zeigte, dass der Anthocyantyp bei 'Muttertag' im Laufe der Entwicklung sich vom Pg zu Cy verschiebt. Spektralphotometrische Untersuchungen, aber auch DC-Analysen der Blütenextrakte von 'Muttertag' zeigten, dass junge Blüten hauptsächlich Pg als Anthocyanidintyp enthalten. Dagegen weisen voll-aufgeblühte Blüten mehr Cy als Pg auf. In der Literatur findet man die Farbänderung während der Blütenentwicklung in Zusammenhang mit der Bestäubung. Eine Farbverschiebung wurde nach der Bestäubung bei einigen Mitgliedern der Fabaceae (76), Bignoniaceae (77) und Verbenaceae (78) beobachtet. In einigen Fällen sind die Farbänderungen unauffällig, da sie nur an den "Honigmalen" vorkommen (79) bzw., da sie im Ultraviolett auftreten, mit dem menschlichen Auge nicht sichtbar (80,81). Vermutlich spielt dabei Ethylen eine wesentliche Rolle (82). Leider stand auf Grund der langwierigen Untersuchungen nicht mehr genügend Blütenmaterial von 'Muttertag' zur Verfügung, um enzymologische Arbeiten bezüglich der Blütenphasenentwicklung durchzuführen.

Zur Isolierung der Flavonoidenzyme wurde zunächst mit vielfältiger Variation der am Lehrstuhl etablierten Aufarbeitungs- und Enzymassaymethoden versucht, wenigstens einige der Flavonoidenzyme bei Rosen nachzuweisen. Alle Anstrengungen blieben jedoch ohne Erfolg. Der Grund dafür stellte sich bei genaueren Analyse der Blüteninhaltsstoffe heraus. Rosenblüten enthalten einen relativ hohen Gehalt an Gerbstoffen wie Gallussäure. Diese polyphenolischen Verbindungen bilden beim Aufschluss der Zellen mit den Proteinen Komplexe und inaktivieren damit die Enzyme. Da bekanntlich Bäumen, Gehölze und Stauden ebenso durch einen hohen Gehalt an Gallotanninen gekennzeichnet sind, wurde in der Literatur nach Methoden zur Isolierung von Enzymen aus Geweben dieser Pflanzen gesucht. Die Suche ergab, dass in letzter Zeit tatsächlich Methoden entwickelt wurden, um Enzyme aus Geweben von Gehölzen zu isolieren (66). Diese Methoden basieren auf die Verwendung von Polyethylenglykol (PEG) in einer Konzentration von bis zu 1,5 % im Extraktionspuffer, um die negative Interaktion zwischen Polyphenolen und Proteinen zu minimieren. Nach Anpassung an die Verhältnisse der Rose konnte mit Hilfe dieser Extraktionsmethode die Aktivität der CHS, der FHT und der DFR in Blütenextrakten aus Rosen nachgewiesen werden. Damit waren die Voraussetzungen für weiterführende Untersuchungen geschaffen.



Die CHS akzeptierte sowohl p-Cumaroyl-CoA als auch Caffeoyl-CoA als Substrate. Ausnahmen waren die Sorten, 'Königin der Rosen', wo Anthocyane ausschließlich durch Pelargonidinderivate vertreten sind und 'Reinweiß', wo zwar keine Anthocyane gebildet werden, die jedoch - anhand der festgestellten Zwischenprodukte - ein potentieller Pelargonidin-Typ ist. In beiden Fällen akzeptierte die CHS nur p-Cumaroyl-CoA als Substrat. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, nutzt die CHS in der Regel nur p-Cumaroyl-CoA als Substrat. p-Cumaroyl-CoA wird deshalb als natürliches Substrat der CHS bezeichnet. Dies wurde bei *Matthiola incana* (83), *Antirrhinum majus* (84) und *Phaseolus vulgaris* (85) aufgezeigt. Es wurde aber auch über die Nutzung von Caffeoyl-CoA durch die CHS *in vitro* bei einigen Pflanzengattungen berichtet, z.B. bei *Dianthus caryophyllus* (14), *Verbena hybrida* (58) und *Daucus carota* (15). Beweis für die Nutzung von Caffeoyl-CoA *in vivo* wurde allerdings nur für die CHS von *Verbena hybrida* (58) und *Tulipa* (86) geliefert. Blüten von *Verbena hybrida* enthalten trotz der Abwesenheit einer messbaren F<sup>3</sup>H-Aktivität, neben Pg- auch Cyanidinderivate (58). Auf der anderen Seite kann Caffeoyl-CoA bei *Dianthus caryophyllus* als natürliches Substrat *in vivo* ausgeschlossen werden, da im Konkurrenzversuche p-Cumaroyl-CoA das exklusive Substrat ist (14).

Bei Cy- und Mischtypen der Rosen, wurde durch Konkurrenzversuchen mit beiden Substraten im Enzymassay festgestellt, dass die Substratspezifität eindeutig vom pH-Wert der CHS-Reaktion abhängt. Während bei pH-Werten um 7,6 p-Cumaroyl-CoA wesentlich besser genutzt wurde als Caffeoyl-CoA, war bei pH 6,0 Caffeoyl-CoA das bessere Substrat. Mit Caffeoyl-CoA als Substrat hatte die CHS-Reaktion bei der Sorte 'Kardinal' zwei pH-Optima. Eines bei 6,2 und das andere bei 7,4. Die Ergebnisse der Charakterisierung der CHS bei Rosen deuten auf der Anwesenheit mehrere CHS-Enzymen hin, die unterschiedliche Substratspezifität besitzen. Beweis für die Anwesenheit unterschiedlicher Formen von CHS wurde durch Southernblot- und Enzymreinigungsanalysen bei einigen Pflanzenarten erbracht, z.B. bei Sojabohne (17), Spinat (18), Karotten (19), Buchweizen (20) und sogar Rosen (87). Die Genprodukte unterscheiden sich voneinander unter anderem im Molekulargewicht und im isoelektrischen Punkt. Analyse der CHS-Genfamilien bei *Petunia* (88) und bei *Pisum* (89) ergab, dass vier CHS-Gene bei *Petunia* und drei bei *Pisum* in unterschiedlichen Geweben bzw. in verschiedenen Entwicklungsstadien exprimiert werden.

Die FHT konnte erwartungsgemäß als 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase charakterisiert werden. Tris war gegenüber KPi der bessere Enzymtestpuffer. Die FHT aus 'Kardinal' setzte Naringenin und Eriodictyol in vergleichbarem Maß zu DHK bzw. DHQ um. Eine Abhängigkeit vom pH-Wert konnte dabei nicht beobachtet werden. Das bedeutet, dass die FHT-Substratspezifität bei den Rosen anscheinend keine große Rolle für den Anthocyanidin-Typ spielt.

DFR-Präparationen aller untersuchten Linien zeigten unterschiedliche Substratspezifität für dieses Enzym. Während die DFR von 'Königin der Rosen', eine Sorte mit 100 % Pg sowohl DHK als auch DHQ als Substrate akzeptierte, nutzte die DFR von 'Crimson Glory', eine Sorte mit 100 % Cy ausschließlich DHQ als Substrat. DFR-Enzyme mit unterschiedlicher Substratspezifität sind mehrfach in der Literatur beschrieben worden.

So akzeptiert z.B. die DFR aus *Petunia hybrida* nur DHQ und DHM, aber kein DHK als Substrat. Entsprechend findet man bei Petunien keine Pelargonidinderivate (49). Auf der anderen Seite nutzt die DFR aus *Dahlia variabilis*, *Dianthus caryophyllus* und *Matthiola incana* neben DHK und DHQ auch DHM *in vitro*, obwohl keine Delphinidinderivate in den Blüten gebildet werden (16). Wie bei der CHS, kann davon ausgegangen werden, dass die DFR von einer Genfamilie exprimiert wird, die für verschiedene DFR-Enzyme mit unterschiedlicher Substratspezifität kodieren. Solche DFR-Genfamilien sind zumindest bei einigen Pflanzen bereits nachgewiesen worden (90,91,92).

Während mit der PEG-Aufarbeitungsmethode die Aktivität der löslichen Flavonoidenzyme nachweisbar waren, scheiterten alle Versuche, auch das mikrosomale, Cytochrom P450-Enzym F3`H in aktiver Form nachzuweisen. Auch bei den verschiedensten Variationen der Aufarbeitungsmethode konnte weder in Rohextrakten noch in mikrosomalen Präparationen F3`H-Aktivität nachgewiesen werden. Ein indirekter F3`H-Test durch das Besprühen der Petalen von 'Crimson Glory' mit dem F3`H-spezifischen Inhibitor Tetcyclacis ergab, im Gegensatz zu ähnlichen Experimenten bei Gerbera, keine sichtbare Farbverschiebung, was auch durch die Chromatographie bestätigt wurde. Das weist darauf hin, dass offenbar keine F3`H-Aktivität vorhanden ist. Es wurde angenommen, dass die Rosen zwar F3`H-Aktivität haben können, jedoch das Enzym unter einer intrazellulären Hemmung vorliegt. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde ein Test durchgeführt, bei dem die Wirkung der Rosenextrakte auf die aktive F3`H der Cyclamen geprüft wurde. Tatsächlich sank die F3`H-Aktivität der Cyclamen mit beiden Substraten Nar und DHK zur Hälfte, wenn ein 1:1 Enzymextrakt aus Rosen und Cyclamen im Test vorlag.

Es folgt eine Zusammenfassung der Ergebnisse zur Anthocyanbiosynthese bei Rosen:

- Die CHS-Substratspezifität, die Abwesenheit einer aktiven F3`H und die DFR-Substratspezifität sind die Hauptfaktoren, bei der Entscheidung, welches Anthocyan in Rosenblüten zur Erscheinung kommt.
- Da bei 'Reinweiß' die CHS, FHT und die DFR nachgewiesen wurden, liegt hier offenbar ein ANS-Block, der die Anthocyanidinbildung verhindert.
- Die CHS bei Pelargonidintypen kann nur p-Cumaroyl-CoA als Substrat nutzen, während bei Misch- und Cyanidintypen die CHS beide Substrate akzeptiert.
- Die F3`H konnte bei den Rosen nicht nachgewiesen werden, liegt aber höchstwahrscheinlich in inaktiver Form vor.
- Die DFR vom Pg-Typ 'Königin der Rosen' nutzt DHK und DHQ als Substrate, während die DFR vom Cy-Typ 'Crimson Glory' nur DHQ als Substrat umsetzt.
- Bei Abwesenheit einer F3`H-Aktivität spielt also die CHS-Substratspezifität bei der Entstehung von Pg-Typen eine wesentliche Rolle. DHQ kann aufgrund der CHS-Substratspezifität und des Ausfalls von F3`H nicht gebildet werden, für eine DFR, die eigentlich in der Lage wäre, DHQ umzusetzen. Deswegen kann bei Pg-Typen kein Cyanidin entstehen.

- Cy-Typen bei den Rosen verdanken dagegen ihre Entstehung der DFR-Substratspezifität. Denn hier können die CHS und die FHT zwar durch die zusätzliche Nutzung von Caffeooyl-CoA bzw. Eriodictyol den Ausfall einer F3`H-Aktivität ausgleichen, führen aber auch zur Bildung von sowohl DHQ als auch DHK. Die DFR kann jedoch nur DHQ, und nicht DHK umsetzen. Deshalb kann auch nur Cyanidin entstehen.

### **Cyclamen persicum**

Die Blütenpigmente von *Cyclamen* und ihre Vererbung sind in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts bis Mitte der sechziger Jahre sehr intensiv untersucht worden. KARRER und WIDMER gelingt es bereits 1927, aus *Cyclamen* ein Malvidinglukosid zu isolieren (93). Untersuchungen von ROBINSON und ROBINSON bestätigen das Vorkommen von Malvidin-3-Glukosid in den *Cyclamen*sorten 'Giant Crimson' und 'Vulkan' und von Päonidin-3-Pentoseglukosid in der Sorte 'Fire Fly' (71). KAPPERT (94) und WELLENSIEK *et al.* (95) finden heraus, dass die meisten der damaligen Handelssorten tetraploid waren. Da diese aber ein sehr kompliziertes Erbverhalten aufweisen und ihre Reinzüchtung relativ schwierig ist, war der erste wichtige Schritt zur Erforschung der Farbexpression in *Cyclamen*blüten die Schaffung von diploidem Ausgangsmaterial, das die entsprechenden Farbtypen des Handelsortiments als diploides Pendant enthielt. KAPPERT führte Kreuzungen und wiederholte Rückkreuzungen mit diploiden Wildformen von *Cyclamen persicum* durch, bis er schließlich über ein diploides Ausgangsmaterial verfügte, das alle Blütenfarben des Standardsortiments enthielt (94). Schließlich hat SEYFFERT (96,97) zur Erweiterung der Kenntnisse über die Vererbung der Anthocyane in *Cyclamen*blüten massiv beigetragen.

Wie sämtliche Untersuchungen zu den Pigmenten in *Cyclamen*blüten ergeben, werden keine Pelargonidinderivate gebildet. Als Ergebnis einer Diplomarbeit am Lehrstuhl, konnte in allen farbigen *Cyclamen*linien eine Kombination von vier Anthocyantypen identifiziert werden: Päonidin-, Malvidin-, Cyanidin- und Delphinidinderivate. Dabei ergibt sich durch bestimmte Konzentrationen der Pigmente zueinander die Blütenfarbe. Der häufig dunklere Basalfleck an den Petalen kann auf höhere Konzentration von methylierten Anthocyanen (Päonidin und Malvidin) zurückgeführt werden (67). Von diesen *Cyclamen*, die in dieser Diplomarbeit ausführlich auf Flavonoide geprüft worden waren, wurden einige Typen ausgewählt, die als Blütenmaterial für die enzymologische Arbeiten dienten.

Wie bei den Rosen war auch bei *Cyclamen* erstaunlicherweise bisher kein einziger Nachweis der Flavonoidenzyme bekannt. Es gab ebenfalls bei *Cyclamen* erhebliche Schwierigkeiten beim Nachweis der Flavonoidenzyme in Blütenextrakten. Mit den für viele Pflanzenarten etablierten und als bestens geeignet befundenen Aufarbeitungsmethoden war es nicht möglich, auch nur eines der Flavonoidenzyme nachzuweisen. Erst die inzwischen für Rosen ausgearbeitete Enzympräparation führte zum Erfolg. Mit dieser Aufarbeitungsmethode konnten die löslichen Enzyme CHS, CHI, FHT, DFR und FLS sowie die membrangebundenen, Cytochrom P450-Enzyme F3`H und F3`5`H nachgewiesen und zum Teil näher charakterisiert werden.

Die CHS nutzte sowohl p-Cumaroyl-CoA als auch Caffeooyl-CoA als Substrate für die Synthese des Flavonoid-Grundgerüsts. Obwohl es bei Cyclamen keinen Pelargonidin-Typ gibt, scheint allerdings auch hier p-Cumaroyl-CoA das bevorzugte Substrat zu sein. Nur bei der weißen Linie 12, die keine Anthocyane bildet, wurde durch die CHS nur p-Cumaroyl-CoA als Substrat akzeptiert. Ebenso wie bei den Rosen, kann dies als ein Hinweis auf der Anwesenheit zweier CHS-Enzyme angesehen werden. Eine CHS, die nur p-Cumaroyl-CoA - wie bei der Linie 12 - und eine CHS, die beide Substrate - wie bei der farbigen Linie 21 - umsetzen kann.

Die FHT konnte erwartungsgemäß als 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase charakterisiert werden. Wie bei den Rosen setzte das Enzym Naringenin zu Dihydrokämpferol und Eriodictyol zu Dihydroquercetin um, wobei allerdings Naringenin das bessere Substrat ist. Tris-Puffer scheint auch hier gegenüber KPi der bessere Enzymtestpuffer zu sein. Ferner war das pH-Optimum der FHT-Reaktion mit Naringenin als Substrat 7,5 und mit Eriodictyol als Substrat 6,5.

Die Ebene der Dihydroflavonole ist bei Cyclamen von besonderen Interesse, da hier vier verschiedene Enzyme, die DFR, die FLS, die F3`H und die F3`5`H um Dihydroflavonole als Substrate konkurrieren.

Die Aktivität der F3`H und der F3`5`H konnte mit Naringenin aber auch mit Dihydrokämpferol nachgewiesen werden. Die Lokalisierung in der Membran konnte auch bestätigt werden. Die Aktivität in der mikrosomalen Fraktion war vielfach höher als im Rohextrakt. Ferner zeigte die F3`H eine leichte Präferenz zu Naringenin als Substrat. In Linie 21, bei der Cyanidin-/Delphinidinderivate im Verhältnis von 8:3 vorliegen, konnte im Test F3`H-Aktivität aber keine F3`5`H-Aktivität nachgewiesen werden. Dagegen konnte bei der Linie 4, wo das Verhältnis von Cyanidin-/Delphinidinderivate 2:3 beträgt, eine F3`5`H-Aktivität gezeigt werden. Da aber die Linie 21 neben F3`H zusätzlich eine F3`5`H für die Synthese von Dp-Derivaten besitzen müsste, wird die F3`5`H-Aktivität vermutlich über eine temporäre Expression reguliert.

Die FLS wurde ebenfalls als 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase charakterisiert. Das Enzym setzte sowohl Dihydrokämpferol zu Kämpferol als auch Dihydroquercetin zu Quercetin um, wobei für die FLS-Reaktion Dihydroquercetin das bessere Substrat zu sein scheint. In der Literatur, wurde über den Nachweis von FLS bei *Matthiola incana* (39), *Petunia hybrida* (40), bei denen DHK das bevorzugte Substrat für die FLS und *Dianthus caryophyllus* (42), bei der DHK und DHQ in vergleichbarem Maß als Substrate dienen, berichtet.

Die gewebespezifische Expression der FLS wurde auch hinsichtlich der Musterbildung bei der Linie 4 untersucht. Mit Dihydrokämpferol als Substrat, zeigte die FLS-Aktivität keinen Unterschied im Basalfleck und in der Spreite. DHQ wurde leicht höher in der Spreite als im Basalfleck umgesetzt. Dies korrelierte auch mit dem Flavonolgehalt sowohl in der Spreite als auch im Basalfleck (67).

Die DFR zeigte mit dem Substrat Dihydroquercetin Enzymaktivität. Dagegen wurde Dihydrokämpferol als Substrat von der DFR der Cyclamen nicht genutzt. Dies dürfte auch die eindeutige Erklärung für das Fehlen von Pelargonidinderivaten in Cyclamen sein.

Wie bei der Petunie ist bei Cyclamen also das Fehlen von Pelargonidinderivate ebenso auf die DFR-Substratspezifität zurückzuführen. Meyer *et al.* haben aufgrund dieser Kenntnis die Petunie mit einem DFR-Gen aus Mais transformiert. Bei diesen Petunien konnten anschließend Pelargonidinderivate gebildet werden (49).

Die gewebespezifische Expression der DFR wurde hinsichtlich der Musterbildung ebenfalls geprüft. Die DFR-Aktivität mit Dihydroquercetin als Substrat war doppelt so hoch im Basalfleck als in der Spreite. Dies stand auch im Einklang mit der Tatsache, dass im Basalflecken eine höhere Konzentration an Anthocyanen als in der Spreite vorliegen (67). Die FLS-Aktivität mit Dihydroquercetin als Substrat war dagegen im Basalfleck niedriger als in der Spreite. Basalflecken könnten also dadurch entstehen, dass die DFR in diesem Gewebe sehr aktiv ist, aber auch die FLS-Aktivität schwächer als in der Spreite sein muss.

Der Nachweis der CHI war insofern wichtig, als Anfang der 90er Jahre eine gelblich blühende Cyclamen-Mutante beschrieben wurde (24), die in den Blüten Naringeninchalkon 2'-Glukosid (Isosalipurposid) akkumuliert. Ebenfalls sind bei *Callistephus chinensis*-, *Dianthus caryophyllus*-Blüten und *Petunia hybrida*-Pollen Mutanten bekannt, in denen Chalkon in den Blüten angereichert wird (21,22,23). Als Ursache wurde ein CHI-Block bei diesen Pflanzen festgestellt. Eigene Untersuchungen an den Blüten gelber Cyclamen führten nun zum gleichen Ergebnis. In den Blüten von 'Winter Sun' wird das gelbe Chalkon Isosalipurposid angereichert, weil keine CHI-Aktivität vorhanden ist. Aufgrund der spontane Isomerisierung, ist dennoch der Ausfall von CHI nicht ausreichend, um die Anthocyanbildung völlig zu unterbinden. Deshalb wurde die CHS, die FHT und die DFR bei der gleichen gelben Mutante geprüft. Es stellte sich dabei heraus, dass 'Winter Sun' sowohl CHS- als auch FHT- und DFR-Aktivitäten besitzen. Es muss also einen zusätzlichen Ausfall bei der ANS in Blüten gelber Cyclamen geben, der das Fehlen der Anthocyane erklärt.

Die Ergebnisse bei den Cyclamen können folgendermassen zusammengefasst werden:

- Die Abwesenheit des Pelargonidin-Typs bei Cyclamen ist auf das Fehlen einer DFR, die Dihydrokämpferol als Substrat nutzen kann, zurückzuführen.
- Für die Bildung von Cyanidin- bzw. Delphinidinderivate ist hauptsächlich die F3`H bzw. die F3`5`H verantwortlich, da p-Cumaroyl-CoA für die CHS bei Cyclamen das natürliche Substrat zu sein scheint.
- Die gelbe Cyclamen-Mutante 'Winter Sun' besitzt keine CHI-Aktivität und folglich wird das gelbe Isosalipurposid anreichert. Ein weiterer Block im Biosyntheseweg ist mitverantwortlich, dass keine Anthocyane bei diesen Cyclamen gebildet werden können. Eigene Tests belegen jedoch, dass erwartungsgemäß die CHS aber auch die FHT und die DFR aktiv sind. Vermutlich liegt ein ANS-Block bei 'Winter Sun' vor, der die Anthocyanbildung unterbindet.

- Musterbildung in dunkleren Basalflecken und helleren Spreiten basiert auf der einen Seite auf einer erhöhten DFR-Aktivität und einer schwächeren FLS-Aktivität im Basalflecken im Gegensatz zu der Aktivität in der Spreite auf der anderen Seite.

### **Euphorbia pulcherrima**

Schon im Jahr 1960 beschrieb STEWART das Farbspektrum der roten Brakteen von Weihnachtssterne (98). Danach variiert es zum einen von einem leuchtenden bis matten Rot, zum anderen von einem bläulichem bis orangen Rot. ASEN (99) und BERGMANN (100) untersuchten verschiedene rote und rosa Weihnachtssterne. Beide berichteten von 2 verschiedenen Anthocyanotypen: nämlich Pelargonidin- und Cyanidinderivaten. STEWART *et al.* stellten bei der Untersuchung einiger Sportfamilien eine Verschiebung des Cyanidin/Pelargonidin-Verhältnisses beim Übergang von Rot zu Rosa fest (101). Demnach enthalten rosa Weihnachtssterne relativ mehr Cyanidinderivate. In der vorliegenden Arbeit wurde die Sorte 'Angelika' verwendet, die ein Cy/Pg Verhältnis von weniger als eins aufweist (68).

Auch bei Weihnachtssternen lag bisher kein einziger Nachweis der in der Flavonoid-Biosynthese beteiligten Enzyme vor. So musste zunächst versucht werden, die Flavonoidenzyme in funktionellem Zustand zu isolieren. Aber wie bei den Rosen und Cyclamen, führten die für vielen Pflanzenarten etablierten Aufarbeitungsmethoden nicht zum erhofften Erfolg. Erst die für die Rosen und Cyclamen optimierte Aufarbeitungsmethode hat auch bei Weihnachtssternen dazu geführt, erstmalig Flavonoidenzyme nachzuweisen.

Die CHS bei Weihnachtssternen akzeptierte sowohl p-Cumaroyl-CoA als auch Caffeooyl-CoA als Substrate. Die CHS-Reaktion zeigte ein pH-Optimum bei 7,0 für beide Substrate. Im Konkurrenzversuch, bei dem beide Verbindungen in äquimolaren Mengen vorhanden waren, bevorzugte die CHS immer p-Cumaroyl-CoA als Substrat, auch wenn bei niedrigeren pH-Werten Caffeooyl-CoA besser akzeptiert wurde als bei höheren pH-Werten. Die CHS bei Weihnachtssternen folgte damit den für vielen Pflanzenarten beobachteten Anthocyanbiosyntheseweg (16), d.h. p-Cumaroyl-CoA scheint auch hier das natürliche Substrat für die CHS zu sein.

Die FHT-Aktivität bei Weihnachtssternen konnte nur mit Naringenin als Substrat nachgewiesen werden. Es wurde kein Umsatz bei der FHT-Reaktion mit Eriodictyol als Substrat festgestellt. Da die FHT-Reaktion mit Naringenin, das natürliche Substrat bei den meisten FHT-Enzymen, eine sehr niedrige Aktivität aufwies, ist es nicht auszuschließen, dass Eriodictyol *in vivo* bei Weihnachtssternen ebenfalls als Substrat für die FHT dienen kann, ein Umsatz zu DHQ aber nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

Interessanterweise führten FHT-Enzymtests mit Proteinextrakten, die mit Hilfe von PEG aufgearbeitet wurden, nur zur Bildung von Dihydrokämpferol als Produkt einer FHT-Aktivität. Wenn man dagegen kein PEG bei der Aufarbeitung zusetzte, erhielt man - auch ohne NADPH-Zusatz - sowohl Eriodictyol als auch Dihydroquercetin als Produkte einer kombinierten FHT- und F3'H-Aktivität. Offenbar bewirkt PEG durch eine negative Interaktion mit der Membran, dass die F3'H-Aktivität ausfällt.

Die F3`H von Weihnachtsternen wurde mit Naringenin und Dihydrokämpferol nachgewiesen. Wie bei Cyclamen, scheint Naringenin auch hier das bevorzugte Substrat für die F3`H zu sein.

Die DFR von Weihnachtssternen konnte erfolgreich mit Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin als Substrate nachgewiesen werden. Im Enzymtest erhielt man mit DHK als Substrat ein Nebenprodukt, das auf der Höhe von LCy auf der DC-Platte lag. Höchstwahrscheinlich wurde Dihydrokämpferol durch eine starke F3`H-Aktivität - da NADPH im Test vorlag - zu DHQ hydroxyliert, das weiter durch die DFR zu LCy umgesetzt wurde.

Anthocyanbiosynthese bei Weihnachtssternen kann wie folgt zusammengefasst werden:

- Die DFR spielt anscheinend bei der Entstehung von Mischtypen in den Brakteen eine wesentliche Rolle.
- Dihydrokämpferol und Dihydroquercetin können gut durch die DFR in die entsprechende Leukoanthocyanidine umgesetzt werden.
- Obwohl die CHS beide Substrate akzeptierte, ist dennoch p-Cumaroyl-CoA sowohl bei niedrigen als bei hohen pH-Werten das bessere Substrat.
- Dafür besitzen Weihnachtsterne eine aktive F3`H, die sowohl Naringenin als auch Dihydrokämpferol umsetzen kann, und damit ausreichende Menge an Cyanidin-Vorstufen für die DFR zur Verfügung stellt.

### **Anagallis**

Zwei Anagallissorten wurden in die Arbeit einbezogen. Eine blau-blühende *Anagallis monelli* der Sorte 'Sky Lover' und eine rotorange-blühende *Anagallis tenella* der Sorte 'Sunrise'. Die DC- und spektralphotometrische Untersuchung der Blüteninhaltsstoffe ergab, dass 'Sky Lover' ausschließlich Malvidinderivate und 'Sunrise' ausschließlich Pelargonidinderivate in den Blüten enthält. Es war zu klären, wie diese Anthocyanidintypen zustande kommen. Da aber bisher kein Nachweis der Flavonoidenzyme bei Anagallis vorliegt, musste erst versucht werden, die Enzyme erfolgreich nachzuweisen. Zunächst wurde wiederum mit der etablierten Aufarbeitungsmethoden versucht, die Enzyme im aktiven Zustand zu extrahieren. Dies führte aber zu keinem Erfolg. Auch die verschiedenste Variationen bei der Aufarbeitungsbedingungen brachten keinen Durchbruch. Erst mit der für Rosen, Cyclamen und Weihnachtssterne optimierten Aufarbeitungsmethode konnten die löslichen Enzyme CHS, FHT und die DFR nachgewiesen werden.

Die CHS wurde bei beiden Sorten nachgewiesen. Die CHS akzeptierte sowohl p-Cumaroyl-CoA als auch Caffeyoyl-CoA als Substrat. Im Vergleich der CHS-Substratspezifität der beiden Sorten, wurde kein Unterschied festgestellt. Bei beiden Sorten war p-Cumaroyl-CoA das bessere Substrat.

Die FHT-Aktivität von *Anagallis* konnte auch mit beiden Substraten Naringenin und Eriodictyol nachgewiesen werden. Naringenin scheint jedoch auch hier eindeutig das bessere Substrat zu sein. Zwischen der beiden Sorten 'Sky Lover' und 'Sunrise' konnte kein Unterschied bezüglich der Substratspezifität der FHT festgestellt werden.

Die DFR von *Anagallis* dürfte somit eine besondere Rolle bei der Entscheidung zur Bildung bestimmter Anthocyan Typen spielen. DFR von *Anagallis* konnte erfolgreich nachgewiesen werden. Ein Vergleich der DFR-Substratspezifität der beiden Sorten ergab, dass bei 'Sky Lover', die Sorte mit fast ausschließlich Malvidinderivaten in den Blüten, Dihydroquercetin, nicht aber Dihydrokämpferol als Substrat von der DFR umgesetzt werden konnte. Hingegen hatte die DFR bei 'Sunrise', die Sorte mit fast ausschließlich Pelargonidinderivaten in den Blüten, sowohl Dihydroquercetin als auch Dihydrokämpferol als Substrate akzeptierte.

Diese ungewöhnliche Substratspezifität der DFR bei *Anagallis* dürfte der Grund der unterschiedlichen Anthocyanmuster bei beiden *Anagallis*sorten sein. Vermutlich spielt aber auch die F3'5'H für die unterschiedliche Anthocyanmuster bei *Anagallis* eine wesentliche Rolle. Bei 'Sunrise', kann davon ausgegangen werden, dass die F3'5'H völlig inaktiv vorliegt und entsprechend nur Pg-Vorstufen gebildet werden können. 'Sky Lover', muss dagegen eine sehr aktive F3'5'H haben, die fast alle Vorstufen in die entsprechende 3',5' hydroxylierten Form umwandelt und damit ausreichende Menge an Dp-Vorstufen synthetisieren kann. Alle Anstrengungen auch die F3'5'H bei *Anagallis* nachzuweisen, blieb jedoch ohne Erfolg.

### **Papaver orientale**

Abschließend wurden auch Blüten von *Papaver orientale* (Mohn) in die vorliegende Arbeit einbezogen. Die scharlachroten Blüten von *Papaver orientale* besitzen sehr dunkelrote Basalflecken. Eigene DC- und spektralphotometrische Untersuchungen der Blüteninhaltsstoffe ergaben, dass die Spreiten hauptsächlich Pelargonidin- und nur wenig Cyanidinderivate, während die Basalflecken ausschließlich Cyanidinderivate enthalten. Deshalb war aufzuklären, wie diese unterschiedlichen Anthocyanmuster gebildet werden. Im Vordergrund stand die Substratspezifität der CHS und der DFR.

Die CHS konnte sowohl in der Spreite als auch im Basalfleck mit p-Cumaroyl-CoA und Caffeoyl-CoA als Substrate nachgewiesen werden, wobei p-Cumaroyl-CoA eindeutig das bessere Substrat ist. Die CHS bei Mohn folgt also dem allgemein gültigen Weg der Anthocyanbiosynthese. Das gleiche galt auch für die FHT. Naringenin scheint das natürliche Substrat sowohl in der Spreite als auch im Basalfleck bei Mohn zu sein. Die DFR-Substratspezifität erklärte weitgehend die unterschiedliche Anthocyanmuster bei Mohn. In der Spreite, wo fast ausschließlich Pelargonidinderivate vorliegen, setzte die DFR im Test kaum Dihydroquercetin zu Leukocyanidin um, dafür nutzte sie Dihydrokämpferol als Substrat zur Bildung von Leukopelargonidin. Im Basalfleck hingegen, wo ausschließlich Cyanidinderivate vertreten sind, akzeptierte die DFR kaum DHK als Substrat, dafür hauptsächlich DHQ zur Bildung von Leukocyanidin. Die DFR-Substratspezifität scheint also der Hauptfaktor bei der Musterbildung in Blüten von *Papaver orientale* zu sein.



## 6. Literatur

1. Smith, H. (1972). In "Phytochrome" (K. Mitrakos and W. Shropshire, eds), s. 433. Academic Press, NY and London.
2. Robberecht, R. and Caldwell, M. M. (1978): Leaf epidermal transmittance of UV-radiation and its implication for plant sensitivity to UV-radiation induced injury. **Oecologia** 32: 277-287.
3. Grisebach, H. und Ebel, J. (1978): Phytoalexine, chemische Abwehrstoffe höherer Pflanzen?. **Angew. Chemie** 90: 668-681.
4. Harborne, J. B. (1988): The flavonoids: Advances in Research. Chapman and Hall, London.
5. Sprengel, K. (1793). In "Das entdeckte Geheimnis der Natur in Bau and in der Befruchtung der Blumen". Berlin: Vieweg. (In Englisch von Haase, P. (1996): In "Lloyd DG, Barrett SCH, eds. Floral biology. NY: Chapman & Hall, 3-43).
6. Daumer, K. (1958). Blumenfarben, wie sie die Bienen sehen. **Z. Vergl. Physiologie** 38: 413–478.
7. Eisner, T., Eisner, M., Hypio, D., Aneshansley, D. and Silberglied, R. E. (1973). Plant Taxonomy: UV patterns of flowers visible as fluorescent patterns in pressed Herbarium specimens. **Science** 179: 486–487.
8. Thompson, W. R. (1972). Chemical ecology: components of the hairpencil secretion of *Daunus chrysippus*. **Diss. Abstr. Int. B.** 33: 1062.
9. Van Doom, W. G. (1997). Effects of pollination on floral attraction and longevity **J. Exp. Bot.** 48 (314): 1615 – 1622.
10. Grisebach, H. und Braz, W. (1969): Biochemie der Flavonoide. **Naturwiss.** 56: 538-544.
11. Kreuzaler, F. and Hahlbrock, K. (1972): Enzymatic synthesis of the aromatic compounds in higher plants: formation of naringenin (5,7,4'-trihydroxyflavanone) from p-cumaroyl-CoA and malonyl-CoA. **FEBS Lett.** 28: 69-72.

12. Kreuzaler, F. and Hahlbrock, K. (1975): Enzymatic synthesis of the aromatic ring from acetate units. Partial purification and some properties of flavone synthase from cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. **Eur. J. Biochem.** 56: 205-213.
13. Kreuzaler, F. and Hahlbrock, K. (1975): Enzymatic synthesis of the aromatic compounds in higher plants. **Arch. Biochem. Biophys.** 169: 205-213.
14. Spribille, R. and Forkmann, G. (1982): Chalcone synthase and hydroxylation of flavonoids in 3'-position with enzyme preparation from flowers of *Dianthus caryophyllus* L. (carnation). **Planta** 155: 176-182.
15. Hinderer, W., Noe, W. and Seitz, U. (1983): Differentiation of metabolic pathways in the umbel of *Daucus carota*. **Phytochem.** 22: 2417-2420.
16. Heller, W. and Forkmann, G. (1994) In "The flavonoids: advances in research since 1986", (ed. Harborne, J. B.), Chapman and Hall, London, pp. 499.
17. Welle, R. and Grisebach, H. (1987): Purification and properties of chalcone synthase from cell suspension cultures of soybean. **Z. Naturforsch.** 42c: 1200-1206.
18. Beerhues, L. and Wiermann, R. (1998): Chalcone synthase from spinach (*Spinacia oleracea* L.): purification, peptide patterns and immunological properties of different forms. **Planta** 173: 532-543.
19. Gleitz, J. and Seitz, U. (1989): Induction of chalcone synthase in cell suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L. ssp. *sativus*) by UV light: evidence for two different forms of chalcone synthase. **Planta** 179: 323-330.
20. Reeves, S. G. and Hrazdina, G. (1989): Isoforms of chalcone synthase in the biosynthesis of anthocyanins in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* M.). **Plant Physiol.** 89: 54, Abstract No. 322.
21. Kuhn, B. Forkmann, G. and Seyffert, W. (1978): Genetic control of chalcone-isomerase activity in *Callistephus chinensis*. **Planta** 138: 199-203.
22. Forkmann, G. and Kuhn, B. (1979): Genetic control of chalcone isomerase activity in anthers of *Petunia hybrida*. **Planta** 144: 189-192.
23. Forkmann, G. and Danglmayer, B. (1980): Genetic control of chalcone isomerase activity in flowers of *Dianthus caryophyllus*. **Biochem. Genet.** 18: 519-527.

24. Takamura, T., Tomihama, T. and Miyajima, I. (1995): Inheritance of yellow-flowered characteristics and yellow pigments in diploid cyclamen. (*Cyclamen persicum* Mill.) cultivars. **Scientia Hortic.** (Amsterdam) 64 (1-2): 55-63.
25. van Tunen, A. J. and Mol, J. N. M. (1987): A novel purification procedure of chalcone isomerase from *Petunia hybrida* and the use of antibodies to characterise the Po-mutation. **Arch. Biochem. Biophys.** 257: 85-91.
26. Bedener, R. A. and Hadcock, J. R. (1988): Purification and characterisation of chalcone isomerase from soybeans. **J. Biol. Biochem.** 263: 9582-9588.
27. Dixon, R. A., Blyden, E. R., Robbins, M. P., van Tunen, A. J. and Mol, J. N. (1988): Comparative biochemistry of chalcone isomerases. **Phytochem.** 27: 2801-2808.
28. Forkmann, G., Heller, W. and Grisebach, H. (1980): Anthocyanin biosynthesis in flowers of *Matthiola incana*, flavanone 3- and 3'-hydroxylases. **Z. Naturforsch.** 35c: 691-695.
29. Britsch, L., Heller, W. and Grisebach, H. (1981): Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol to flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley. **Z. Naturforsch.** 36c: 742-750.
30. Forkmann, G. and Stotz, G. (1981): Genetic control of flavanone 3-hydroxylase and flavonoid 3'-hydroxylase in *Anthirrhinum majus*. **Z. Naturforsch.** 36c: 411-416.
31. Froemel, S., de Valming, P., Stotz, G., Wiering, H., Forkmann, G. and Schram, A. M. (1985): Genetic and biochemical studies on the conversion of the flavanones to dihydroflavonols in flowers of *Petunia hybrida*. **Theor. Appl. Genet.** 70: 561-568.
32. Britsch, L. and Grisebach, H. (1986): Purification and characterisation of 2S-flavanone 3-hydroxylase from *Petunia hybrida*. **Eur. J. Biochem.** 156: 569-577.
33. Britsch, L. (1990): Purification of flavanone 3  $\beta$ -hydroxylase from *Petunia hybrida*: antibody preparation and characterisation of a chemogenetically defined mutant. **Arch. Biochem. Biophys.** 276: 348.
34. Britsch, L., Ruhnau, B. and Forkmann, G. (1992): Molecular cloning, sequence analysis and *in vitro* Expression of Flavanone 3  $\beta$ -hydroxylase from *Petunia hybrida*. **J. Biol. Biochem.** 267: 5280-5387.

35. Stich, K., Ebermann, R. und Forkmann, G. (1988): Einfluss Cytochrom P-450-spezifischer Inhibitoren auf die Aktivität von Flavonoid-3'-Hydroxylase and Flavonsynthase II bei verschiedenen Pflanzen. **Phyton** (Austria) 28: 237.
36. Omura, T. and Sato, R. (1964): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. **J. Biol. Biochem.** 239: 2370-2378.
37. West, C. A. (1980): In "The Biochemistry of Plants", Bd. 2 (ed. Davis), Academic Press, NY: 317-364.
38. Rademacher, W., Fritsch, H., Graebe, J. E., Sauter, H. and Jung, J. (1987): Tetracyclis and Triazole-type plant growth retardant: Their influence on the biosynthesis of gibberellins and other metabolic processes. **Pestic. Sci.** 21: 241-252.
39. Spribille, R. and Forkmann, G. (1984): Conversion of dihydroflavonols to flavonols with enzyme extracts from flower buds of *Matthiola incana* R. Br. **Z. Naturforsch.** 39c: 714-719.
40. Forkmann, G., de Vlaming, P., Spribille, R., Wiering, H., and Schram, A. W. (1986): Genetic and biochemical studies on the conversion of dihydroflavonols to flavonols in flowers of *Petunia hybrida*. **Z. Naturforsch.** 41c: 179-186.
41. Beerhues, L., Forkmann, G., Schöpker, H., Stotz, G. and Wiermann, R. (1989): Flavanone 3-hydroxylase and dihydroflavonol oxygenase activities in anthers of *Tulipa*. The significance of the tapetum fraction in flavonoid metabolism. **Plant Physiol.** 133: 743-749.
42. Stich, K., Eidenberger, T., Wurst, F. and Forkmann, G. (1992): Flavonol synthase activity and the regulation of flavonol and anthocyanin biosynthesis during flower development in *Dianthus caryophyllus* L. (Carnation). **Z. Naturforsch.** 47c: 553-560.
43. Stafford, H. A. and Lester, H. H. (1982). Enzymatic and nonenzymatic reduction of (+)-dihydroquercetin to its 3,4-diol. **Plant Physiol.** 70: 695.
44. Heller, W. and Forkmann, G. (1988) In "The flavonoids: advances in research since 1980", (ed. Harborne, J. B.), Chapman and Hall, London, pp. 399-422.
45. Forkmann, G. and Ruhnau, B. (1987): Distinct substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase from flowers of *Petunia hybrida*. **Z. Naturforsch.** 35c: 691-695.

46. Ruhnau, B. and Forkmann, G. (1988): Flavan-3,4-diols in anthocyanin biosynthesis, enzymatic formation with flower extracts from *Callistephus chinensis*. **Phytochem.** 27 (4): 1035-1039.
47. Fischer, D., Stich, K., Britsch, L. and Grisebach, H. (1988): Purification and characterisation of (+) dihydroflavonol (3-hydroxyflavanone) 4-reductase from flowers of *Dahlia variabilis*. **Arch. Biochem. Biophys.** 264: 40-47.
48. Forkmann, G. (1989): Gene-enzyme relations and genetic manipulation of anthocyanin biosynthesis in flowering plants. In: Styles, D. E., Gavazzi, G. A. and Racchi, M. L. (eds) "The Genetics of Flavonoids" pp. 49-60, Proceedings of a post congress meeting of the XVI International Congress of Genetics. Edizioni Unicopli, Milan.
49. Meyer, P., Heidman, I., Forkmann, G. and Saedler, H. (1987): A new petunia flower colour generated by the transformation of a mutant with a maize gene. **Nature** 330: 677-678.
50. Heller, W., Britsch, L., Forkmann, G. and Grisebach, H. (1985): Leucoanthocyanidins as intermediates in anthocyanidin biosynthesis in flowers of *Matthiola incana* R. Br. **Planta** 163: 191-196.
51. Saito, K., Kobayashi, M., Gong, Z., Tanaka, Y. and Yamazaki, M. (1999): Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: molecular cloning and functional expression of cDNA from a red forma of *Perilla frutescens*. **Plant J.** 17(2): 181-189.
52. Larson, R. L. and Coe, E. H. (1968): Enzymatic action of the Bz anthocyanin factor in maize. Proc. XII Int. Congr. Genet., Tokyo, Japan.
53. Seyffert, W. (1982): Beiträge zur Genetik und Enzymologie der Flavonoide. **Biol. Zentralbl.** 101: 465-483.
54. Teusch, M., Forkmann, G. and Seyffert, W. (1986): UDP-glucose-anthocyanidin / flavonol-3-O-glucosyltransferase in enzyme preparations from flower extracts of genetically defined lines of *Matthiola incana* R. Br. **Z. Naturforsch.** 41c: 699.
55. Gerats, A. G. M., Wallroth, M., Donker-Koopman, W., Groot, S. P. C. and Schram, A. W. (1983): The genetic control of the enzyme UDP-glucose:3-O-flavonoid-glucosyltransferase in flowers of *Petunia hybrida*. **Theor. Appl. Genet.** 70: 245-247.
56. Forkmann, G. (1994) In "The flavonoids: advances in research since 1986", (ed. Harborne, J. B.), Chapman and Hall, London, pp. 537.

57. Stotz, G., Spribille, R. und Forkmann, G. (1983): Jahrestagung der Gesellschaft für Genetik in Bayreuth. Poster Abstract.
58. Stotz, G., Spribille, R. and Forkmann, G. (1984): Flavonoid biosynthesis in flowers of *Verbena hybrida*. **Plant Physiol.** 116: 173-183.
59. Stotz, G., De Vlaming, P., Wiering, H., Schram, A. W. and Forkmann, G. (1985): Genetic and biochemical studies of flavonoid 3'-hydroxylation in flowers of *Petunia hybrida*. **Theor. Appl. Genet.** 70: 300-305.
60. Harborne, J. B. (1967): In "Comparative Biochemistry of the Flavonoids" Academic Press, London.
61. Marbry, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. B. (1970): In "The Systematic Identification of Flavonoids" Springer Verlag, NY.
62. Hahlbrock, K., Wong, E., Schill, L. and Griesbach, H. (1970): Comparison of chalcone-flavanone isomerase heterozymes and isoenzymes. **Phytochem.** 9: 949.
63. Moustafa, E. and Wong, E. (1967): Purification and properties of chalcone-flavanone isomerase from soybean seed. **Phytochem.** 6: 625.
64. Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
65. Biolley, J-P, Jay, M. and Viricel, M-R (1994): Flavonoid diversity and metabolism in 100 *Rosa x hybrida* cultivars. **Phytochem.** 35: 413-419.
66. Dellus, V., Heller, W., Sandermann, Jr. H and Scalber, A. (1997): Dihydroflavonol 4-Reductase activity in lignocellulosic Tissues. **Phytochem.** 45: 1415-1418.
67. Plate, Friedrike (1995): Biosynthese der Blütenfarbstoffe in *Cyclamen persicum* Mill. –Perspektiven für die Neuzüchtung. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, TUM Weihenstephan.
68. Fuchs, Klaus-Adelbert (1995): Flavonoidbiosynthese in Brakteen von *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, TUM Weihenstephan.
69. Koes, R. E., Quattocchio, F. and Mol, J. N. M. (1994): The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. **Bioassays** 16: 123-132.

70. Holton, T. A. and Cornish, E. C. (1995): Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. **Plant Cell** 7: 1071-1083.
71. Forkmann, G. (1991): Flavonoids as flower pigments: The formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. **Plant Breeding** 106: 1-26.
72. Willstätter, W. und Nolan, T. J. (1915), **J. Liebig. Ann. Chem.** 408: 1.
73. Robinson, G. M. and Robinson, R. (1934): A survey of anthocyanins. IV. **Biochemical J.** 28: 1712-1720.
74. Harborne, J. (1961): The anthocyanins of roses. Occurrence of Paeonin. **Experientia** 17: 72.
75. Yokoi, M., Saito, N., Kawabata, Y., Suzuki, S. and Hirabayashi, H. (1979), **Chiba Daigaku Engeigakubu Gakujitsu Hokoku** 1.
76. Dunn, D. B. (1956): The breeding system of *Lupinus* group Micranthi. **American Midland Naturalist** 55: 443-472.
77. Stephenson, A. G. and Thomas, W. W. (1977): Diurnal and nocturnal pollination of *Catalpa speciosa* (Bignoniaceae). **Sys. Bot.** 2: 191-8.
78. Estes J. R, and Brown, L. S. (1973): Entomophilous, interfloral pollination in *Phyla incisa*. **Am. J. Bot.** 60: 228-230.
79. Gori, D. F. (1983): Post-pollination phenomena and adaptive floral changes. In: Jones, C. E. and Little R. J., eds. Handbook of experimental pollination biology. New York: Van Nostrand Reinhold, 31-49.
80. Jones, C. E. and Buchmann, S. L. (1974): Ultraviolet floral patterns as functional orientation cues in hymenopterous pollination systems. **Animal Behaviour** 22: 481-485.
81. Silberglied, R. E. (1979): Communication in the ultraviolet. **Ann. Rev. Ecol. Sys.** 10: 373-398.
82. Van Doorn, W. G. (1997): Effects of pollination on floral attraction and longevity. **J. Exp. Bot.** 48 (314): 1615-1622.
83. Spribille, R. and Forkmann, G. (1981): Genetic control of chalcon synthase activity in flowers of *Matthiola incana* R. Br. **Z. Naturforsch.** 36c: 619-624.

84. Spribille, R. and Forkmann, G. (1982): Genetic control of chalcone synthase activity in flowers of *Antirrhinum majus*. **Phytochem.** 21: 2231-2234.
85. Whitehead, J. M. and Dixon, R. A. (1983): Chalcone synthase from cell suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*. **Biochem. Biophys. Acta** 747: 298-303.
86. Sütffeld, R. and Wiermann, R. (1981): Purification of chalcone synthase from Tulip anthers and comparison with the synthase from *Cosmos* petals. **Z. Naturforsch.** 36c: 30.
87. Byung-Whan Min (1994): Klonierung flavonoidspezifischer Gene aus cDNA-Bibliotheken verschiedener Blütenpflanzen und die Charakterisierung ihrer Expression in einem genetisch definierten Pflanzenmaterial. Dissertation an der TU-München Weihenstephan 1994.
88. Koes, R. E., Spelt, C. E., van den Elzen, P. J. and Mol, N. M. (1989): Cloning and molecular characterisation of the chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida*. **Gene** 81: 245-257.
89. Harker, C. L., Ellis, T. H. E. and Coen, E. S. (1990): Identification and genetic regulation of the chalcone synthase multigene family in pea. **Plant Cell** 2: 185-194.
90. Beld, M., Martin, C., Huits, H., Stuitje, A. R. and Gerats, A. G. M. (1989): Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: partial characterisation of dihydroflavonol-4-reductase. **Plant Mol. Biol.** 13: 491-502.
91. Helariutta, Y., Elomaa, P., Kotilainen, M., Seppänen, P. and Teeri, T. H. (1993): Cloning of cDNA coding for dihydroflavonol-4-reductase (DFR) and characterisation of *dfr* expression in the corollas of *Gerbera hybrida* var. Regina (Compositae). **Plant Mol. Biol.** 22: 183-193.
92. Moyano, E., Portero-Robles, I., Medina-Escobar, N., Valpuesta, V., Muñoz-Blanco, J. and Caballero, J. L. (1998): A fruit-specific putative dihydroflavonol 4-reductase gene is differentially expressed in strawberry during the ripening process. **Plant Physiol.** 117: 711-716.
93. Karrer, P. und Widmer, R. (1927): Untersuchungen über Pflanzenfarbstoffe, I. Über die Konstitution einiger Anthocyanidine. **Helv. Chem. Acta.** 10: 5-23.
94. Kappert, H. (1941): Die Bedeutung der Polyploidie in der Cyclamenzüchtung. **Züchter** 13: 106-114.



- 
95. Wellensiek, S. J., Doorenbos, J. and De Haan, I. (1950): Systematik, Cytologie en Genetica van Cyclamen. **Meded. Dir. Tuinb.** 13: 608-619.
96. Seyffert, W. (1955): Über die Wirkung von Blütenfarbgenen bei *Cyclamen*. **Z. indukt. Abst. Vererbungsl.** 87: 311-334.
97. Seyffert, W. (1955): Die Genetik der Cyclamenfarben. Rep. XIVth Int. Hortic. Congr. The Hague-Scheveningen: 929-937.
98. Stewart, R. N. (1960): Inheritance of bract colour in poinsettia. **J. Hered.** 51 (4): 175-177.
99. Asen, S. (1958): Anthocyanins in bracts of *Euphorbia pulcherrima* as revealed by paper chromatographic and spectrophotometric methods. **Plant Physiol.** 33: 14-17.
100. Bergmann, F. (1962): Über den Nachweis zwischenzelliger Genwirkungen (Partnerinduktion) bei der Pigmentierung in den Brakteen der Periklinalchimäre *Euphorbia pulcherrima* Willd. "Eckes Rosa". **Biol. Zentralbl.** 81: 469-503.
101. Stewart, R. N. and Arisumi, T. (1966): Genetic and histogenetic determination of pink bract colour in poinsettia. **J. Hered.** 57: 217-220.

# Zusammenfassung

Eine Klasse der Flavonoide sind die Anthocyane. Sie bedingen alle Farbtöne vom Orange über Rot und Violett bis zum Blau in Blüten, Früchten sowie auch in Blättern und Wurzeln der Pflanzen. Man spricht von drei Hauptanthocyanidinen, dem Pelargonidin, dem Cyanidin und dem Delphinidin, die sich noch durch weitere Modifizierungen zu anderen Pigmenten verwandeln lassen, z.B. zu Päonidin (Cyanidin-3`-Methylester) oder Malvidin (Delphinidin-3`,5`-Dimethylester). Durch die Wirkung einzelner oder unterschiedlicher Anthocyane, die häufig in Copigmentierung mit anderen Flavonoiden auftreten, entsteht die Blütenfarbe. Jahrzehntelange Untersuchungen zur Anthocyanbiosynthese erlaubten nicht nur die Aufklärung allgemein gültiger Regeln, sondern führten auch zur Aufdeckung einiger Besonderheiten. Ziel der Arbeit war die Aufklärung der Biosynthese ungewöhnlicher bzw. komplizierter Anthocyanidin-Muster mit Hilfe gezielter enzymologischer Untersuchungen an Rosen, Cyclamen, Weihnachtssternen, Anagallis und Mohn. Bis auf Mohn waren bisher keine Nachweise von Flavonoidenzymen bei diesen Pflanzen bekannt. Deshalb musste zunächst versucht werden, zu diesen Nachweisen zu gelangen.

Leider konnte hier mit den etablierten und für viele Pflanzenarten geeigneten Aufarbeitungsmethoden keinen Erfolg erzielt werden. Auch die verschiedenste Variationen dieser Methoden brachten keinen Durchbruch. Der Grund dafür stellte sich bei genaueren Analyse der Blüteninhaltsstoffe dieser Pflanzengattungen heraus. Ein hoher Gehalt an Gallotanninen war der Grund, dass die Isolierung der Enzyme in funktionellem Zustand gescheitert war. Diese polyphenolische Verbindungen bilden offenbar beim Aufschluss der Zellen ein Komplex mit den Proteinen und inaktivieren damit die Enzyme. Die Suche in der Literatur ergab, dass in letzter Zeit eine Methode zur Isolierung von Enzymen aus Gehölzen - die ebenfalls durch einen hohen Gehalt an diesen Verbindungen gekennzeichnet sind - entwickelt wurde. Nach Anpassung dieser Methode an die Verhältnisse der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pflanzen, konnten auch hier erstmalig Flavonoidenzyme nachgewiesen und hinsichtlich ihrer Substratspezifität charakterisiert werden.

Bei Rosen konnte festgestellt werden, dass reine Pg-Typen dadurch entstehen, dass die CHS nur p-Cumaroyl-CoA als Substrat nutzt und die F3`H inaktiv ist. Während bei reinen Cy-Typen die CHS neben dem natürlichen Substrat p-Cumaroyl-CoA auch Caffeooyl-CoA verstärkt nutzt aber die DFR nur DHQ umsetzen kann. Bei Cyclamen stand sowohl die Abwesenheit von Pg-Derivaten als auch die Bildung von dunklen Basalflecken in den Blüten im Vordergrund. Das Fehlen von Pg-Derivaten wird offenkundig dadurch verursacht, dass die DFR kein DHK als Substrat akzeptiert. Die Musterbildung in helleren Spreiten und dunkleren Basalflecken ist auf einer erhöhten DFR-Aktivität im Basalfleck gegenüber der in der Spreite zurückzuführen. Parallel dazu wurde eine erhöhte FLS-Aktivität in der Spreite gegenüber der im Basalfleck beobachtet.

Ferner wurde eine gelbe Cyclamen-Mutante untersucht, die Isosalipurposid in den Blüten anreichert. Als Grund dafür konnte ein Ausfall der CHI-Aktivität nachgewiesen werden. In Brakteen der Weihnachtssternen tritt immer Pg- mit Cy-Derivaten auf. Dabei spielt die DFR-Substratspezifität eine besondere Rolle. Die DFR setzte DHK und DHQ in vergleichbarem Maß zu LPg bzw. LCy um.

Bei Anagallis wurden zwei Pflanzen der orangen Sorte *A. tenella* 'Sunrise' und der blauen Sorte *A. monelli* 'Sky Lover' enzymologisch untersucht. Da keine F3`H-Aktivität gemessen werden konnte, wurden nur die CHS-, die FHT- und die DFR-Substratspezifität bei den zwei Anagallis-Typen verglichen. Die Substratspezifität der CHS bzw. der FHT verhielten sich gleich bei beiden Typen. Die DFR des orangen Pg-Typs nutzte neben DHK auch DHQ, während bei dem blauen Mv-Typ nur DHQ. Bei Mohn wurde der immer auftretende dunkel-rote Basalfleck bei *P. orientale*, wo ausschließlich Cy-Derivate auftreten, gegenüber der orangen Spreite, wo hauptsächlich Pg- mit etwas Cy-Derivaten vorkommen bezüglich der Substratspezifität der verschiedenen Enzymen untersucht. Es stellte sich heraus, dass im Basalfleck die DFR hauptsächlich DHQ als Substrat akzeptiert. In der Spreite hingegen hatte die DFR fast ausschließlich DHK umgesetzt.

# Abstract

Anthocyanins, one class of flavonoid pigments, are responsible for orange, red, purple and blue shades in flowers, fruits, leaves and roots of plants. There are three main anthocyanins: pelargonidin, cyanidin and delphinidin, which can be transformed through further modification into other pigments, for e.g. paeonidin (cyanidin 3'-methylester) or malvidin (delphinidin 3'-dimethylester). Flower colour arises upon the influence of single or various anthocyanins, which usually co-occur with other flavonoids in what is called as "copigmentation". Extensive research for many decades in the biosynthesis of anthocyanins permitted not only the clearing-up of generally valid rules, but led also to uncovering some unusual features. They concern in the first place the type and number of the anthocyanins synthesised in plants as well as their dominance conditions to each other. Aim of this work was the clearing-up of the biosynthesis of uncommon or complex anthocyanin patterns with the help of enzymological tools on petals of roses, cyclamen, poinsettias, anagallis and mohn. With the exception of mohn, there were no proof of flavonoid enzymes upto date in any of these plants. Therefore, it was first tried to come to successful isolation of flavonoid enzymes in these plants.

Unfortunately it was not possible to reach this goal with the well known extraction methods, which are successfully used for many other plant varieties. Also trying various variations in these methods did not produce any breakthrough. With a more exact analysis of the content of petals of these plants which indicates a relatively high level of polyphenols, the reason for unsuccessful isolation of flavonoid enzymes turned out to be that obviously tannins form complexes after the disruption of cells with proteins and in this way inactivating the enzymes. An extraction method was therefore necessary, that minimizes or prevents this negative interaction. Searching in literature for methods with that purpose led to the field of trees biochemistry, which are also characterised by high levels of polyphenols. After adjustment of a method for extracting enzymes from oak to conditions of the plants used in this work, it was possible for the first time to demonstrate flavonoid enzyme activities in these plants.

In roses, it has been shown that lines with only Pg- derivatives in their petals originate because the CHS accepts only p-cumaroyl-CoA as a substrate, in the meantime there was no active F3'H in these petals. On the other hand lines with only Cy-derivatives arise because the CHS uses beside p-cumaroyl-CoA, the natural substrate, also caffeoil-CoA, but the DFR accepts only DHQ. In Cyclamen it was important to answer two questions: absence of Pg-derivatives in all lines and the formation of dark eyes in petals of some lines. The first question could be clearly answered through the unusual DFR-substrate specificity. DFR of cyclamen accepts no DHK at all. The formation of dark eyes turned to be a result of metabolising DHQ by the DFR in this tissue with a double rate as it does in the flag. Moreover the FLS-activity was lower with the same substrate in the eye than in the flag.

A yellow cyclamen mutant which accumulates isosailpurposid in the petals has been also examined. It has been shown that the reason for the accumulation of this chalcone is a block in the CHI. One find in bracts of poinsettias always a mix of Pg- and Cy-derivatives. The reason for this uncommon feature is obviously the equal consumption rate of both DHK and DHQ by the DFR in the bracts.

With anagallis a comparison between a line with only Pg-derivatives in the petals and another having only Mv-derivatives has shown that there were no difference between the two lines with the CHS and the FHT. F3`5`H could not be isolated. The DFR of the Pg-line accepted beside DHK also DHQ, whereas the DFR of the Mv-line accepted no DHK at all. *P. orientale* is a case of unusual dominance of Pg- over Cy-synthesis as well. The deep dark eye in the petal of this line contains only Cy-derivatives, where in the flag there are mainly Pg- and little Cy-derivatives. Comparison of activities of the enzymes involved has revealed that the DFR in the eye-tissue uses mainly DHQ, where in the flag-tissue mainly DHK as a substrate. Differences in the CHS or in the FHT have not been found. As with anagallis F3`H could not unfortunately be proven.

# Danksagung

Bei Gott soll und möchte ich mich sehr bedanken. Einfach für alles. Denn fange ich an die Situationen aufzulisten, wo Er – nur Er - neben mir stand, denke ich, wird kaum Platz übrig bleiben, wo ich die Doktorarbeit weiterschreiben kann.

Bei meinen Eltern möchte ich mich vom tiefsten Herzen dafür bedanken, dass sie sehr viel Geduld während meines langen Aufenthalts in Deutschland gezeigt haben. Ich weiß es sehr zu schätzen. Ich möchte Ihnen auch sehr danken, mir gezeigt zu haben, wie man viele Probleme im Leben, sowohl vermeiden als auch schmerzloser lösen kann.

Bei all meinen Geschwistern und ihren Familien in Ägypten möchte ich mich auch sehr bedanken für ihre Zärtlichkeit und die Wärme, die sie mir nicht nur durch das Telefon immer gegeben haben. Besonders meiner Schwester Frau Dr. B. Elsherif, gilt meine tiefste Anerkennung, ohne Sie wäre ich niemals in Deutschland. Ihre seelische und finanzielle Hilfe waren nicht nur am Anfang unersetzlich für meine Einreise, sondern auch zwischendrin massiv entscheidend für die Beendigung des ganzen Studiums. Vielen vielen Dank. Diese Doktorarbeit ist Ihnen gewidmet. Aber auch meiner Schwester und zweiten Mutter Frau R. Elsherif gilt mein herzlichster Dank für die große Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. Gert Forkmann kann ich mich nicht gut genug bedanken, für die interessante Aufgabestellung, die engagierte Betreuung der Arbeit und nicht zuletzt für sein Geduld und fast väterliche Sorge in schweren Zeiten.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Wolfgang Horn möchte ich mich für das liebevolle Lesen des Manuskripts und die hilfreichen Anmerkungen sehr bedanken.

Bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Zierpflanzenbau an der TU München-Weihenstephan möchte ich mich sehr bedanken, insbesondere Frau Look, die immer bei den wichtigen Terminen nicht nur ein sehr gutes Gedächtnis bewiesen hat, besonders auch bei allen Mitarbeitern des Versuchsbetriebs für die professionelle Pflege aller Pflanzen. Auch bei Florian möchte ich ein dickes Dankeschön sagen für das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung bei EDV-Problemen.

Bei allen Freunden und Freundinnen hier in Deutschland, die mich dauerhaft mit ihren wunderbaren Art, Lebensgeschichten und Unterstützung im Laufe der Jahren geheilt, bereichert und nicht zuletzt sehr stark unterstützt haben. Danke vom Herzen.

# Acknowledgement

I should and I want to thank Allah, just for everything. Since if I start counting the situations, where He – and only He - has supported and cared for me, I think I wouldn't have space enough to end up writing my thesis.

I want to thank my parents from the deepest of my heart, for their never-ending patience during my long stay in Germany. I know that you sacrificed a lot just to give me a chance to improve my career through the PhD. Moreover I want to thank you for showing me how to avoid or to painless get over troubles in life. I hope I would never disappoint you.

I want to thank all my sisters and brothers and their families in Egypt, who always have given me warmness and tenderness through the wires along my living abroad. Special thanks to my sister Mrs. Dr. B. Elsherif, without you I would never be in Germany. Your emotional and financial support was not only at the beginning indispensable, but also in-between was decisive in completing my post studies in Germany. Thank you very much. I dedicate this PhD to you. Also special thanks to my sister and second mother Mrs. R. Elsherif for the great support.

I can not show enough gratefulness and respect to Mr. Prof. Dr. Gert Forkmann, for giving me this interesting subject, for his support during my work and not at last for his patience and almost paternal care in hard times.

Special thanks to Mr. Prof. Dr. Dr. Wolfgang Horn for the critical reading of this manuscript and the helpful notes.

I want to thank all of my colleges in the department of ornamental plant breeding at the technical university in Munich-Weihenstephan. Especially our secretary Mrs. Look who not only proved a strong memory by very important deadlines. I want also to thank all colleges at our greenhouses for their professional caring for all plants. Also great thanks to Florian for the good vibrations.

I want to thank all of my friends in Germany, who cured, enriched and helped me a lot through their manner, life stories and support. Thanks from the heart.

# Lebenslauf

12.5.1965: geboren in Kairo als Sohn von Omar Elsherif und Z. Abdel-Magid.

1970-1976: Grundschule in Kairo und in Saudi Arabien.

1976-1979: Mittlere Schule in Saudi Arabien und in Kairo.

1979-1982: Gymnasium in Kairo - Abitur im Mai 1982.

1982-1986: Studium der Biologie an der Universität Kairo.

Mai 1986: B.Sc. Abschluss mit Note "sehr gut".

1986-1987: Militärdienst in Ägypten.

Sep 1988: Einreise in die Bundesrepublik.

Juni 1989: PND (Prüfung zum Nachweis deutscher Sprache).

März 1990: Anerkennung vom B.Sc. als Vordiplom der Biologie an der LMU.

1990-1992: Hauptstudium der Biologie an der LMU München.

1992-1993: Diplomarbeit am Max Planck Institut für Biochemie - Martinsried  
"Durchflußzytometrische Untersuchung der frühen Prozesse der Apoptose in T-Lymphozyten".

Nov 1993: Diplomabschluss der Biologie an der LMU mit Note 1,9.

1996-1999: Promotionsstudium an der technischen Universität München.

- **Veröffentlichungen:**

Elsherif, T., Kahle, H., Klingel, S., Ganesh, S. and Valet, G. (1994): Flow cytometric demonstration of early functional changes in human T-cells induced to apoptosis by x-irradiation or cortisone. **J. Anal. Cell. Pathology** Vol. 6: 185-317. Abstracts of the 3rd ESACP Congress, Grenoble - France 1994.

Elsherif, T., Kahle, H., Klingel, S., Ganesh, S. and Valet, G. (1994): Early functional changes in human T-cells induced to apoptosis by X-irradiation or cortisone. **Cytometry** Suppl.7,p.25.

Hassenpflug, R., Elsherif, T. and Forkmann, G. (1998): Polyphenolics as interfering compounds in ornamental plant characterisation. Poster in the 19th international congress of plant breeding, Angers - France 1998.



# C.V.

12.5.1965: born in Cairo as a Son of Mr. Omar Elsherif and Mrs. Z. Abdel-Magid.

1970-1976: primary school in Cairo and in Saudi Arabia.

1976-1979: preparatory school in Saudi Arabia and in Cairo.

1979-1982: secondary school in Cairo - GCE on may 1982.

1982-2986: study of biology at the Cairo university.

May 1986: B.Sc. degree with note "very good".

1986-1987: military service in Egypt.

Sep 1988: entry into the federal republic of Germany.

June 1989: PND5 (exam for the proof of german language).

Mars 1990: qualification of the B.Sc. as Vordiplom of biology at the Ludwig Maximilian University (LMU) in Munich.

1990-1992: study of biology (Hauptdiplom) at the LMU.

1992-1993: Thesis (diploma) at Max Planck institute for biochemistry - Martinsried "analysis of the early biochemical changes of apoptosis in T-lymphocytes using flow cytometry".

Nov 1993: Diploma of biology at the LMU with note 1,9.

1996-1999: Ph.D. study at the technical university (TU) in Munich.

- **Publications:**

Elsherif, T., Kahle, H., Klingel, S., Ganesh, S. and Valet, G. (1994): Flow cytometric demonstration of early functional changes in human T-cells induced to apoptosis by x-irradiation or cortisone. **J. Anal. Cell. Pathology** Vol. 6: 185-317. Abstracts of the 3rd ESACP Congress, Grenoble - France 1994.

Elsherif, T., Kahle, H., Klingel, S., Ganesh, S. and Valet, G. (1994): Early functional changes in human T-cells induced to apoptosis by X-irradiation or cortisone. **Cytometry** Suppl.7,p.25.

Hassenpflug, R., Elsherif, T. and Forkmann, G. (1998): Polyphenolics as interfering compounds in ornamental plant characterisation. Poster in the 19th international congress of plant breeding, Angers - France 1998.

Was ist das Schwerste von allem? Was dir das Leichteste dünkt:  
mit den Augen zusehen, was vor den Augen Dir liegt.

(Xenien, Goethe)

ما هو الأصعب على الاطلاق؟ والذي يبدو الأسهل لك :  
أن ترى بعينيك . ما هو أمام عينيك  
جونه

What is the most difficult of all? That which seems easiest to you:  
to see with your eyes, what is in front of your eyes.

(Xenien, Goethe)