

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

# Funktionelle Charakterisierung von Glycosyltransferasen der Erdbeerfrucht (*Fragaria x ananassa*)

Markus Grießer

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

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Engel  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Wilfried Schwab  
2. Univ.-Prof. Dr. Gert Forkmann  
3. Univ.-Prof. Dr. Peter Schieberle

Die Dissertation wurde am 20.12.2006 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum  
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 12.03.2007  
angenommen.

*But this beauty serves merely as a guide to birds and beasts  
in order that the fruit may be devoured and the manured seeds disseminated.*

Charles Darwin

**DANKSAGUNG**

Die vorliegende Arbeit wurde vom 1. März 2003 bis zum 31. August 2006 am Fachgebiet Biomolekulare Lebensmitteltechnologie der Technischen Universität München angefertigt. Herrn Prof. Wilfried Schwab danke ich für die Überlassung des Themas, die kontinuierliche wissenschaftliche Betreuung, das entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit, mich in den Niederlanden und in Spanien molekularbiologisch weiterzubilden.

Prof. Juan Munoz-Blanco und Dr. Mari Luz Bellido bin ich dankbar für die Möglichkeit, die Genexpressionsstudien an der Universität Córdoba (Spanien) durchzuführen und für die Überlassung von Sequenzen aus cDNA Bibliotheken. Beide haben für diese Arbeit auch bisher unveröffentlichte Daten zur Verfügung gestellt. *Muchas gracias por todo!*

Dr. Asaph Aharoni von Plant Research International in Wageningen (Niederlande) gilt mein herzlicher Dank für die komprimierte Einführung in die Welt der Molekularbiologie und die Bereitstellung von drei Glycosyltransferase-Klonen.

Dr. Thomas Hoffmann danke ich für seine Unterstützung bei den Experimenten zur RNA-Interferenz und der statistischen Auswertung. Barbara Fink und Robert Kurtzer gilt mein herzlicher Dank für die stets hervorragende technische Assistenz. Constanze Raasch und Zhen Yang danke ich für ihre engagierte Mitarbeit im Rahmen von Studienarbeiten. Dr. Thilo Fischer vom Lehrstuhl für Zierpflanzenbau gilt mein Dank für die Bereitstellung von Quercetin-7-glucosid als analytischem Standard.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Fachgebiets Biomolekulare Lebensmitteltechnologie danke ich herzlich für die stets ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre, die zahlreichen fachfremden Aktivitäten und ihre vielfältige Unterstützung im Laboralltag!

Der degussa. AG bin ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und die hervorragenden Arbeitsbedingungen zu Dank verpflichtet.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>3</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Pflanzliche Glycosyltransferasen des Sekundärstoffwechsels.....</b>	<b>5</b>
1.1.1 <i>Glycosyltransferasen</i> .....	5
1.1.1.1 Überblick und Einteilung.....	5
1.1.1.2 Grundlegende Eigenschaften .....	5
1.1.1.3 Katalysierte Reaktion .....	6
1.1.1.4 Konsensussequenz (PSPG-Box) .....	7
1.1.1.5 Struktur und Mechanismus.....	7
1.1.2 <i>Strategien zur Untersuchung pflanzlicher Glycosyltransferasen</i> ....	10
1.1.2.1 Biochemische <i>in vitro</i> Charakterisierung .....	10
1.1.2.2 Vollständige Sequenzierung pflanzlicher Genome .....	11
1.1.2.3 Funktionelle <i>in vivo</i> Charakterisierung.....	12
1.1.3 <i>Funktionen von Glycosyltransferasen</i> .....	12
1.1.3.1 Regulation der zellulären Homöostasis .....	12
1.1.3.2 Biosynthese von Sekundärmetaboliten .....	13
1.1.3.3 Beteiligung in der Pflanzenabwehr .....	17
1.1.3.4 Regulation von Pflanzenhormonen .....	19
1.1.4 <i>Anwendungsmöglichkeiten pflanzlicher Glycosyltransferasen</i> .....	20
1.1.4.1 Biokatalyse .....	20
1.1.4.2 <i>Metabolic Engineering</i> in Pflanzen .....	22
<b>1.2 Die Erdbeere.....</b>	<b>23</b>
1.2.1 <i>Botanische Sicht</i> .....	23
1.2.1.1 Arten und Sorten .....	23
1.2.1.2 Morphologie und Anatomie.....	23
1.2.1.3 Fruchtwachstum und Fruchtreifung .....	24
1.2.2 <i>Inhaltsstoffe der Erdbeerfrucht</i> .....	26
1.2.2.1 Primärstoffwechsel und Aromastoffe.....	26
1.2.2.2 Phenylpropanstoffwechsel und Flavonoid-Biosynthese .....	27
1.2.2.3 Anthocyane .....	27
1.2.2.4 Flavonole.....	29

---

1.2.2.5	Hydroxycimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren .....	30
1.2.2.6	Ernährungswissenschaftliche Aspekte .....	31
1.2.3	<i>Untersuchungen zum Sekundärstoffwechsel reifender Erdbeerfrüchte</i> .....	32
1.2.3.1	Enzymisolierung und Bestimmung von Enzymaktivitäten .....	32
1.2.3.2	Untersuchungen zur Genexpression .....	33
1.2.3.3	Heterologe Expression rekombinanter Proteine .....	34
1.2.3.4	Herabregulation von Genen <i>in planta</i> .....	34
<b>1.3</b>	<b>Aufgabenstellung</b> .....	<b>35</b>
<b>2</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>37</b>
<b>2.1</b>	<b>Volllängensequenzen und bioinformatische Charakterisierung</b> ..	<b>37</b>
2.1.1	<i>Isolierung der Glycosyltransferase-Sequenzen</i> .....	37
2.1.2	<i>3' Rapid Amplification of cDNA Ends (3' RACE)</i> .....	37
2.1.3	<i>5' Rapid Amplification of cDNA Ends (5' RACE)</i> .....	38
2.1.4	<i>Übersicht und Klonierung der offenen Leserahmen</i> .....	39
2.1.5	<i>Klonierung der genomischen Sequenzen</i> .....	40
2.1.6	<i>Alignment und Nachweis der PSPG-Box</i> .....	41
2.1.7	<i>Phylogenetische Analyse</i> .....	42
<b>2.2</b>	<b><i>Fragaria x ananassa</i> Glycosyltransferase 1 (FaGT1)</b> .....	<b>46</b>
2.2.1	<i>Genexpressionsanalyse</i> .....	46
2.2.2	<i>Heterologe Expression und biochemische Charakterisierung</i> .....	47
2.2.2.1	Partielle Aufreinigung und Nachweis rekombinanter FaGT1 ...	47
2.2.2.2	Substratspezifität der rekombinanten FaGT1 .....	48
2.2.2.3	Identifizierung der Reaktionsprodukte .....	49
2.2.2.4	Optimierung der Reaktionsbedingungen .....	50
2.2.2.5	Bevorzugte Substrate <i>in vitro</i> .....	51
2.2.2.6	Ermittlung der kinetischen Parameter .....	52
2.2.3	<i>RNAi-induzierte Herabregulation von FaGT1</i> .....	53
2.2.3.1	Konstruktion von pBI- <i>FaGT1i</i> und Infiltration .....	53
2.2.3.2	Genexpressionsanalyse durch semi-quantitative PCR .....	54
2.2.3.3	Phänotyp der Früchte mit verringerter <i>FaGT1</i> -Expression .....	55
2.2.3.4	Auswirkungen auf den Sekundärstoffwechsel .....	55
<b>2.3</b>	<b><i>Fragaria x ananassa</i> Glycosyltransferase 3 &amp; 4 (FaGT3 &amp; 4)</b> .....	<b>57</b>
2.3.1	<i>Genexpressionsanalyse</i> .....	57
2.3.1.1	Fruchtspezifische und reifekorrelierte Expression .....	57

---

2.3.1.2	Hormonelle Kontrolle und wundinduzierte Expression .....	58
2.3.2	<i>Heterologe Expression</i> .....	59
2.3.2.1	Nachweis der rekombinanten Enzyme .....	59
2.3.2.2	Aktivitätsassays .....	60
<b>2.4</b>	<b><i>Fragaria x ananassa Glycosyltransferase 5 (FaGT5)</i></b> .....	<b>60</b>
2.4.1	<i>Genexpressionsanalyse</i> .....	60
2.4.2	<i>Heterologe Expression und biochemische Charakterisierung</i> .....	62
2.4.2.1	Aufreinigung und Nachweis rekombinanter FaGT5.....	62
2.4.2.2	Substratspezifität der rekombinanten FaGT5 .....	63
2.4.2.3	Identifizierung der Reaktionsprodukte .....	63
2.4.2.4	Optimierung der Reaktionsbedingungen .....	64
2.4.2.5	Bevorzugte Substrate <i>in vitro</i> .....	65
2.4.2.6	Ermittlung der kinetischen Parameter .....	66
<b>2.5</b>	<b><i>Fragaria x ananassa Glycosyltransferase 6 &amp; 7 (FaGT6 &amp; 7)</i></b> .....	<b>67</b>
2.5.1	<i>Genexpressionsanalyse</i> .....	67
2.5.1.1	Expression in Achänen und Blütenboden.....	67
2.5.1.2	Hormonelle Kontrolle .....	68
2.5.2	<i>Heterologe Expression und biochemische Charakterisierung</i> .....	69
2.5.2.1	Aufreinigung und Nachweis der rekombinanten Enzyme .....	69
2.5.2.2	Substratspezifität der rekombinanten Enzyme .....	69
2.5.2.3	Identifizierung der Reaktionsprodukte .....	71
2.5.2.4	Optimierung der Reaktionsbedingungen .....	73
2.5.2.5	Bevorzugte Substrate <i>in vitro</i> .....	75
2.5.2.6	Ermittlung der kinetischen Parameter .....	76
2.5.3	<i>Glucosylierung von Xenobiotika in planta</i> .....	77
<b>3</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>79</b>
<b>3.1</b>	<b><i>Fragaria x ananassa Glycosyltransferase 1 (FaGT1)</i></b> .....	<b>79</b>
3.1.1	<i>Sequenz und phylogenetische Analyse</i> .....	79
3.1.2	<i>Genexpressionsprofile</i> .....	79
3.1.2.1	Reifekorrelierte Expression und hormonelle Kontrolle.....	79
3.1.2.2	Bedeutung der FaGT1 in der Flavonoid-Biosynthese.....	80
3.1.3	<i>Biochemische Charakterisierung</i> .....	81
3.1.3.1	Substrat- und Regiospezifität .....	81
3.1.3.2	Bevorzugte Substrate und kinetische Parameter .....	82
3.1.4	<i>RNAi-induzierte Herabregulation von FaGT1</i> .....	83

---

3.1.4.1	Bedeutung und Methodik .....	83
3.1.4.2	Phänotyp der injizierten Früchte.....	83
3.1.4.3	Funktionen von FaGT1 <i>in planta</i> .....	84
<b>3.2</b>	<b><i>Fragaria x ananassa</i> Glycosyltransferase 3 &amp; 4 (FaGT3 &amp; 4).....</b>	<b>85</b>
3.2.1	<i>Sequenz und phylogenetische Analyse</i> .....	85
3.2.2	<i>Genexpressionsprofile</i> .....	86
3.2.2.1	Reifekorrelierte Expression und hormonelle Kontrolle.....	86
3.2.2.2	Wundinduzierte Expression.....	87
3.2.3	<i>Heterologe Expression</i> .....	87
3.2.3.1	Probleme bei der heterologen Expression in <i>Escherichia coli</i> ..	87
3.2.3.2	Mögliche Akzeptor-Substrate und Zucker-Donoren.....	88
<b>3.3</b>	<b><i>Fragaria x ananassa</i> Glycosyltransferase 5 (FaGT5).....</b>	<b>90</b>
3.3.1	<i>Sequenz und phylogenetische Analyse</i> .....	90
3.3.2	<i>Genexpressionsprofile</i> .....	90
3.3.3	<i>Biochemische Charakterisierung</i> .....	91
3.3.3.1	Aufreinigung des GST-Fusionsproteins.....	91
3.3.3.2	Substratspezifität und Identifizierung der Reaktionsprodukte..	91
3.3.3.3	Bevorzugte Substrate und kinetische Parameter .....	92
3.3.4	<i>Mögliche Funktionen in planta</i> .....	93
3.3.4.1	Potentielle Substrate <i>in planta</i> .....	93
3.3.4.2	Bedeutung der aktivierten Glucose-Ester.....	93
<b>3.4</b>	<b><i>Fragaria x ananassa</i> Glycosyltransferase 6 &amp; 7 (FaGT6 &amp; 7).....</b>	<b>94</b>
3.4.1	<i>Sequenz und phylogenetische Analyse</i> .....	94
3.4.2	<i>Genexpressionsprofile</i> .....	95
3.4.2.1	Expression in Achänen und Blütenboden.....	95
3.4.2.2	Induktion der Genexpression.....	96
3.4.3	<i>Biochemische Charakterisierung</i> .....	96
3.4.3.1	Substratspezifität und Identifizierung der Reaktionsprodukte..	96
3.4.3.2	Bevorzugte Substrate und kinetische Parameter .....	98
3.4.4	<i>Mögliche Funktionen in planta</i> .....	99
3.4.4.1	Biosynthese von Flavonolglucosiden .....	99
3.4.4.2	Glucosylierung von Fremdstoffen.....	100
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>102</b>
<b>4.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>102</b>
4.1.1	<i>Chemikalien</i> .....	102

---

4.1.2	<i>Pflanzen</i> .....	102
4.1.3	<i>Bakterienstämme</i> .....	102
4.1.4	<i>Vektoren</i> .....	103
4.1.5	<i>Enzyme</i> .....	103
4.1.6	<i>Primer</i> .....	104
4.1.7	<i>Kommerzielle Kits</i> .....	105
4.1.8	<i>Medien, Puffer und sonstige Lösungen</i> .....	106
<b>4.2</b>	<b>Geräte</b> .....	<b>110</b>
4.2.1	<i>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)</i> .....	110
4.2.2	<i>Flüssigkeitschromatographie-Elektrospray-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS)</i> .....	110
4.2.3	<i>Flüssigszintillationszähler (LSC)</i> .....	111
4.2.4	<i>Sonstige Geräte</i> .....	111
4.2.5	<i>Software und Internetressourcen</i> .....	112
<b>4.3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>112</b>
4.3.1	<i>Grundlegende molekularbiologische Arbeitstechniken</i> .....	112
4.3.1.1	Isolierung von RNA .....	112
4.3.1.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	113
4.3.1.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	114
4.3.1.4	Klonieren von PCR-Produkten .....	114
4.3.1.5	Restriktionsverdau und Auffüllen klebriger Enden.....	115
4.3.1.6	Vektor-Dephosphorylierung und Ligation klebriger Enden ....	116
4.3.1.7	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen.....	116
4.3.1.8	Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	116
4.3.1.9	Kolonie-PCR und Isolierung von Plasmid-DNA.....	117
4.3.1.10	DNA-Fällung und Sequenzierung.....	117
4.3.1.11	Anlegen von Glycerinkulturen.....	117
4.3.2	<i>Klonierung der Vollängensequenzen</i> .....	117
4.3.2.1	Reverse Transkription (RT).....	117
4.3.2.2	<i>3' Rapid Amplification of cDNA Ends (3' RACE)</i> .....	118
4.3.2.3	<i>5' Rapid Amplification of cDNA Ends (5' RACE)</i> .....	118
4.3.2.4	Klonierung der offenen Leserahmen .....	120
4.3.2.5	Klonierung in den Expressionsvektor .....	121
4.3.2.6	Klonierung der genomischen Sequenzen.....	121
4.3.3	<i>Genexpressionsanalyse</i> .....	121



---

4.3.3.1	Pflanzenmaterial und Auxin-Behandlung .....	121
4.3.3.2	DNase-Behandlung und reverse Transkription (RT) .....	122
4.3.3.3	Quantitative PCR (qPCR).....	122
4.3.3.4	Datenauswertung .....	123
4.3.4	<i>Heterologe Expression und biochemische Charakterisierung</i> .....	124
4.3.4.1	Expression der rekombinanten Enzyme .....	124
4.3.4.2	Zellaufschluss.....	124
4.3.4.3	His-Tag Affinitätschromatographie .....	124
4.3.4.4	GST Affinitätschromatographie .....	125
4.3.4.5	Proteinbestimmung nach Bradford .....	125
4.3.4.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	125
4.3.4.7	Western Blot.....	126
4.3.4.8	Enzymassays mit LC-ESI-MS Detektion .....	126
4.3.4.9	Enzymassays mit Radiodetektion.....	127
4.3.5	<i>Experimente zur Funktionalität in planta</i> .....	128
4.3.5.1	Injektion von Substratlösungen .....	128
4.3.5.2	Konstruktion von pBI- <i>FaGT1i</i> .....	128
4.3.5.3	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	129
4.3.5.4	Transfektion der Erdbeeren mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	129
4.3.5.5	Genexpressionsanalyse der transfizierten Früchte .....	130
4.3.5.6	Metabolitenanalyse der transfizierten Früchte.....	131
<b>5</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>132</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>156</b>
	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>157</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

4CL	<i>p</i> -Cumarsäure:CoA Ligase
A	Adenylat
A <sub>260</sub>	Absorption bei 260 nm
ABA	<i>Abscisic acid</i> (Abscisinsäure)
Abb.	Abbildung
ANS	Anthocyanidin-Synthase
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Cytidylat
C <sub>t</sub>	<i>Threshold cycle</i>
C3H	<i>p</i> -Cumarsäure-3-Hydroxylase
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase
CAD	Zimtalkohol-Dehydrogenase
CAZy	<i>carbohydrate-active enzyme</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CHI	Chalcon-Isomerase
CHS	Chalcon-Synthase
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cv.	Cultivar
DAD	Diodenarraydetektor
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DBP	<i>DNA Binding Protein</i> (DNA-Bindungsprotein)
DCA	3,4-Dichloranilin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFR	Dihydroflavonol-4-Reduktase
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat

---

DON	Desoxynivalenol
DPM	<i>Disintegrations per minute</i> (Zerfälle pro Minute)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i>
F	<i>Forward</i> (Vorwärts)
F3H	Flavonoid-3-Hydroxylase
F3'H	Flavonoid-3'-Hydroxylase
FaGT	<i>Fragaria x ananassa</i> Glycosyltransferase
FaRT	<i>Fragaria x ananassa</i> Rhamnosyltransferase
FHT	Flavanon-3-Hydroxylase
FLS	Flavonol-Synthase
G	Guanylat
Glc	Glucose
GST	Glutathion S-Transferase
GT	Glycosyltransferase
HDMF	4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3-(2H)-furanon
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
ICC	<i>Ion Count Control</i>
ihp	<i>Intron-hairpin</i>
INSP	<i>Interspacer</i> 26S-18S RNA
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
kb	Kilobase(n)
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Luria-Bertani
LC-ESI-MS	Flüssigkeitschromatographie-Elektrospray-Massenspektrometrie
LSC	<i>Liquid Scintillation Counter</i> (Flüssigszintillationszähler)
<i>m</i>	<i>meta</i>
MES	2-Morpholinethansulfonsäure
MOPS	3-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA (Boten-RNA)
MS	Massenspektrometrie
MS-Salze	<i>Murashige and Skoog Basal Salt Mixture</i>
NAA	1-Naphthalinessigsäure

---

NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
<i>o</i>	<i>ortho</i>
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
OMT	O-Methyltransferase
ORF	<i>Open reading frame</i> (offener Leserahmen)
<i>p</i>	<i>para</i>
P-3-glc	Pelargonidin-3-glucosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PATH	Phenylacetothiohydroximat
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PSPG	<i>Plant Secondary Product Glycosyltransferase</i>
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
R	<i>reverse</i> (Rückwärts)
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris buffered saline</i> (Trisgepufferte Salzlösung)
TCP	2,4,5-Trichlorphenol
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
THP	Tris(hydroxypropyl)phosphin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UDPG	Uridindiphosphat-D-Glucose
UGT	UDP-Glycosyltransferase
UV	Ultraviolett
$V_{max}$	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit

**Tabelle 1:** Ein- und Dreibuchstabencodes der Aminosäuren.

<b>Aminosäure</b>	<b>Dreibuchstabencode</b>	<b>Einbuchstabencode</b>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## ZUSAMMENFASSUNG

Pflanzliche Glycosyltransferasen katalysieren die Übertragung eines aktivierten Zuckermoleküls auf eine Vielzahl verschiedener Verbindungen. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Biosynthese von Sekundärmetaboliten, sind an pflanzlichen Abwehrmechanismen beteiligt und regulieren die Konzentrationen wichtiger Pflanzenhormone. Biotechnologisch können Glycosyltransferasen zur Produktion physiologisch bedeutender Glycoside eingesetzt werden.

Die Sequenzierung der Genome von *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* hat ergeben, dass Pflanzen große Glycosyltransferase-Familien enthalten. Auch in cDNA-Bibliotheken der Erdbeere (*Fragaria x ananassa*), die sich in den letzten Jahren zu einem Modellorganismus für die Untersuchung der nicht-klimakterischen Fruchtreifung entwickelt hat, wurden verschiedene potentielle Glycosyltransferase-Sequenzen identifiziert.

Um deren Funktion aufzuklären, wurden die vollständigen offenen Leserahmen der entsprechenden Enzyme kloniert und heterolog in *Escherichia coli* exprimiert. Die rekombinanten Proteine sind mit Affinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend biochemisch charakterisiert worden. Die Expression der Glycosyltransferasen während der Fruchtreifung und in verschiedenen Geweben wurde mit quantitativer PCR untersucht und mit den Konzentrationen verschiedener Metabolite verglichen. Um die potentielle Funktion der FaGT1 *in planta* zu bestätigen, wurden durch RNA-Interferenz (RNAi) Früchte mit verringerter FaGT1-Expression generiert und massenspektrometrisch untersucht.

FaGT1 bildet *in vitro* bevorzugt Cyanidin- und Pelargonidin-3-glucosid, die wichtigsten in der Erdbeerfrucht vorkommenden Anthocyane. Die reifekorrelierte Genexpression, die parallel zur Akkumulation der Anthocyane verläuft, deutet auf eine Beteiligung an der Anthocyan-Biosynthese *in planta* hin. Dies konnte durch RNAi-induzierte Herabregulation der FaGT1 bestätigt werden. Die transfizierten Früchte wiesen zwar nur einen leicht veränderten Phänotyp, aber signifikant reduzierte Anthocyan-Konzentrationen auf. Zusätzlich war auch die Konzentration von Kämpferol-3-glucosid, nicht aber von Quercetin-3-glucosid deutlich erniedrigt.

FaGT3 und FaGT4 werden reifekorreliert und fruchtspezifisch exprimiert. Die Genexpression von FaGT4 wird durch das Pflanzenhormon Auxin negativ kon-

trolliert, während *FaGT3* vermutlich durch Verwundung induziert wird. Für die heterolog exprimierten Proteine konnte *in vitro* keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Die phylogenetische Analyse deutet darauf hin, dass Flavonole beziehungsweise Anthocyanidin-3-glucoside Substrate der *FaGT3* und *FaGT4* sein könnten.

*FaGT5* wird ebenfalls reifekorreliert exprimiert und durch das Pflanzenhormon Auxin negativ reguliert. Das rekombinante Enzym bildet *in vitro* Glucose-Ester von Benzoe- und Zimtsäure und deren hydroxylierten Derivaten. *FaGT5* könnte auch *in planta* an der Biosynthese der Hydroxyzimtsäureglucose-Ester beteiligt sein, deren Funktion in der Erdbeerfrucht erst ansatzweise verstanden wird.

*FaGT6* und *FaGT7* sind *in vitro* multifunktionelle Glycosyltransferasen, die eine breite Substratspezifität aufweisen und eine Vielzahl von Flavonoiden, Hydroxycumarinen und Naphtholen glucosylieren. *FaGT7* bildet aus Quercetin zu gleichen Teilen Quercetin-3-glucosid und das bisher nicht in Erdbeerfrüchten nachgewiesene Quercetin-4'-glucosid. *FaGT6* katalysiert bevorzugt die Bildung von Quercetin-3-glucosid sowie drei weiterer Monoglucoside und einem Diglucosid und ist das erste biochemisch charakterisierte Enzym, das in grünen und roten Früchten stärker in den Achänen als im Blütenboden exprimiert wird. *FaGT7* weist in grünen Achänen ebenfalls eine relativ starke Expression auf. Die Enzyme könnten *in planta* eine bifunktionelle Rolle übernehmen. Zum einen erscheint eine Beteiligung an der Biosynthese der Flavonolglucoside plausibel, da in grünen Früchten und in Achänen relativ hohe Konzentrationen phenolischer Verbindungen nachgewiesen wurden. Andererseits deuten das breite Substratspektrum und die Induzierbarkeit der Genexpression durch Salicylsäure darauf hin, dass beide Enzyme an der Glucosylierung von Xenobiotika beteiligt sein könnten. Dies wird auch dadurch bekräftigt, dass verschiedene, in die Erdbeerfrucht injizierte, nicht natürliche Substrate *in planta* glucosyliert werden.

Diese Ergebnisse tragen zu einem besseren Verständnis der Funktion von Glycosyltransferasen während der Fruchtreifung der nicht-klimakterischen Erdbeere bei. Die funktionelle Charakterisierung der *FaGT1* durch RNAi stellt den ersten Bericht über die Herabregulation einer Anthocyanidin-3-glucosyltransferase dar.

## SUMMARY

Plant glycosyltransferases catalyze the transfer of activated sugar molecules to various different compounds. They play a decisive role in the biosynthesis of secondary metabolites, are involved in plant defense mechanisms and regulate the homeostasis of important plant hormones. In biotechnology, glycosyltransferases can be utilized to produce physiologically important glycosides.

Sequencing the genomes of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* revealed large glycosyltransferase families in plants. In cDNA libraries of strawberry (*Fragaria x ananassa*), a plant that has emerged as a model for non-climacteric fruit ripening in recent years, several different putative glycosyltransferase sequences were identified.

To elucidate their function, the complete open reading frames of the respective enzymes were cloned and heterologously expressed in *Escherichia coli*. The recombinant proteins were purified by affinity chromatography and characterized biochemically. The spatial and temporal gene expression during fruit ripening was analyzed by quantitative PCR and compared with the concentrations of several relevant metabolites. To confirm the putative function of FaGT1 *in planta*, fruits with reduced transcript levels of *FaGT1* were generated by RNA-interference (RNAi) and analyzed by mass spectrometry.

FaGT1 forms preferentially pelargonidin- and cyanidin-3-glucoside, the major anthocyanins of strawberry fruit. The ripening-related gene expression correlates with the accumulation of red pigments indicating an involvement of FaGT1 in anthocyanin biosynthesis. This could be confirmed by RNAi-induced down-regulation of *FaGT1*. The transfected fruits showed only a slightly changed phenotype, but anthocyanin concentrations were considerably reduced. Additionally, the concentration of kaempferol-3-glucoside, but not quercetin-3-glucoside decreased significantly.

*FaGT3* and *FaGT4* are expressed in a ripening-related and fruit-specific way. Gene expression of *FaGT4* is negatively regulated by the plant hormone auxin, while *FaGT3* is putatively induced by wounding. The heterologously expressed proteins did not show enzymatic activity *in vitro*. Phylogenetic analysis indicated that flavonols and anthocyanidin-3-glucosides could be substrates for FaGT3 and FaGT4, respectively.



*FaGT5* is also expressed ripening-related and negatively regulated by auxin. The recombinant enzyme forms *in vitro* glucose esters of benzoic and cinnamic acid and their hydroxylated derivatives. *In planta*, *FaGT5* is putatively involved in the biosynthesis of hydroxycinnamoyl glucose esters, whose function in strawberry fruit is only partially understood.

*FaGT6* and *FaGT7* are multifunctional glycosyltransferases showing a broad substrate specificity *in vitro* glucosylating numerous flavonoids, hydroxycumarins and naphthols. *FaGT7* converts quercetin to equal amounts of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside. *FaGT6* catalyzes the formation of quercetin-3-glucoside and minor amounts of three other monoglucosides and one diglucoside. This is the first biochemically characterized enzyme that shows higher expression in achenes than receptacle of green and red fruits. *FaGT7* is also highly expressed in achenes of green fruit. Both enzymes could take over a bifunctional role *in planta*. On the one hand, a participation in the biosynthesis of flavonol glucosides sounds plausible as green fruits and achenes contain relatively high amounts of phenolic compounds. On the other hand, the broad substrate spectra and the inducibility of gene expression by salicylic acid indicate that both enzymes could be involved in the glucosylation of xenobiotics. This is supported by the fact that several unnatural substrates injected into strawberry fruit are glucosylated *in planta*.

These results contribute to a better understanding of glycosyltransferases and their function during ripening of the non-climacteric strawberry fruit. The functional characterization of *FaGT1* by RNAi is the first report on the downregulation of an anthocyanidin-3-glycosyltransferase.

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Pflanzliche Glycosyltransferasen des Sekundärstoffwechsels

#### 1.1.1 Glycosyltransferasen

##### 1.1.1.1 Überblick und Einteilung

Der Transfer von Glucose ist quantitativ gesehen die wichtigste Reaktion auf der Erde (Campbell et al., 1997). Schätzungsweise 1 % aller offenen Leserahmen codieren für Enzyme, die für die Bildung glycosidischer Bindungen verantwortlich sind (Coutinho et al., 2003).

Enzyme können entsprechend der katalysierten Reaktion und ihrer Substratspezifität gemäß der Nomenklatur der *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) eingeordnet werden (Campbell et al., 1997). Glycosyltransferasen gehören zur Klasse EC 2.4.x.y. Eine genaue Einteilung ist oft nicht möglich, da viele potentielle Glycosyltransferasen nicht vollständig biochemisch charakterisiert wurden oder viele Enzyme mehrere Substrate akzeptieren (Coutinho et al., 2003).

Deshalb werden Glycosyltransferasen in der post-genomischen Ära nach Substratspezifität und Sequenzhomologien geordnet (Campbell et al., 1997; Coutinho et al., 2003). Der rasante Anstieg der bekannten Glycosyltransferase-Sequenzen in der vergangenen Dekade führte dazu, dass heute in der *carbohydrate-active enzyme* (CAZy) Datenbank (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) 87 Familien aufgeführt sind. Die in dieser Arbeit behandelten pflanzlichen Glycosyltransferasen des Sekundärstoffwechsels gehören zur Familie 1, die mittlerweile 1561 Sequenzen umfasst.

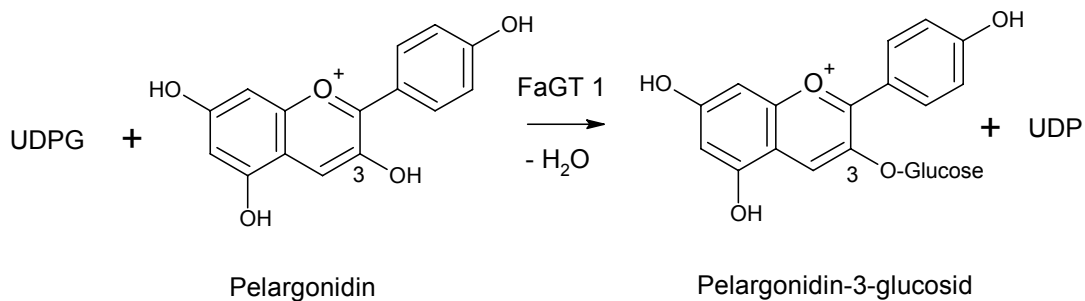
##### 1.1.1.2 Grundlegende Eigenschaften

Die durchschnittliche Größe der Glycosyltransferasen beträgt zwischen 45 und 60 kDa (Vogt und Jones, 2000). In den Sequenzen dieser Proteine wurden bisher keine Signalpeptide und Membranbindungsstellen identifiziert (Li et al., 2001). Die Aktivität pflanzlicher Glycosyltransferasen wird in der Regel in der cytosolischen Fraktion wiedergefunden, d. h. sie sind bis auf wenige Ausnahmen lösliche Enzyme (Bowles, 2002). Es gibt allerdings Hinweise, dass die Enzyme der Flavonoid-Biosynthese einen Membran-assoziierten Multienzymkom-

plex bilden, der auch die entsprechenden Glycosyltransferasen beinhalten könnte (Winkel-Shirley, 1999).

### 1.1.1.3 Katalysierte Reaktion

Pflanzliche Glycosyltransferasen katalysieren die Übertragung eines aktivierten Zuckermoleküls auf zahlreiche verschiedene Akzeptoren (Vogt und Jones, 2000). In Abbildung 1 ist beispielhaft die Glucosylierung des Anthocyanidins Pelargonidin durch eine Glucosyltransferase aus Erdbeerfrüchten dargestellt. Das entstehende Pelargonidin-3-glucosid (vgl. 1.2.2.3) ist der wichtigste Farbstoff der Erdbeerfrucht (Bakker et al., 1994).



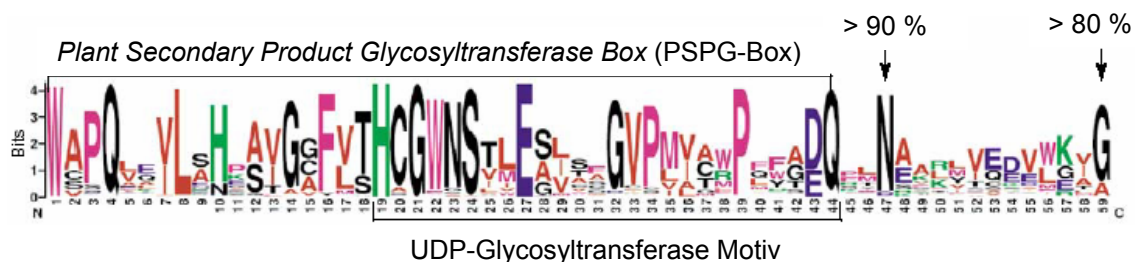
**Abbildung 1:** Glucosylierung von Pelargonidin durch die Glucosyltransferase FaGT1 aus Erdbeerfrüchten. Das Enzym überträgt ein Molekül D-Glucose des aktivierten Zucker-Donors Uridindiphosphat-D-Glucose (UDPG) auf die Hydroxygruppe 3 des Pelargonidins. Das entstehende Pelargonidin-3-glucosid ist der wichtigste Farbstoff der Erdbeerfrucht (vgl. 1.2.2.3).

Als Substrate kommen prinzipiell Sekundärmetabolite wie Flavonoide, Phenylpropanoide, Terpene, Cyanhydrine und Alkaloide sowie Xenobiotika und Pflanzenhormone in Frage (Vogt und Jones, 2000). Die meisten Glycosyltransferasen weisen keine strikte Substratspezifität für das Akzeptormolekül auf. Sie sind eher regiospezifisch und katalysieren die Übertragung des Zuckers auf eine oder wenige definierte Positionen. Es wird angenommen, dass breite Substratspezifität ein allgemeines Merkmal von Enzymen ist, die die letzten Biosynthese-Schritte katalysieren. Für den Zuckerdonor besteht dagegen in der Regel eine hohe Spezifität. Die meisten Glycosyltransferasen akzeptieren bevorzugt UDP-D-Glucose. Es wurden aber auch Enzyme beschrieben, die UDP-D-Glucuronsäure (Sawada et al., 2005), UDP-D-Galactose (Miller et al., 1999), UDP-D-Xylose (Martin et al., 1999a) und UDP-L-Rhamnose (Jones et al., 2003; Frydman et al., 2004) übertragen. Da UDP-L-Rhamnose nicht kommerziell ver-

füßbar ist und viele Charakterisierungen ausschließlich mit UDP-D-Glucose durchgeführt wurden, dürfte es darüber hinaus noch weitere Enzyme geben, die neben UDP-D-Glucose auch andere Zucker akzeptieren.

#### 1.1.1.4 Konsensussequenz (PSPG-Box)

Glycosyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels weisen in der Nähe des C-Terminus mit der *Plant Secondary Product Glycosyltransferase Box* (PSPG-Box, Abb. 2) eine hochkonservierte Sequenz auf (Hughes und Hughes, 1994). Die 44 Aminosäuren große PSPG-Box beinhaltet eine N-terminale Erweiterung der ursprünglich für alle UDP-Glycosyltransferasen vorgeschlagenen Konsensussequenz (Mackenzie et al., 1997). Daneben sind auch zwei einzelne Aminosäuren außerhalb des C-terminalen Endes der PSPG-Box hochkonserviert (Gachon et al., 2005). Mit Ausnahme der PSPG-Box weisen pflanzliche Glycosyltransferasen nur relativ geringe Sequenzhomologien auf (Vogt und Jones, 2000).

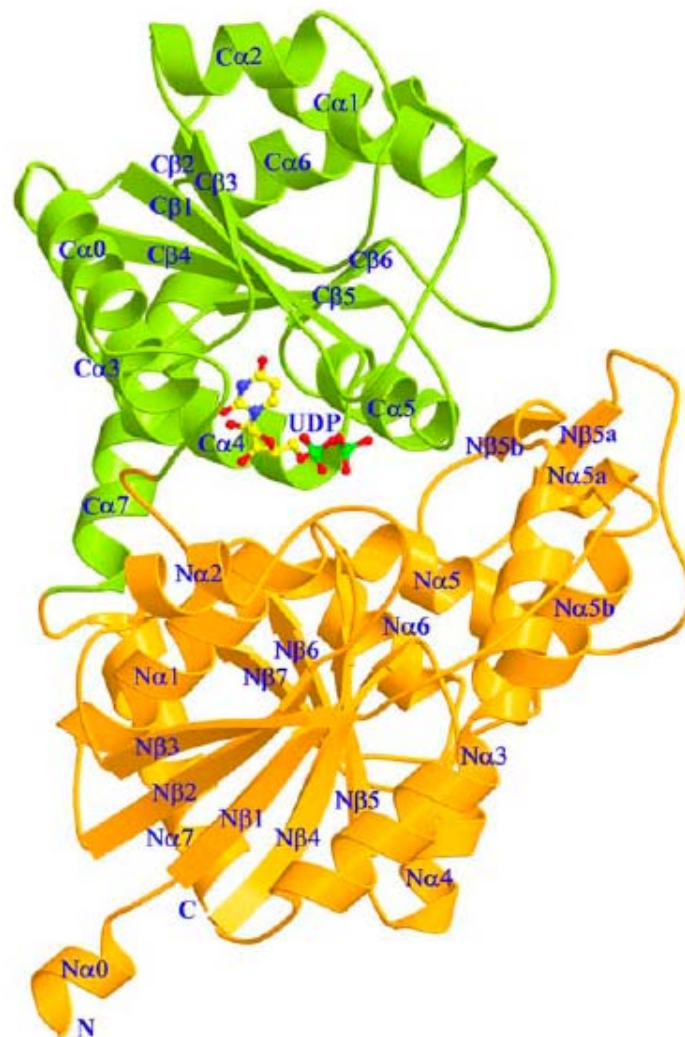


**Abbildung 2:** *Plant Secondary Product Glycosyltransferase Box* (PSPG-Box) der Glycosyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels (Aminosäuren 1-44). Daneben ist auch das allgemeine Motiv der UDP-Glycosyltransferasen (Aminosäuren 19-44) angegeben (Mackenzie et al., 1997). Die Buchstabengröße ist ein Maß, wie hoch die entsprechende Aminosäure konserviert ist (Gachon et al., 2005).

#### 1.1.1.5 Struktur und Mechanismus

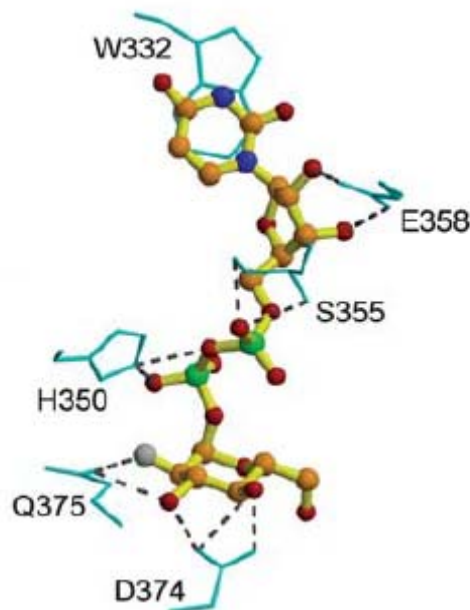
Die erste Kristallstruktur einer pflanzlichen Glycosyltransferase wurde erst kürzlich vorgestellt. Es handelt sich dabei um die multifunktionelle Triterpen/Flavonoid Glycosyltransferase (UGT71G1) aus *Medicago truncatula* (Shao et al., 2005). Etwas später wurde auch die dreidimensionale Struktur der UDP-Glucose:Flavonoid 3-O-Glycosyltransferase (VvGT1) aus *Vitis vinifera* veröffentlicht (Offen et al., 2006).

Die Gesamtstruktur der UGT71G1 aus *M. truncatula* (Abb. 3) setzt sich zusammen aus zwei N- und C-terminalen Domänen mit ähnlichen Rossmann-Faltungen (Shao et al., 2005). Der N-terminale Bereich besteht aus einem siebensträngigen  $\beta$ -Faltblatt, das beidseitig von acht  $\alpha$ -Helices und einem kleinen zweisträngigen  $\beta$ -Faltblatt umgeben ist. Die C-terminale Domäne beinhaltet ein sechssträngiges  $\beta$ -Faltblatt, das von acht  $\alpha$ -Helices flankiert wird. Zwischen beiden Domänen bildet sich eine tiefe Spalte aus, in der UDP gebunden wird. Obwohl die Sequenzhomologien zwischen pflanzlichen und bakteriellen Glycosyltransferasen mit GT-B Faltung sehr gering sind, weisen beide relativ ähnliche dreidimensionale Strukturen auf, die auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung hindeuten.



**Abbildung 3:** Bändermodell der UGT71G1 aus *M. truncatula* mit gebundenem UDP. Die N-terminale Domäne ist in orange, die C-terminale Domäne in grün gekennzeichnet. Die Sekundärstrukturen sind für jede Domäne einzeln nummeriert. Das UDP Molekül ist als Kugel-Stab-Modell (Stickstoff: blau, Kohlenstoff: gelb, Sauerstoff: rot, Phosphor: grün) dargestellt (Shao et al., 2005).

Wie bereits früher vermutet wurde, ist die PSPG-Box an der Bindung des Zucker-Donors (Abb. 4) beteiligt (Vogt und Jones, 2000). In VvGT1 aus *V. vinifera* bildet Trp-332 mit dem Uracil der UDP-D-Glucose einen Sandwich-Komplex (Offen et al., 2006). His-350 und Ser-355 bilden mit den  $\beta$ - und  $\alpha$ -Phosphat-Gruppen der UDP-D-Glucose Wechselwirkungen aus. Asp-374 und Gln-375 binden an die Hydroxygruppen der D-Glucose. Die einzige Wechselwirkung zwischen dem Sauerstoffatom 6 der D-Glucose findet mit Thr-141 statt. In UGT78D1 aus *Arabidopsis thaliana* ist Thr-141 durch Alanin ersetzt. Interessanterweise katalysiert dieses Enzym bevorzugt die Übertragung von UDP-L-Rhamnose auf Flavonole (Jones et al., 2003). Dadurch konnte die Funktion von Thr-141 indirekt bestätigt werden, da L-Rhamnose ein 6-Desoxyzucker ist. Weitere Interpretationen der Zuckerspezifität werden aber durch die ungeklärte Konformation der UDP-L-Rhamnose im Übergangszustand der Reaktion erschwert (Offen et al., 2006).



**Abbildung 4:** Dreidimensionale Darstellung der Struktur der Zuckerbindungsstelle von VvGT1 aus *V. vinifera* mit gebundener UDP-2-Desoxy-2-fluor-glucose. Gezeigt werden die an der Bindung des Zucker-Donors beteiligten Aminosäuren von VvGT1 (Bowles et al., 2006).

Die Seitenkette His-22 in UGT71G1 von *M. truncatula* befindet sich in der Nähe der Akzeptorbindungsstelle und ist essentiell für den katalytischen Mechanismus (Shao et al., 2005). UGT71G1 bildet aus Quercetin fünf verschiedene Produkte. Übereinstimmend mit der entscheidenden Funktion von His-22 konnten

alle fünf Hydroxygruppen des Quercetins in räumlicher Nähe zu His-22 gebunden werden. Die Bindungsstelle für den Akzeptor ist entscheidend länger und größer als Quercetin und könnte damit für die *in vitro* festgestellte breite Substratspezifität verantwortlich sein. Zusammen mit der sauren Seitenkette von Asp-121 bildet His-22 wahrscheinlich eine Elektronentransferkette. His-22 reagiert als Base und deprotoniert die Hydroxygruppe des Akzeptors. Anschließend wird das Proton an Asp-121 weitergeleitet. Das gebildete Oxyanion des Akzeptors greift dann nucleophil das C1-Kohlenstoffatom der UDP-D-Glucose an und ersetzt UDP. Zielgerichtete Mutagenese, bei der His-22 oder Asp-121 durch Alanin ersetzt wurden, führte zu einem vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität. Dieser Reaktionsmechanismus konnte auch durch die Aufklärung der Kristallstruktur der VvGT1 bestätigt werden (Offen et al., 2006).

### 1.1.2 Strategien zur Untersuchung pflanzlicher Glycosyltransferasen

#### 1.1.2.1 Biochemische *in vitro* Charakterisierung

Die klassische Methode zur Untersuchung pflanzlicher Glycosyltransferasen ist die Aufreinigung des entsprechenden Proteins mit anschließender biochemischer Charakterisierung (Vogt und Jones, 2000). Allerdings sind Glycosyltransferasen meist nur in geringen Mengen vorhanden und relativ instabil, so dass eine Aufreinigung oft sehr mühsam ist. Zum anderen ist eine Charakterisierung des aufgereinigten Proteins problematisch, da Verunreinigungen mit anderen Enzymen oft nicht ausgeschlossen werden können. Dies kann dazu führen, dass einer Glycosyltransferase fälschlicherweise eine zu breite Substratspezifität zugeschrieben wird. Ein Beispiel, bei dem zunächst das Protein erfolgreich isoliert und anschließend teilweise sequenziert wurde, ist die 1,2-Rhamnosyltransferase aus Zitrusfrüchten (Frydman et al., 2004).

Einen anderen Ansatz stellt die Klonierung und heterologe Expression des betreffenden Proteins dar. Die erste Gensequenz einer pflanzlichen Glycosyltransferase wurde durch Transposonmutagenese aus Mais isoliert (Fedoroff et al., 1984). Seither ist es möglich, aufgrund von Sequenzhomologien in cDNA-Bibliotheken nach potentiellen Glycosyltransferase-Sequenzen zu suchen. Ein entscheidender Fortschritt war die Identifizierung der konservierten PSPG-Box (Hughes und Hughes, 1994). Damit können einerseits cDNA-Bibliotheken nach pflanzlichen Glycosyltransferasen durchsucht werden, zum anderen eignet sich dieser Bereich auch zur Konstruktion degenerierter Primer (Vogt, 2000). Bei-

spielsweise wurde die UDP-Glucose:Flavonoid 3-O-Glycosyltransferase aus *Vitis vinifera* (VvGT1) aufgrund von Sequenzhomologien in einer cDNA-Bibliothek aus Shiraz-Trauben identifiziert und eine Crocetin Glucosyltransferase aus *Crocus sativus* mit Hilfe degenerierter Primer erfolgreich kloniert (Ford et al., 1998; Moraga et al., 2004).

#### 1.1.2.2 Vollständige Sequenzierung pflanzlicher Genome

Die verschiedenen Genomprojekte haben auch für die Untersuchung pflanzlicher Glycosyltransferasen neue Ansatzpunkte geschaffen. Die erste vollständig sequenzierte Pflanze war *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). In ihrem Genom wurden 107 Sequenzen von UDP-Glycosyltransferasen festgestellt (Bowles, 2002). Auch im Genom von Reis ist eine große Glycosyltransferase-Familie mit 193 Mitgliedern identifiziert worden, von denen aber erst eine Glycosyltransferase näher analysiert wurde (Ko et al., 2006).

Die überraschend hohe Anzahl an Glycosyltransferasen im Genom von *A. thaliana* wurde dagegen bereits umfassend untersucht. Ein phylogenetischer Baum der Glycosyltransferasen besteht aus 12 Gruppen, die untereinander eine hohe Ähnlichkeit aufweisen (Li et al., 2001). Auch die genomischen Sequenzen der Glycosyltransferasen wurden analysiert (Li et al., 2001; Paquette et al., 2003). Über die Hälfte der Glycosyltransferasen aus *A. thaliana* weist keine Introns auf. Nur ein sehr kleiner Teil besitzt mehr als ein Intron.

In den folgenden Jahren wurden fast alle Glycosyltransferasen aus *A. thaliana* erfolgreich heterolog exprimiert und gegen das folgende Substratspektrum getestet: Hydroxycimtsäuren (Lim et al., 2001), Hydroxybenzoesäuren (Lim et al., 2002), Hydroxycumarine (Lim et al., 2003a), Quercetin (Lim et al., 2004) und Monolignole (Lim et al., 2005a). Es wurden auch Enzyme identifiziert, die Pflanzenhormone wie Indoleessigsäure (Jackson et al., 2001), Cytokinine (Hou et al., 2004), Abscisinsäure (Lim et al., 2005b) und Brassinosteroide (Poppenberger et al., 2005) sowie die Xenobiotika 2,4,5-Trichlorphenol (TCP) und 3,4-Dichloranilin (DCA) glycosylieren (Loutre et al., 2003). Die hohe Anzahl an Glycosyltransferasen führt dazu, dass viele Enzyme das gleiche Substrat akzeptieren (Lim et al., 2004). Dagegen sind nur relativ wenige Enzyme für die Glycosylierung der Pflanzenhormone zuständig (Bowles et al., 2006).



### 1.1.2.3 Funktionelle *in vivo* Charakterisierung

Die Substratspezifität *in vitro* liefert allein noch keine eindeutige Aussage über die Funktion einer Glycosyltransferase. In der Pflanze spielen unter anderem auch die Regulation der Genexpression und die Verfügbarkeit von Substraten eine wichtige Rolle (Ross et al., 2001). Deshalb muss eine breite Substratspezifität *in vitro* nicht unbedingt eine breite Substratspezifität *in planta* bedeuten. Beispielsweise kann die Beteiligung einer Glycosyltransferase in einem Multi-enzymkomplex, wie er für die Flavonoid-Biosynthese vorgeschlagen wurde, die Substratverfügbarkeit drastisch einschränken (Winkel-Shirley, 1999; Jones und Vogt, 2001). Daneben spielt *in planta* auch die Konkurrenz verschiedener Enzyme um die gleichen Substrate eine Rolle (Bowles et al., 2005).

Deshalb sind integrierte Ansätze notwendig, die die *in vitro* gewonnenen Daten mit den Profilen der entsprechenden Metabolite oder der Genexpression korrelieren (Achnine et al., 2005; Tohge et al., 2005).

Ein anderer Ansatz ist es, die Genexpression einer Glycosyltransferase *in planta* zu erhöhen oder zu erniedrigen. Eine erhöhte Expression konnte durch die Verwendung eines entsprechenden Promotors wie des 35S-Promotors aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) erreicht werden (Lim und Bowles, 2004). Alternativ ist auch der entsprechende Transkriptionsfaktor überexprimiert worden (Tohge et al., 2005).

Die Herabregulation oder das völlige Ausschalten eines Gens kann durch verschiedene Methoden erreicht werden. Für Glycosyltransferasen wurden bisher *antisense*-Konstrukte (Chong et al., 2002), T-DNA *knock-out* Linien (Jones et al., 2003) und RNA-Interferenz (Hüsken et al., 2005a) erfolgreich angewendet.

## 1.1.3 Funktionen von Glycosyltransferasen

### 1.1.3.1 Regulation der zellulären Homöostasis

Die Glycosylierung verändert grundlegende Moleküleigenschaften der Akzeptoren (Bowles et al., 2006). Sekundärmetabolite wie Anthocyane, Glucosinolate und cyanogene Glycoside werden stabilisiert, wobei der übertragene Zucker die Polarität des Akzeptormoleküls erhöht und somit eine freie Diffusion durch Lipiddoppelmembranen verhindert. Anthocyane werden als Glutathion-Konjugate durch eine Glutathion-Pumpe in die Vakuole transportiert (Marss et al., 1995). Auch ein H<sup>+</sup>-abhängiger Transport von Glucosiden durch den Tonoplasten wurde gezeigt (Bartholomew et al., 2002). Bemerkenswert ist, dass das Aglycon

nicht aufgenommen wurde. Durch die Glycosylierung kann also die zelluläre Lokalisation beeinflusst und die lokale Konzentration eines Metaboliten gesteuert werden (Lim und Bowles, 2004). Jones und Vogt (2001) bezeichneten dies als eine biologische Markierung, die die Kompartimentierung von Sekundärmetaboliten steuert. Teilweise können die Aglyca durch Hydrolasen bedarfsweise wieder freigesetzt werden (Vogt und Jones, 2000).

Neben der Stabilisierung von Sekundärmetaboliten ist auch eine Aktivierung möglich. Einige Glucosyltransferasen übertragen D-Glucose auf die Säuregruppe von Hydroxycimtsäuren. Die dabei gebildeten Glucose-Ester sind energiereiche Verbindungen, die ein hohes Gruppenübertragungspotential besitzen (Mock und Strack, 1993). Sie werden deshalb als Biosynthese-Zwischenstufen und nicht als Endprodukte betrachtet.

#### 1.1.3.2 Biosynthese von Sekundärmetaboliten

Pflanzen können eine Vielzahl an Sekundärstoffen bilden, die offenbar keine direkte Funktion im Stoffwechsel übernehmen (Heldt, 2003). Während primäre Metabolite wie Aminosäuren oder Fettsäuren in allen Pflanzen vorkommen, weisen viele Pflanzen charakteristische Sekundärmetabolite auf. Meistens übernehmen sie ökologische Funktionen wie die Anlockung von Insekten und Tieren oder den Schutz gegen pathogene Mikroorganismen und Herbivoren. Die große Vielfalt der von Pflanzen synthetisierten Sekundärmetabolite wird vor allem durch Modifikation eines Grundgerüsts mit verschiedenen funktionellen Gruppen erreicht (Jones und Vogt, 2001). Dabei spielt die enzymatische Übertragung von Hydroxy-, Methoxy-, Carboxygruppen und Zuckern eine entscheidende Rolle. So gibt es beispielsweise über 5000 verschiedene Flavonoide, und allein von Quercetin sind über 300 verschiedene Glycoside bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass die hohe Anzahl an Sekundärmetaboliten den Pflanzen die flexible Anpassung an verschiedene Umwelteinflüsse ermöglicht (Bowles et al., 2006).

#### *Flavonoide*

Einer der am besten untersuchten Bereiche ist die Glycosylierung der Flavonoide. Anthocyane (vgl. 1.2.2.3, Abb. 8) sind die Pigmente zahlreicher Früchte und Blüten und ihre Biosynthese wurde in vielen Pflanzen intensiv untersucht. Im Allgemeinen wird angenommen, dass zunächst UDP-D-Glucose auf Position

3 der Anthocyanidine übertragen wird, wodurch das erste stabile Pigment entsteht. Ein entsprechendes Enzym wurde unter anderem aus *Vitis vinifera* isoliert (Ford et al., 1988). In *Perilla frutescens* und *Verbena hybrida* sind Anthocyan 5-Glucosyltransferasen beschrieben worden, die ein weiteres Molekül D-Glucose auf Position 5 eines Anthocyanidin-3-glucosids übertragen (Yamazaki et al., 1999). Fukuchi-Mizutani et al. (2003) berichteten von einer Anthocyan 3'-Glucosyltransferase, die D-Glucose auf Position 3' des B-Rings von Anthocyanidin-3,5-diglucosiden überträgt und somit ein Triglycosid bildet. Auch auf eine Position des Anthocyanidin-Grundgerüsts können mehrere Zuckermoleküle transferiert werden. In *Petunia hybrida* führt dies zur Bildung von Anthocyanidin-3-rutinosiden und in *Ipomea nil* zu Anthocyanidin-3-sophorosiden (Brugliera et al., 1994; Kroon et al., 1994; Morita et al., 2005). In *Rosa hybrida* wurde dagegen ein neuartiges Enzym beschrieben, dass sequentiell zwei Moleküle D-Glucose überträgt und die Bildung von instabilem Cyanidin-5-glucosid und stabilem Cyanidin-3,5-diglucosid katalysiert (Ogata et al., 2005). Interessanterweise akzeptierte die aus *Dorotheanthus bellidiformis* isolierte UDP-Glucose:Betanidin-6-Glucosyltransferase nicht nur das native Substrat Betanidin, sondern auch Cyanidin (Vogt et al., 1997). Dies ist bemerkenswert, da sich die Farbstoffe der Betacyane und Anthocyane in ihrem Vorkommen gegenseitig ausschließen.

In der Regel wird zunächst das Flavonoid-Grundgerüst synthetisiert, bevor Glycosyltransferasen Zucker auf bestimmte Hydroxygruppen übertragen (vgl. 1.2.2.4, Abb. 9). Flavonol-3-glycosyltransferasen sind aus vielen Organismen bekannt. In Pollen machen Flavonole 2-5 % des Trockengewichtes aus (Bowles et al., 2006). In Mais und *P. hybrida* beeinflussen Flavonole entscheidend die Entwicklungsfähigkeit der Pollen. Die in den Pollen von *P. hybrida* exprimierte UDP-Galactose:Flavonoid-3-O-Galactosyltransferase übernimmt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Konzentration des aktiven Aglycons (Miller et al., 1999). Das erste Gen einer Flavonoid-7-glucosyltransferase wurde aus einer Zellkultur von *Scutellaria baicalensis* isoliert (Hirotsani et al., 2000). Das entsprechende rekombinante Enzym transferiert D-Glucose auf Position 7 von Kämpferol, Baicalein und anderen Flavonoiden. Es wurden auch Enzyme beschrieben, die weniger regiospezifisch sind und Zucker auf verschiedene Hydroxygruppen übertragen. UGT73G1 aus *Allium cepa* bildet beispielsweise aus Quercetin drei verschiedene Monoglucoside und zwei verschiedene Diglucoside, wobei die

Positionen 3, 4' und 7 glucosyliert werden (Kramer et al., 2003). Jones et al. (2003) isolierten eine UDP-Rhamose:Flavonol-3-O-rhamnosyltransferase und eine UDP-Glucose:Flavonol-3-O-glucosid-7-O-glucosyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* und konnten die Beteiligung beider Enzyme an der Biosynthese der entsprechenden Flavonole durch T-DNA *knock-out* Linien bestätigen. Eine Besonderheit stellt die Biosynthese der gelben Aurone in der Zierpflanze *Antirrhinum majus* dar (Ono et al., 2006). Hier wird das entsprechende Chalcon an Position 4' glucosyliert, anschließend in die Vakuole transportiert und dort enzymatisch in Auron-6-glucosid umgewandelt. Die Glycosylierung ist in diesem Fall also nicht der terminale Schritt in der Biosynthese. Eine Chalcon-2'-glucosyltransferase wurde auch aus den gelben Blütenblättern von *Dianthus caryophyllus* kloniert (Ogata et al., 2004).

#### *Phenylpropanoide*

Zahlreiche Glycosyltransferasen akzeptieren Monolignole, Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren (1.2.2.5, Abb. 10) als Substrate. Enthält eine Verbindung sowohl eine Hydroxy- als auch eine Säuregruppe, so ist der Transfer des Zuckers prinzipiell auf beide Gruppen möglich. Die entstehenden energiereichen Zucker-Ester werden als Vorläufer weiterer Sekundärmetabolite wie dem ungenießbaren Sinapoylcholin und dem UV-Schutzstoff Sinapoylmalat betrachtet. Eine entsprechende UDP-Glucose:Sinapat Glucosyltransferase aus *Brassica napus* ist ausführlich beschrieben worden (Milkowski et al., 2004).

Aus *A. thaliana* wurden mehrere Glycosyltransferasen kloniert, die neben Hydroxyzimtsäuren vor allem als Lignin-Vorläufer betrachtete Monolignole *in vitro* glucosylieren (Lim et al., 2005a). Diese Ergebnisse konnten durch Herabregulation und Überexpression der entsprechenden Gene in transgenen *A. thaliana* bestätigt werden (Lanot et al., 2006).

#### *Terpene*

Aus Kartoffeln wurde eine Glucosyltransferase kloniert, die verschiedene Steroidalkaloide wie Solanidin und Tomatidin *in vitro* glucosyliert (Moehs et al., 1997). Der entsprechende Klon wurde aus einer cDNA Datenbank aufgrund der unterschiedlichen Toxizität des Aglycons und des Glucosids isoliert. Als Selektionsmarker wurde das toxische Aglycon Solasodin verwendet. Nur der Klon mit

der entsprechenden Glycosyltransferaseaktivität konnte auf den Platten wachsen.

In der Modellpflanze *Medicago truncatula* sind zwei Glycosyltransferasen nachgewiesen worden, die an der Biosynthese der Saponine beteiligt sind (Achnine et al., 2005). Obwohl UGT71G1 *in vitro* bevorzugt Quercetin und bestimmte Isoflavone glucosyliert, konnte durch die integrierte Untersuchung von Transkripten und Metaboliten gezeigt werden, dass UGT71G1 *in vivo* die Biosynthese von Saponinen katalysiert.

Aus *Avena sativa* wurde eine UDP-Glucose:Sterol Glucosyltransferase kloniert und heterolog exprimiert, wobei das rekombinante und das aufgereinigte Enzym *in vitro* die selben Substrate  $\beta$ -Sitosterol, Stigmasterol, Cholesterol und Ergosterol akzeptierten (Warnecke und Heinz, 1994; Warnecke et al., 1997). Ungewöhnlich ist, dass es sich nicht um ein cytosolisches, sondern um ein membrangebundenes Enzym handelt.

### *Geschmacksstoffe*

Einige Zitrusfrüchte wie Grapefruit und Pampelmuse enthalten bitter schmeckende Flavanon-7-neohesperidoside, während andere Sorten die geschmacklosen Flavanon-7-rutinoside enthalten. Der geschmacksbestimmende Schritt ist also der positionsspezifische Transfer von L-Rhamnose auf das Flavanon-7-glucosid. Das Enzym Cm1,2RhaT wurde aus *Citrus maxima* kloniert und katalysiert *in vitro* die Bildung des bitter schmeckenden Flavanon-7-neohesperidosids (Frydman et al., 2004). Die Expression des entsprechenden Gens wurde nur in bitteren Zitrusfrüchten nachgewiesen und zeigt in der Pampelmuse eine reifeabhängige Expression entsprechend des Gehalts an Flavanon-7-neohesperidosid.

Die Blätter von *Stevia rebaudiana* enthalten eine Mischung verschiedener süßer Glycoside. Eine der Hauptkomponenten Rebaudiosid A enthält vier Moleküle Glucose. Aus einer EST-Bibliothek wurden drei Glycosyltransferasen identifiziert, die das Aglycon Steviol oder ein Steviolglucosid *in vitro* regioselektiv glucosylieren (Richman et al., 2005).

### 1.1.3.3 Beteiligung in der Pflanzenabwehr

#### *Induzierbare Glycosyltransferasen*

Die Addition eines Zuckers reduziert in der Regel die Toxizität eines Fremdstoffs, erhöht die Wasserlöslichkeit und ermöglicht die Lagerung des Glycosids in der Vakuole (Jones und Vogt, 2001). So wandelt UGT72B1 aus *Arabidopsis thaliana* unter anderem die Schadstoffe 3,4-Dichloranilin (DCA) und 2,4,5-Trichlorphenol (TCP) effektiv in *N*- und *O*-Glucoside um (Loutre et al., 2003). Die Expression des entsprechenden Gens wird durch Pflanzenschutzmittel induziert. In *A. thaliana* Mutanten mit einer Insertion im *UGT72B1*-Gen ist eine deutlich verringerte Fähigkeit festgestellt worden, DCA und TCP zu konjugieren (Brazier-Hicks und Edwards, 2005). In entsprechenden Wurzelzellkulturen war allerdings nur der Metabolismus von DCA verändert. Offenbar sind andere Glycosyltransferasen in der Lage, TCP zu konjugieren und fehlendes UGT72B1 zu kompensieren.

Fusarien sind Pflanzenpathogene, die das Mykotoxin Desoxynivalenol (DON) produzieren, das wahrscheinlich als Virulenzfaktor fungiert und auch für Mensch und Tier toxisch ist. Aus *A. thaliana* wurde UGT73C5 isoliert, die DON an Position 3 glucosyliert und somit inaktiviert (Poppenberger et al., 2003). Die Expression des entsprechenden Gens wird durch DON, aber auch durch Salicylsäure, Ethylen und Jasmonat induziert. Pflanzen mit konstitutiv überexprimierter *UGT73C5* wiesen eine erhöhte Toleranz gegen DON auf.

In Zellkulturen von *Nicotiana tabacum* sind eine Reihe multifunktionaler Glycosyltransferasen beschrieben worden, die Flavonoide, Hydroxycumarine und nicht natürlich vorkommende Naphthole *in vitro* glucosylieren und deren Expression durch Naphthole oder Salicylsäure induziert werden kann (Taguchi et al., 2001, 2003a und 2003b).

Salicylsäure ist ein wichtiges Signalmolekül in pflanzlichen Abwehrmechanismen. Eine Glycosyltransferase, die sowohl das Glucosid als auch den Glucose-Ester von Salicylsäure *in vitro* bildet, wurde aus Tabak kloniert (Lee und Raskin, 1999). Das rekombinante Enzym akzeptiert aber auch andere Phenole und Benzoessäure ist das beste Substrat *in vitro*. Die Expression des entsprechenden Gens wird durch Salicylsäure und inkompatible Pathogene induziert. Obwohl in *A. thaliana* 14 Glycosyltransferasen identifiziert wurden, die Benzoate akzeptieren, setzen davon nur zwei Enzyme bevorzugt Salicylsäure um (Lim et al., 2002). UGT74F1 bildet ausschließlich das Glucosid, während UGT74F2

eine höhere Aktivität für den Glucose-Ester und eine geringere Aktivität für das Glucosid aufweist.

Aus Tabak konnten durch Infektion, Phytoalexine und Salicylsäure induzierbare Glycosyltransferasen (TOGT) kloniert werden, die *in vitro* Flavonoide, Hydroxycumarine und Hydroxyzimtsäuren glucosylieren (Horvath und Chua, 1996; Fraissinet-Tachet et al., 1998; Vogt et al., 1999). Tabakpflanzen, die *antisense* RNA von *TOGT1* exprimierten, wiesen erniedrigte Gehalte an glucosidisch gebundenem Scopolin auf (Chong et al., 2002). Überraschenderweise waren auch die Gehalte an freiem Scopoletin erniedrigt. Diese verringerten Konzentrationen gingen mit einer verminderten Resistenz gegen den Tabakmosaikvirus einher. Eine Überexpression von *TOGT1* in transgenen Tabakpflanzen führte zu widersprüchlichen Ergebnissen. Es wurden zwar erhöhte Gehalte von Scopoletin und Scopolin in transgenen Pflanzen nachgewiesen, aber die Anzahl an Tabakmosaikviren war in den Läsionen nach der Infektion unverändert. Daraus schlossen Gachon et al. (2004), dass die Resistenz gegen den Tabakmosaikvirus nicht erhöht wird. Dagegen konnte gezeigt werden, dass transgene Tabakpflanzen mit *TOGT1* Überexpression nach Infektion mit dem Kartoffelvirus Y einen verringerten Gehalt an Virushüllprotein in den Läsionen aufweisen (Matros und Mock, 2004).

#### *Vorgebildete Pflanzenabwehrstoffe*

Pflanzen synthetisieren eine Reihe von Verbindungen wie Saponine, cyano-gene Glucoside und Glucosinolate, die als inaktive Vorläufer von Pflanzenabwehrstoffen vor allem in der Vakuole gelagert werden (Osbourn, 1996). Bei einer Verletzung des Gewebes, z. B. durch den Angriff eines pathogenen Mikroorganismus, werden sie als Folge der Dekompartimentierung freigesetzt.

Glucosinolate kommen fast ausschließlich in der Familie der *Brassicaceae* vor. Die Zerstörung des pflanzlichen Gewebes führt zur Hydrolyse und zur Entstehung bioaktiver Verbindungen wie Isothiocyanate, Thiocyanate und Nitrile, die mit pflanzlichen Abwehrmechanismen gegen Krankheitserreger und Herbivoren in Verbindung gebracht werden. UGT74B1 aus *A. thaliana* glucosyliert *in vitro* Phenylacetothiohydroximat (PATH) und bildet das entsprechende Thioglucosid (Grubb et al., 2004). *A. thaliana* Mutanten ohne funktionelle UGT74B1 weisen erniedrigte Glucosinolat-Konzentrationen und einen Phänotyp auf, der mit er-

höhten Auxin-Konzentrationen und der Toxizität der Aglyca in Verbindung gebracht werden kann.

Benzoxazinoide sind häufige Sekundärmetabolite in Gräsern (von Rad et al., 2001). In Roggen kommt hauptsächlich 2,4-Dihydroxy-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-on (DIBOA) und in Mais und Weizen das Methoxyderivat 2,4-Dihydroxy-7-methoxy-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-on (DIMBOA) vor. Beide Metabolite werden als inaktive Glucoside in der Vakuole gelagert und bei der Zerstörung des Zellverbandes durch Herbivoren oder Pathogene durch enzymatische Hydrolyse freigesetzt. Aus Mais wurden zwei Glycosyltransferasen kloniert, die spezifisch DIBOA und DIMBOA glucosylieren und wenig Ähnlichkeit zu anderen bekannten Glycosyltransferasen aufweisen. Die Überexpression in *A. thaliana* führte zu einer erhöhten Toleranz gegen exogen appliziertes DIBOA und DIMBOA.

#### 1.1.3.4 Regulation von Pflanzenhormonen

Alle klassischen Pflanzenhormone außer Ethylen kommen auch als Glycoside vor, allerdings wurden für Gibellerinsäure und Jasmonat noch keine entsprechenden Glycosyltransferasen beschrieben (Bowles et al., 2006).

Die erste Glucosyltransferase, die das Pflanzenhormon Indoleessigsäure glucosyliert, wurde aus Mais kloniert (Szerszen et al., 1994). Es wird angenommen, dass das entstehende Produkt eine Vorstufe des *myo*-Inositol-Konjugats ist, das in Mais die vorherrschende Lagerungsform darstellt. Auch in *Arabidopsis thaliana* wurde eine Glycosyltransferase mit hoher Aktivität gegen Indoleessigsäure identifiziert (Jackson et al., 2001). Das rekombinante Protein katalysiert die Bildung eines Glucose-Esters und wurde biochemisch charakterisiert. Die Überexpression des entsprechenden Gens in *A. thaliana* führte zu erhöhten Gehalten des Glucose-Esters und einem Auxin-defizienten Phänotyp (Jackson et al., 2002). Erstaunlicherweise war aber auch der Gehalt an freiem Auxin erhöht. Die Ergebnisse zeigen, dass die entsprechende Glucosyltransferase eine wichtige Rolle für die Auxin-Homöostasis spielt.

Zeatin ist das häufigste und aktivste Cytokinin und kommt in *cis*- und *trans*-Konfiguration vor. Die Zeatin-*O*-glucoside werden als Transport- und Lagerungsform gesehen, die Zeatin vor enzymatischem Abbau schützen sollen. Eine Glucosyltransferase aus *Phaseolus lunatus* setzt spezifisch *trans*-Zeatin um, während ein homologes Enzym aus Mais ausschließlich *cis*-Zeatin akzeptiert



(Martin et al., 1999b und 2001). Aus *A. thaliana* wurden Glycosyltransferasen kloniert, die *in vitro* sowohl *N*-Glucoside wie auch *O*-Glucoside von *trans*-Zeatin und anderen Cytokininen bilden (Hou et al., 2004). Die Aktivität der UGT76C1, die *N*-Glucoside synthetisiert, konnte in transgenen *A. thaliana* Pflanzen mit konstitutiver Überexpression bestätigt werden.

Das bevorzugte Substrate einer Abscisinsäure (ABA) Glucosyltransferase aus *Vigna angularis* war 2-*trans*-(+)-ABA (Xu et al., 2002). Das entsprechende Gen wird durch ABA, Wasserstress und Verletzung induziert. Das Genom von *A. thaliana* beinhaltet acht Sequenzen, die für Glycosyltransferasen codieren, die Abscisinsäure akzeptieren (Lim et al., 2005b). Hervorzuheben ist, dass UGT71B6 enantioselektiv ausschließlich (+)-ABA glucosyliert.

Die einzige Glycosyltransferase, die Brassinosteroide glucosyliert, wurde aus *A. thaliana* kloniert (Poppenberger et al., 2005). UGT73C5 katalysiert die Übertragung von D-Glucose auf die Hydroxygruppe an Position 23 von Brassinolid und Castasteron. Pflanzen mit erhöhter Expression von *UGT73C5* weisen einen Brassinosteroid-defizienten Phänotyp auf, der durch Applikation von aktiven Brassinosteroiden rückgängig gemacht werden konnte. In transgenen Pflanzen, in denen die Expression von *UGT73C5* durch RNA-Interferenz herabreguliert wurde, konnte auch nach Fütterungsexperimenten kein Brassinosteroid-23-glucosid detektiert werden. UGT73C5 glucosyliert also auch *in planta* Brassinosteroide.

#### 1.1.4 Anwendungsmöglichkeiten pflanzlicher Glycosyltransferasen

##### 1.1.4.1 Biokatalyse

Die Biofunktionalität vieler Moleküle wird durch Glycosylierung positiv beeinflusst, indem Wasserlöslichkeit und Stabilität erhöht werden (Lim, 2005). Sowohl die Isolierung als auch die chemische Synthese natürlicher Glycoside erfordert aber einen großen Aufwand und resultiert zumeist in niedrigen Ausbeuten (Arend et al., 2001). Alternativ können Glycoside mit Hilfe von Glycosyltransferasen biosynthetisiert werden. Ein Vorteil pflanzlicher Glycosyltransferasen ist die hohe Regioselektivität. Prinzipiell werden Glycosyltransferasen *in vitro* als aufgereinigte rekombinante Enzyme oder *in vivo* in pflanzlichen oder bakteriellen Systemen verwendet. Rekombinante Enzyme können immobilisiert und damit wiederverwendet werden, allerdings stellt die Verfügbarkeit und der Preis der notwendigen aktivierten Zucker einen beschränkenden Faktor dar.

Dagegen können pflanzliche und bakterielle *in vivo* Systeme endogene Zuckerdonoren zur Verfügung stellen. In Pflanzenzellen werden die D-Glucoside allerdings häufig in die Vakuole transportiert, was eine kontinuierliche Produktion verhindert und eine aufwändigere Extraktion nötig macht (Lim, 2005). Durch die Verwendung von *Escherichia coli* Zellen, die sowohl ein Glycosyltransferase-Gen als auch *RHM1* exprimieren, können in bakteriellen Systemen auch L-Rhamnoside synthetisiert werden (Lim et al., 2006).

Die multifunktionelle Arbutin-Synthase aus *Rauvolfia serpentina* lässt sich relativ einfach heterolog exprimieren und aufreinigen (Hefner et al., 2002). Sie katalysiert *in vitro* die Bildung einer Reihe von ökonomisch bedeutenden D-Glucosiden, unter anderem das in Kosmetika verwendete Arbutin (Arend et al., 2001). Da Bakterien einen endogenen Vorrat an UDP-D-Glucose besitzen, können die D-Glucoside auch einfach *in vivo* synthetisiert werden. Weil die Reaktionsprodukte ins Medium sekretiert werden, ist eine komplizierte Aufreinigung nicht notwendig.

Ein Beispiel für die Anwendung eines pflanzlichen *in vivo* Systems ist die Glucosylierung von Curcumin durch flüssige Zellkulturen von *Catharanthus roseus* (Kaminaga et al., 2003). Durch die Bildung neuer, nicht in der Natur vorkommender D-Glucoside konnte die Wasserlöslichkeit von Curcumin um den Faktor 20 Millionen erhöht werden. Dies ist bedeutsam, da bisher die geringe Wasserlöslichkeit der pharmazeutisch interessanten Verbindung ihre Anwendung eingeschränkt hat.

Die Glycosyltransferasen von *Arabidopsis thaliana* wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, das wichtige Flavonol Quercetin zu glucosylieren (Lim et al., 2004). *In vitro* konnten dabei zum ersten Mal verschiedene Mono- und Diglucoside von Quercetin synthetisiert werden. Auch bei der *in vivo* Synthese blieb die Regio-selektivität erhalten. Durch die gemeinsame Verwendung von *E. coli* Stämmen, die rekombinante Glycosyltransferasen und O-Methyltransferasen exprimieren, sind polymethylierte Flavonolglucoside *in vivo* synthetisiert worden (Willits et al., 2004).

Der komplette Anthocyan-Biosyntheseweg (vgl. 1.2.2.2) inklusive einer UDP-Glucose:Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase aus *Petunia hybrida* wurde ebenfalls in *E. coli* kloniert, wodurch die gentechnisch veränderten Zellen aus Naringenin und Eriodictyol die entsprechenden Anthocyane Pelargonidin-3-glucosid und Cyanidin-3-glucosid synthetisieren konnten (Yan et al., 2005).

#### 1.1.4.2 *Metabolic Engineering* in Pflanzen

Durch die Herabregulation, Überexpression oder die Einführung neuer Gene in Pflanzen kann der Sekundärmetabolismus gezielt beeinflusst werden. Mögliche Beispiele sind die Erhöhung der Resistenz gegen pathogene Mikroorganismen, Herbivoren und Xenobiotika oder die gezielte Veränderung der Blütenfarbe bestimmter Zierpflanzen. Die Gehalte erwünschter und unerwünschter Sekundärmetabolite können ebenfalls entsprechend gesteuert werden.

Der komplette Biosyntheseweg für das cyanogene Glucosid Dhurrin mit der entsprechenden UDP-Glucose:*p*-Hydroxymandelonitrile-*O*-glucosyltransferase wurde aus *Sorghum bicolor* in *Arabidopsis thaliana* übertragen (Jones et al., 1999; Tattersall et al., 2001; Kristensen et al., 2005). Die transgenen Arabidopsis Pflanzen enthielten bis zu 4 % Dhurrin bezogen auf das Trockengewicht und wiesen eine erhöhte Resistenz gegen *Phyllotreta nemorum* auf. Die Transformation mit der Glycosyltransferase aus *S. bicolor* war essentiell, da keine der über 100 endogenen Glycosyltransferasen von *A. thaliana* *p*-Hydroxymandelonitril in Dhurrin umwandeln konnte.

*Brassica napus* ist die wichtigste Öl-liefernde Pflanze der gemäßigten Breiten. Der nach der Extraktion des Öls erhaltene Rückstand enthält etwa 40 % wertvolles Protein, aber auch ungenießbare phenolische Verbindungen wie Sinapoylcholin. Durch RNA-Interferenz konnte die Expression einer UDP-Glucose:Sinapat Glucosyltransferase herabreguliert werden, die an der Biosynthese des Sinapinsäureglucose-Esters beteiligt ist (Hüsken et al., 2005a). Diese energiereiche Verbindung ist die biochemische Vorstufe von Sinapoylcholin in Raps. Dadurch konnte der Gehalt an unerwünschten Sinapat-Estern um bis zu 62 % erniedrigt werden. Durch die gleichzeitige Expression einer Stilben-Synthase aus *Vitis vinifera* wurden Raps-Pflanzen erzeugt, die bis zu 361 µg/g Resveratrolglucosid (Piceid) in den Samen enthielten (Hüsken et al., 2005b). Sowohl Sinapoylcholin als auch Resveratrol gehen auf den Vorläufer *p*-Cumar-säure zurück, der durch die Expression der Stilben-Synthase in einen neuen Biosyntheseweg umgeleitet wird. Dadurch konnte der Gehalt eines unerwünschten Metaboliten (Sinapoylcholin) verringert und gleichzeitig ein neuer Sekundärstoff mit positiven Ernährungseigenschaften (Piceid) eingeführt werden.

Viele wichtige Zierpflanzen wie Geranien und Alpenveilchen sind nicht mit gelben Blütenfarben erhältlich. Aurone sind intensiv gelb gefärbte Flavonoide, die

beispielsweise dem Löwenmäulchen ihre gelbe Farbe verleihen. Durch die Expression der Auran-Biosynthesegene Chalcon 4'-Glucosyltransferase und Aureusidin-Synthase und der gleichzeitigen Herabregulation der Anthocyan-Biosynthese durch RNA-Interferenz konnten transgene *Torenia hybrida* Blüten mit gelber Farbe erzeugt werden (Ono et al., 2006).

## 1.2 Die Erdbeere

### 1.2.1 Botanische Sicht

#### 1.2.1.1 Arten und Sorten

Erdbeeren gehören zur Gattung *Fragaria* in der Familie der *Rosaceae* (Hancock, 1999). Die in Europa heimische Wildform ist die diploide Walderdbeere *F. vesca*. Sie zeichnet sich durch ihre tiefrote Farbe und ihr intensives Aroma aus. Bereits vor 2000 Jahren wurde sie von Griechen und Römern angebaut.

Die wichtigste Erdbeere ist heute die oktaploide Kulturerdbeere *F. x ananassa* (Hancock, 1999). Sie entstand aus einer zufälligen Kreuzung der amerikanischen Wildformen *F. chiloensis* und *F. virginiana* Mitte des 18. Jahrhunderts. Aufgrund ihres Aromas wurde sie von dem französischen Botaniker Antoine Nicholas Duchesne Ananaserdbeere genannt. Sie vereinte die Widerstandsfähigkeit und Produktivität der *F. virginiana* mit der Größe der Früchte von *F. chiloensis*.

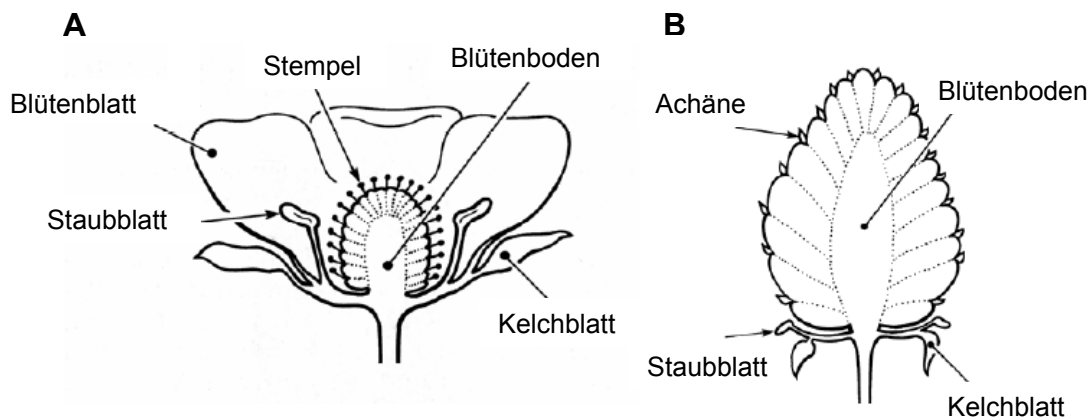
In der Folgezeit wurden kontinuierlich neue Sorten gezüchtet. In den warmen Klimaten dominieren heute weltweit die in Kalifornien gezüchteten Varietäten wie Camarosa und Chandler (Hancock, 1999). In den kälteren Anbaugebieten herrschen lokale Sorten vor. Hier hat die Varietät Elsanta internationale Bedeutung erlangt.

#### 1.2.1.2 Morphologie und Anatomie

Erdbeeren sind mehrjährige krautige Pflanzen mit einem zentralen Vegetationskegel, aus dem Blätter, Wurzeln, Ausläufer und Blütenstände hervorgehen (Hancock, 1999). Blätter und Wurzeln zeigen den für Dikotyledonen typischen Aufbau. Die Ausläufer bestehen in der Regel aus zwei Nodien, wobei die Tochterpflanze am zweiten Nodium gebildet wird.

Die Erdbeerblüte setzt sich aus zehn Kelchblättern, fünf Blütenblättern, 20 bis 30 Staubblättern und einer Vielzahl von Stempeln zusammen (Hancock, 1999;

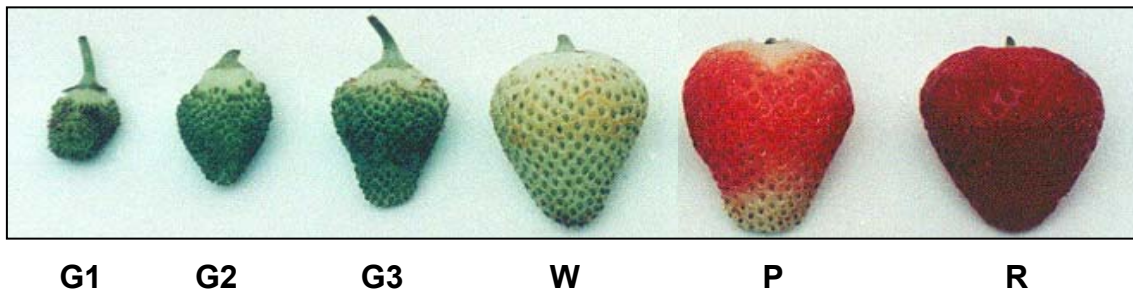
Abb. 5A). Die Blüten werden von Insekten, vor allem Honigbienen (*Apis mellifera*) bestäubt und nach weiteren ein bis zwei Tagen befruchtet. Die umgangssprachlich als Früchte bezeichneten Aggregate sind im botanischen Sinne Sammelnussfrüchte (Abb. 5B). Den eigentlichen genießbaren Teil stellt der verdickte Blütenboden dar (Franke, 1997). Er besteht aus weißlichem Mark und der durch Anthocyane rot gefärbten Rinde. Die Nüsschen, die auch Achänen genannt werden und in die Epidermis des Blütenbodens eingebettet sind, stellen die echten Früchte dar (Hancock, 1999). Sie werden von den Leitbündeln, die den Blütenboden durchziehen, mit Nährstoffen versorgt (Perkins-Veazie, 1995). Sowohl Achänen wie auch Leitbündel sind stark lignifiziert (Suutarinen et al., 1998). In dieser Arbeit wird aus Gründen der Verständlichkeit die gesamte Sammelnussfrucht als Erdbeerfrucht bezeichnet.



**Abbildung 5:** Blüte (A) und Frucht (B) der Erdbeere (Hancock, 1999).

### 1.2.1.3 Fruchtwachstum und Fruchtreifung

Die Zeit von der Blüte bis zur Ernte der reifen Früchte beträgt etwa 30 Tage, wobei verschiedene Stadien des Fruchtwachstums und der Fruchtreifung unterschieden werden können (Abb. 6). Die Zellen der Rinde tragen den größten Teil zum Wachstum der Früchte bei (Hancock, 1999). Etwa 15 bis 20 % des Wachstums lassen sich auf Zellteilung zurückführen, der überwiegende Rest wird durch Vergrößerung bestehender Zellen erreicht. Das in den Achänen gebildete Auxin kontrolliert in erster Linie das Wachstum des Blütenbodens. Das Entfernen von Achänen in frühen Entwicklungsphasen führt zu einem Wachstum des Blütenbodens nur in der Umgebung der verbliebenen Achänen. Nach Applikation des synthetischen Auxins 1-Naphthalinessigsäure (NAA) wird das Wachstum fortgesetzt.



**Abbildung 6:** Wachstums- und Reifestadien der Erdbeerfrucht. Zu sehen sind kleine grüne (G1), mittelgroße grüne (G2), große grüne (G3), weiße (W), pinkfarbene (P) und reife rote Früchte (R).

Die Reifung der Erdbeerfrucht geht mit der Synthese von farbgebenden Anthocyanen und der Erweichung der Textur einher. Man unterscheidet gewöhnlich zwischen klimakterischen (z. B. Tomate und Banane) und nicht-klimakterischen (z. B. Zitrusfrüchte und Trauben) Früchten (Perkins-Veazie, 1995; Giovannoni, 2001). Erstere weisen während der Fruchtreifung einen gleichzeitigen Anstieg der Ethylenproduktion und Respiration auf. Erdbeeren werden im Allgemeinen zu den nicht-klimakterischen Früchten gezählt, da sie nur sehr geringe Mengen Ethylen produzieren und die Fruchtreifung von exogenem Ethylen kaum beeinflusst wird (Hancock, 1999). Unter den nicht-klimakterischen Früchten wird die Erdbeere häufig als Modellorganismus zur Untersuchung der Fruchtreifung herangezogen (Giovannoni, 2001).

Bei der Fruchtreifung der Erdbeere spielt vielmehr das Pflanzenhormon Auxin eine entscheidende Rolle (Perkins-Veazie, 1995). Der höchste Gehalt an Auxin wird in Achänen und Blütenboden von fast weißen Früchten detektiert und dieser fällt im Blütenboden anschließend stark ab. Dieser Abfall der Auxinkonzentration löst den Beginn der Fruchtreifung aus (Given et al., 1988a). Durch das Entfernen der Achänen konnte die Akkumulation von Anthocyanen beschleunigt werden. Die Anwendung von 1-Naphthalinessigsäure (NAA) führte dagegen zu einer verlangsamten Fruchtreifung, die durch verzögerte Anthocyanbildung und verlangsamte Erweichung gekennzeichnet war.

Neuere Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass nicht alle reifekorrelierten Gene durch Auxin kontrolliert werden. Von 80 verschiedenen reifekorrelierten cDNAs waren über 60 % (48) unabhängig von Auxin exprimiert (Aharoni et al., 2002). Es wird diskutiert, dass auch oxidativer Stress und die Entwicklung des Gefäßsystems wichtige Rollen in der Erdbeerfruchtreifung spielen. Ein rei-

fekorreliertes Expansin-Gen (*FaExp2*) und eine Zimtalkohol-Dehydrogenase (*CAD*) werden in der Erdbeerfrucht reifekorreliert exprimiert, aber nicht durch Auxin kontrolliert (Civello et al., 1999; Blanco-Portales et al., 2002).

Empfindlichere Messungen haben kürzlich ergeben, dass auch die Erdbeere ähnlich wie die klimakterische Tomate während der Fruchtreifung ein charakteristisches Muster der Ethylen-Produktion zeigt, das mit einem Anstieg der respiratorischen Aktivitäten einhergeht (Iannetta et al., 2006). So korrelierte auch das Expressionsmuster zweier Ethylen-Biosynthesegene in Erdbeerfrüchten mit dem beobachteten Ethylen-Muster (Trainotti et al., 2005). Der gleichzeitige Anstieg der Expression des Ethylen-Rezeptors *FaEtr2* deutet darauf hin, dass auch die geringen Mengen des gebildeten Ethylens einen reifekorrelierten physiologischen Effekt auslösen können.

Eine klare Trennung zwischen klimakterischen und nicht-klimakterischen Früchten scheint somit nicht immer sinnvoll zu sein. Auch in klimakterischen Früchten existieren wahrscheinlich Ethylen-unabhängige Mechanismen, die reifekorrelierte Gene regulieren (Giovannoni, 2001). Andererseits wurde nachgewiesen, dass ein Homolog des für die Fruchtreifung der klimakterischen Tomate wichtigen Gens *LeMADS-RIN* ebenfalls in der Erdbeere fruchtspezifisch exprimiert wird (Vrebalov et al., 2002). Möglicherweise gibt es gemeinsame regulatorische Kaskaden sowohl in klimakterischen wie in nicht-klimakterischen Früchten (White, 2002).

### 1.2.2 Inhaltsstoffe der Erdbeerfrucht

#### 1.2.2.1 Primärstoffwechsel und Aromastoffe

Reife Erdbeerfrüchte bestehen zu 90 % aus Wasser und zu 10 % aus gelösten Verbindungen (Hancock, 1999). Die wichtigsten Zucker sind D-Glucose und D-Fructose, die in etwa gleichen Teilen vorliegen und zusammen 40 % der Trockenmasse ausmachen. Die bedeutendste Fruchtsäure ist die Zitronensäure.

Das Aroma der Erdbeerfrucht ist komplex zusammengesetzt und besteht aus über 360 flüchtigen Verbindungen (Schieberle und Hofmann, 1997). Die Untersuchung der Aroma-Werte verschiedener Bestandteile des Erdbeeraromas zeigte, dass insbesondere (*Z*)-3-Hexenal, 2,3-Butandion, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3-(*2H*)-furanon (HDMF), Buttersäuremethylester, Buttersäureethylester und 2-Methylpropansäuremethylester zu den wichtigsten Verbindungen zählen.

Rekonstitutionsexperimente deuten darauf hin, dass insbesondere 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3-(2*H*)-furanon eine entscheidende Rolle spielt.

Auch Benzoesäureethylester und die Methyl- und Ethylester von Zimtsäure wurden im Aroma von Erdbeerfrüchten nachgewiesen (Schreier, 1980; Gomes da Silva und Chaves das Neves, 1999).

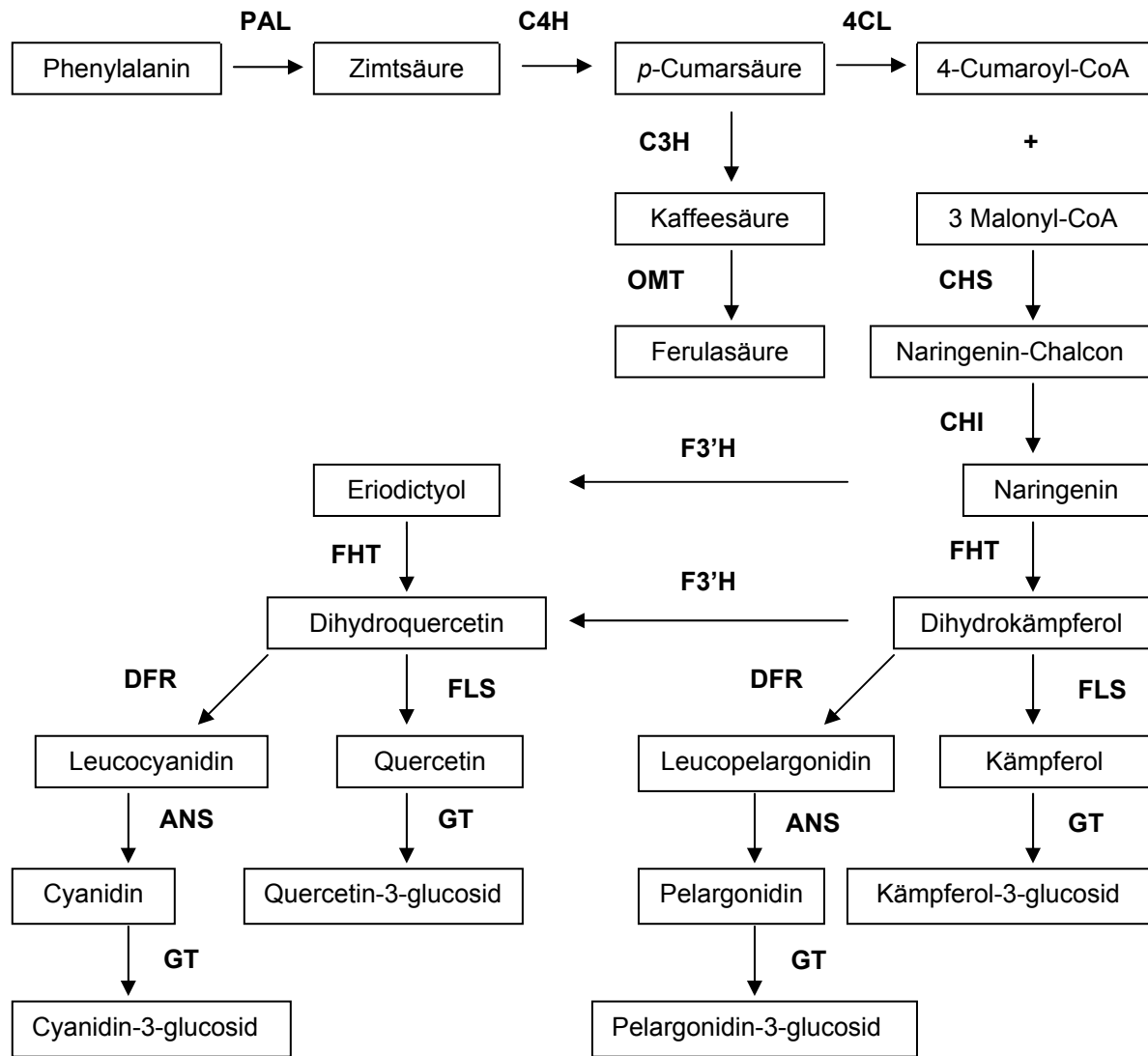
#### 1.2.2.2 Phenylpropanstoffwechsel und Flavonoid-Biosynthese

Die in Erdbeeren vorkommenden Anthocyane, Flavonole, Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren lassen sich aus dem Phenylpropanstoffwechsel ableiten (Forkmann und Martens, 2001; Heldt, 2003; Abb. 7). Ausgangspunkt ist die Aminosäure Phenylalanin, die über den Shikimatweg gebildet wird. Die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) katalysiert die Abspaltung von Ammoniak und die Bildung von Zimtsäure. Durch Abspaltung eines C<sub>2</sub>-Fragments werden aus Phenylpropanen Benzoesäurederivate gebildet. Aus einem Molekül 4-Cumaroyl-CoA und drei Molekülen Malonyl-CoA bildet die Chalcon-Synthase (CHS) das Grundgerüst der Flavonoide. Die wichtigsten Substrate für die Hydroxylierung des B-Rings sind Naringenin und Dihydrokämpferol. Einen weiteren Verzweigungspunkt stellen Dihydroquercetin und Dihydrokämpferol dar. Durch die Flavonol-Synthase (FLS) entstehen die entsprechenden Flavonole, während die Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) und die Anthocyanidin-Synthase (ANS) zur Bildung der Anthocyanidine führt. Sowohl Flavonole als auch Anthocyanidine werden anschließend durch Glycosyltransferasen (GT) glycosyliert.

#### 1.2.2.3 Anthocyane

Erdbeeren enthalten ausschließlich Glycoside der Anthocyanidine Pelargonidin und Cyanidin (Bakker et al., 1994; Abb. 8). Der wichtigste Farbstoff der Kultur-erdbeere ist Pelargonidin-3-glucosid, der in der Varietät Elsanta 92 % der gesamten Anthocyane ausmacht. Daneben wurden geringere Mengen Cyanidin-3-glucosid (4 %) und andere Glycoside von Pelargonidin nachgewiesen. Die Konzentration der Anthocyane ist insgesamt niedriger als in anderen, stärker gefärbten Früchten wie der Brombeere und schwankt relativ stark von Sorte zu Sorte. Es sind Werte zwischen 23,3 und 45,3 mg/100 g Frischgewicht festgestellt worden (Wang und Lin, 2000).

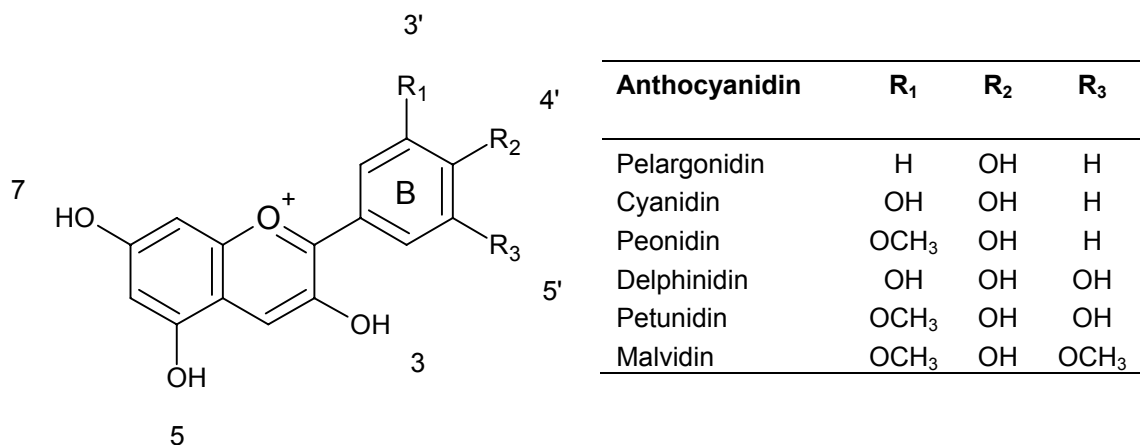




**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der Biosynthese der Flavonoide (Forkmann und Martens, 2001; Winkel-Shirley, 2001). Die Namen der entsprechenden Enzyme wurden wie folgt abgekürzt: PAL: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, C4H: Zimtsäure-4-Hydroxylase, C3H: *p*-Cumarsäure-3-Hydroxylase, OMT: O-Methyltransferase, 4CL: *p*-Cumarsäure:CoA Ligase, CHS: Chalcon-Synthase, CHI: Chalcon-Isomerase, F3'H: Flavonoid-3'-Hydroxylase, FHT: Flavanon-3-Hydroxylase, FLS: Flavonol-Synthase, DFR: Dihydroflavonol-4-Reduktase, ANS: Anthocyanidin-Synthase, GT: Glucosyltransferase.

Kürzlich wurden auch dimere Anthocyane in Erdbeerfrüchten identifiziert, die aus Pelargonidin und vier verschiedenen Flavanolen (Catechin, Epicatechin, Afzelechin und Epiafzelechin) bestehen, die über Position 4 des Flavanols und Position 8 des Anthocyanidins miteinander verbunden sind (Fossen et al., 2004). Auch ein neuartiges Aglycon, 5-Carboxypyranopelargonidin, ist in Erdbeerfrüchten identifiziert worden (Andersen et al., 2004). Das entsprechende Malvidin-Derivat wurde bereits in Rotwein nachgewiesen und Vitisidin A genannt.

Interessanterweise unterscheiden sich Blütenboden und Achänen in der Zusammensetzung der Anthocyane. Im Blütenboden dominiert Pelargonidin-3-glucosid, während die Achänen fast gleiche Mengen an Cyanidin- und Pelargonidin-3-glucosid aufweisen (Aaby et al., 2005; Yoshida und Tamura, 2005). Auch der Gehalt an malonylierten Anthocyanen ist in den Achänen deutlich erhöht. Anthocyane sind in grünen und weißen Früchten praktisch nicht nachweisbar (Cheng und Breen, 1991). Der Gehalt an Anthocyanen nimmt etwa 23 Tage nach der Anthese sprunghaft zu und erreicht den höchsten Wert in reifen roten Früchten.



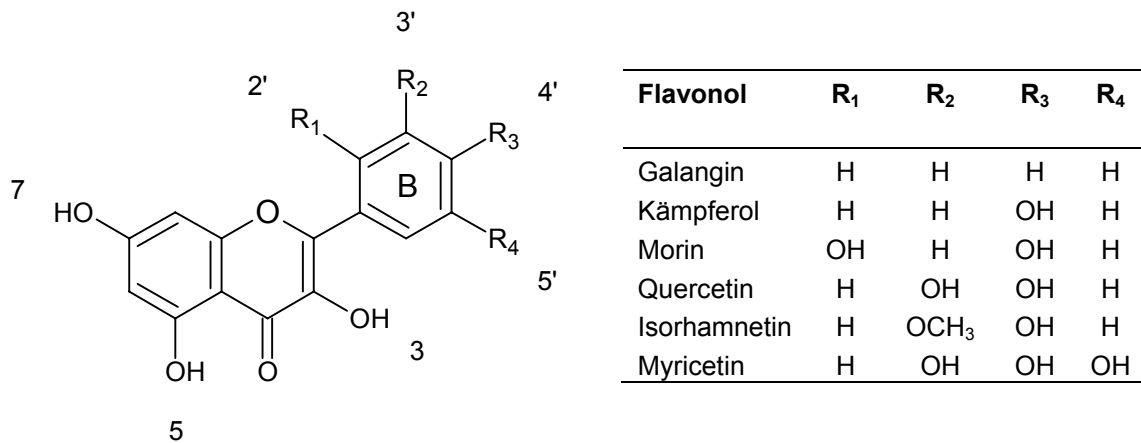
**Abbildung 8:** Strukturformel und Substitutionsmuster der Anthocyanidine.

#### 1.2.2.4 Flavonole

Der Gehalt an Flavonolen ist in den verschiedenen Erdbeersorten stark unterschiedlich (Mikkonen et al., 2002; Abb. 9). Quercetin und Kämpferol sind in der Regel die häufigsten Aglyca (Häkkinen und Törrönen, 2000). Der Gehalt an Kämpferol schwankte in sechs Cultivaren von 0,2 bis 0,9 mg/100 g Frischgewicht und Quercetin wurde mit 0,3 bis 0,5 mg/100 g Frischgewicht bestimmt. Myricetin wurde im Cultivar Honeyone in relativ großen Mengen (1,7 mg/100 g Frischgewicht) nachgewiesen (Mikkonen et al., 2002). Interessanterweise zeigen Sorten mit höheren Flavonol-Gehalten auch eine größere Resistenz gegen Pilzkrankungen. Die Konzentration an Flavonolen (bezogen auf das Frischgewicht) ist in den Achänen höher als im Blütenboden (Aaby et al., 2005).

Erdbeerfrüchte weisen ein komplexes Flavonolglycosidmuster auf. In der Literatur wurden beispielsweise sieben verschiedene Glycoside von Kämpferol beschrieben (Macheix et al., 1990). Ryan (1971) identifizierte 3-glucoside und 3-glucuronide von Quercetin und Kämpferol sowie Kämpferol-7-glucosid. Henning (1981) berichtete, dass praktisch nur Glycoside von Quercetin und

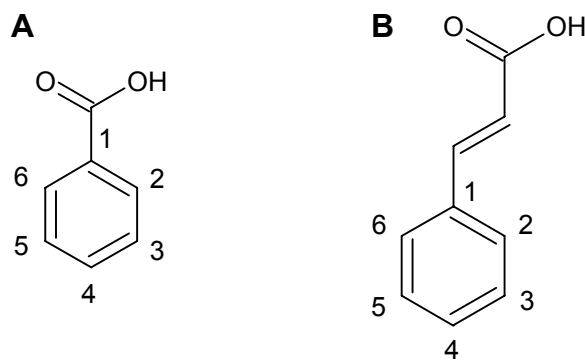
Kämpferol in Erdbeerfrüchten vorkommen. Als Hauptglycoside erkannte er 3-glucuronide, 3-glucoside und 3-xylosylglucuronide. Als Nebenglycoside wurden einige 3,7-diglycoside identifiziert. Die Konzentration der Phenole und Flavonoide ohne Tannine ist in grünen Früchten am größten und sinkt anschließend stetig ab (Cheng und Breen, 1991; Wang und Lin, 2000).



**Abbildung 9:** Strukturformel und Substitutionsmuster der Flavonole.

#### 1.2.2.5 Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren

Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren kommen in vielen Früchten mit D-Glucose konjugiert vor (Abb. 10).



Benzoensäuren (A)	Zimtsäuren (B)	2	3	4	5
Salicylsäure	<i>o</i> -Cumarsäure	OH	H	H	H
3-Hydroxybenzoesäure	<i>m</i> -Cumarsäure	H	OH	H	H
4-Hydroxybenzoesäure	<i>p</i> -Cumarsäure	H	H	OH	H
3,4-Dihydroxybenzoesäure	Kaffeensäure	H	OH	OH	H
Vanillinsäure	Ferulasäure	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Gentisinsäure	-	OH	H	H	OH
Gallussäure	-	H	OH	OH	OH
-	Sinapinsäure	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>

**Abbildung 10:** Strukturformeln von Benzoesäure (A) und Zimtsäure (B) und die in dieser Arbeit als Substrate verwendeten Derivate mit ihren gebräuchlichen Trivialnamen.

In Erdbeerfrüchten dominiert mengenmäßig *p*-Cumaroylglucose, das in zwei Varietäten mit 14 bzw. 27 mg/100 g Frischgewicht gefunden wurde (Herrmann, 1989). An Hydroxybenzoesäure-Verbindungen wurde vor allem *p*-Hydroxybenzoesäure-Glucosid nachgewiesen (Tab. 2).

**Tabelle 2:** Hydroxyzimtsäure- und Hydroxybenzoesäure-Verbindungen in Erdbeerfrüchten (Herrmann, 1989).

Verbindung	Konzentration [mg/kg Frischgewicht]
<i>p</i> -Cumaroylglucose	14-27
Feruloylglucose	1
Caffeoylglucose	1
<i>p</i> -Cumarsäure-Glucosid	Spuren
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure-Glucosid	3-7
5-Galloylchinasäure	1

Eine neue Untersuchung zeigte, dass auch Zimtsäure- und Sinapinsäure-glucose-Ester in Erdbeerfrüchten vorliegen und die Konzentration der Glucose-Ester von Zimtsäure, *p*-Cumarsäure und Kaffeesäure während der Frucht-reifung ansteigt (Lunkenbein et al., 2006a).

#### 1.2.2.6 Ernährungswissenschaftliche Aspekte

Erdbeeren enthalten durchschnittlich 56,7 mg Vitamin C pro 100 g Frischgewicht (Hancock, 1999). Daneben gelten Erdbeerfrüchte auch wegen des Gehalts an verschiedenen Polyphenolen als wertvolles Lebensmittel. Die antioxidativen Eigenschaften der Polyphenole werden von manchen Autoren mit dem Potential, das Risiko koronarer Herzkrankheiten zu verringern, in Verbindung gebracht (Törrönen und Määttä, 2002; Hannum, 2004). Ellagsäure, die bis zu 41 % der gesamten Polyphenole ausmacht und Quercetin werden darüber hinaus auch antikarzinogenes Potential zugesprochen. *In vitro* reduzieren Erdbeerextrakte durch oxidativen Stress induzierte Neurotoxizität und weisen eine neuroprotektive Aktivität auf (Heo und Lee, 2005).

Die Art des glycosidisch gebundenen Zuckers entscheidet über die Bioverfügbarkeit und das antioxidative Potential der entsprechenden Flavonole. So weist Quercetin-3-rutinosid nur 20 % der Bioverfügbarkeit von Quercetin-4'-glucosid auf (Olthof et al., 2000). Das nach Abspaltung von Rhamnose entstehende Quercetin-3-glucosid hat dagegen eine dem Quercetin-4'-glucosid vergleich-

bare Bioverfügbarkeit im Menschen. In einem Rattenmodell wurde für Quercetin-4'-glucosid ein höheres antioxidatives Potential als für Quercetin-3-glucosid festgestellt (Murota et al., 2004).

In Erdbeerfrüchten korreliert der Gesamtphenolgehalt mit der antioxidativen Aktivität (Wang und Lin, 2000). Die höchsten Werte wurden in kleinen grünen Früchten festgestellt. Die Anthocyane scheinen in der Erdbeerfrucht nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da das vorherrschende Pelargonidin ein schwächeres antioxidatives Potential als Cyanidin oder Delphinidin aufweist.

### *1.2.3 Untersuchungen zum Sekundärstoffwechsel reifender Erdbeerfrüchte*

#### 1.2.3.1 Enzymisolierung und Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Reifung der Erdbeerfrucht wurde auf unterschiedlichen Ebenen untersucht. Eine Methode ist die Untersuchung der Aktivität bestimmter Enzyme während der verschiedenen Wachstums- und Reifestadien. Relativ früh wurde festgestellt, dass die Aktivitäten der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) und UDP-Glucose:Flavonoid-3-O-Glucosyltransferase (UDPGFT) parallel zum Anthocyanengehalt ansteigen (Given et al., 1988b). Die Aktivität der UDPGFT ist mit dem Anthocyanidin Malvidin bestimmt worden. Cheng und Breen (1991) haben zwei Maxima in der Aktivität der PAL festgestellt. Das erste tritt 5 Tage nach der Anthese auf und ist mit dem höchsten Gehalt an löslichen Polyphenolen assoziiert. Die Akkumulation der Anthocyane verläuft parallel zu einem zweiten Peak der PAL-Aktivität, der 23 Tage nach der Anthese beginnt.

Kürzlich wurden die Aktivitäten verschiedener Schlüsselenzyme der Flavonoid-Biosynthese bestimmt (Halbwirth et al., 2006). Dabei zeigte sich, dass Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL), Chalcon-Synthase (CHS), Chalcon-Isomerase (CHI), Flavanon-3-Hydroxylase (FHT), Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR), Flavonoid-3-glucosyltransferase (F3GT) und Flavonoid-7-glucosyltransferase (F7GT) zwei Aktivitäts-Maxima aufweisen. Die Enzyme unterschieden sich allerdings in den genauen Aktivitätsmustern. So wies die CHS nur ein sehr schwach ausgeprägtes zweites Maximum auf. Berücksichtigt werden muss auch, dass die Aktivität von F3GT mit Quercetin bestimmt wurde. Dies erklärt das zu früheren Berichten unterschiedliche Aktivitätsmuster (Given et al., 1988b). Die Autoren schließen aus den Ergebnissen, dass die Biosynthese der Flavonoide in Erdbeerfrüchten in zwei Phasen abläuft (Halbwirth et al., 2006).

Der erste Bericht über die Aufreinigung einer Glycosyltransferase aus der Erdbeerfrucht beschreibt eine Flavonoid-7-glucosyltransferase mit relativ breiter Substratspezifität (Cheng et al., 1994). Es wurden *in vitro* sowohl Flavonole, Flavanone und ein Flavon akzeptiert. Das Reaktionsprodukt von Quercetin wurde auf Grund der  $R_f$ -Werte dünnschichtchromatographisch als Quercetin-7-glucosid identifiziert.

#### 1.2.3.2 Untersuchungen zur Genexpression

Medina-Escobar et al. (1997a) wendeten erfolgreich differentielles Screening einer substraktiven cDNA-Bibliothek kombiniert mit *Southern Blots* an, um reife-korrelierte Gene aus verschiedenen Stoffwechselwegen zu klonieren.

In einer cDNA-Bibliothek sind von Manning (1998) 26 verschiedene Klone identifiziert worden, die eine reifekorrelierte Expression zeigten. Die Expression verschiedener Chalcon-Synthasen (*CHS*), Flavonoid-3-Hydroxylasen (*F3H*) und einer UDP-Glucose:Flavonol-3-O-glucosyltransferase (*UFGT*) wurde anschließend mit *Northern Blots* detaillierter untersucht. Während *CHS* und *F3H* zwei Maxima aufwiesen, wurde *UFGT* nur in pinkfarbenen und roten Früchten exprimiert.

Durch *Northern Blots* konnte gezeigt werden, dass auch die Expression einer potentiellen Dihydroflavonol-4-Reduktase (*DFR*) zwei Maxima aufweist (Moyano et al., 1998). Die Expression steigt zunächst in grünen Früchten an, fällt dann aber wieder ab und steigt mit beginnender Anthocyan-Akkumulation stark an. Die Genexpression wird durch das Entfernen der Achänen mittelgroßer grüner Früchte induziert und kann durch eine Auxin-Paste wieder inhibiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Expression von *DFR* durch das Pflanzenhormon Auxin reguliert wird (vgl. 1.2.1.3).

Später wurde auch quantitative PCR zur Bestimmung des Genexpressionsprofils herangezogen (Blanco-Portales et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl *Northern Blots* als auch quantitative PCR vergleichbare Ergebnisse liefern. Eine Zimtalkohol-Dehydrogenase (*CAD*), die *in vitro* die Bildung von Monolignolen katalysiert, wird in Erdbeerfrüchten reifekorreliert exprimiert. Durch das Entfernen der Achänen wird die Genexpression induziert, allerdings hat die Applikation eines synthetischen Auxins keine Auswirkung.

Neuere Untersuchungen verwendeten DNA-Microarrays zur umfassenden Untersuchung der Genexpression (Aharoni und O'Connell, 2002; Aharoni et al.,

2002). Damit wurde die Expression von 1701 cDNAs verglichen. Es konnten 537 verschiedene cDNAs identifiziert werden, die in den verschiedenen Reifestadien und/oder in Achänen und Blütenboden unterschiedlich exprimiert sind. Darunter befanden sich vier Sequenzen, die eine hohe Ähnlichkeit zu Glycosyltransferasen aufweisen.

#### 1.2.3.3 Heterologe Expression rekombinanter Proteine

Eine Reihe von Enzymen des Sekundärstoffwechsels wurde auch kloniert und heterolog in Wirtsorganismen exprimiert. Eine Alkohol-Acyltransferase (SAAT) aus Erdbeeren ist durch Sequenzieren einer reifekorrelierten cDNA identifiziert und in *Escherichia coli* heterolog exprimiert worden (Aharoni et al., 2000). Das rekombinante Protein katalysierte *in vitro* die Bildung einer Reihe flüchtiger Ester, die eine wichtige Rolle für das Aroma der reifen Erdbeerfrucht spielen.

An der Biosynthese des wichtigen Aromastoffs 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3-(2H)-furanon (HDMF) ist eine Chinon-Oxidoreduktase aus Erdbeeren (FaQR) beteiligt (Raab et al., 2006). Das rekombinante Protein katalysiert den letzten Schritt in der Biosynthese von HDMF. Daneben reduziert das rekombinante Enzym *in vitro* auch das nicht natürlich vorkommende 9,10-Phenanthrenchinon.

Auch eine Glycosyltransferase der Erdbeerfrucht wurde bereits erfolgreich heterolog exprimiert (Lunkenbein et al., 2006a). *In vitro* akzeptiert FaGT2 Benzoe- und Zimtsäure und ihre Derivate und bildet energiereiche Glucose-Ester, die Vorstufen für andere Sekundärmetabolite wie Aromastoffe sein können.

#### 1.2.3.4 Herabregulation von Genen *in planta*

Durch die Expression einer *antisense* Sequenz einer Pektat-Lyase konnte die Expression des entsprechenden Gens in transgenen Erdbeerfrüchten herabreguliert werden (Jiménez-Bermúdez et al., 2002). Die transgenen Früchte unterschieden sich nicht in Farbe, Größe, Gewicht und Form, wiesen aber eine deutlich festere Textur auf. Auch die wirtschaftlich bedeutsame Erweichung der Früchte nach der Ernte war verlangsamt. Es wird vermutet, dass das entsprechende Protein am Abbau des Pektins der Zellwände beteiligt ist und so zu einer Erweichung der Textur beiträgt (Medina-Escobar et al., 1997b).

Die Herabregulation der *FaGT2* durch ein *antisense* Konstrukt zeigte, dass die Substratspezifität *in vitro* und *in vivo* erheblich voneinander abweichen kann (Lunkenbein et al., 2006a). Während das rekombinante Enzym zahlreiche Deri-

vate von Benzoesäure und Zimtsäure akzeptiert, waren in den transgenen Linien nur die Gehalte von Zimtsäureglucose-Ester und *p*-Cumarsäureglucose-Ester signifikant erniedrigt. Da die Konzentrationen der Aromastoffe Zimtsäuremethyl- und Zimtsäureethylester in der Sorte Calypso sehr niedrig sind, konnte keine Aussage über die Auswirkung der Herabregulation auf die mutmaßlichen Endprodukte des Stoffwechselweges gemacht werden.

Durch die Expression eines *antisense* Konstrukts ist auch der Transkriptgehalt der Chalcon-Synthase (CHS) in Erdbeerfrüchten in neun Linien um mindestens 50 % erniedrigt worden (Lunkenbein et al., 2006b). Ein sichtbarer Phänotyp wurde aber nur detektiert, wenn die Expression auf unter 25 % reduziert war. In diesen transgenen Linien war der Gehalt an Anthocyanen und Flavonolen stark erniedrigt. Die Vorläufer des Flavonoid-Biosynthesewegs waren in den allgemeinen Phenylpropanoidweg verschoben und führten zu stark erhöhten Gehalten an verschiedenen Hydroxyzimtsäureestern, *p*-Cumarylalkohol und *p*-Cumaryl-1-acetat. Durch diese Ergebnisse konnte die Schlüsselstellung der CHS zwischen Phenylpropanoid- und Flavonoidweg bestätigt werden.

Über eine alternative Methode zu der zeitaufwändigen Herstellung transgener Pflanzen wurde kürzlich berichtet (Hoffmann et al., 2006). Durch die Injektion eines *intron-hairpin* (ihp)-Konstrukts in grüne Früchte kann die Expression reifekorrelierter Gene unterdrückt werden. Die Methode wurde zunächst für die Chalcon-Synthase (CHS) entwickelt und führte zu Früchten, die auch im reifen Stadium keinerlei Anthocyane akkumulierten. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der transgenen Linien waren die Konzentrationen der Hydroxyzimtsäureglucose-Ester stark erhöht (Lunkenbein et al., 2006b). Diese Methode sollte prinzipiell für alle reifekorrelierten Gene anwendbar sein und somit einen wichtigen Beitrag zur Untersuchung der Erdbeerfruchtreifung liefern.

### 1.3 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten neue Erkenntnisse über die Glycosyltransferasen der Erdbeerfrucht gewonnen werden. Aus einer cDNA Bibliothek waren bereits vier vollständige offene Leserahmen von Glycosyltransferasen bekannt, von denen aber erst *FaGT2* detailliert untersucht worden war (Lunkenbein, 2006; Lunkenbein et al., 2006a). Zusätzlich wurden in anderen cDNA Bibliotheken weitere unvollständige Sequenzen von Glycosyltransferasen identifiziert.



Durch *Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE) mussten hier zunächst die vollständigen offenen Leserahmen gewonnen werden.

Die Volllängensequenzen sollten anschließend in geeignete Expressionssysteme kloniert und die entsprechenden Proteine heterolog exprimiert werden. Ein Ziel war es, die rekombinanten Enzyme nach partieller Aufreinigung biochemisch zu charakterisieren. Dazu gehörte die Bestimmung der Substratspezifität, die Identifizierung der Reaktionsprodukte, die Optimierung der Reaktionsbedingungen und die Bestimmung kinetischer Parameter.

Um wichtige Informationen über die Funktion der Glycosyltransferasen *in planta* zu erhalten, sollten die Genexpressionsprofile in verschiedenen Reifestadien und vegetativen Geweben mit quantitativer PCR untersucht und zusätzlich durch das Entfernen der Auxin-produzierenden Achänen Erkenntnisse über die hormonelle Kontrolle der Genexpression gewonnen werden.

Die *in vivo* Funktion von FaGT1 sollte schließlich mittels RNA-Interferenz bestimmt werden. Dafür wurde die kürzlich mit der Chalcon-Synthase (CHS) angewandte Injektion eines *intron-hairpin* (ihp)-Konstrukts in grüne Früchte verwendet (Hoffmann et al., 2006). Die transfizierten Früchte sind anschließend mit semi-quantitativer PCR und Flüssigchromatographie-Elektrospray-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS) auf Transkript- und Metabolitenebene analysiert worden.

Durch die integrierte Untersuchung der verschiedenen Glycosyltransferasen der Erdbeerfrucht konnte die komplexe Bildung zahlreicher glycosylierter Verbindungen näher erforscht werden. Die Kombination von biochemischen *in vitro* Daten mit Genexpressionsprofilen und Metabolitenkonzentrationen ermöglichte eine funktionelle Analyse der entsprechenden Enzyme und ihrer möglichen Bedeutung für die Fruchtreifung.

## 2 ERGEBNISSE

### 2.1 Volllängensequenzen und bioinformatische Charakterisierung

#### 2.1.1 Isolierung der Glycosyltransferase-Sequenzen

Beim Sequenzieren von 1 100 Klonen einer EST-Bibliothek aus reifen Erdbeerfrüchten wurden vier Klone identifiziert, die in einer BLASTx-Datenbankabfrage eine hohe Ähnlichkeit zu pflanzlichen Glycosyltransferasen aufwiesen (Altschul et al., 1990 und 1997; Aharoni und O'Connell, 2002). Die Sequenzen der vollständigen offenen Leserahmen wurden bereits beschrieben und aufgrund der Ergebnisse der Datenbankabfrage als *Fragaria x ananassa* Glycosyltransferasen (*FaGT*) bezeichnet und mit den Nummern 1-4 versehen (Lunkenbein et al., 2006a).

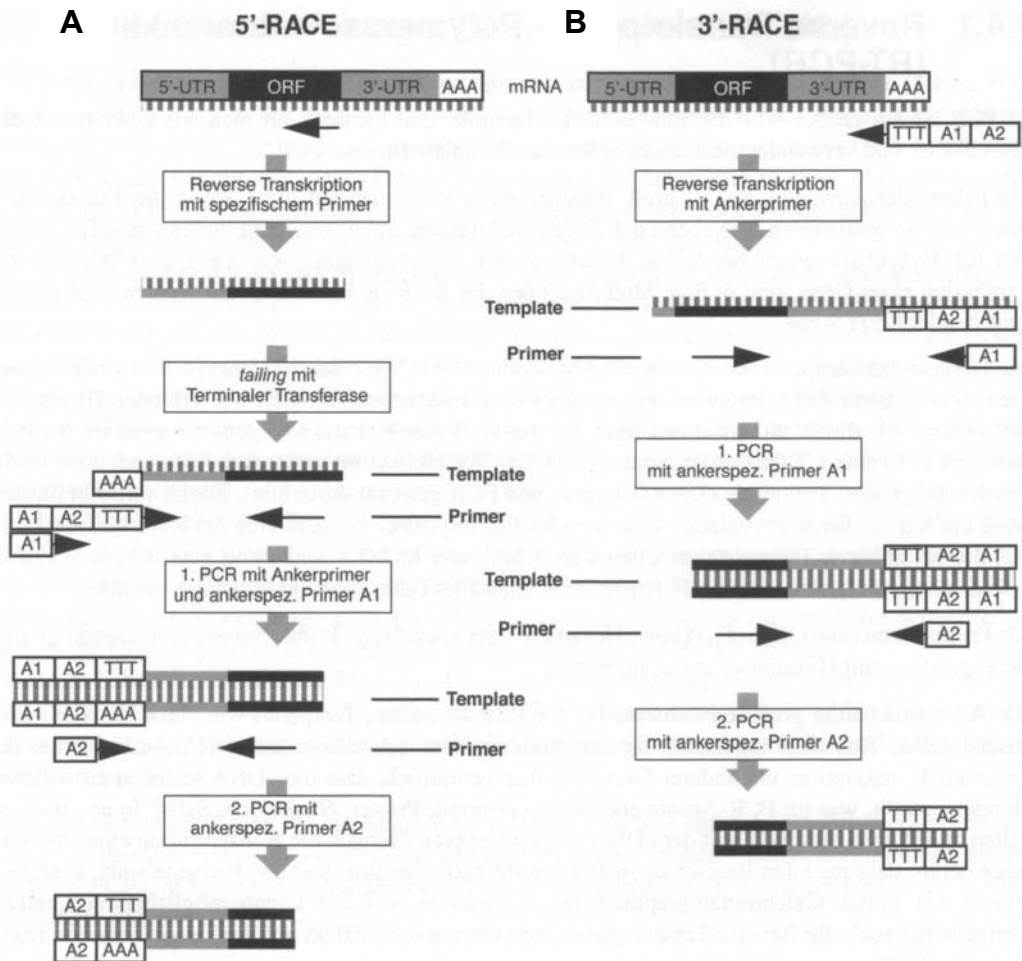
Bei der Untersuchung weiterer cDNA-Bibliotheken am Departamento de Bioquímica y Biología Molecular an der Universität Córdoba (Spanien) sind drei weitere Klone identifiziert worden, die wahrscheinlich für Glycosyltransferasen codieren (Altschul et al., 1990 und 1997; Juan Munoz-Blanco, Persönliche Mitteilung). Die zusätzlichen Sequenzen wurden entsprechend als *Fragaria x ananassa* Glycosyltransferasen 5-7 (*FaGT5-7*) bezeichnet. Für die heterologe Expression musste zunächst durch *Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE) der vollständige offene Leserahmen ermittelt werden (Frohmann et al., 1988; Schaefer, 1995). Ausgehend von einem kurzen Teil einer bekannten Sequenz ermöglicht diese auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierende Methode die Vervielfältigung der unbekanntenen 3'- und 5'-Enden des offenen Leserahmens.

#### 2.1.2 3' Rapid Amplification of cDNA Ends (3' RACE)

Ein *Alignment* der *FaGT5*-Sequenz mit den vollständigen offenen Leserahmen bekannter Glycosyltransferasen deutete an, dass das 5'-Ende des offenen Leserahmens bereits enthalten war. Das noch fehlende 3'-Ende der Sequenz wurde durch 3' RACE gewonnen (Abb. 11B). Mit einem genspezifischen und einem ankerspezifischen Primer wurde der fehlende Teil erfolgreich amplifiziert und anschließend sequenziert (Schaefer, 1995). *FaGT5* weist einen offenen Leserahmen von 1428 bp auf und codiert für ein Protein mit 475 Aminosäuren (Tab. 3).

### 2.1.3 5' Rapid Amplification of cDNA Ends (5' RACE)

Der bekannte Teil der *FaGT6* und *FaGT7*-Sequenzen schloss bereits das 3'-Ende des offenen Leserahmens ein, da die entsprechenden Klone den PolyA-Schwanz der mRNA enthielten. Um das unbekannte 5'-Ende der Sequenz zu vervielfältigen, wurde eine 5' RACE durchgeführt (Abb. 11A).



**Abbildung 11:** Prinzip der *Rapid Amplification of cDNA Ends* (RACE). **A** 5' RACE. Die reverse Transkription wird mit einem genspezifischen Primer durchgeführt, der möglichst nahe am 5'-Ende der bekannten Sequenz hybridisiert. Nach Aufreinigung wird die erhaltene cDNA durch terminale Transferase mit einem PolyA-Schwanz versehen. In einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Ankerprimer, ankerspezifischem und genspezifischem ( ← ) Primer kann das unbekannte 5'-Ende amplifiziert werden. Falls in der ersten PCR keine ausreichende Amplifikation erfolgt, kann eine zweite PCR mit geschichteten Primern durchgeführt werden. **B** 3' RACE. Nach reverser Transkription mit einem Ankerprimer kann die cDNA direkt für die PCR mit einem ankerspezifischen und einem genspezifischen Primer eingesetzt werden. Falls dabei keine ausreichende Amplifikation erfolgt, kann ebenfalls eine zweite PCR mit geschichteten Primern durchgeführt werden (Mülhardt, 2006).

Die reverse Transkription ist mit einem genspezifischen Primer durchgeführt worden, der komplementär zur betreffenden mRNA-Sequenz ist (Schaefer, 1995). Die erhaltene cDNA wurde durch terminale Transferase mit einem PolyA-Schwanz am 5'-Ende der Sequenz versehen. Anschließend konnte das unbekannte 5'-Ende in einer Polymerase-Kettenreaktion mit Ankerprimer, ankerspezifischem und genspezifischem Primer amplifiziert werden.

Sowohl bei *FaGT6* als auch bei *FaGT7* sind zunächst nur Teile des gesuchten 5'-Endes amplifiziert worden. Deshalb wurde die 5' RACE mit neuen genspezifischen Primern wiederholt. Aus den erhaltenen Sequenzen wurden die Volllänge-Sequenzen beider Glycosyltransferasen zusammengesetzt. *FaGT6* und *FaGT7* weisen offene Leserahmen von 1440 bp bzw. 1464 bp auf und codieren für Proteine mit 480 bzw. 487 Aminosäuren (Tab. 3).

#### 2.1.4 Übersicht und Klonierung der offenen Leserahmen

Nach der erfolgreichen Durchführung der RACE waren insgesamt sieben vollständige offene Leserahmen potentieller Glycosyltransferasen der Erdbeerfrucht bekannt (Tab. 3). Die biochemische Charakterisierung und die Funktion der *FaGT2* sind bereits ausführlich beschrieben worden (Lunkenbein, 2006; Lunkenbein et al., 2006a).

Zur biochemischen Charakterisierung der verbleibenden sechs Glycosyltransferasen wurden zunächst die vollständigen offenen Leserahmen mit einer korrekturlesenden Polymerase amplifiziert und subkloniert. Die verwendeten Primer führten dabei vor dem Start- und Stopp-Codon Restriktionsschnittstellen ein (Tab. 3). Nach vollständiger Sequenzierung der subklonierten offenen Leserahmen wurden die Glycosyltransferasen in die Expressionsvektoren kloniert.

**Tabelle 3:** Glycosyltransferasen der Erdbeerfrucht (*FaGT1*, *FaGT3-7*). Die Tabelle enthält die GenBank-Akzessionsnummern der Nukleotidsequenzen, die Länge der offenen Leserahmen (ORF), die Größe der codierten Proteine und die zum Klonieren in den Expressionsvektor verwendeten Restriktionsschnittstellen. Zusätzlich sind die besten Treffer einer BLASTp-Datenbankabfrage angegeben.

	GenBank- Nummer	ORF [bp]	Amino- säuren	M [kDa]	Schnitt- stellen	Bester BLASTp-Treffer (Altschul et al., 1990 und 1997)
<i>FaGT1</i>	AY663784	1401	466	50,5	<i>EcoRI</i> <i>XhoI</i>	UDP-Glucose:Flavonoid 3-O-GT aus <i>Vitis Vinifera</i> (Ford et al., 1998)
<i>FaGT3</i>	AY663786	1437	478	52,8	<i>BamHI</i> <i>XhoI</i>	FaGT6 aus <i>Fragaria x ananassa</i> (diese Arbeit)
<i>FaGT4*</i>	AY663787	1437	478	54,3	<i>BamHI</i> <i>XhoI</i>	UDP-Rhamnose:Anthocyanidin-3-glucosid RT aus <i>Petunia hybrida</i> (Brugliera et al., 1994; Kroon et al., 1994)
<i>FaGT5</i>	DQ289586	1428	475	52,5	<i>EcoRI</i> <i>XhoI</i>	UDP-Glucose:Limonoid GT aus <i>Citrus unshiu</i> (Kita et al., 2000)
<i>FaGT6</i>	DQ289587	1440	479	53,5	<i>EcoRI</i> <i>NotI</i>	FaGT3 aus <i>Fragaria x ananassa</i> (Lunkenbein et al., 2006a; diese Arbeit)
<i>FaGT7</i>	DQ289588	1464	487	54,7	<i>BamHI</i> <i>XhoI</i>	IS5a aus <i>Nicotiana tabacum</i> (Horvath und Chua, 1996)

\* *FaRT1* (Lunkenbein et al., 2006a) wurde in *FaGT4* umbenannt, da kürzlich publizierte homologe Glycosyltransferasen auch UDP-D-Glucose akzeptierten (Morita et al., 2005; vgl. 2.1.7).

### 2.1.5 Klonierung der genomischen Sequenzen

Das Auftreten von Introns in den Sequenzen der *Arabidopsis thaliana* Glycosyltransferasen ist hilfreich bei der phylogenetischen Einordnung (Li et al., 2001). Deshalb wurden auch die genomischen Sequenzen der Glycosyltransferasen der Erdbeerfrucht bestimmt. Dazu ist DNA aus Erdbeerblättern isoliert und als Matrize in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt worden. Die gelelektrophoretische Untersuchung zeigte, dass für *FaGT1* und *FaGT5* PCR-Produkte erhalten wurden, die größer als die betreffenden offenen Leserahmen sind. Die anschließende Sequenzierung ergab, dass beide Sequenzen ein kurzes Intron aufweisen. Bei *FaGT1* sind 166 bp nach Position 493 des offenen Leserahmens eingefügt. Die Sequenz der *FaGT5* weist ein Intron von 164 bp nach Position 603 auf (Anhang).

### 2.1.6 Alignment und Nachweis der PSPG-Box

Die in dieser Arbeit behandelten Glycosyltransferasen wurden in die entsprechenden Protein-Sequenzen übersetzt und zusammen mit VvGT1 aus *Vitis vinifera* mit der Software MegAlign im Clustal W Modus nach Sequenzhomologien angeordnet (Thompson et al., 1994; Abb. 12).

```

VvGT1.PRO MSQTT-TNP---HVAVLAFFPSTHAAPLLAVVRLAAAPHAV-----SFFFTSQSNASIFHDSMHTMQC-NIKSYD 68
FaGT1.PRO MAPVS-NQVGG-HVAVLAFFPSTHAAPLLNIVCRLLAAAPSTL-----SFFNTKQSNSSILAGNTSVLRYSNVSVCE 71
FaGT3.PRO MEKPA-----ELVLISSPGIGHLVSTLEIAKLLVSRDOKLEITVLLIMHFFAVSKGTATAYVQSLADSSSPIQRINFIN 73
FaGT4.PRO MSSSSATKRKKLHIALFVWLAGHILPFLBVAKHIAKKGKVSFISTPPIQORLEKIPETLPLINLVQIPLPHVBNLEF 80
FaGT5.PRO MG--S-VGSDNTHIFLVCPAAGHINPMRLRGLKLAAG---LIVTFSTTEDYGNKMRNANGIVDNHPTPVNGGTFRF-E 73
FaGT6.PRO MKKAS-----ELIFIPFPGIGHIVSTVEIAKLLCRDNLLEFIIILMKPFPTADGSDVYTKSLAVDSLKTQRIFFVN 73
FaGT7.PRO WAMET-KSCQQIHLFFLPFARGHSEIPLTIIAKLFFSSHGARCITVITPFLNAPLFSKATQRGTEILV-----LIK 68

VvGT1.PRO ISDGVPEGYVVFAGRPOED--IELFTFAAPESF--RQGMVMAVETGREFVSLVADAFILW-FAADMAAENG-LAWLFPWTA 142
FaGT1.PRO VADGVPEGYVVFVGPQED--IELFMKAAPDNF--RGLASVAVSAGREVSCLVTDAAFFW-FGVHMADDGGVFWVFPWTA 146
FaGT3.PRO LPHTNMDHTEGSEVNSLVGEVSSQPHVKDA--VANRDRSK--T--TFLAGFVVMFECT-TMINVANQLG-VPSYVEFTS 145
FaGT4.PRO NAEATMD-----VPELVIPYLKIAHDGLEQG--ISEFLQAQSPD-----WIHDFAPHLPPIATKIL-GISNAEHSIF 145
FaGT5.PRO EFDDSLPLDPDDPRRTNLEFYVPLLELVGKE--LVTGMIKKHGFEGGARVSVCLVNNPFIEP-WVCDVATELG-IFCATLMIQ 149
FaGT6.PRO LKQ---EHPQSGATGFFTEIDSHKSHVKDA--VTRLMETKSET--TRIAGFVILMEFCT-GMLDLAHEFG-IPSYVEYTS 144
FaGT7.PRO PPSAEGAPLQDCESADLITQDMLGRFVVKATFLIEPHFEKILDE--HRPHCLVADAFET-WATDVAAKFR-LERLVHGT 144

VvGT1.PRO GPNSLSTHVIYI-DEIREKIG--VSGIQGREDELLNIEPGMSK---VRFRLQEGIVFGNLNLSFSR-MIHRMGQVLEPKAT 215
FaGT1.PRO GPASLSAIVHT-DLIRSTTS---GGCHD-EKETITVLAGMSK---VRFQDLPEGLIEFNGLESLSFSR-MIHRMGQVLEPKAT 217
FaGT3.PRO GAATLGLLHHL-QELRDOYN--KDCTEFKLSDAELIIPSFNFPLEA-KV-LBGRMLVKDSAEFFLN-VIKRFPETK---- 215
FaGT4.PRO NASSMCFPGSTSPNRVSPYAPRKLKLEQFTSPPEWIPFPSKIYHREFEAKRIMDGLTLENASGVTDI---FRLESTIQGCF 222
FaGT5.PRO SCAVHSAMFH-----YN--AETVKFTEAPEELDVQLPSTPLLKHDEIPLSFLHPDPYAILGRAILGQFKKLSKSSY 219
FaGT6.PRO GAATLGLMFLH-QALRDEBN--KDCTEFKLSDAELVVSSEVNPVLPAAARV-LPSVVFKEGEGNFFLN-FAKRYRETK---- 215
FaGT7.PRO G-----FALCASLSVMY--QPHSNLSSDSSEFVLPNLEDEIKMTRSQLP--VFPDESE--FMK-MLKASIEIERSY 211

VvGT1.PRO AVFINSFEELDDSLTNDLRSKLEKTYL-NIGPFNLIIEPP-PVVENIT-----GCLQWLKEKKEPISVVIISFGTVT 282
FaGT1.PRO AVFINSFEELDEVITNDLRSKFKRFL-NVGPLDLEPP-ASAATTPQTAAEAVAGDGLSLWLDLQKVASVVIISFGSVT 295
FaGT3.PRO GILVNTFTDLES---HALHALSSDA-EIIPVYVGVPLLNLNSNESRVDSEVKKKNDILKWLDDQPPISVVFLOFGSMG 290
FaGT4.PRO VYFIRSCREIEGEWL-DLLEDLHEK----PIVLEPTGLLPSLPSRDEGKDSNWSKIAVWLDKQEKGVVYAAPGSEL 296
FaGT5.PRO -ILMDTIQLELEP-----EIVEEMSKVCLVFPVGLFKIPEATNTTIRGDLIRADCLWLSSKPPASVVIISFGSIV 290
FaGT6.PRO GILVNTFTLELEP-----HALQSLSSDG-KLIPVYVGVILLNVKSEGNQVSSSEKSKCKSDILEWLDLQPPISVVFLOFGSMG 290
FaGT7.PRO GVIWNSFYELEBAYANHYRKVGRRAWHILGPVVSFCNKATELKAERGSIKSSTA-EKHBLKWLDSRKPISVVIISFGSMV 290

VvGT1.PRO TPPPAEVVALSEALEASRVFFIWSLR-----DKARWELPEGFLEKTRGTCGMVVP-WAPQAEVLAHEAVGAF 347
FaGT1.PRO RPSPEELMALAEALASRVFFLWSLR-----DNLKRRQLDEFLSKGGKINGMVVP-WAPQPVLAHGSVGF 360
FaGT3.PRO SFDESQVREIAlANALEHAGHFLWSLRSPPTGKVAFFSDYDDHTGVLEPEGFDRDTGGIGKVI-GWAPQAVLAHPSVGF 369
FaGT4.PRO NLSCEVFNELALGLELISGLPFFVWLRKPSHSGS---DGSVKLELGEFDRVKGRLVWTTWAPQLKILSHESVGGF 369
FaGT5.PRO YLKEQVDEIAGHLSSGVSWFLWVVRPRAAGVDMH-----VLEPEGFLEKVGDNGLVQ-WSPEQVLAHPSLACF 361
FaGT6.PRO CFGEEDQVREIAlAHALOGGIRFLWSLRO-PSKEKIGFSDYTDYKAVLEPEGFDRDTDILGKVI-GWAPQAVLAHPSVGF 368
FaGT7.PRO RFADSQLEIAlAIGLEASQDFIWSVVK-----EKKEVEEWLEPEGFLEKTRGGLIIRWAPQVLIILSHHAIGAF 359
                                                                                               * * * * *

VvGT1.PRO VTHCGWNSLWESVAGGVPLICRPFPGDCLNARMVVDVLEIGVRI-----EGGVTKSGLMSECFDQ 408
FaGT1.PRO VTHCGWNSVLESVAGGVPLICRPFPGDCLNARMVVDVWVIGLIRL-----EGGVTKNGMLKSLDM 421
FaGT3.PRO VSHCGWNSLWESLWEGVVPATWFLYAECQLNAPQPVKELE---LAVBID---MSY---RSKSPFVIVSAKEIEPGRIFE 437
FaGT4.PRO ITHCGWNSLWESLQYGCPLIMIPMYDCELIARFWDN--KIGAEVPRD-EETGW-----FTNRLANSIKL 432
FaGT5.PRO ITHCGWNSVLEALTIGVFPVVTIEPQMGDQVINAQYLVDFVGVGLRCRGAENR-----LWLRQEVERKILLE 427
FaGT6.PRO VSHCGWNSLWESIWYGVPIATWPFYAECQVNAFELVYKELK---LAVBID---MGY---RKDSGVIVSRENIEKGIKE 436
FaGT7.PRO VTHCGWNSLWESVAGVPIATWPFVGEQCFYNE-KLVTEIH---RIGVPGSEKVALSFVDVNAETEGVWRREALEAVTR 435
***** * * * *

VvGT1.PRO ILSQEKKGLRENLRALRETAADRAVGPKGSSTENFITLVLDVSKPK----DV 456
FaGT1.PRO LLSQDKGFKMKNKINTLKQFAKQAVBPKGSSARNFESLLEMTT-----N. 467
FaGT3.PRO VMEIDSS-DIRKRVKEMSEKGRKALMDGSSYTSLGHFIDCI. 479
FaGT4.PRO IVVDHEGKQYRDGANESKLEFRDKELHD---RYMDECEVYLETHAHHEV. 479
FaGT5.PRO ATVGEKAVQLKHNAKWKVVAEEAVAEFGSSQRNLHDFIDEIARTS----IA. 476
FaGT6.PRO VME-QES-ELRKRVKEMSQMSRKALEEDGSSYSLSGRFLDQIT-----S. 480
FaGT7.PRO IMVGDEAVETRSRVKELGEMARFAVEEGSSFLDLSALVGLNLDLAFGGGLE. 488

```

**Abbildung 12:** Alignment von VvGT1 aus *V. vinifera* mit den in dieser Arbeit charakterisierten Glycosyltransferasen (FaGT1, FaGT3-7). Die übersetzten Proteinsequenzen wurden mit der Software MegAlign und der Clustal W Methode angeordnet (Thompson et al., 1994). Identische Aminosäuren sind schwarz gekennzeichnet. Die hochkonservierte Region der PSPG-Box ist mit einem Kasten hervorgehoben (Hughes und Hughes, 1994). Alle Aminosäuren der PSPG-Box, die in über 80 % der pflanzlichen Glycosyltransferasen vorkommen, sind mit einem Sternchen markiert (Vogt und Jones, 2000).

Der Bereich der *Plant Secondary Product Glycosyltransferase Box* (PSPG-Box) ist mit einem Kasten gekennzeichnet (Hughes und Hughes, 1994). Aminosäuren der PSPG-Box, die in über 80 % der pflanzlichen Glycosyltransferasen identisch sind, wurden zusätzlich mit einem Sternchen markiert (Vogt und Jones, 2000). Alle potentiellen Glycosyltransferasen der Erdbeerfrucht enthalten diesen charakteristischen und hochkonservierten Bereich am C-terminalen Ende des Proteins. Die Ähnlichkeiten am N-Terminus sind dagegen relativ gering. Das Ergebnis der BLAST-Datenbankabfrage konnte also durch das Vorkommen des hochkonservierten und spezifischen Motivs der PSPG-Box bestätigt werden. Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Sequenzen handelt es sich somit um potentielle Glycosyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels.

#### 2.1.7 Phylogenetische Analyse

Phylogenetische Bäume können wichtige Informationen über die Substrat- und Regiospezifität von Glycosyltransferasen liefern (Vogt, 2000). Dadurch kann die biochemische Charakterisierung erheblich erleichtert werden (Vogt und Jones, 2000). Allerdings sollte eine Identifizierung der biologischen Funktion nicht allein mit bioinformatischen Methoden erfolgen, da dies zu falschen Zuordnungen führen kann (Milkowski et al., 2000). Der phylogenetische Baum (Abb. 13) ist mit allen in dieser Arbeit behandelten Enzymen und den Glycosyltransferasen, die zu ihnen die größte Ähnlichkeit aufweisen, mit Clustal W erstellt worden (Thompson et al., 1994). Dabei wurden in erster Linie erfolgreich biochemisch charakterisierte Proteine berücksichtigt.

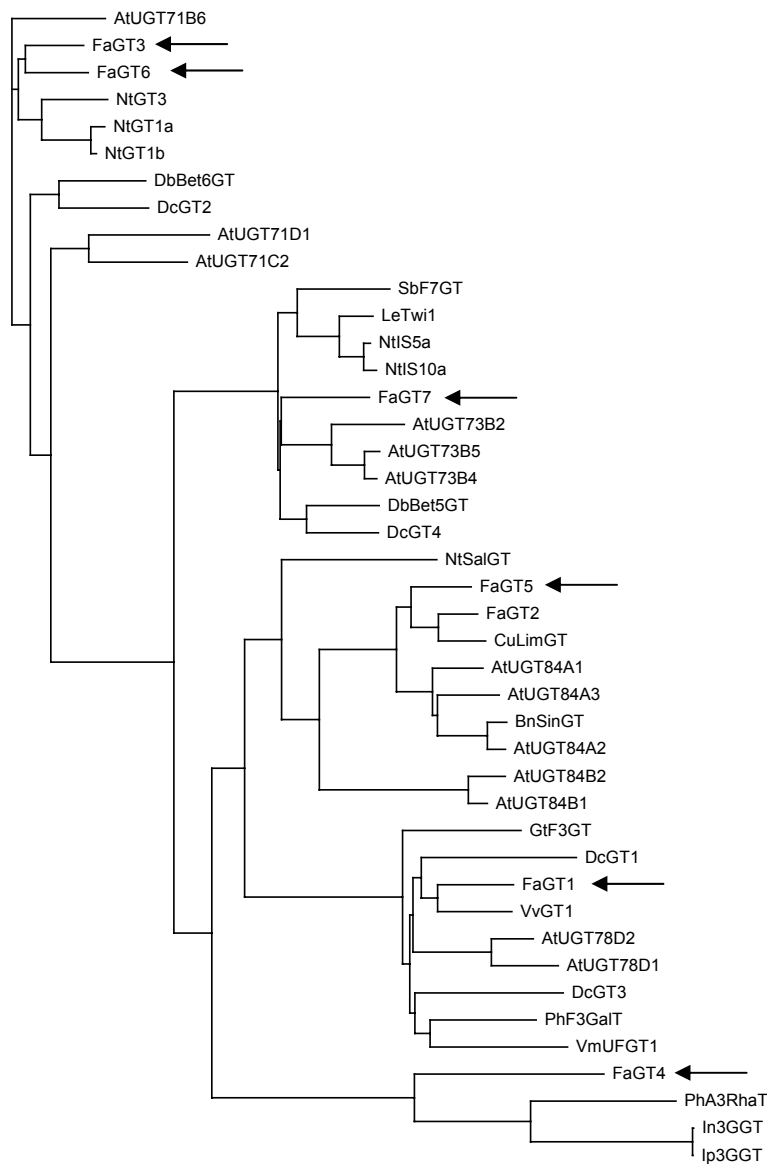
FaGT1 zeigt die größte Ähnlichkeit zu einer UDP-Glucose:Flavonoid-3-O-Glycosyltransferase aus *Vitis vinifera* (VvGT1), die bevorzugt den Transfer von UDP-D-Glucose auf Anthocyanidine katalysiert (Ford et al., 1998). In der gleichen Gruppe befinden sich die Enzyme aus *Dianthus caryophyllus* (DcGT1 und DcGT3; Ogata et al., 2004), *Petunia hybrida* (PhF3GalT; Miller et al., 1999), *Vigna mungo* (VmUFGT1; Mato et al., 1998) und *Gentiana triflora* (GtF3GT; Tanaka et al., 1996), die alle UDP-D-Glucose oder UDP-D-Galactose auf Anthocyanidine oder Flavonole übertragen. Auch UGT78D2 und UGT78D1 aus Gruppe F der *Arabidopsis thaliana* Glycosyltransferasen zeigen eine hohe Ähnlichkeit zu FaGT1 (Li et al., 2001). UGT78D2 akzeptiert *in vitro* sowohl Anthocyanidine als auch Flavonole und UDP-D-Glucose (Tohge et al., 2005), wäh-

rend UGT78D1 UDP-L-Rhamnose und UDP-D-Glucose auf das Flavonol Quercetin überträgt (Jones et al., 2003; Lim et al., 2004). Alle Glycosyltransferasen dieses Clusters akzeptieren ausschließlich die Hydroxygruppe an Position 3 der Anthocyanidine und Flavonole. Bei FaGT1 scheint es sich also um eine Anthocyanidin- oder Flavonol-3-Glycosyltransferase zu handeln.

FaGT3 und FaGT6 bilden eine kleine Untergruppe innerhalb eines recht heterogenen Clusters. Die höchste Ähnlichkeit besteht zu multifunktionellen Glycosyltransferasen aus Tabak-Zellkulturen (NtGT1a, NtGT1b und NtGT3), die Cumarine, Flavonoide, Naphthole und Hydroxyzimtsäuren umsetzen (Taguchi et al., 2001 und 2003a). Die Betanidin 6-Glycosyltransferase aus Zellkulturen von *Dorotheanthus bellidiformis* (DbBet6GT) katalysiert die Übertragung von UDP-D-Glucose auf die Hydroxygruppe 6 von Betanidin, die Hydroxygruppe 3 von Anthocyanidinen und die Hydroxygruppen 3 und 7 von Flavonolen (Vogt et al., 1997; Vogt, 2002). Flavonole sind ebenfalls Substrate der DcGT2 aus *D. caryophyllus* (Ogata et al., 2004). Im gleichen Cluster befinden sich auch UGT71B6, UGT71D1 und UGT71C2 aus *A. thaliana*. Hervorzuheben ist die Aktivität von UGT71B6, die spezifisch (+)-Abscisinsäure, nicht aber (-)-Abscisinsäure akzeptiert (Lim et al., 2005b). UGT71D1 und UGT71C2 setzen *in vitro* sowohl Hydroxycumarine als auch Quercetin um (Lim et al., 2003a und 2004). FaGT3 und FaGT6 könnten demnach multifunktionelle Glycosyltransferasen sein, die *in vitro* Flavonole und Hydroxycumarine akzeptieren. Da die Enzyme dieses Clusters D-Glucose auf verschiedene Hydroxygruppen der Flavonole übertragen, ist eine Vorhersage der Regiospezifität nicht möglich.

FaGT4 weist insgesamt geringere Ähnlichkeiten zu bereits charakterisierten Glycosyltransferasen auf. Die Enzyme aus *P. hybrida* (PhA3RhaT), *Ipomea nil* (In3GGT) und *I. purpurea* (Ip3GGT) akzeptieren Anthocyanidin-3-glucoside, unterscheiden sich aber in der Spezifität für den Zuckerdonor (Brugliera et al., 1994; Kroon et al., 1994; Morita et al., 2005). Das Enzym aus *P. hybrida* ist an der Bildung von Anthocyanidin-3-rutinosiden beteiligt, während die Glycosyltransferasen aus *I. nil* und *I. purpurea* UDP-D-Glucose akzeptieren. Anthocyanidin-3-glucoside sind deshalb potentielle Substrate der rekombinanten FaGT4.





.01

**Abbildung 13:** Phylogenetische Analyse der pflanzlichen Glycosyltransferasen. Der Baum (*unrooted*) wurde mit Proteinsequenzen und der *neighbour joining* Methode mit Clustal W berechnet und mit der Software TreeView angezeigt (Thompson et al., 1994). Die GenBank-Akzessionsnummern der Proteinsequenzen sind: AtUGT71B6 (BAB02840), FaGT3 (AAU09444), FaGT6 (ABB92748), NtGT3 (BAB88934), NtGT1a (BAB60720), NtGT1b (BAB60721), DbBet6GT (AAL57240), DcGT2 (BAD52004), AtUGT71D1 (AAC35239), AtUGT71C2 (AAC35238), SbF7G (BAA83484), LeTwi1 (CAA59450), NtIS5a (AAB36653), NtIS10a (AAB36652), FaGT7 (ABB92749), AtUGT73B2 (AAR01231), AtUGT73B5 (AAD17392), AtUGT73B4 (AAD17393), DbBet5GT (CAB56231), DcGT4 (BAD52006), NtSalGT (AAF61647), FaGT5 (ABB92747), FaGT2 (AAU09443), CuLimGT (BAA93039), AtUGT84A1 (CAB10326), AtUGT84A3 (CAB10327), BnSinGT (AAF98390), AtUGT84A2 (BAB02351), AtUGT84B2 (AAB87106), AtUGT84B1 (AAB87119), GtF3GT (BAA12737), DcGT1 (BAD52003), FaGT1 (AAU09442), VvGT1 (AAB81682), AtUGT78D2 (NP\_197207), AtUGT78D1 (NP\_564357), DcGT3 (BAD52005), PhF3GalT (AAD55985), VmUFGT1 (BAA36972), FaGT4 (AAU09445), PhA3RhaT (CAA81057), In3GGT (BAD95881) und Ip3GGT (BAD95882).

FaGT5 weist die höchste Ähnlichkeit zu FaGT2 (Lunkenbein et al., 2006a) und der Limonoid Glycosyltransferase aus *Citrus unshiu* auf (CuLimGT; Kita et al., 2000). Während letzteres Enzym nur mit einem Substrat getestet wurde, katalysiert FaGT2 die Bildung von Glucose-Estern einer Reihe von Hydroxybenzoe- und Hydroxyzimtsäuren. Ein ähnliches Enzym aus *Brassica napus* (BnSinGT) ist eine UDP-Glucose:Sinapat Glycosyltransferase, die verschiedene Hydroxyzimtsäuren *in vitro* akzeptiert und ebenfalls Glucose-Ester bildet (Milkowski et al., 2004). UGT84A1, UGT84A2 und UGT84A3 aus *A. thaliana* reagieren ebenfalls mit Hydroxyzimtsäuren unter Bildung von Glucose-Estern (Lim et al., 2001). Von diesen Enzymen akzeptiert *in vitro* nur UGT84A1 auch Hydroxybenzoesäuren (Lim et al., 2002). Eine eigene kleine Untergruppe bilden die *A. thaliana* Glycosyltransferasen 84B1 und 84B2, die die Pflanzenhormone Abscisinsäure und Indoleessigsäure glucosylieren (Jackson et al., 2001; Lim et al., 2005b). Auch die Salicylsäure Glycosyltransferase aus Tabak (NtSalGT) zeigt nur relativ wenig Ähnlichkeit zu den anderen Mitgliedern dieses Clusters. Dieses Enzym bildet sowohl Glucoside als auch Glucose-Ester von verschiedenen Hydroxybenzoe- und Hydroxyzimtsäuren (Lee und Raskin, 1999). Entsprechend der phylogenetischen Analyse katalysiert FaGT5 wahrscheinlich die Bildung von Glucose-Estern von Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren. FaGT7 zeigt eine hohe Ähnlichkeit zu zwei durch Salicylsäure induzierbaren Glycosyltransferasen aus Tabak (NtIS5a und NtIS10a), die *in vitro* sowohl Flavonole, Hydroxycumarine, Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren umsetzen (Horvath und Chua, 1996; Fraissinet-Tachet et al., 1998; Vogt et al., 1999). Auch ein wundinduziertes Protein aus Tomate (LeTwi1) mit Homologie zu Glycosyltransferasen gehört in diese Gruppe (O'Donnell et al., 1998). Daneben bestehen Ähnlichkeiten zu Flavonoid Glycosyltransferasen aus *Scutellaria baicalensis* (SbF7GT; Hirotsu et al., 2000) und *D. caryophyllus* (DcGT4; Ogata et al., 2004). Die Betanidin 5-Glycosyltransferase aus *D. bellidiformis* (DbBet5GT) glucosyliert sowohl die Hydroxygruppe 5 von Betanidin als auch die Hydroxygruppen an den Positionen 4' und 7 von *ortho*-dihydroxylierten Flavonolen (Vogt et al., 1999). UGT73B2, UGT73B4 und UGT73B5 aus *A. thaliana* akzeptieren sowohl Flavonole als auch Hydroxycumarine als Substrate (Lim et al., 2003a und 2004; Willits et al., 2004). Die Expression von UGT73B5 wird durch pathogene Mikroorganismen und oxidativen Stress induziert (Langlois-Meurinne et al., 2005). FaGT7 scheint also eine multifunktionelle Glycosyl-

transferase zu sein, die Flavonole und Hydroxycumarine akzeptiert. Allerdings ist keine Aussage über die Position der Glucosylierung möglich, da in diesem Cluster sowohl 3- als auch 7-Glucoside gebildet werden.

## 2.2 *Fragaria x ananassa* Glycosyltransferase 1 (FaGT1)

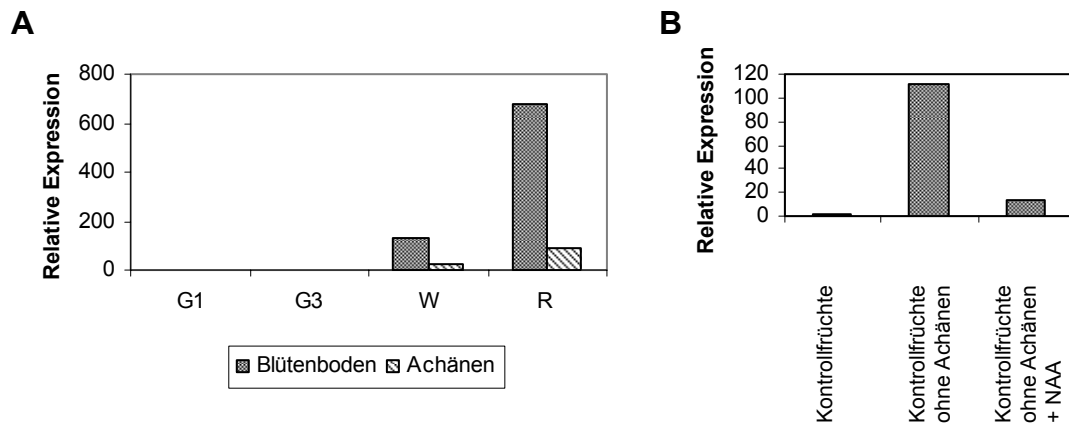
### 2.2.1 Genexpressionsanalyse

Die Genexpression von *FaGT1* wurde in den Achänen und im Blütenboden von Früchten verschiedener Reifestadien mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) unter Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes bestimmt (Mari Luz Bellido und Juan Munoz-Blanco, Persönliche Mitteilung). Dazu ist RNA aus dem Blütenboden und den Achänen kleiner grüner (G1), großer grüner (G3), weißer (W) und roter (R) Früchte isoliert (Abb. 6) und anschließend revers transkribiert worden. Die Ergebnisse der quantitativen PCR wurden mit dem *Interspacer* 26S-18S RNA Referenzgen (Benítez-Burraco et al., 2003; Raab et al., 2006) normalisiert und nach Livak und Schmittgen (2001) als relative Expression bezogen auf große grüne Früchte (G3) ausgedrückt.

Im Blütenboden wurde ein typisch reifekorreliertes Muster festgestellt (Abb. 14A). Auch die Genexpression in den Achänen steigt während der Reifung an, ist aber insgesamt deutlich niedriger als im Blütenboden. Die höchsten Transkriptmengen wurden im Blütenboden reifer roter Früchte detektiert.

Viele reifekorrelierte Gene der Erdbeerfrucht stehen unter der Kontrolle des Pflanzenhormons Auxin (Medina-Escobar et al., 1997b; Manning, 1998; Aharoni et al., 2002; Lunkenbein et al., 2006a; Raab et al., 2006). In frühen Entwicklungsstadien wird Auxin von den Achänen synthetisiert und in den Blütenboden transportiert (Perkins-Veazie, 1995). Um den Einfluss von Auxin auf die Genexpression der *FaGT1* zu untersuchen, sind die Achänen mittelgroßer grüner Früchte (G2) vorsichtig entfernt worden. Ein Teil der Früchte wurde mit dem synthetischen Auxin 1-Naphthalinessigsäure (NAA) behandelt, nach 5 Tagen geerntet und die Genexpression mit quantitativer PCR bestimmt. Alle Ergebnisse wurden auf unbehandelte Kontrollfrüchte mit Achänen bezogen.

Die Genexpression der *FaGT1* steht unter der Kontrolle des Pflanzenhormons Auxin (Abb. 14B). Das Entfernen der Auxin-produzierenden Achänen induziert einen deutlichen Anstieg der Genexpression, der durch die Applikation eines synthetischen Auxins wieder reprimiert werden kann.



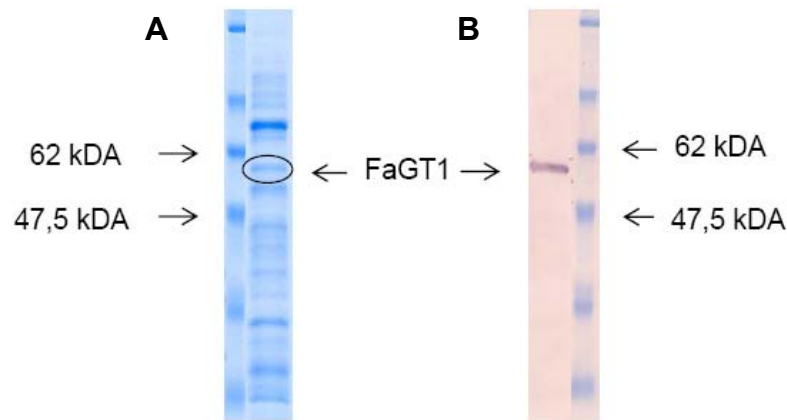
**Abbildung 14:** Genexpressionsstudie der *FaGT1*. **A** Reifekorrelierte Expression in Blütenboden und Achänen kleiner grüner (G1), großer grüner (G3), weißer (W) und reifer roter (R) Früchte. Die relativen Expressionswerte beziehen sich auf große grüne Früchte (G3). **B** Hormonelle Kontrolle der Genexpression. Die Achänen mittelgroßer grüner Früchte (G2) wurden entfernt und die Genexpression im Blütenboden wurde nach 5 Tagen analysiert. Ein Teil der Früchte ohne Achänen wurde mit dem synthetischen Auxin 1-Naphthalinessigsäure (NAA) behandelt. Die relativen Expressionswerte beziehen sich auf die Kontrollfrüchte (Mari Luz Bellido und Juan Munoz-Blanco, Persönliche Mitteilung).

## 2.2.2 Heterologe Expression und biochemische Charakterisierung

### 2.2.2.1 Partielle Aufreinigung und Nachweis rekombinanter *FaGT1*

Zur heterologen Expression wurde der vollständige offene Leserahmen der *FaGT1* in pET29a(+) kloniert. Dieser Vektor ermöglicht die Expression rekombinanter Proteine mit einem N-terminalen S-Tag und einem optionalen C-terminalen His-Tag. Da *FaGT1* in Leserichtung mit der für den His-Tag codierenden Sequenz kloniert wurde, konnte das rekombinante Enzym über den His-Tag aufgereinigt und detektiert werden. Als Wirtsorganismus wurde *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS verwendet, der eine verringerte Proteaseaktivität und den *lacUV5* Promotor enthält. Dies ermöglicht die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG), die bei 16-18 °C über Nacht durchgeführt wurde, um die Menge an aktivem, löslichem Enzym zu erhöhen (Ford et al., 1998). Die Zellen wurden anschließend durch eine Ultraschallsonotrode aufgeschlossen. Die Aufreinigung des rekombinanten Enzyms erfolgte durch Säulchen mit immobilisierten  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen. Die Bindung der Histidin-Reste des His-Tags an die  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen der Säulchen erlaubte die affinitätschromatographische Aufreinigung der *FaGT1*. Obwohl das gewünschte Zielprotein (50,5 kDa ohne Tag) angereichert wurde, befanden sich im Eluat noch einige Protein-Verunreinigungen (Abb. 15A). Im *Western Blot* mit Anti-His

Antikörper konnte gezeigt werden, dass tatsächlich rekombinante FaGT1 exprimiert wurde (Abb. 15B). Das Enzym konnte also in voller Länge und in löslicher Form heterolog exprimiert und partiell aufgereinigt werden.



**Abbildung 15:** Nachweis und Aufreinigung rekombinanter FaGT1. **A** SDS-PAGE einer durch His-Tag Affinitätschromatographie aufgereinigten Proteinfraction, die neben einigen Protein-Verunreinigungen auch His-getaggte FaGT1 enthält. **B** Nachweis von FaGT1 in einem Proteinrohextrakt. Der *Western Blot* wurde mit Anti-His Antikörper durchgeführt.

#### 2.2.2.2 Substratspezifität der rekombinanten FaGT1

Die phylogenetische Analyse deutete darauf hin, dass FaGT1 Anthocyanidine umsetzt. Deshalb wurden zunächst Enzymassays mit rekombinanter FaGT1, UDP-D-Glucose und verschiedenen Anthocyanidinen durchgeführt und die Mischung mit Flüssigchromatographie-Elektrospray-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS) auf die Bildung der entsprechenden Glucoside hin untersucht. Da für alle getesteten Anthocyanidine (Pelargonidin, Cyanidin, Delphinidin, Peonidin, Petunidin und Malvidin) Produkte nachgewiesen werden konnten, wurde das Substratscreening auf andere Flavonoide ausgedehnt. Dabei konnte Aktivität gegenüber allen getesteten Flavonolen (Quercetin, Kämpferol, Myricetin, Isorhamnetin, Fisetin, Galangin und 3,7-Dihydroxyflavonol) außer Morin und 3-Hydroxyflavon gezeigt werden. Morin ist das einzige getestete Substrat, das an Position 2' eine Hydroxygruppe aufweist. Bei Substraten anderer Stoffklassen wie Flavanen (Catechin, Epicatechin), Flavanonen (Naringenin, Taxifolin), Flavonen (5-Hydroxyflavon, 7-Hydroxyflavon, Chrysin, Apigenin), Flavonolglucosiden (Quercetin-3-glucosid, Kämpferol-3-glucosid) und Anthocyanen (Pelargonidin-3-glucosid) konnte keine Aktivität festgestellt werden. Ebenso wurden Benzoe- und Zimtsäure, Betanidin, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon

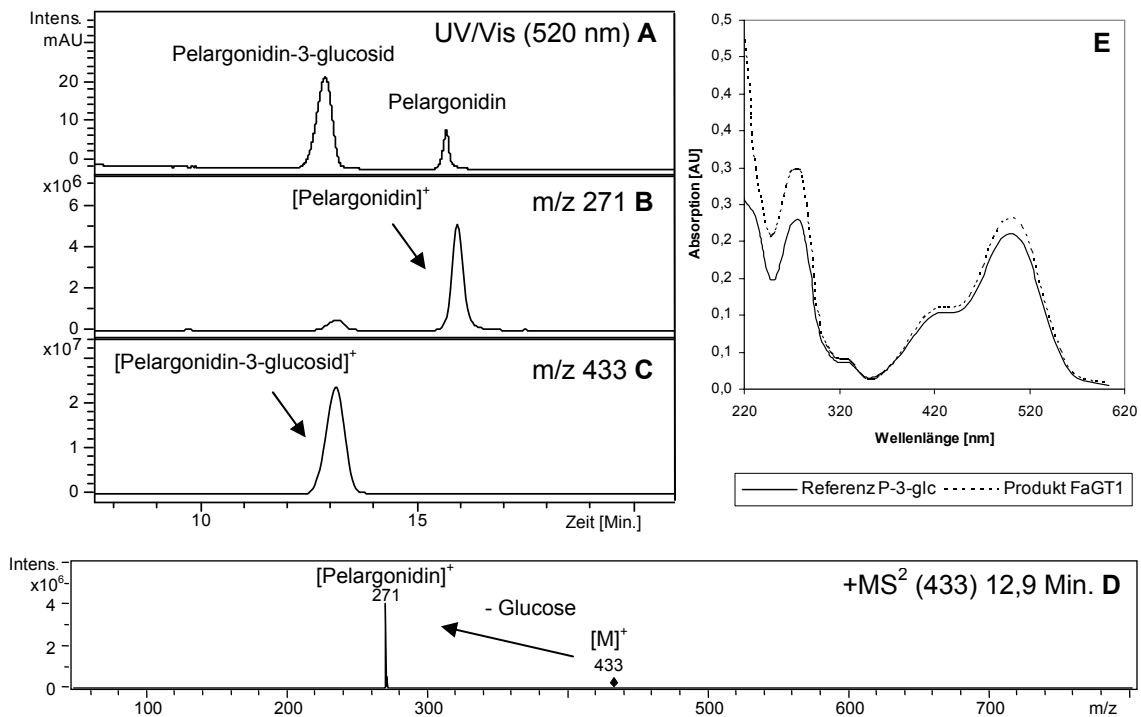
(HDMF) und einige Hydroxycumarine (7-Hydroxycumarin, Daphnetin, Esculetin; Abb. 35) negativ getestet. Als Zuckerdonor wurde ausschließlich UDP-D-Glucose akzeptiert, während UDP-D-Glucuronsäure und UDP-D-Galactose keine Aktivität zeigten. Als Negativkontrollen dienten Proteinrohextrakte, die aus BL21 (DE3) pLysS Zellen, die einen leeren pET29a(+) Expressionsvektor enthielten, erhalten wurden. Zusätzlich sind Assays mit hitzeinaktiviertem Protein (5 Minuten, 95 °C) durchgeführt worden. In beiden Fällen konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Das Substratscreening zeigte, dass FaGT1 *in vitro* ausschließlich die Glucosylierung von Anthocyanidinen und Flavonolen (ohne Substitution an Position 2') katalysiert.

### 2.2.2.3 Identifizierung der Reaktionsprodukte

Die getesteten Anthocyanidine weisen mehrere Hydroxygruppen auf, an denen die Addition des Zuckers möglich ist, auch wenn die meisten Anthocyane als Anthocyanidin-3-glucoside vorliegen (Macheix et al., 1990). Dass mit 3,7-Dihydroxyflavon, nicht aber mit Chrysin (5,7-Dihydroxyflavon) Aktivität detektiert werden konnte, deutete ebenfalls auf eine Glucosylierung an Position 3 hin.

Um dieses Ergebnis abzusichern, wurden Pelargonidin-3-glucosid, Quercetin-3-glucosid und Kämpferol-3-glucosid als authentische Referenzsubstanzen für die Flüssigchromatographie-Elektrospray-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS) eingesetzt. Die Retentionszeiten und MS<sup>2</sup>-Spektren stimmten in allen Fällen mit den entsprechenden Reaktionsprodukten überein (Abb. 16). Pelargonidin-3-glucosid weist durch den transferierten Zucker eine höhere Wasserlöslichkeit als das eingesetzte Substrat auf und eluiert bei den gewählten chromatographischen Bedingungen früher (Abb. 16A, B, C). Im MS<sup>2</sup>-Spektrum kann man die Abspaltung eines Moleküls D-Glucose erkennen (Abb. 16D).

Anthocyane weisen charakteristische UV/Vis-Spektren auf. Deshalb wurden Pelargonidin-3-glucosid und das aus Pelargonidin gebildete Reaktionsprodukt auch mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Diodenarraydetektion (HPLC-DAD) untersucht. Wie Abbildung 16E zeigt, stimmen die UV/Vis-Spektren von Pelargonidin-3-glucosid und dem Reaktionsprodukt exakt überein. Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass FaGT1 *in vitro* die Bildung von Pelargonidin-3-glucosid katalysiert.

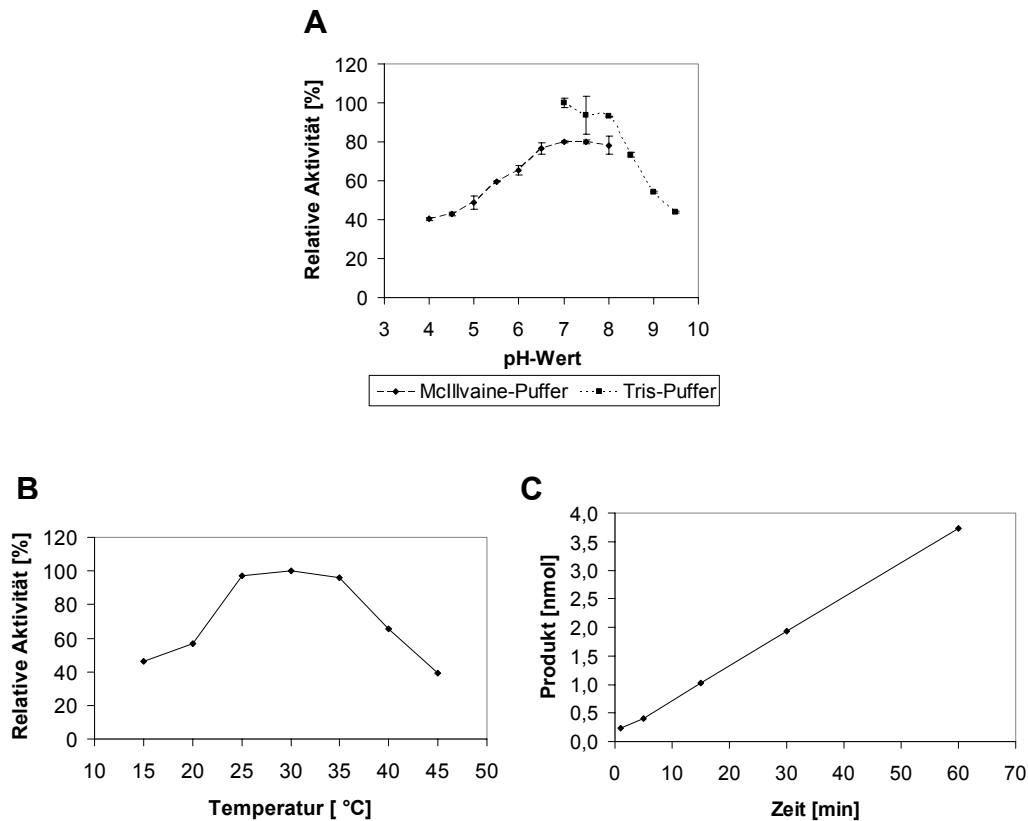


**Abbildung 16:** Identifizierung des aus Pelargonidin gebildeten Reaktionsproduktes. **A-D** LC-ESI-MS Untersuchung eines FaGT1 Assays im positiven Modus. Man erkennt sowohl im UV/Vis-Chromatogramm (520 nm, A) als auch in den Ionenspuren  $m/z$  271 (B) und  $m/z$  433 (C), dass aus Pelargonidin eine früher eluierende, glucosylierte Verbindung gebildet wird. Im  $MS^2$ -Spektrum (D) des gebildeten Reaktionsproduktes kann die Abspaltung von Glucose beobachtet werden. **E** HPLC-DAD Untersuchung eines FaGT1 Assays. Die charakteristischen UV/Vis-Spektren der Referenzsubstanz Pelargonidin-3-glucosid (P-3-glc) und des Reaktionsproduktes stimmen exakt überein.

#### 2.2.2.4 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Zur Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen wurden Enzymassays mit Pelargonidin und radioaktiv markierter UDP-D-Glucose und anschließender Detektion im Flüssigszintillationszähler durchgeführt. Das pH-Optimum ist dabei sowohl in Tris-Puffer (pH 7,0-9,5) als auch in McIlvaine-Puffer (pH 4,0-8,0) bestimmt worden. In beiden Puffersystemen wurden die höchsten Aktivitäten zwischen pH 7,0 und 8,0 ermittelt, wobei die beste Umsatzrate in Tris-Puffer erreicht wurde (Abb. 17A). Anschließend sind Inkubationstemperaturen von 15 °C bis 45 °C getestet worden. Die höchsten Aktivitäten wurden zwischen 25 °C und 35 °C mit einem Maximum bei 30 °C gemessen (Abb. 17B). Die Addition von bis zu 200 mM  $Mg^{2+}$  führte zu keiner messbaren Beeinflussung der enzymatischen Aktivität. Die Produktbildung ist unter diesen Bedingungen für mindes-

tens 60 Minuten linear (Abb. 17C). Alle folgenden Assays wurden daher bei pH 7,0 (Tris-Puffer) und 30 °C für 30 Minuten inkubiert.



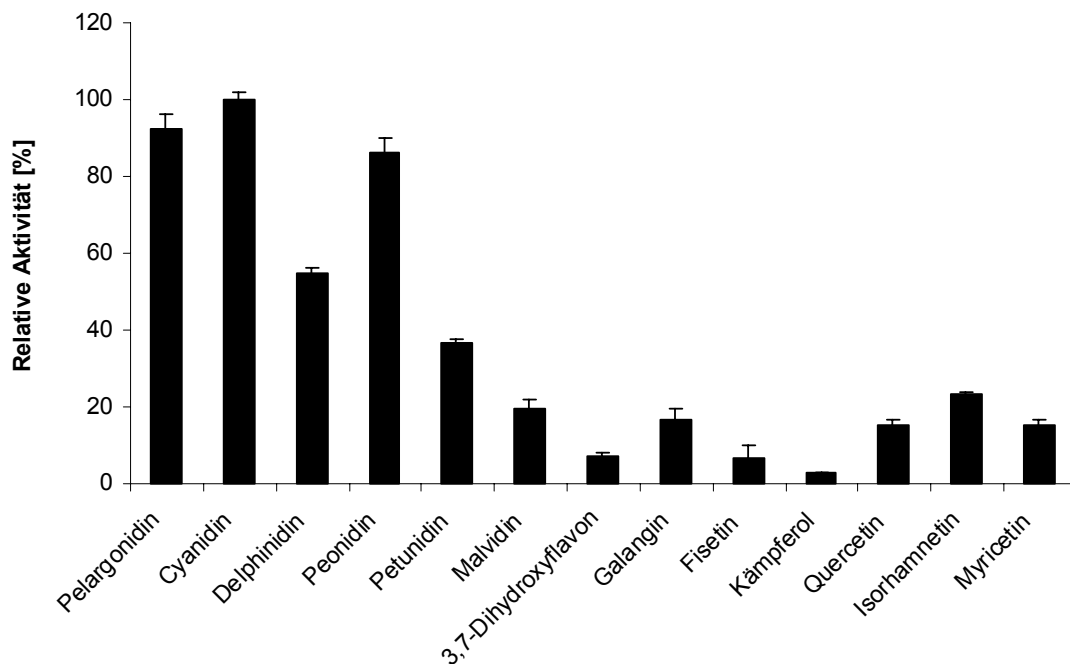
**Abbildung 17:** Optimierung der Reaktionsbedingungen der FaGT1. **A** Einfluss des pH-Wertes. Die Bildung von Pelargonidin-3-glucosid wurde bei 30 °C und einer Inkubationszeit von 30 Minuten in Tris- und McIlvaine-Puffer bei verschiedenen pH-Werten gemessen. **B** Einfluss der Inkubationstemperatur. Die Bildung von Pelargonidin-3-glucosid wurde bei pH 7 (Tris-Puffer) und einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei verschiedenen Inkubationstemperaturen detektiert. **C** Einfluss der Inkubationszeit auf die Produktbildung. Die Assays wurden bei pH 7 (Tris-Puffer) und 30 °C inkubiert.

#### 2.2.2.5 Bevorzugte Substrate *in vitro*

Die relative Aktivität von FaGT1 gegenüber den positiv getesteten Substraten ist unter optimalen Reaktionsbedingungen in Assays mit Radiodetektion verglichen worden (Abb. 18). Pelargonidin, Cyanidin und Peonidin wurden bevorzugt umgesetzt, während Delphinidin, Petunidin, Malvidin und alle Flavonole geringere Umsatzraten aufwiesen. Es ist auffällig, dass Substrate ohne Substitution an Position 5' (Pelargonidin, Cyanidin, Peonidin) bevorzugt glucosyliert werden. Die Substitution von Hydroxy- durch Methoxygruppen reduziert die Produktbildung weiter. FaGT1 katalysiert also *in vitro* bevorzugt die Glucosylierung der



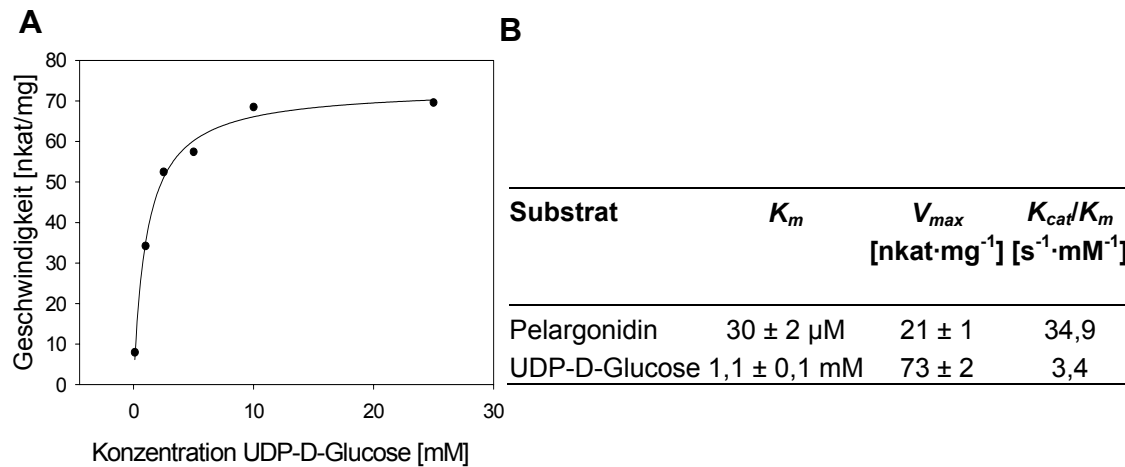
Anthocyanidine Pelargonidin, Cyanidin und Peonidin, während Flavonole deutlich reduzierte Umsatzraten aufweisen.



**Abbildung 18:** Relative Aktivitäten von FaGT1 gegenüber verschiedenen Substraten. Das rekombinante Enzym wurde mit dem entsprechenden Substrat und radioaktiv markierter UDP-D-Glucose bei pH 7,0 (Tris-Puffer) und 30 °C 30 Minuten lang inkubiert. Die Produktbildung wurde durch Flüssigszintillation gemessen. Die relativen Aktivitäten beziehen sich auf das beste Substrat Cyanidin (100 %).

#### 2.2.2.6 Ermittlung der kinetischen Parameter

Für das wichtigste in der Erdbeere vorkommende Anthocyanidin Pelargonidin und für UDP-D-Glucose erfolgte die Bestimmung der kinetischen Parameter bei optimalen Bedingungen. Dazu wurde bei konstanter UDP-D-Glucose Konzentration die Menge Pelargonidin variiert und die Reaktionsgeschwindigkeit gemessen. Dabei ergab sich die für eine Michaelis-Menten-Kinetik typische Sättigungskurve (Abb. 19A). Mit der Software SigmaPlot wurden aus der Hyperbel die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{max}$  und die Konzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit (Michaelis-Menten-Konstante,  $K_m$ ) ermittelt. Der  $K_m$ -Wert für Pelargonidin ist 30  $\mu\text{M}$  bei einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten von 21 nkat/mg (Abb. 19B). UDP-D-Glucose zeigt bei konstanter Pelargonidin Konzentration einen  $K_m$ -Wert von 1,1 mM und eine  $V_{max}$  von 73 nkat/mg (Abb. 19B).



**Abbildung 19:** Kinetische Parameter für ausgesuchte Substrate der FaGT1. **A** Sättigungskurve für UDP-D-Glucose. Die Daten wurden bei konstanter Pelargonidin Konzentration bei 30 °C und pH 7,0 (Tris-Puffer) aufgenommen. Die graphische Auswertung erfolgte mit der Software SigmaPlot. **B** Die aus den Sättigungskurven ermittelten kinetischen Parameter für Pelargonidin und UDP-D-Glucose.

### 2.2.3 RNAi-induzierte Herabregulation von FaGT1

#### 2.2.3.1 Konstruktion von pBI-FaGT1i und Infiltration

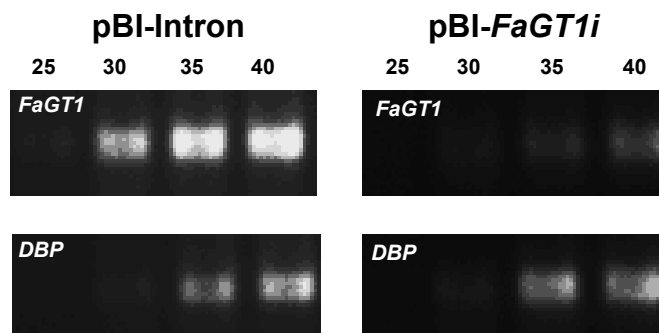
Um die *in vitro* ermittelte Substratspezifität zu bestätigen, wurde die Genexpression der *FaGT1 in planta* herabreguliert. Das Potential doppelsträngiger RNA spezifisch die Expression des betreffenden Gens zu unterdrücken, wurde erstmals im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Fire et al., 1998). Seitdem ist diese Technologie von vielen Gruppen erfolgreich weiterentwickelt und in zahlreichen Organismen angewandt worden. Kürzlich wurde eine Methode beschrieben, mittels der die Expression reifekorrelierter Gene in Erdbeerfrüchten durch die Injektion von *intron-hairpin* (ihp)-RNA Konstrukten unterdrückt werden kann (Hoffmann et al., 2006). Die ersten 500 bp des offenen Leserahmens der *FaGT1* wurden deshalb in *sense*- und *antisense*-Richtung, getrennt durch ein Intron der Chinon-Oxidoreduktase (*FaQR*) aus Erdbeeren (Raab et al., 2006), in den Vektor pBI121 ligiert. Das entstandene Konstrukt (pBI-FaGT1i) wurde in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert und in mittelgroße grüne Erdbeerfrüchte (14 Tage nach der Befruchtung) injiziert. Die reifen Erdbeerfrüchte sind nach weiteren 14 Tagen geerntet und mit semi-quantitativer PCR und Flüssigchromatographie-Elektrospray-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS) untersucht worden. Als Kontrolle wurde ein Konstrukt injiziert, dass aus

dem pBI121-Vektor und dem Glucuronidase-Gen (GUS) unterbrochen mit dem Intron der Chinon-Oxidoreduktase aus Erdbeeren bestand (pBI-Intron).

### 2.2.3.2 Genexpressionsanalyse durch semi-quantitative PCR

Um die erfolgreiche Herabregulation der *FaGT1* nachzuweisen, ist aus den transfizierten Früchten RNA isoliert und revers transkribiert worden. Als Referenzgen wurde eine für ein *DNA Binding Protein (DBP)* codierende Sequenz gewählt (Schaart et al., 2002). Da für die quantitative Bestimmung kein Thermocycler mit Fluoreszenz-Detektion zur Verfügung stand, wurde nach jeweils 25, 30, 35 und 40 Zyklen ein Aliquot der PCR-Reaktion entnommen und auf ein Agarose-Gel aufgetragen (Abb. 20).

In etwa einem Drittel der infiltrierten Früchte konnte eine deutliche Herabregulation nachgewiesen werden. Amplifikate der *FaGT1* sind in den mit pBI-*FaGT1i* transfizierten Früchten erst nach etwa 40 Zyklen in geringer Menge detektierbar. In den Kontrollfrüchten (pBI-Intron) ist dagegen bereits nach 30 Zyklen eine deutliche Bande nachweisbar. Wie das Referenzgen (*DBP*) zeigt, wurden für beide Früchte vergleichbare mRNA-Mengen revers transkribiert und für die semi-quantitative PCR eingesetzt. Die Expression der *FaGT1* konnte also durch die Injektion von pBI-*FaGT1i* erfolgreich herabreguliert werden.



**Abbildung 20:** Herabregulation der *FaGT1* durch *intron-hairpin* (ihp)-RNA. Aus Kontrollfrüchten (pBI-Intron) und mit pBI-*FaGT1i* transfizierten Früchten wurde RNA isoliert und revers transkribiert. Die Expression der *FaGT1* und des Referenzgens (*DBP*) wurde mit semi-quantitativer PCR ermittelt. Aliquote der PCR-Reaktion wurden nach 25, 30, 35 und 40 Zyklen entnommen und auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

### 2.2.3.3 Phänotyp der Früchte mit verringerter *FaGT1*-Expression

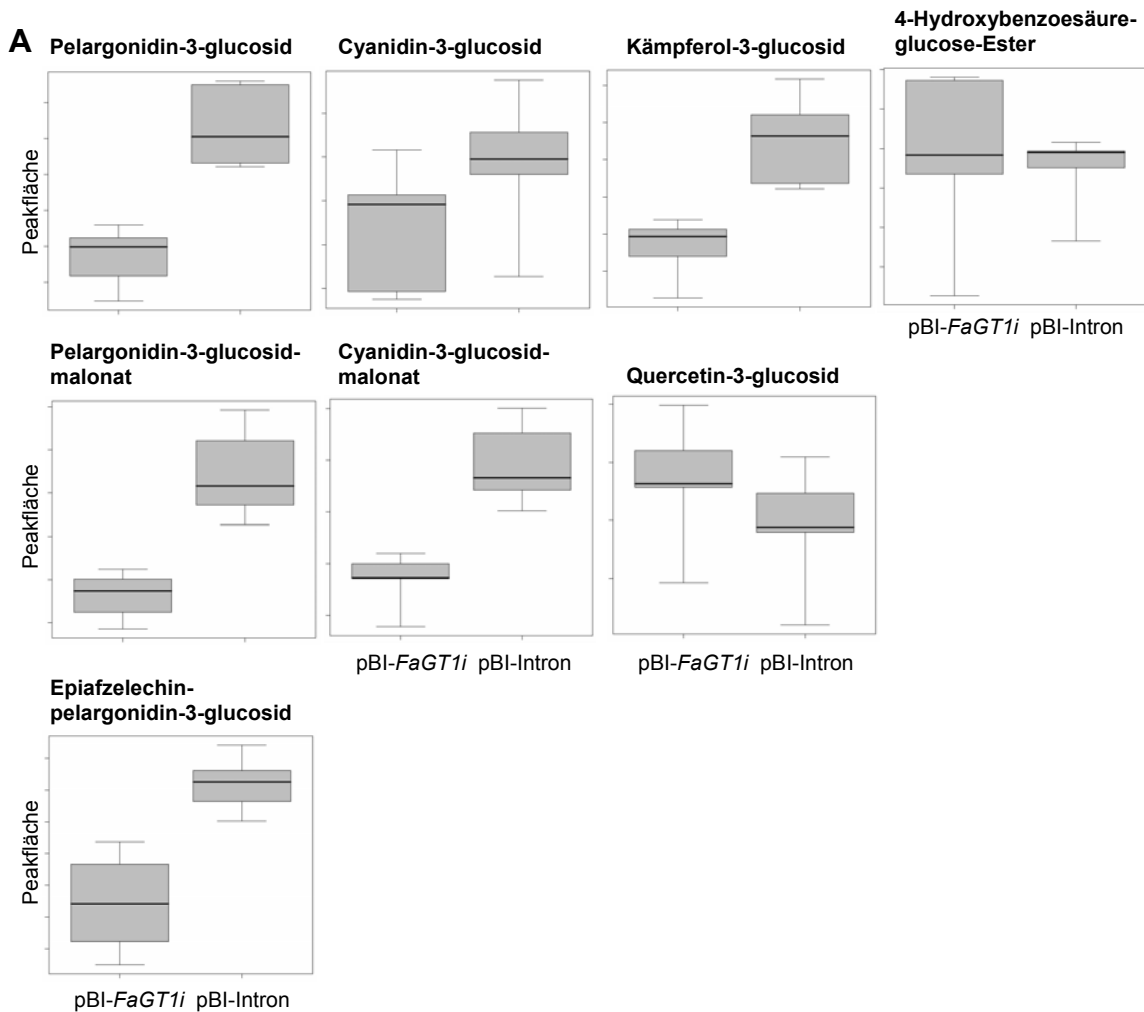
Die Erdbeerfrüchte mit verringerter *FaGT1*-Expression weisen nur einen leicht veränderten Phänotyp auf. Während die mit dem Kontrollkonstrukt pBI-Intron infiltrierten Früchte eine intensiv dunkelrote Farbe besitzen, sind die entsprechenden pBI-*FaGT1i*-Erdbeeren etwas heller gefärbt. Auch der Farbton ist leicht verändert und von einem dunklen Rot zu orangefarbeneren Tönen verschoben (Abb. 21).



**Abbildung 21:** Phänotyp der Erdbeerfrüchte mit verringerter *FaGT1*-Expression. Kontrollerdbeeren (A), die mit pBI-Intron transfiziert wurden, weisen eine intensiv dunkelrote Färbung auf. Die Erdbeeren mit herabregulierter *FaGT1* (B) sind weniger stark gefärbt und weisen einen leicht veränderten Farbton auf.

### 2.2.3.4 Auswirkungen auf den Sekundärstoffwechsel

In Kontrollfrüchten (pBI-Intron) und Früchten, die eine deutlich erniedrigte Expression der *FaGT1* aufweisen, wurde die Konzentration verschiedener Sekundärmetabolite mit LC-ESI-MS bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit einem dem Extraktionsmittel beigefügten internen Standard (4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -glucuronid) normalisiert. Die Identifizierung der einzelnen Verbindungen erfolgte durch Vergleich der Retentionszeit, Molekülionen und  $MS^2$ -Spektren mit Referenzsubstanzen und Literaturdaten. Aufgrund der biologischen Variabilität und ungleichmäßiger Herabregulation der *FaGT1* in den infiltrierten Früchten, weisen die ermittelten Konzentrationen der einzelnen Metabolite eine relativ große Schwankungsbreite auf (Abb. 22A). Außerdem sind die Konzentrationen der Metabolite in transgenen Erdbeerfrüchten nicht normalverteilt (Lunkenbein et al., 2006b). Deshalb wurde der parameterfreie Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen (pBI-Intron und pBI-*FaGT1i*) nachzuweisen (Hart, 2001; Hoffmann et al., 2006; Abb. 22B).



**B**

Verbindung	p (pBI-Intron/pBI-FaGT1i)
Pelargonidin-3-glucosid	$7,9 \cdot 10^{-3}$
Pelargonidin-3-glucosid-malonat	$7,9 \cdot 10^{-3}$
Epiafzelechin-pelargonidin-3-glucosid	$7,9 \cdot 10^{-3}$
Cyanidin-3-glucosid	$1,5 \cdot 10^{-1}$
Cyanidin-3-glucosid-malonat	$7,9 \cdot 10^{-3}$
Kämpferol-3-glucosid	$7,9 \cdot 10^{-3}$
Quercetin-3-glucosid	$2,2 \cdot 10^{-1}$
4-Hydroxybenzoesäureglucose-Ester	1,0

**Abbildung 22:** Auswirkung der Herabregulation von *FaGT1* auf den Sekundärstoffwechsel.

**A** *Box-Whisker-Plots* mit der quantitativen Auswertung der Peakflächen verschiedener Sekundärmetabolite in mit pBI-*FaGT1i* transfizierten Früchten (links, n=5) und in Kontrollfrüchten (pBI-Intron, rechts, n=5). Dargestellt sind der Median (horizontale Linie) und der Bereich der Interquartile (graue Box). Der *Whisker* (vertikale Linie) reicht bis zu den Extremwerten jeder Gruppe. **B** Der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test wurde zum parameterfreien Vergleich der Konzentrationen in mit pBI-*FaGT1i* infiltrierten Früchten und Kontrollfrüchten (pBI-Intron) verwendet. Statistisch signifikante Werte mit einem Signifikanzniveau  $p < 1 \cdot 10^{-2}$  (1 %) sind grau gekennzeichnet.

Wie der Signifikanztest und die *Box-Whisker-Plots* zeigen, werden die Konzentrationen aller auf Pelargonidin basierenden Anthocyane in den injizierten Früchten deutlich erniedrigt ( $p = 7,9 \cdot 10^{-3}$ ). Das gleiche trifft auf Kämpferol-3-glucosid zu, während der Gehalt von Quercetin-3-glucosid kaum beeinflusst wird. Die Konzentration an Cyanidin-3-glucosid ist weniger deutlich erniedrigt als die des entsprechenden malonylierten Derivats. Zum Vergleich ist der *Box-Whisker-Plot* von 4-Hydroxybenzoesäureglucose-Ester angegeben. Das entsprechende Aglycon ist kein Substrat rekombinanter FaGT1 und die Konzentration des Esters wird durch die Injektion von pBI-*FaGT1i* nicht verändert. Damit konnte gezeigt werden, dass FaGT1 auch *in planta* die Glucosylierung der Anthocyanidine katalysiert und an der Biosynthese der Anthocyane beteiligt ist.

### **2.3 *Fragaria x ananassa* Glycosyltransferase 3 & 4 (FaGT3 & 4)**

#### **2.3.1 Genexpressionsanalyse**

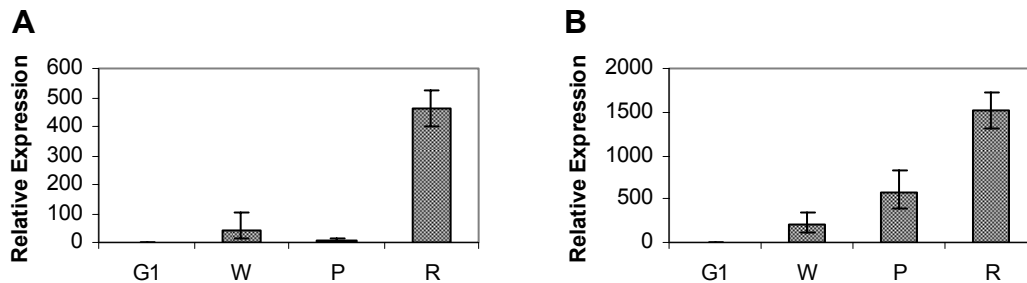
##### **2.3.1.1 Fruchtspezifische und reifekorrelierte Expression**

Die gewebespezifische und zeitliche Expression der *FaGT3*- und *FaGT4*-Gene wurde mit quantitativer PCR ermittelt. Dazu ist RNA aus dem Blütenboden und den Achänen kleiner grüner (G1), weißer (W), pinkfarbener (P) und roter (R) Früchte (Abb. 6) isoliert worden. Beide Glycosyltransferasen zeigen eine reifekorrelierte Genexpression und weisen die höchsten Transkriptmengen in reifen roten Früchten (R) auf (Abb. 23). Der relative Anstieg der Genexpression ist bei *FaGT4* insgesamt größer als bei *FaGT3*. Auffällig ist die geringe Transkriptmenge der *FaGT3* in pinkfarbenen Früchten (P).

Die Expression in den Achänen von Früchten aller Reifestadien ist bei beiden Glycosyltransferasen um Größenordnungen niedriger als im Blütenboden reifer roter Früchte. *FaGT3* wird auch in den Achänen schwach reifekorreliert exprimiert, wobei aber maximal die Werte des Blütenbodens weißer Früchte erreicht werden. Die Expression von *FaGT4* in den Achänen ist nicht reifekorreliert und die Transkriptmengen liegen im Bereich des Blütenbodens kleiner grüner Früchte.

Die gewebespezifische Expression wurde auch in Wurzeln, Blättern, Blüten, Ausläufern und dem Wurzelhals bestimmt. Bei *FaGT3* konnte in allen Geweben eine basale Expression in maximal der gleichen Größenordnung wie im Blütenboden kleiner grüner Früchte detektiert werden. Transkripte der *FaGT4* waren

in Wurzeln und Blättern auch mit quantitativer PCR nicht nachweisbar, in den anderen Geweben wurde ebenfalls eine basale Expression nachgewiesen. Unter Berücksichtigung der extrem hohen Sensitivität der quantitativen PCR kann die Expression der *FaGT3* und *FaGT4* als fruchtspezifisch und reifekorreliert bezeichnet werden.

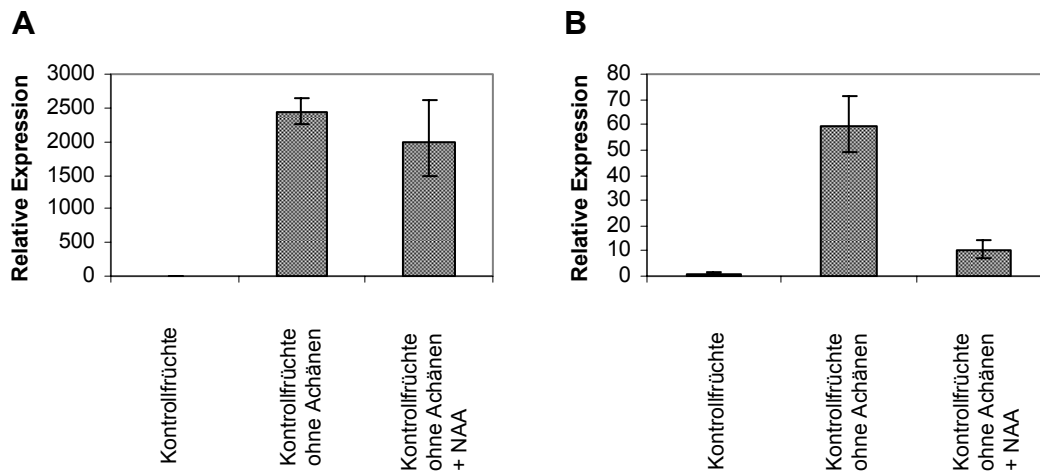


**Abbildung 23:** Reifekorrelierte Expression der *FaGT3* (A) und *FaGT4* (B) im Blütenboden. RNA wurde aus dem Blütenboden kleiner grüner (G1), weißer (W), pinkfarbener (P) und reifer roter (R) Erdbeerfrüchte isoliert. Nach reverser Transkription wurde die Genexpression mit quantitativer PCR bestimmt. Die relativen Expressionswerte beziehen sich auf kleine grüne Früchte (G1). Beide Glycosyltransferasen zeigen eine stark reifekorrelierte Expression und weisen die größte Transkriptmenge in reifen roten (R) Früchten auf.

### 2.3.1.2 Hormonelle Kontrolle und wundinduzierte Expression

Der Einfluss von Auxin auf die Genexpression der *FaGT3* und *FaGT4* ist analog zu 2.2.1 untersucht worden. Die Genexpression der *FaGT3* wurde durch das Entfernen der Achänen sehr stark induziert (Abb. 24A). Allerdings konnte die Applikation exogener 1-Naphthalinessigsäure (NAA) diesen Anstieg nicht signifikant reprimieren. Das Pflanzenhormon Auxin scheint also keinen Einfluss auf die Transkriptmenge der *FaGT3* zu haben. Da der Blütenboden beim Entfernen der Achänen mit dem Skalpell leicht verletzt wird, kann dies auf eine wundinduzierte Expression hindeuten.

Auch bei *FaGT4* wird ein Anstieg der Transkriptmenge durch das Entfernen der Achänen induziert (Abb. 24B). Durch die Anwendung des synthetischen Auxins NAA kann diese Induktion aber fast vollständig revertiert werden. Die Expression der *FaGT4* steht somit unter negativer Kontrolle durch das Pflanzenhormon Auxin.



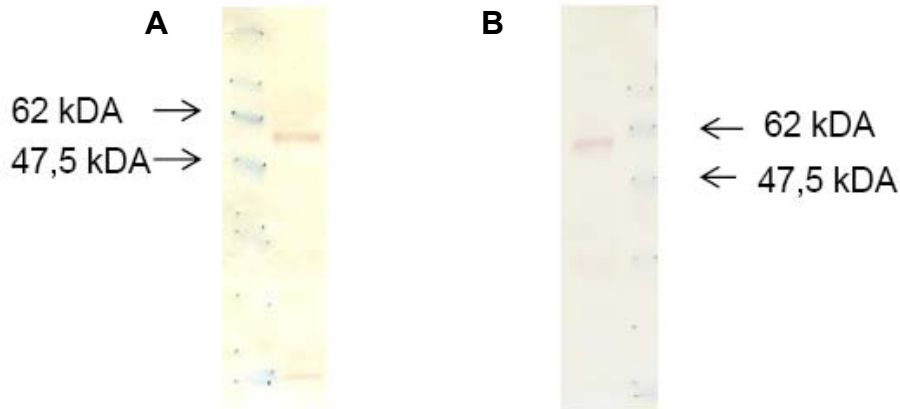
**Abbildung 24:** Wundinduzierte Expression der *FaGT3* (A) und hormonelle Kontrolle der Expression der *FaGT4* (B). Die Achänen von mittelgroßen grünen Früchten (G2) wurden entfernt und nach 5 Tagen erfolgte die Ernte der Früchte. Ein Teil der Früchte ohne Achänen wurde mit dem synthetischen Auxin 1-Naphthalinessigsäure (NAA) behandelt. Die Genexpression der *FaGT3* und *FaGT4* wurde anschließend mit quantitativer PCR bestimmt. Alle relativen Expressionswerte beziehen sich auf die Kontrollfrüchte. **A** Die Genexpression der *FaGT3* wird durch das Entfernen der Achänen induziert, die Applikation von Auxin hat keinen signifikanten Effekt. **B** Die Genexpression der *FaGT4* wird ebenfalls durch das Entfernen der Achänen induziert, kann aber durch die Applikation von Auxin reprimiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Expression der *FaGT4* durch das Pflanzenhormon Auxin negativ reguliert wird.

### 2.3.2 Heterologe Expression

#### 2.3.2.1 Nachweis der rekombinanten Enzyme

Die vollständigen offenen Leserahmen der *FaGT3* und *FaGT4* wurden in den Expressionsvektor pET29a(+) kloniert und in *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS Zellen heterolog exprimiert. Nach dem Zellaufschluss sind die entsprechenden Proteinrohextrakte mit SDS-PAGE und *Western Blot* untersucht worden. Dazu wurde ein spezifischer Antikörper gegen den His-Tag am C-Terminus der rekombinanten Proteine verwendet. In beiden Fällen konnte eine Bande in der korrekten Größe (*FaGT3*: 52,8 kDa; *FaGT4*: 54,3 kDa) im *Western Blot* detektiert werden (Abb. 25). *FaGT3* und *FaGT4* wurden also in voller Länge und in löslicher Form heterolog exprimiert.





**Abbildung 25:** Nachweis rekombinanter FaGT3 (A) und FaGT4 (B) im Proteinrohextrakt. Der *Western Blot* wurde mit Anti-His Antikörper gegen den His-Tag am C-Terminus der rekombinanten Proteine durchgeführt.

### 2.3.2.2 Aktivitätsassays

Mit beiden Proteinrohextrakten wurden Enzymassays durchgeführt. Die Glycosyltransferasen, die die höchste phylogenetische Ähnlichkeit zu FaGT3 aufweisen, akzeptieren *in vitro* Flavonole. Deshalb wurden die FaGT3 Assays mit Quercetin bzw. Kämpferol und UDP-D-Glucose durchgeführt. Obwohl im Proteinrohextrakt lösliche FaGT3 vorlag, konnte keine Aktivität nachgewiesen werden.

Die phylogenetische Analyse von FaGT4 wies darauf hin, dass Anthocyanidin-3-glucoside potentielle Substrate der FaGT4 sind. Da UDP-L-Rhamnose kommerziell nicht erhältlich ist, wurden die Enzymassays mit UDP-D-Glucose und Pelargonidin-3-glucosid durchgeführt. Zusätzlich wurden auch die Flavonole Kämpferol und Quercetin getestet. In keinem Fall konnte enzymatische Aktivität nachgewiesen werden, obwohl auch hier lösliche FaGT4 im Proteinrohextrakt detektiert werden konnte.

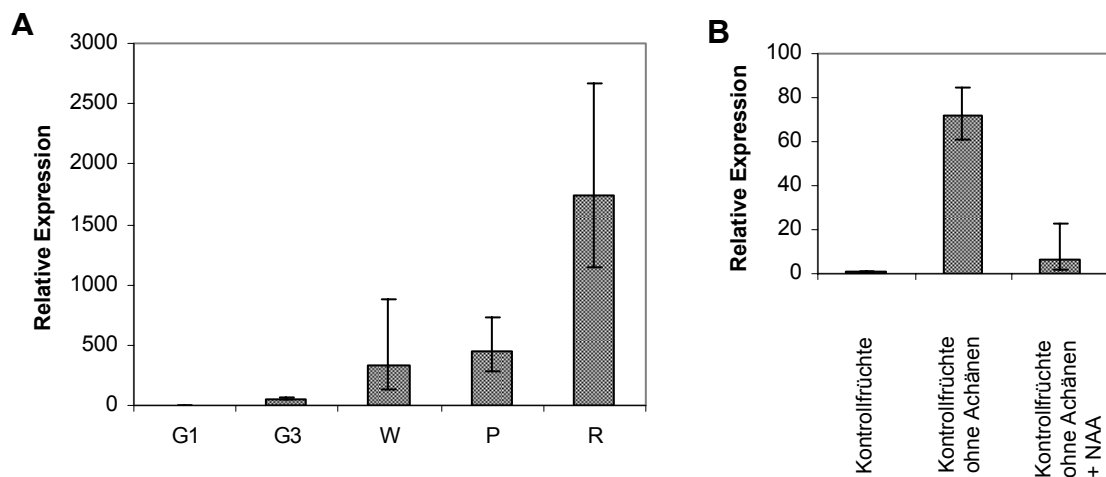
## 2.4 *Fragaria x ananassa* Glycosyltransferase 5 (FaGT5)

### 2.4.1 Genexpressionsanalyse

Die Genexpression der *FaGT5* wurde ebenfalls mit quantitativer PCR untersucht. Die Transkriptmengen sind in kleinen grünen (G1), großen grünen (G3), weißen (W), pinkfarbenen (P) und roten (R) Früchten (Abb. 6) bestimmt worden. Um den Einfluss des Pflanzenhormons Auxin zu untersuchen, sind die Achänen von mittelgroßen grünen Früchten (G2) analog zu 2.2.1 entfernt wor-

den. Ein Teil der Früchte ohne Achänen wurde mit dem synthetischen Auxin 1-Naphthalinessigsäure (NAA) behandelt.

*FaGT5* zeigt wie *FaGT1* und *FaGT3-4* eine reifekorrelierte Genexpression und ist am stärksten im Blütenboden reifer roter Früchte (R) exprimiert (Abb. 26A). Die Transkriptmengen in den Achänen waren nicht reifekorreliert und erreichten maximal den Wert des Blütenbodens kleiner grüner Früchte (G1). In Wurzeln war mit quantitativer PCR keine Expression nachweisbar. In Blättern, Blüte und Wurzelhals bewegten sich die ermittelten Transkriptmengen ebenfalls im Bereich des Blütenbodens kleiner grüner Früchte (G1). Da mit quantitativer PCR auch sehr seltene Transkripte detektiert werden, kann bei *FaGT5* ebenfalls von einer fruchtspezifischen und reifekorrelierten Expression gesprochen werden.



**Abbildung 26:** Genexpressionsstudie der *FaGT5*. **A** Reifekorrelierte Expression im Blütenboden. RNA wurde aus dem Blütenboden kleiner grüner (G1), großer grüner (G3), weißer (W), pinkfarbener (P) und reifer roter (R) Erdbeerfrüchte isoliert. Nach reverser Transkription wurde die Genexpression mit quantitativer PCR bestimmt. Die relativen Expressionswerte beziehen sich auf kleine grüne Früchte (G1). *FaGT5* wird reifekorreliert exprimiert und weist die größte Transkriptmenge in reifen roten (R) Früchten auf. **B** Hormonelle Kontrolle der Expression der *FaGT5*. Die Achänen mittelgroßer grüner Früchte (G2) wurden entfernt und nach 5 Tagen erfolgte die Ernte der Früchte. Ein Teil der Früchte ohne Achänen wurde mit dem synthetischen Auxin 1-Naphthalinessigsäure (NAA) behandelt. Die Genexpression der *FaGT5* wurde mit quantitativer PCR bestimmt. Die relativen Expressionswerte beziehen sich auf die Kontrollfrüchte. Die Genexpression der *FaGT5* wird durch das Entfernen der Achänen induziert, kann aber durch die Applikation von Auxin reprimiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Genexpression durch das Pflanzenhormon Auxin negativ reguliert wird.

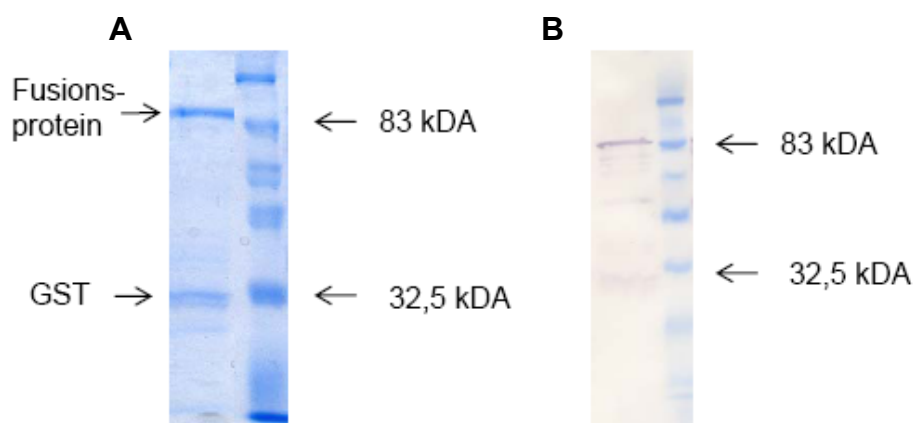
Durch das Entfernen der Achänen wird die Expression der *FaGT5* induziert (Abb. 26B). Dieser Effekt konnte aber durch die Applikation einer Auxin-Paste

wieder rückgängig gemacht werden. Die Genexpression der *FaGT5* scheint also vom Pflanzenhormon Auxin negativ kontrolliert zu werden.

#### 2.4.2 Heterologe Expression und biochemische Charakterisierung

##### 2.4.2.1 Aufreinigung und Nachweis rekombinanter FaGT5

Da durch His-Tag Affinitätschromatographie nur eine partielle Aufreinigung rekombinanter FaGT1 erreicht werden konnte, wurde *FaGT5* in den Expressionsvektor pGEX-4T-1 kloniert und als Fusionsprotein mit Glutathion S-Transferase (GST) exprimiert. Die heterologe Expression und der Zellaufschluss erfolgte ansonsten wie bei FaGT1. Durch die Verwendung dieses Expressionssystems wird die Löslichkeit des rekombinanten Proteins erhöht und eine Aufreinigung durch GST Affinitätschromatographie ermöglicht. Dazu wird ein Harz mit immobilisiertem reduziertem Glutathion verwendet, an das die GST-Domäne bindet. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit 10 mM reduziertem Glutathion. Die erhaltene Proteinfraction wurde mit SDS-PAGE untersucht. Dabei konnte sowohl das Fusionsprotein (52,5 kDa FaGT5 + 29 kDa GST), als auch GST (29 kDa) detektiert werden (Abb. 27A). Die Instabilität des Fusionsproteins und die Abspaltung von GST stellt ein bereits von anderen Arbeitsgruppen beobachtetes Problem bei der Verwendung dieses Expressionssystems dar (Jackson et al., 2001; Isayenkova et al., 2006).



**Abbildung 27:** Aufreinigung und Nachweis rekombinanter FaGT5. **A** SDS-PAGE einer durch GST Affinitätschromatographie aufgereinigten Proteinfraction, die sowohl GST (29 kDa) als auch das Fusionsprotein (52,5 kDa FaGT5 + 29 kDa GST) enthält. **B** Mit Anti-GST Antikörper durchgeführter *Western Blot* einer aufgereinigten Proteinfraction.

Hervorzuheben ist, dass ausschließlich Proteine, die an reduziertem Glutathion binden, aufgereinigt wurden. Dadurch konnte in einem chromatographischen

Schritt bereits eine erfolgreiche Aufreinigung erreicht und im *Western Blot* mit Anti-GST Antikörper das Fusionsprotein nachgewiesen werden (Abb. 27B). FaGT5 ist also in löslicher Form exprimiert und erfolgreich aufgereinigt worden.

#### 2.4.2.2 Substratspezifität der rekombinanten FaGT5

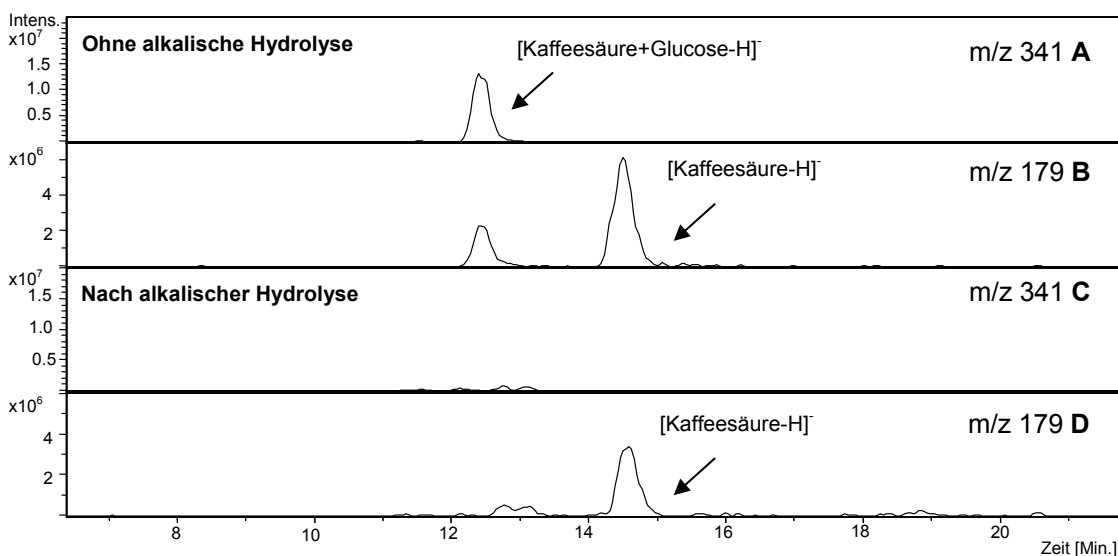
Aufgrund der phylogenetischen Analyse wurden zunächst Hydroxybenzoe- und Hydroxyzimtsäuren als Substrate getestet. Die Assays sind mit rekombinanter FaGT5 und UDP-D-Glucose durchgeführt und die Produkte mit LC-ESI-MS untersucht worden. Mit Zimtsäure und Hydroxyzimtsäuren (*o*-Cumarsäure, *m*-Cumarsäure, *p*-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Sinapinsäure und 3,4-Dimethoxyzimtsäure) konnte eine Produktbildung nachgewiesen werden. Auch Benzoessäure und einige Hydroxybenzoesäuren (3-Hydroxybenzoesäure, 4-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure und 3,4-Dimethoxybenzoesäure) wurden positiv getestet. Salicylsäure, Gentisinsäure, Gallussäure und Sorbinsäure lieferten hingegen keine Produkte. Überraschenderweise wurden auch Spuren von Quercetin, Kämpferol, 7-Hydroxyflavon und 7-Hydroxycumarin umgesetzt, während Pelargonidin, Callistephin, Catechin, 3-Hydroxyflavon, 5-Hydroxyflavon und andere Hydroxycumarine (Daphnetin, Esculetin; Abb. 35) keine Substrate waren. Auch die Pflanzenhormone 3-Indolessigsäure, Abscisinsäure, Gibellerinsäure sowie 1-Naphthol, 2-Naphthol und der Aromastoff 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (HDMF) wurden nicht glucosyliert. Als Negativkontrollen sind Proteinrohextrakte aus BL21 (DE3) pLysS Zellen verwendet worden, die den leeren Expressionsvektor pGEX-4T-1 enthielten. Zusätzlich wurden hitzeinaktivierte Proteinextrakte eingesetzt (5 Minuten, 95 °C). Es konnte somit gezeigt werden, dass rekombinante FaGT5 *in vitro* sowohl Hydroxybenzoesäuren als auch Hydroxyzimtsäuren umsetzt.

#### 2.4.2.3 Identifizierung der Reaktionsprodukte

Eine Nebenaktivität der FaGT5 wurde mit Quercetin beobachtet. Durch Referenzsubstanzen konnten die Reaktionsprodukte als Quercetin-3-glucosid und Quercetin-4'-glucosid identifiziert werden (vgl. 2.5.2.3).

Die eigentlichen Substrate der FaGT5 sind allerdings Hydroxyzimt- und Hydroxybenzoesäuren. Der Transfer eines aktivierten Zuckers kann bei diesen Verbindungen sowohl auf die Säure- als auch auf die Hydroxygruppe des Moleküls erfolgen. Dabei entstehen entweder Zucker-Ester oder Glycoside. Bei Ben-

zoesäure, Zimtsäure und den entsprechenden 3,4-dimethoxylierten Derivaten kommt aufgrund der fehlenden Hydroxygruppe nur die Bildung der entsprechenden Glucose-Ester in Frage. Um zu zeigen, dass auch bei Kaffeesäure ein Zucker-Ester und kein Glycosid gebildet wird, wurde eine alkalische Hydrolyse des enzymatisch gebildeten Produkts durchgeführt. Unter alkalischen Bedingungen werden Esterbindungen gespalten, während glycosidische Bindungen unbeeinflusst bleiben (Lim et al., 2001). Wie Abbildung 28 zeigt, konnte das Reaktionsprodukt der Kaffeesäure nach einer Alkalibehandlung nicht mehr nachgewiesen werden. FaGT5 bildet also den Glucose-Ester von Kaffeesäure.

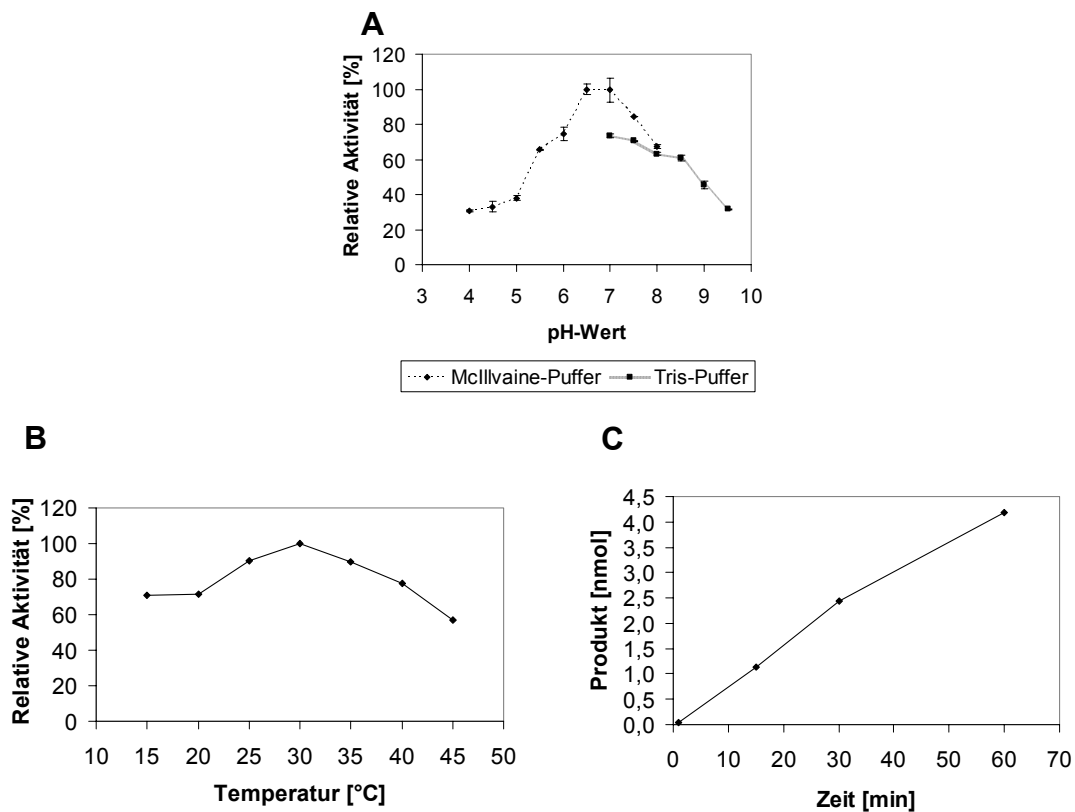


**Abbildung 28:** Nachweis der Bildung von Glucose-Ester durch FaGT5. Ein Standardassay mit FaGT5, UDP-D-Glucose und Kaffeesäure wurde nach erfolgter enzymatischer Reaktion mit 1 M NaOH versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (C, D). Als Kontrolle wurde ein Teil des Assays mit Wasser versetzt (A, B). Die Analytik erfolgte mit LC-ESI-MS im negativen Modus. Die Chromatogramme zeigen die Ionenspuren des Reaktionsproduktes ( $m/z$  341; A, C) und des Substrates (Kaffeesäure;  $m/z$  179; B, D). Nach einer alkalischen Behandlung ist das gebildete Produkt nicht mehr nachweisbar (C). Dies deutet auf die Bildung eines Glucose-Esters hin, da glycosidische Bindungen durch NaOH nicht beeinflusst werden.

#### 2.4.2.4 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die Optimierung der Enzymassays wurde mit radioaktiv markierter UDP-D-Glucose und 4-Hydroxybenzoesäure durchgeführt, da erste Tests auf eine hohe Aktivität dieses Substrats hinwiesen. Die höchsten Umsatzraten konnten bei pH 6,5-7,0 in McIlvaine-Puffer gemessen werden (Abb. 29A). Das Temperaturoptimum betrug 30 °C (Abb. 29B) und unter diesen Bedingungen war die Produktzunahme für mindestens 30 Minuten linear (Abb. 29C). Alle folgenden Assays

wurden deshalb bei 30 °C in McIlvaine-Puffer bei pH 7,0 für 30 Minuten inkubiert.

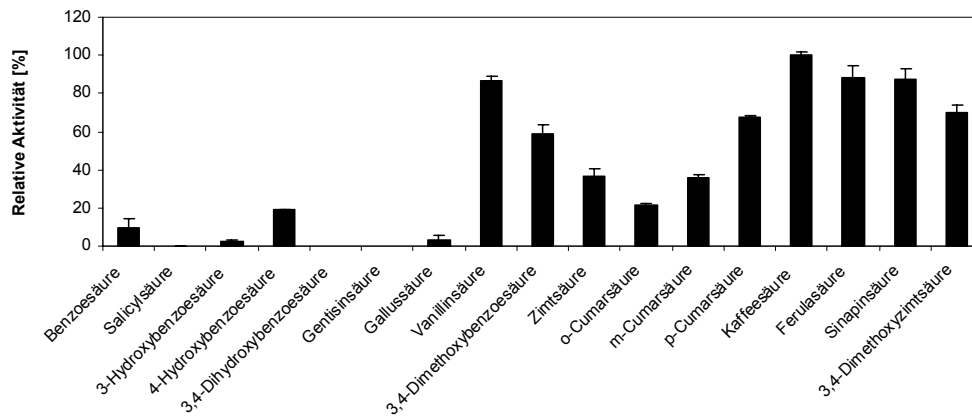


**Abbildung 29:** Optimierung der Reaktionsbedingungen der FaGT5. **A** Einfluss des pH-Wertes. Die Bildung von 4-Hydroxybenzoesäureglucose-Ester wurde bei 30 °C und einer Inkubationszeit von 30 Minuten in Tris- und McIlvaine-Puffer bei verschiedenen pH-Werten gemessen. **B** Einfluss der Inkubationstemperatur. Die Bildung von 4-Hydroxybenzoesäureglucose-Ester wurde bei pH 7 (Tris-Puffer) und einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei verschiedenen Inkubationstemperaturen detektiert. **C** Einfluss der Inkubationszeit auf die Produktbildung. Die Assays wurden bei pH 7 (Tris-Puffer) und 30 °C inkubiert.

#### 2.4.2.5 Bevorzugte Substrate *in vitro*

Um die bevorzugten Substrate zu ermitteln, wurden verschiedene Hydroxybenzoe- und Hydroxyzimtsäuren in Assays mit radioaktiv markierter UDP-D-Glucose und anschließender Riodetektion eingesetzt (Abb. 30). Hydroxyzimtsäuren weisen im allgemeinen höhere Umsatzraten als die entsprechenden Hydroxybenzoesäuren auf. Beim Vorhandensein einer Hydroxygruppe nimmt in beiden Fällen die Aktivität von der *ortho*- über die *meta*- zur *para*-Stellung zu. Salicylsäure (2-Hydroxybenzoesäure) wird nicht als Substrat akzeptiert. Auch das entsprechende Zimtsäurederivat (*o*-Cumarsäure) weist eine relativ niedrige Aktivität auf. Die höchsten Umsatzraten zeigen Substrate mit mindestens zwei Hydroxy- oder Methoxygruppen in *meta*- und *para*-Stellung auf. Das beste ge-

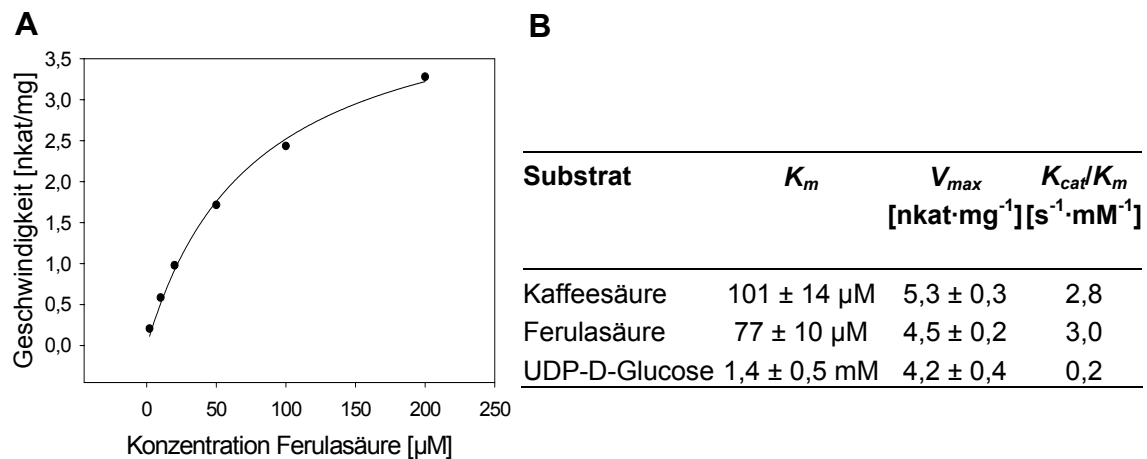
testete Substrat rekombinanter FaGT5 ist Kaffeesäure, gefolgt von Ferulasäure, Sinapinsäure und Vanillinsäure.



**Abbildung 30:** Relative Aktivitäten verschiedener Substrate der FaGT5. Das rekombinante Enzym wurde mit dem entsprechenden Substrat und radioaktiv markierter UDP-D-Glucose bei pH 7,0 (McIlvaine-Puffer) und 30 °C 30 Minuten lang inkubiert. Die relativen Aktivitäten beziehen sich auf das beste Substrat Kaffeesäure (100 %).

#### 2.4.2.6 Ermittlung der kinetischen Parameter

Da Kaffeesäure und Ferulasäure *in vitro* die höchste Aktivität aufwiesen und ihre Glucose-Ester in Erdbeeren vorkommen (Herrmann, 2001), wurden die kinetischen Daten für diese Substrate bestimmt (Abb. 31).



**Abbildung 31:** Kinetische Parameter für ausgesuchte Substrate der FaGT5. **A** Sättigungskurve für Ferulasäure. Die Daten wurden bei konstanter UDP-D-Glucose Konzentration bei 30 °C und pH 7,0 (McIlvaine-Puffer) erhalten. Die graphische Auswertung erfolgte mit der Software SigmaPlot. **B** Die aus den Sättigungskurven ermittelten kinetischen Parameter für Kaffeesäure, Ferulasäure und UDP-D-Glucose. Die kinetischen Daten für UDP-D-Glucose wurden bei konstanter Kaffeesäure Konzentration ermittelt.

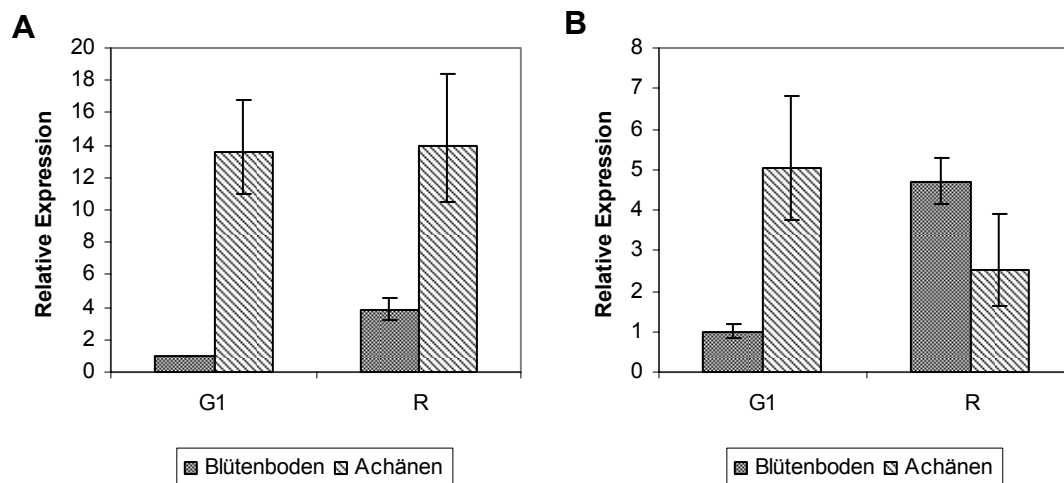
Bei konstanter UDP-D-Glucose Konzentration ergab sich für beide Substrate eine Sättigungskurve nach Michaelis-Menten (Abb. 31A). Für Kaffeesäure und Ferulasäure wurden  $K_m$ -Werte von 101  $\mu\text{mol}$  bzw. 77  $\mu\text{mol}$  und maximale Reaktionsgeschwindigkeiten von 5,3 nkat/mg und 4,5 nkat/mg ermittelt (Abb. 31B). Die Daten für UDP-D-Glucose betragen bei konstanter Kaffeesäure Konzentration 4,2 nkat/mg für  $V_{max}$  und 1,4 mM für den  $K_m$ -Wert.

## 2.5 *Fragaria x ananassa* Glycosyltransferase 6 & 7 (FaGT6 & 7)

### 2.5.1 Genexpressionsanalyse

#### 2.5.1.1 Expression in Achänen und Blütenboden

Die Genexpression der *FaGT6* und *FaGT7* wurde im Blütenboden und in Achänen von kleinen grünen (G1) und reifen roten (R) Früchten (Abb. 6) mit quantitativer PCR untersucht (Abb. 32).



**Abbildung 32:** Expression der *FaGT6* (A) und *FaGT7* (B) in Achänen und Blütenboden. RNA wurde aus Achänen und Blütenboden kleiner grüner (G1) und reifer roter (R) Früchte isoliert und nach reverser Transkription die Genexpression mit quantitativer PCR ermittelt. Alle relativen Expressionswerte wurden auf den Blütenboden kleiner grüner Früchte (G1) bezogen. Im Blütenboden, nicht aber in den Achänen, zeigen beide Glycosyltransferasen eine reifekorrelierte Expression. *FaGT6* weist in den Achänen grüner und roter Früchte die höchste Expression auf, während *FaGT7* auch im Blütenboden roter Früchte relativ stark exprimiert wird.

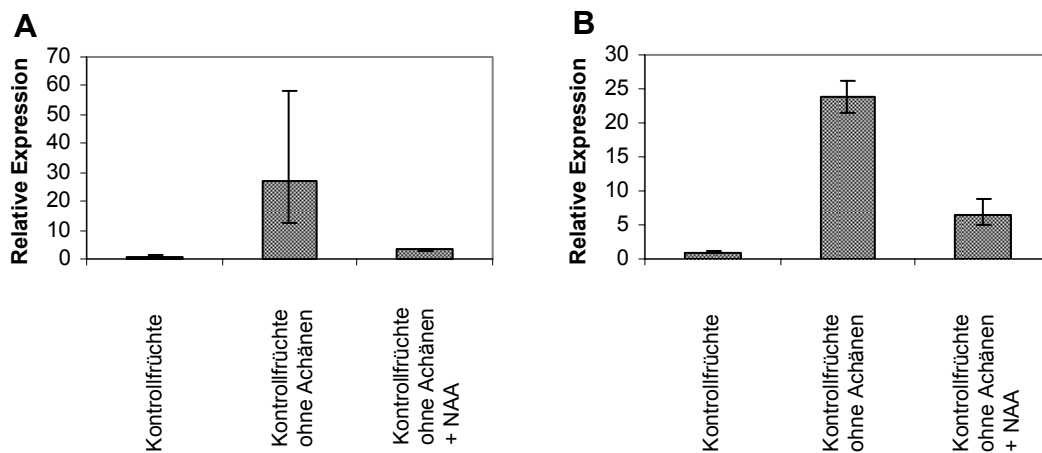
Im Blütenboden weisen beide Glycosyltransferasen eine reifekorrelierte Expression auf. Allerdings ist der Anstieg der Transkriptmenge um einige Größenordnungen geringer als bei den anderen untersuchten Glycosyltransferasen (Abb. 14, Abb. 23 und Abb. 26). *FaGT6* wird am stärksten in den Achänen exprimiert. In diesem Gewebe werden vergleichbare *FaGT6* Transkriptmengen



in kleinen grünen und reifen roten Früchten gefunden (Abb. 32A). *FaGT7* weist in den Achänen kleiner grüner Früchte eine höhere Expression als im Blütenboden des gleichen Reifegrades auf. In roten Früchten können vergleichbare Transkriptmengen sowohl in den Achänen als auch im Blütenboden detektiert werden (Abb. 32B). Verglichen mit den anderen in dieser Arbeit beschriebenen Glycosyltransferasen weisen *FaGT6* und *FaGT7* eine relativ hohe Expression in Achänen und kleinen grünen Früchten (G1) auf. Die Unterschiede in den Transkriptmengen sind aber insgesamt weniger deutlich als bei den anderen Genen.

### 2.5.1.2 Hormonelle Kontrolle

Der Einfluss des Pflanzenhormons Auxins auf die Expression der *FaGT6* und *FaGT7* wurde analog zu 2.2.1 untersucht (Abb. 33). Beide Glycosyltransferasen werden durch das Entfernen der Achänen induziert. Sowohl bei *FaGT6* als auch bei *FaGT7* wird die Induktion der Genexpression durch die Behandlung mit 1-Naphthalinessigsäure unterdrückt. Dies bedeutet, dass die Expression beider Glycosyltransferasen im Blütenboden durch das Pflanzenhormon Auxin negativ reguliert wird.

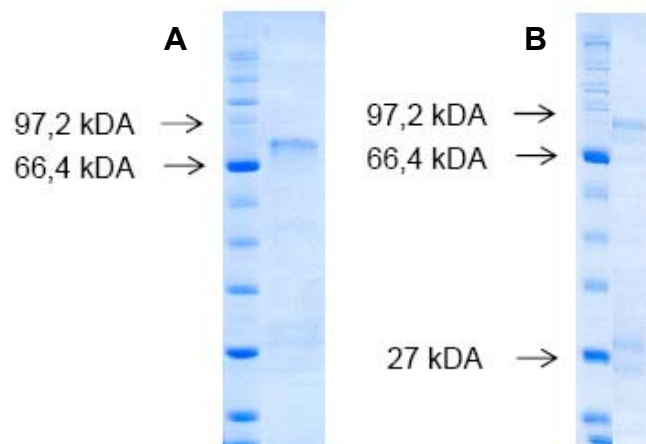


**Abbildung 33:** Hormonelle Kontrolle der Expression der *FaGT6* (A) und *FaGT7* (B). Die Achänen von mittelgroßen grünen Früchten (G2) wurden entfernt und nach 5 Tagen erfolgte die Ernte der Früchte. Ein Teil der Früchte ohne Achänen wurde mit dem synthetischen Auxin 1-Naphthalinessigsäure (NAA) behandelt. Die Genexpression der *FaGT6* und *FaGT7* wurde anschließend mit quantitativer PCR bestimmt. Alle relativen Expressionswerte beziehen sich auf die Kontrollfrüchte. Die Genexpression der *FaGT6* und *FaGT7* wird durch das Entfernen der Achänen induziert und kann durch die Applikation von Auxin reprimiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Expression beider Glycosyltransferasen im Blütenboden durch das Pflanzenhormon Auxin negativ kontrolliert wird.

### 2.5.2 Heterologe Expression und biochemische Charakterisierung

#### 2.5.2.1 Aufreinigung und Nachweis der rekombinanten Enzyme

Die vollständigen offenen Leserahmen der *FaGT6* und *FaGT7* wurden in den Expressionsvektor pGEX-4T-1 kloniert und als GST-Fusionsproteine exprimiert. Die Expression und Aufreinigung erfolgte analog zur *FaGT5*. Sowohl *FaGT6* als auch *FaGT7* konnten in einem Schritt erfolgreich aufgereinigt werden. Bei *FaGT6* wies die mit SDS-PAGE untersuchte Proteinfraction keine nachweisbaren Protein-Verunreinigungen auf (Abb. 34A). Nach der Aufreinigung rekombinanter *FaGT7* wurden noch einige kleinere Proteine in der Größe der GST detektiert (Abb. 34B). Dies deutet auf eine Instabilität des Fusionsproteins hin, die bereits bei *FaGT5* und von anderen Arbeitsgruppen beobachtet wurde (Jackson et al., 2001; Isayenkova et al., 2006). *FaGT6* und *FaGT7* konnten somit in löslicher Form exprimiert und erfolgreich aufgereinigt werden.



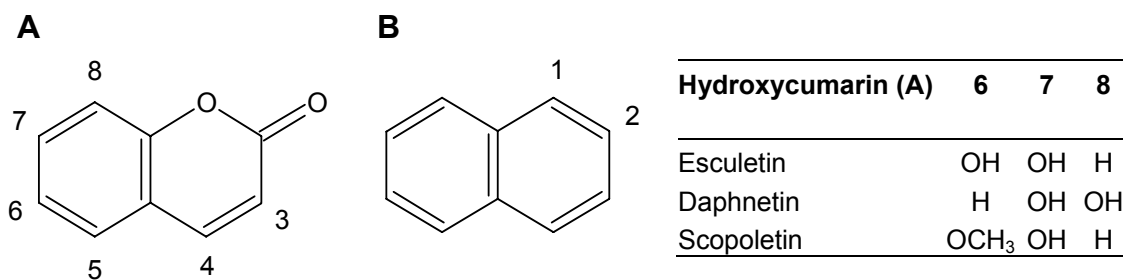
**Abbildung 34:** Aufreinigung rekombinanter *FaGT6* (A) und *FaGT7* (B) durch GST Affinitätschromatographie. **A** Rekombinante *FaGT6* (53,5 kDa *FaGT6* + 29 kDa GST) konnte vollständig aufgereinigt werden. **B** Rekombinante *FaGT7* (54,7 kDa *FaGT7* + 29 kDa GST) enthielt noch einige kleinere Protein-Verunreinigungen in der Größe der GST (29 kDa).

#### 2.5.2.2 Substratspezifität der rekombinanten Enzyme

Trotz der relativ geringen Sequenzhomologien zwischen *FaGT6* und *FaGT7* deutete die phylogenetische Analyse darauf hin, dass Flavonole und Hydroxycumarine potentielle Substrate beider Glycosyltransferasen sind.

In Enzymassays mit rekombinanter *FaGT6* und UDP-D-Glucose wurden verschiedene Flavonole (3-Hydroxyflavon, 3,7-Dihydroxyflavon, Galangin, Kämpferol, Quercetin, Myricetin, Isorhamnetin, Morin) und Flavone (Chrysin, Apigenin) glucosyliert. 5-Hydroxyflavon und 7-Hydroxyflavon fungierten jedoch nicht als Substrate. Auch Flavanone (Taxifolin, Naringenin), Flavonolglucoside (Kämpfe-

rol-3-glucosid) und einige Anthocyanidine (Malvidin, Peonidin, Petunidin) wurden von FaGT6 umgesetzt. Auf Delphinidin, Pelargonidin und Cyanidin konnte dagegen keine D-Glucose übertragen werden. Glucosyliert wurden jedoch einige Hydroxycumarine (3-Hydroxycumarin, 6-Hydroxycumarin, 7-Hydroxycumarin, Esculetin, Daphnetin, Scopoletin) und die nicht in der Natur vorkommenden Verbindungen 1-Naphthol und 2-Naphthol (Abb. 35). Negativ getestet wurden Cumarin und einige Derivate (4-Hydroxycumarin, 7-Methoxycumarin) sowie die Flavane Catechin und Epicatechin. Ebenso sind 3-Hydroxybenzoesäure, 4-Hydroxybenzoesäure, *p*-Cumarsäure, Betanidin, 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (HDMF), Maltol, Ethylmaltol, Vanillin, Tyrosol, Hydrochinon und Phenol nicht umgesetzt worden. UDP-D-Glucuronsäure wurde nicht auf Quercetin, Kämpferol oder Isorhamnetin übertragen und UDP-D-Galactose zeigte keine Reaktion mit Quercetin.



**Abbildung 35:** Strukturformeln von Cumarin (A) und Naphthalin (B). Die möglichen Positionen, die hydroxyliert oder methoxyliert vorliegen können, sind nummeriert. Angegeben ist auch das Substitutionsmuster von drei häufigen Hydroxycumarinen.

FaGT7 wurde zunächst mit verschiedenen Flavonolen und UDP-D-Glucose getestet. Eine Umsetzung konnte mit den Flavonolen 3-Hydroxyflavon, 3,7-Dihydroxyflavon, Galangin, Quercetin, Kämpferol, Isorhamnetin und Myricetin beobachtet werden. Auch einige Flavone (7-Hydroxyflavon, Chrysin), Flavanone (Taxifolin) und Flavonolglucoside (Quercetin-3-glucosid) wurden glucosyliert, während Anthocyanidine (Pelargonidin, Malvidin), Flavane (Catechin) und das Flavanon Naringenin sowie die Flavone Apigenin und 5-Hydroxyflavon nicht umgesetzt worden sind. Akzeptiert wurden dagegen einige Hydroxycumarine (3-Hydroxycumarin, 7-Hydroxycumarin, Esculetin, Daphnetin, Scopoletin) wohingegen 4-Hydroxycumarin, 6-Hydroxycumarin und 7-Methoxycumarin negativ getestet wurden. Die nicht natürlich vorkommenden Verbindungen 1-Naphthol und 2-Naphthol sind auch von FaGT7 akzeptiert worden. Hydroxybenzoesäuren

(Salicylsäure, 3-Hydroxybenzoesäure, 4-Hydroxybenzoesäure), Hydroxyzimtsäuren (*p*-Cumarsäure, Kaffeesäure) und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanon (HDMF) stellten keine Substrate der FaGT7 dar. UDP-D-Glucuronsäure wurde nicht auf Quercetin und Kämpferol übertragen, ebenso konnte keine Umsetzung mit UDP-D-Galactose und Isorhamnetin nachgewiesen werden.

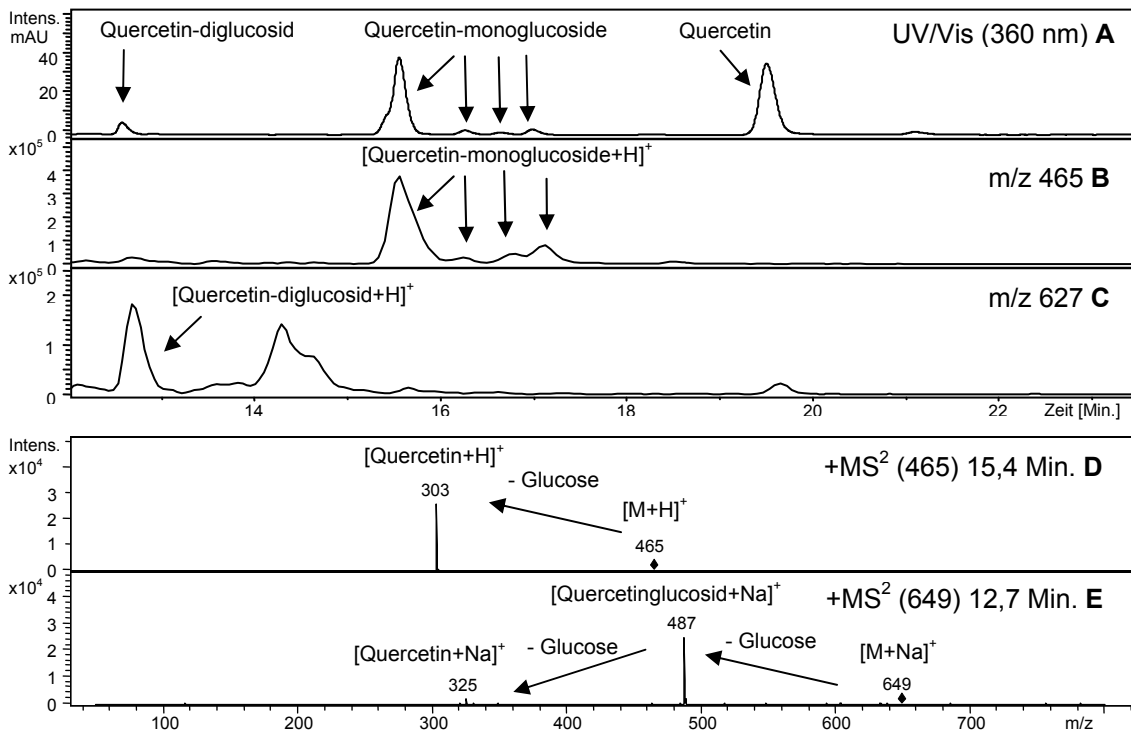
Proteinrohextrakte aus BL21 (DE3) pLysS Zellen, die den leeren Expressionsvektor pGEX-4T-1 enthielten, dienten als Negativkontrollen. Daneben sind auch Assays mit hitzeinaktiviertem Protein (5 Minuten, 95 °C) durchgeführt worden. Bei FaGT6 und FaGT7 handelt es sich somit um multifunktionelle Glycosyltransferasen die *in vitro* verschiedene Flavonoide, Hydroxycumarine und Naphthole akzeptieren.

### 2.5.2.3 Identifizierung der Reaktionsprodukte

Die von beiden Enzymen umgesetzten Substrate weisen teilweise mehrere Hydroxygruppen auf, die für eine Glucosylierung in Frage kommen. Das Substratscreening der FaGT6 wies darauf hin, dass ausschließlich die Position 3 glucosyliert wird, da zwar 3-Hydroxyflavon, nicht aber 5-Hydroxyflavon oder 7-Hydroxyflavon akzeptiert wurde. Allerdings konnte auch mit Chrysin (5,7-Dihydroxyflavon) die Bildung eines Produktes beobachtet werden. 3,7-Dihydroxyflavon wurde sogar zu zwei Produkten umgesetzt. FaGT6 bevorzugt also die Position 3, aber auch die Position 7 scheint mit geringerer Aktivität glucosyliert zu werden, während die Position 5 nicht akzeptiert wird.

Die Untersuchung der aus Quercetin und UDP-D-Glucose gebildeten Reaktionsprodukte zeigte, dass mehrere Produkte gebildet werden (Abb. 36). Sowohl das UV-Chromatogramm (Abb. 36A) als auch die Ionenspur der entsprechenden monoglucosylierten Verbindungen ( $m/z$  465; Abb. 36B) zeigen neben einem Hauptprodukt drei Nebenprodukte. Für drei dieser Produkte konnten MS<sup>2</sup>-Spektren aufgenommen werden, die die Bildung von Glucosiden bestätigten (Abb. 36D). Da Quercetin-3-glucosid als Referenzverbindung zur Verfügung stand, konnte das Hauptprodukt eindeutig als Quercetin-3-glucosid identifiziert werden. Zusätzlich wird auch die Bildung eines Diglucosids beobachtet ( $m/z$  627; Abb. 36C). Im MS<sup>2</sup>-Spektrum (Abb. 36E) des Diglucosids wird auch das Fragment des Monoglucosids detektiert. Somit scheinen beide Moleküle Glucose an verschiedenen Hydroxygruppen von Quercetin gebunden zu sein. Wären beide Zuckerreste als Diglucosid an einer Position gebunden, so würde

man den gleichzeitigen Verlust beider Zuckereinheiten im MS<sup>2</sup>-Spektrum erwarten, da die Bindung zwischen zwei Zuckern unter diesen Bedingungen nicht gespalten wird (Giusti et al., 1999). FaGT6 bildet also bevorzugt Flavonol-3-glucoside neben geringen Mengen anderer Monoglucoside und eines Diglucosids.

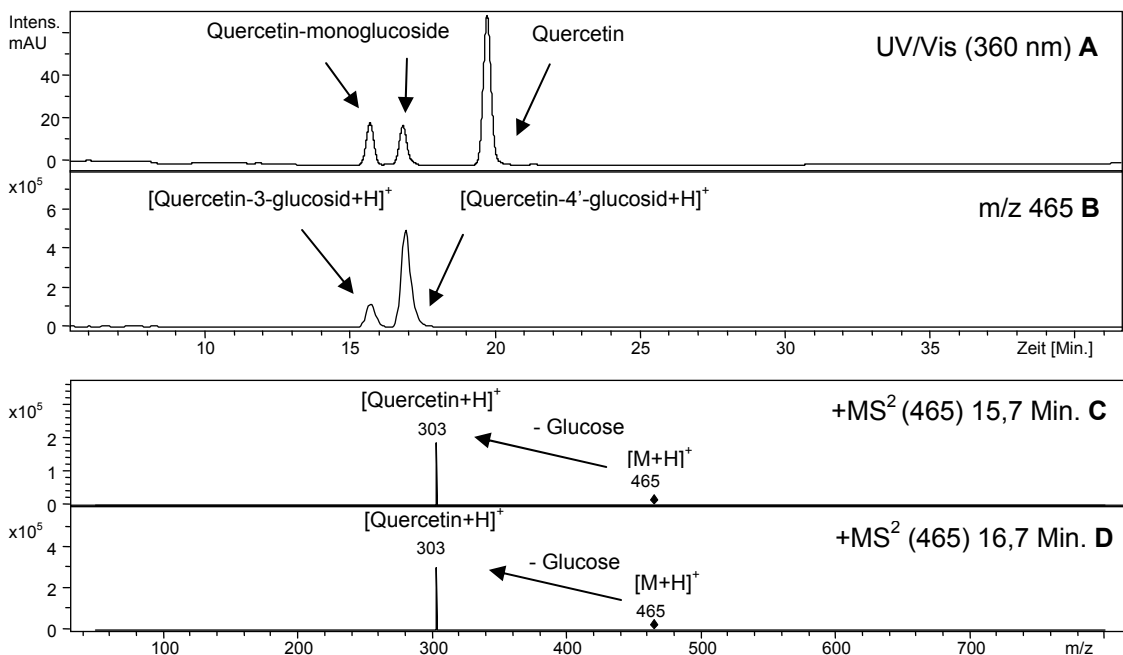


**Abbildung 36:** Identifizierung der FaGT6 Reaktionsprodukte. Quercetin wurde mit UDP-D-Glucose und rekombinanter FaGT6 inkubiert und der Assay mit LC-ESI-MS untersucht. Sowohl im UV-Chromatogramm (360 nm, A) als auch in der betreffenden Ionenspur (m/z 465, B) können ein Hauptprodukt und drei monoglucosylierte Nebenprodukte nachgewiesen werden. Das MS<sup>2</sup>-Spektrum des Hauptprodukts ist in D dargestellt. Die Ionenspur m/z 627 (C) zeigt die Bildung von Quercetin-diglucosid. Das betreffende MS<sup>2</sup>-Spektrum des Na<sup>+</sup>-Addukts (E) deutet darauf hin, dass beide Moleküle D-Glucose an verschiedenen Hydroxygruppen von Quercetin gebunden sind.

Das Substratscreening der FaGT7 zeigte, dass 3-Hydroxyflavon und 7-Hydroxyflavon etwa gleich gute Substrate sind. Dies deutete darauf hin, dass bei den Flavonolen sowohl die Hydroxygruppe an Position 3 und 7 glucosyliert werden kann.

Bei der Umsetzung von Quercetin mit UDP-D-Glucose werden zwei Produkte detektiert, die in etwa gleichen Mengen entstehen (Abb. 37A). Die Ionenspur m/z 465 (Abb. 37B) weist auf die Bildung von Monoglucosiden hin. Die Bildung eines Diglucosids konnte nicht nachgewiesen werden. Die MS<sup>2</sup>-Spektren der

beiden Reaktionsprodukte (Abb. 37C und 37D) sind identisch und bestätigen die Bildung von Quercetin-monoglucosiden. Durch die entsprechenden Referenzverbindungen konnten Quercetin-3-glucosid (15,7 min) und etwas überraschend Quercetin-4'-glucosid (16,7 min) als Reaktionsprodukte identifiziert werden. Die quantitative Auswertung des UV/Vis-Chromatogramms ergab, dass 53 % Quercetin-3-glucosid und 47 % Quercetin-4'-glucosid entstehen.

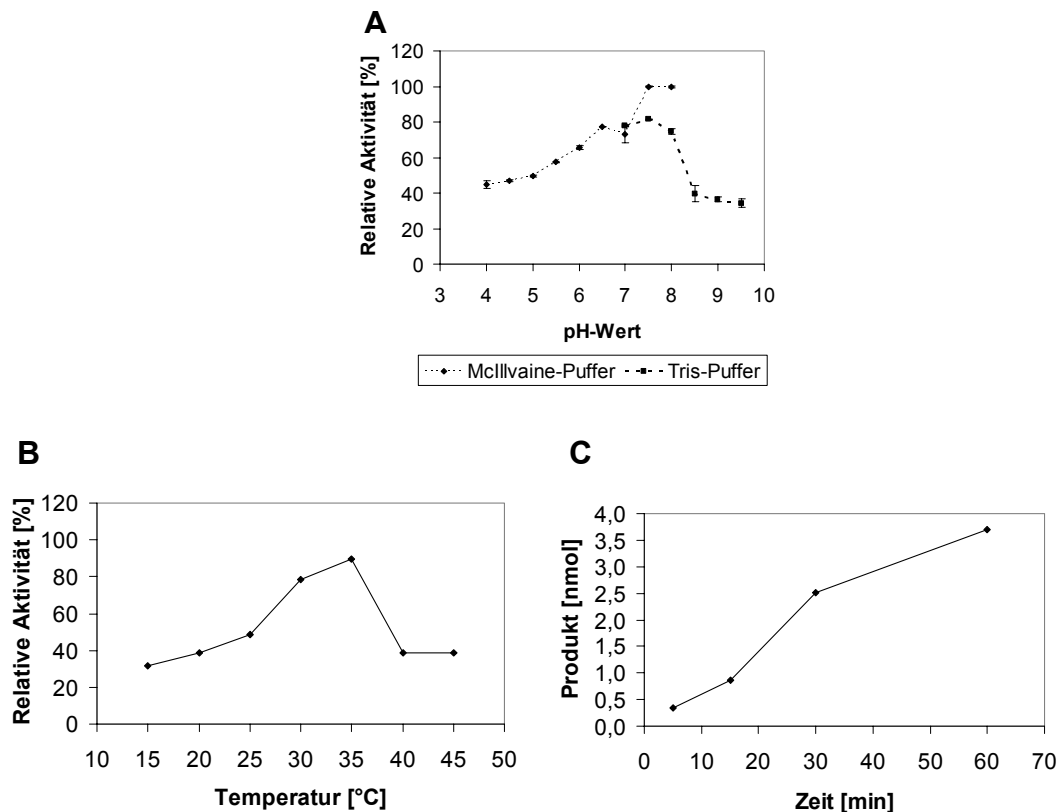


**Abbildung 37:** Identifizierung der FaGT7 Reaktionsprodukte. Quercetin wurde mit UDP-D-Glucose und rekombinanter FaGT7 inkubiert und der Assay mit LC-ESI-MS untersucht. Sowohl im UV-Chromatogramm (360 nm, A) als auch in der Ionenspur der Quercetin-monoglucoside ( $m/z$  465, B) können zwei Produkte nachgewiesen werden. Durch Referenzsubstanzen konnten sie als Quercetin-3-glucosid und Quercetin-4'-glucosid identifiziert werden. Eine quantitative Auswertung des UV-Chromatogramms (A) ergab, dass 53 % Quercetin-3-glucosid und 47 % Quercetin-4'-glucosid entstehen. Die identischen  $MS^2$ -Spektren der beiden Glucoside sind in C (Quercetin-3-glucosid) und D (Quercetin-4'-glucosid) dargestellt.

#### 2.5.2.4 Optimierung der Reaktionsbedingungen

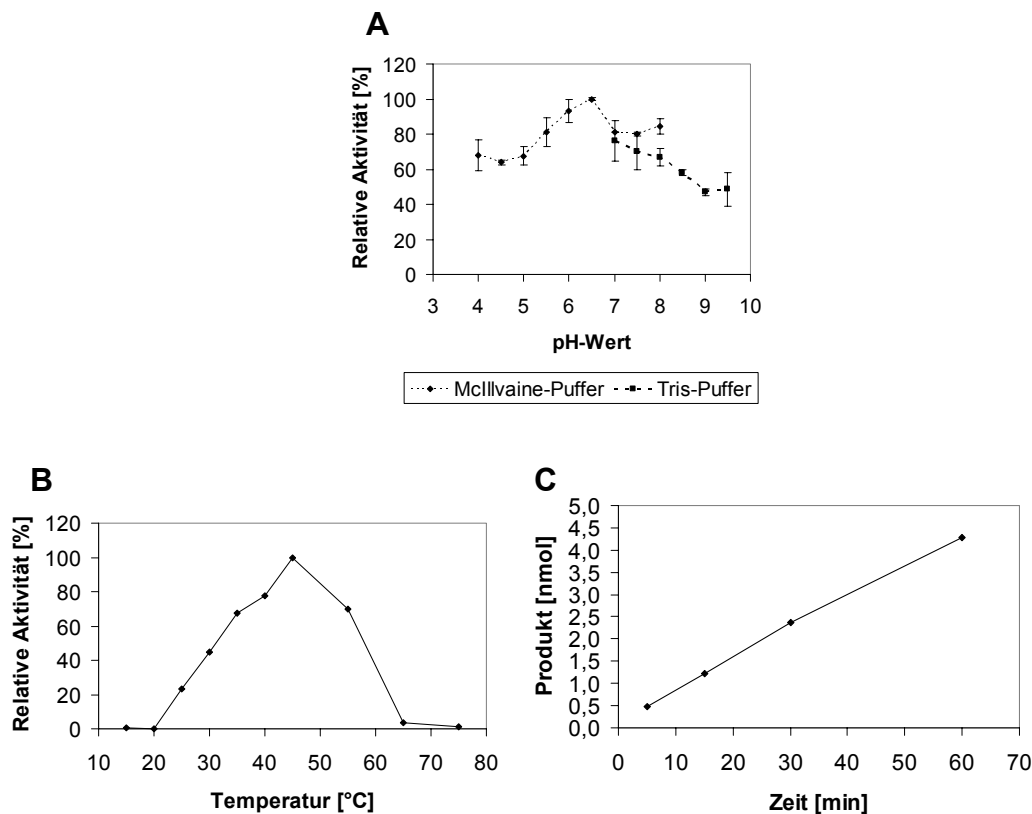
Da Quercetin in Erdbeeren vorkommt (Häkkinen und Törrönen, 2000) und in ersten Aktivitätstests als Substrat akzeptiert wurde, sind die Reaktionsbedingungen der FaGT6 mit Quercetin und radioaktiv markierter UDP-D-Glucose optimiert worden. Die höchste Aktivität wurde in beiden Puffersystemen im Bereich um pH 7,5 erreicht, wobei die besten Umsatzraten in McIlvaine-Puffer zwischen pH 7,5 und 8,0 ermittelt wurden (Abb. 38A). Im Vergleich zu FaGT1 und FaGT5 war das Temperaturoptimum zu höheren Temperaturen verschoben

und lag bei 35 °C (Abb. 38B). Die Produktzunahme war für mindestens 30 Minuten linear (Abb. 38C).



**Abbildung 38:** Optimierung der Reaktionsbedingungen der FaGT6. **A** Einfluss des pH-Wertes. Die Umsetzung von Quercetin wurde bei 30 °C und einer 30-minütigen Inkubationszeit in McIlvaine- und Tris-Puffer bei verschiedenen pH-Werten gemessen. **B** Einfluss der Inkubationstemperatur. Die Umsetzung von Quercetin wurde bei pH 7,0 (Tris-Puffer) und einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei verschiedenen Temperaturen gemessen. **C** Einfluss der Inkubationszeit auf die Produktbildung. Die Assays wurden mit Quercetin bei pH 7 (Tris-Puffer) und 30 °C durchgeführt.

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen der FaGT7 wurde 3-Hydroxycumarin eingesetzt, da es in vorläufigen Tests gut umgesetzt wurde und kommerziell erhältlich ist. Die optimalen Reaktionsbedingungen lagen bei pH 6,5 in McIlvaine-Puffer (Abb. 39A) und 45 °C (Abb. 39B). Da das Temperaturoptimum zu relativ hohen Temperaturen verschoben war, wurden Inkubationstemperaturen bis zu 75 °C getestet. Unter 20 °C und über 65 °C konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Die Produktzunahme war für mindestens 60 Minuten linear (Abb. 39C).



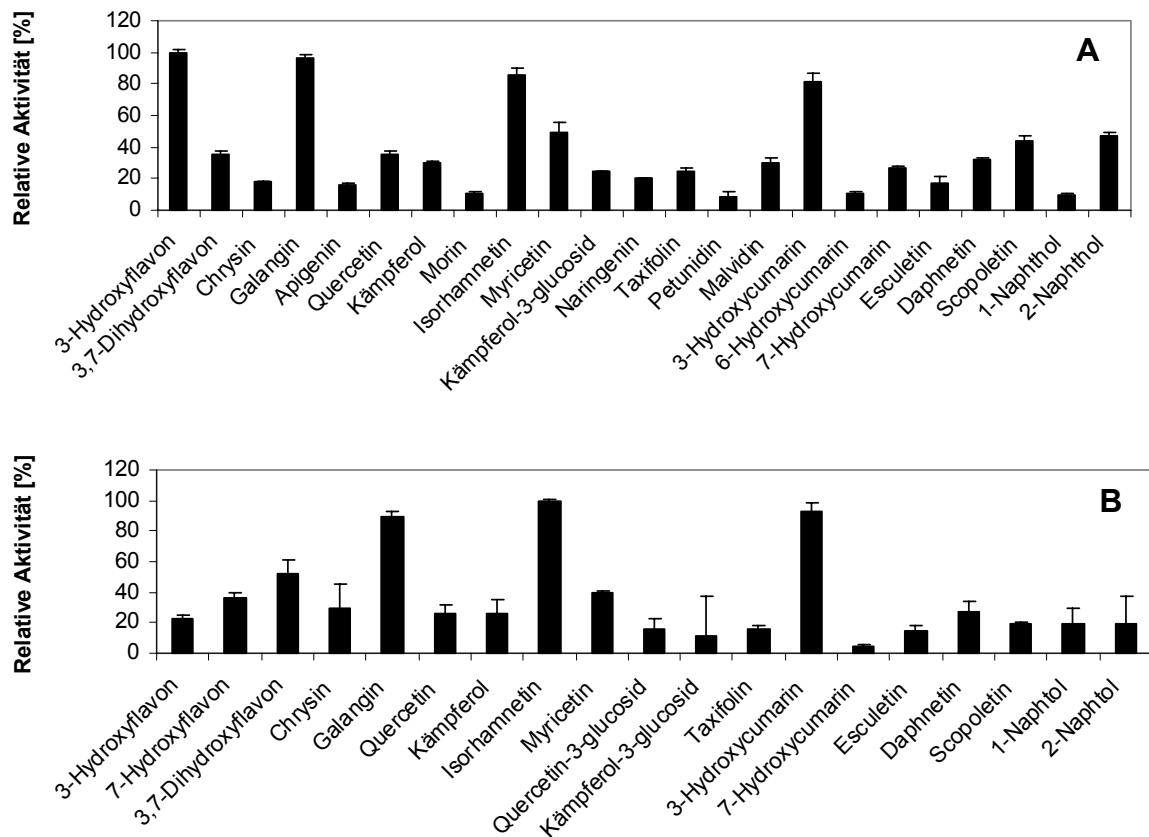
**Abbildung 39:** Optimierung der Reaktionsbedingungen der FaGT7. **A** Einfluss des pH-Wertes. Die Umsetzung von 3-Hydroxycumarin wurde bei 30 °C und einer 30-minütigen Inkubationszeit in McIlvaine- und Tris-Puffer bei verschiedenen pH-Werten gemessen. **B** Einfluss der Inkubationstemperatur. Die Umsetzung von 3-Hydroxycumarin wurde bei pH 6,5 (McIlvaine-Puffer) und einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei verschiedenen Temperaturen gemessen. **C** Einfluss der Inkubationszeit auf die Produktbildung. Die Assays wurden mit 3-Hydroxycumarin bei pH 6,5 (McIlvaine-Puffer) und 30 °C durchgeführt.

### 2.5.2.5 Bevorzugte Substrate *in vitro*

Verschiedene Flavonoide, Hydroxycumarine und Naphthole wurden in Assays mit radioaktiv markierter UDP-D-Glucose eingesetzt, um die bevorzugten Substrate zu ermitteln. Beide Glycosyltransferasen weisen ein recht ähnliches Substratspektrum auf (Abb. 40). Galangin, Isorhamnetin und 3-Hydroxycumarin zählen sowohl bei FaGT6 als auch bei FaGT7 zu den besten Substraten. FaGT6 zeigt zusätzlich auch mit 3-Hydroxyflavon eine sehr hohe Umsatzrate. Des Weiteren weist FaGT6 mit einigen Hydroxycumarinen (insbesondere Scopoletin) und 2-Naphthol höhere relative Aktivitäten auf. Beide Glycosyltransferasen zeigen mit den in der Erdbeere vorkommenden Verbindungen Quercetin und Kämpferol relativ geringe Umsatzraten. Lediglich das in manchen Erdbeersorten nachgewiesene Flavonol Myricetin (Mikkonen et al., 2002) zählt bei



FaGT6 zu den besseren Substraten. Es handelt sich bei FaGT6 und FaGT7 somit um multifunktionelle Glycosyltransferasen, die *in vitro* vor allem nicht in der Erdbeerfrucht vorkommende Verbindungen umsetzen.

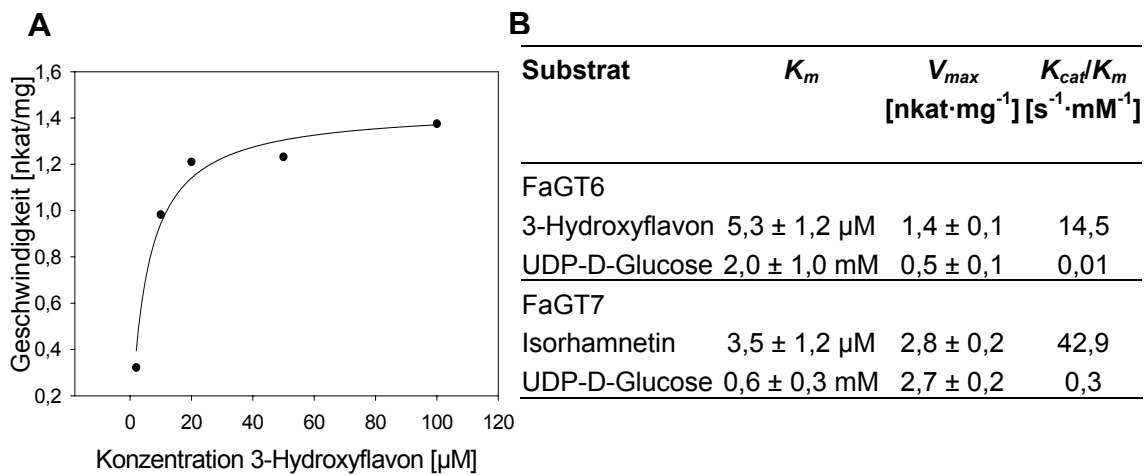


**Abbildung 40:** Relative Aktivitäten verschiedener Substrate der FaGT6 (A) und FaGT7 (B). **A** Das Substratspektrum der FaGT6 wurde bei pH 7,5 (McIlvaine-Puffer) und 30 °C bei 30 Minuten Inkubationszeit bestimmt. Die relative Aktivität ist auf das beste Substrat 3-Hydroxyflavon bezogen (100 %). **B** Das Substratspektrum der FaGT7 wurde bei pH 6,5 (McIlvaine-Puffer) und 35 °C und 30 Minuten Inkubationszeit bestimmt. Die relative Aktivität ist auf das beste Substrat Isorhamnetin bezogen (100 %).

#### 2.5.2.6 Ermittlung der kinetischen Parameter

Unter optimalen Reaktionsbedingungen wurden anschließend kinetische Daten für beide Glycosyltransferasen bestimmt. Für jede Glycosyltransferase ist das jeweils beste Substrat (FaGT6: 3-Hydroxyflavon; FaGT7: Isorhamnetin) ausgewählt worden. Die kinetischen Daten für UDP-D-Glucose wurden bei konstanter Konzentration von 3-Hydroxyflavon (FaGT6) bzw. 3-Hydroxycumarin (FaGT7) bestimmt, da Isorhamnetin in höheren Konzentrationen schlecht löslich ist. Wie auch bei FaGT1 und FaGT5 bewegen sich die  $K_m$ -Werte von UDP-D-Glucose im mM-Bereich (Abb. 41B). Die  $K_m$ -Werte der Akzeptoren liegen im unteren  $\mu$ M-

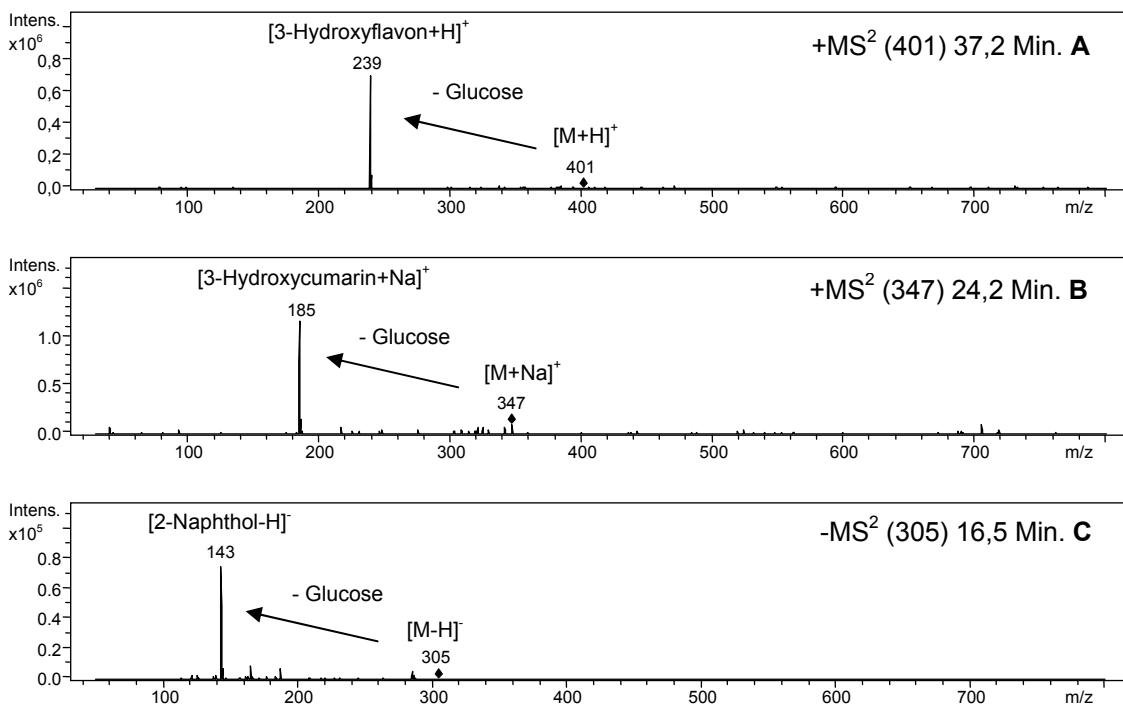
Bereich und damit deutlich niedriger als die bisher in dieser Arbeit bestimmten Konstanten.



**Abbildung 41:** Kinetische Parameter für ausgesuchte Substrate der FaGT6 und FaGT7. **A** Sättigungskurve für 3-Hydroxyflavon (FaGT6). Die Daten wurden bei konstanter UDP-D-Glucose Konzentration bei 35 °C und pH 7,5 (McIlvaine-Puffer) aufgenommen. Die graphische Auswertung erfolgte mit der Software SigmaPlot. **B** Die aus den Sättigungskurven ermittelten kinetischen Parameter für 3-Hydroxyflavon (FaGT6), Isorhamnetin (FaGT7) und UDP-D-Glucose. Der Wert für UDP-D-Glucose wurde bei FaGT6 bei konstanter 3-Hydroxyflavon Konzentration ermittelt. Bei FaGT7 wurde 3-Hydroxycumarin als Substrat verwendet.

### 2.5.3 Glucosylierung von Xenobiotika in planta

Sowohl FaGT6 als auch FaGT7 sind *in vitro* multifunktionelle Glycosyltransferasen, die nicht natürliche (Naphthole) und nicht in der Erdbeerfrucht vorkommende (Hydroxycumarine und einige Flavonoide) Substrate akzeptieren. Um zu zeigen, dass diese Verbindungen auch *in planta* glucosyliert werden, wurden 10 mM Lösungen von 3-Hydroxyflavon, 3-Hydroxycumarin und 2-Naphthol in reife Erdbeerfrüchte injiziert. Nach einem Tag wurden die Früchte geerntet und mit Flüssigchromatographie-Elektrospray-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS) analysiert. Als Kontrollen wurden Lösungen ohne Substrate injiziert. In keiner der Negativkontrollen ist eines der drei Substrate oder der betreffenden Glucoside nachgewiesen worden. Dagegen konnte in allen Erdbeeren, in die eines der drei Substrate injiziert wurde, das betreffende Glucosid detektiert werden. Die MS<sup>2</sup>-Spektren (Abb. 42) bestätigten, dass die jeweiligen Substrate auch *in vivo* zu den betreffenden Glucosiden umgesetzt wurden. In allen Fällen wurde die Abspaltung des Zuckers in MS<sup>2</sup>-Experimenten nachgewiesen. Damit konnte gezeigt werden, dass die Glycosyltransferasen der Erdbeerfrucht auch *in planta* die injizierten Xenobiotika glucosylieren können.



**Abbildung 42:** Nachweis der Glucosylierung von Xenobiotika *in planta*. In reife Erdbeerfrüchte wurden 10 mM Lösungen von 3-Hydroxyflavon (A), 3-Hydroxycumarin (B) und 2-Naphthol (C) injiziert. Nach einem Tag wurden die Früchte geerntet und die betreffenden Glucoside mit LC-ESI-MS nachgewiesen. **A**  $MS^2$ -Spektrum des gebildeten 3-Hydroxyflavonglucosids. **B**  $MS^2$ -Spektrum des gebildeten 3-Hydroxycumaringlucosids ( $Na^+$ -Addukt). **C**  $MS^2$ -Spektrum des gebildeten 2-Naphtholglucosids.

### 3 DISKUSSION

#### 3.1 *Fragaria x ananassa* Glycosyltransferase 1 (FaGT1)

##### 3.1.1 Sequenz und phylogenetische Analyse

Bei FaGT1 handelt es sich um ein Enzym mit 466 Aminosäuren, das von einem offenen Leserahmen mit 1401 bp codiert wird. Die höchste Ähnlichkeit besteht zur VvGT1 aus *Vitis vinifera*, die bevorzugt Anthocyanidine *in vitro* glycosyliert und *in vivo* wahrscheinlich an der Biosynthese der Anthocyane beteiligt ist (Ford et al., 1998). Auch alle anderen Enzyme dieses sehr homogenen Clusters katalysieren regiospezifisch die Glycosylierung der Hydroxygruppe 3 der Flavonoide. Durch die biochemische Charakterisierung konnte dies auch für FaGT1 bestätigt werden, die *in vitro* Anthocyanidin- und Flavonol-3-glucoside bildet.

Die genomische Sequenz von *FaGT1* enthält ein kurzes Intron von 166 bp. Übereinstimmend damit weisen auch alle *Arabidopsis thaliana* Glycosyltransferasen der Gruppe F an vergleichbarer Stelle Intron 2 auf (Li et al., 2001). Es scheint also auch im Auftreten von Introns gewisse Übereinstimmungen zwischen *A. thaliana* und *F. x ananassa* zu geben, die bei der Interpretation der phylogenetischen Analyse berücksichtigt werden können.

##### 3.1.2 Genexpressionsprofile

###### 3.1.2.1 Reifekorrelierte Expression und hormonelle Kontrolle

*FaGT1* wird reifekorreliert exprimiert und weist die höchsten Transkriptmengen im Blütenboden reifer roter Früchte auf. Dieser Anstieg der Genexpression verläuft parallel zur Akkumulation der Anthocyane während der Fruchtreifung (Given et al., 1988b). Es wurde gezeigt, dass Anthocyane in grünen und weißen Früchten praktisch nicht nachweisbar sind und dass ihre Konzentration in pinkfarbenen und roten Früchten sprunghaft ansteigt. Auch die Genexpression in den Achänen, in denen ebenfalls Anthocyane nachgewiesen wurden (Aaby et al., 2005; Yoshida und Tamura, 2005), steigt während der Reifung an.

Das Genexpressionsprofil der *FaGT1* stimmt mit früheren Ergebnissen von Manning (1998) überein, der die Expression einer unvollständigen Glycosyltransferase-Sequenz mit hoher Ähnlichkeit zu *FaGT1* mit *Northern Blots* untersucht hat. Er konnte zeigen, dass das entsprechende Transkript nur in pinkfarbenen und roten, nicht aber in grünen oder weißen Erdbeerfrüchten nach-

weisbar ist. Im Gegensatz dazu wiesen andere Flavonoid-Biosynthesegene mehrere Maxima in der Genexpression auf.

Die Expression der *FaGT1* steht unter der negativen Kontrolle durch das Pflanzenhormon Auxin. Dies wurde bereits für viele andere reifekorrelierte Gene der Erdbeerfrucht beschrieben (Manning, 1998; Aharoni et al., 2002). Auch die Reifung der nicht-klimakterischen Früchte von *Vitis vinifera* wird durch ein synthetisches Auxin um etwa zwei Wochen verzögert (Davies et al., 1997). Die Expression der *VvGT1* wurde in diesen Versuchen vier Wochen später als in den Kontrollfrüchten detektiert. Ebenso setzte die Expression der Chalcon-Synthase (*CHS*) später ein und insgesamt war der Gehalt an Anthocyanen in reifen Trauben auf 47 % (bezogen auf die Kontrollfrüchte) erniedrigt.

### 3.1.2.2 Bedeutung der FaGT1 in der Flavonoid-Biosynthese

Parallel zur Akkumulation der Anthocyane wurde bereits früh ein Anstieg der Flavonoid-3-glucosyltransferase-Aktivität festgestellt, der mit Malvidin als Substrat bestimmt wurde (Given et al., 1988b). Dieses Aktivitätsmuster stimmt mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Expressionsprofil der *FaGT1* überein. Im Gegensatz zu den Anthocyanen liegen die höchsten Gehalte an Phenolen und Flavonoiden ohne Tannine in Erdbeerfrüchten der frühen Entwicklungsstadien vor (Cheng und Breen, 1991; Wang und Lin, 2000). Dies stimmt mit unveröffentlichten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe überein, die niedrigere Gesamtflavonol-Gehalte in roten als in grünen Früchten ergeben haben. Die Aktivität der Flavonoid-3-glucosyltransferase weist zwei Maxima während der Fruchtreifung auf, wenn ihre Aktivität mit dem Flavonol Quercetin bestimmt wird (Halbwirth et al., 2006).

Die beiden Aktivitätsmaxima der Flavonoid-3-glucosyltransferase-Aktivität müssen durch mindestens zwei verschiedene Enzyme verursacht werden. *FaGT1* wird nicht in grünen Früchten exprimiert und in den frühen Entwicklungsstadien konnte auch keine Anthocyanidin-3-glucosyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden (Given et al., 1988b). Somit muss mindestens eine weitere Glycosyltransferase vorhanden sein, die in frühen Stadien für die Glucosylierung von Quercetin und anderen Flavonoiden verantwortlich ist. Dagegen trägt *FaGT1* zumindest teilweise zu dem zweiten beobachteten Maximum bei, da das Enzym *in vitro* sowohl Anthocyanidine als auch Flavonole wie Quercetin akzeptiert.

Die in der Literatur berichteten Aktivitäts- und Transkriptmuster deuten auf eine mögliche regulative Funktion der *FaGT1* hin. Viele wichtige Flavonoid-Biosynthesegene weisen zwei Maxima in der Genexpression auf (Manning, 1998; Moyano et al., 1998). Übereinstimmend dazu wurden auch für viele der entsprechenden Enzyme zwei Aktivitätsmaxima detektiert (Halbwirth et al., 2006). Transkripte von *FaGT1* werden dagegen nur in späten Entwicklungsstadien detektiert und die entsprechende Anthocyanidin-3-glucosyltransferase-Aktivität weist einen dem Anthocyan-Gehalt parallelen Verlauf auf (Given et al., 1988b). *FaGT1* könnte also eine entscheidende Rolle in der Umleitung der Flavonoid-Biosynthese in Richtung der farbgebenden Anthocyane spielen.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Anthocyan-Biosynthese in *Vitis vinifera* erhalten. In Shiraz-Trauben beginnt die Anthocyan-Akkumulation 10 Wochen nach der Blüte und dauert während der gesamten Fruchtreifung an (Boss et al., 1996a). Sechs Anthocyan-Biosynthesegene wurden bis zu vier Wochen nach der Blüte in den Traubenschalen exprimiert. Transkripte von *VvGT1* sind dagegen nur nach Beginn der Reifephase (10 Wochen nach der Blüte) festgestellt worden. *VvGT1* scheint also unabhängig von den anderen Anthocyan-Biosynthesegenen reguliert zu werden und könnte ein wichtiger Kontrollpunkt der Anthocyan-Biosynthese in Trauben sein. Des Weiteren wurde die Expression von *VvGT1* nur in den Schalen roter Trauben festgestellt, während Transkripte anderer Biosynthesegene auch in weißen Trauben und Anthocyan-freien Geweben detektiert wurden (Boss et al., 1996b).

### 3.1.3 Biochemische Charakterisierung

#### 3.1.3.1 Substrat- und Regiospezifität

Rekombinante *FaGT1* überträgt *in vitro* ein aktiviertes Molekül D-Glucose von UDP-D-Glucose auf verschiedene Anthocyanidine und Flavonole. Es wurden alle Anthocyanidine und mit Ausnahme von Morin und 3-Hydroxyflavon auch alle getesteten Flavonole akzeptiert. Andere Flavonoide und Zuckerdonoren sind nicht umgesetzt worden. *VvGT1* aus *Vitis vinifera* zeigt ebenfalls mit Morin keine signifikante Aktivität (Ford et al., 1998). Dies könnte an der seltenen Hydroxygruppe an Position 2' liegen, die eine sterische Hinderung verursacht. Für eine erfolgreiche Glucosylierung muss das entsprechende Substrat so gebunden werden, dass die zu glucosylierende Hydroxygruppe in enge räumliche Nähe zu His-20 kommt (Offen et al., 2006). Dies könnte durch die

Hydroxygruppe an Position 2' deutlich erschwert (VvGT1) oder vollständig verhindert (FaGT1) werden.

FaGT1 weist eine strikte Regiospezifität auf. Bei allen getesteten Substraten wurde nur die Bildung eines einzigen Produktes beobachtet, auch wenn die eingesetzten Verbindungen bis zu sechs Hydroxygruppen (Myricetin, Abb. 9) aufwiesen. Durch Vergleich mit den analytischen Daten von Referenzsubstanzen konnten Quercetin-3-glucosid, Kämpferol-3-glucosid und Pelargonidin-3-glucosid als Reaktionsprodukte identifiziert werden. Das mit Pelargonidin-3-glucosid übereinstimmende UV/Vis-Spektrum des Reaktionsprodukts beweist, dass FaGT1 *in vitro* den wichtigsten Farbstoff reifer Erdbeerfrüchte bilden kann.

### 3.1.3.2 Bevorzugte Substrate und kinetische Parameter

Interessanterweise gehören die Aglyca der in Erdbeerfrüchten vorkommenden Anthocyane *in vitro* zu den besten Substraten. Sowohl Cyanidin als auch Pelargonidin weisen sehr hohe Umsatzraten auf. Eine Substitution an Position 5' wie bei Delphinidin, Petunidin und Malvidin (Abb. 8) erniedrigt die Aktivität signifikant. Auch der Ersatz einer Hydroxygruppe durch eine Methoxygruppe scheint zu einer etwas geringeren Reaktivität zu führen. Offenbar behindert ein weiterer Substituent an Position 5' die effiziente Bindung der Hydroxygruppe 3 in enger Nähe zu der His-20 entsprechenden Aminosäure in der Akzeptorbindungsstelle der FaGT1. Dies korreliert mit dem Fehlen von Anthocyanen mit Substituenten an Position 5' in Erdbeerfrüchten (Bakker et al., 1994). Interessanterweise zeigt dagegen VvGT1 aus *V. vinifera* nur eine relativ geringe Aktivität mit Pelargonidin (Ford et al., 1998), einem nicht in der Traube vorkommenden Aglycon (Mazza und Miniati, 1993).

Die  $K_m$ -Werte von UDP-D-Glucose und Pelargonidin wurden mit 1,1 mM und 30  $\mu$ M bestimmt. Damit stimmen sie prinzipiell mit den in der Literatur berichteten Werten überein. Im Allgemeinen liegen die Werte für den Donor im oberen  $\mu$ M- oder unteren mM-Bereich (Vogt, 2000). Bei VvGT1 aus *V. vinifera* beträgt der  $K_m$ -Wert von UDP-D-Glucose 1,88 mM (Ford et al., 1998). Für den Akzeptor liegen die  $K_m$ -Werte in der Regel deutlich niedriger im unteren  $\mu$ M-Bereich (Vogt, 2000). Für Cyanidin wurde bei VvGT1 ein  $K_m$ -Wert von 30  $\mu$ M bestimmt (Ford et al., 1998).

### 3.1.4 RNAi-induzierte Herabregulation von *FaGT1*

#### 3.1.4.1 Bedeutung und Methodik

Das Genexpressionsprofil deutet zusammen mit den Ergebnissen der biochemischen Charakterisierung auf eine Beteiligung der *FaGT1* an der Glucosylierung der Anthocyanidine hin. Um diese potentielle Rolle der *FaGT1 in planta* zu bestätigen, sollte die Genexpression durch RNA-Interferenz (RNAi) unterdrückt werden.

Bisher wurden zwar zahlreiche Glycosyltransferasen *in vitro* biochemisch untersucht, aber eine funktionelle Charakterisierung *in planta* erfolgte nur in wenigen Fällen. Beispielsweise ist die Expression der *TOGT1* in Tabakpflanzen durch *antisense*-Technologie herabreguliert worden (Chong et al., 2002). Dies führte zu einer geringeren Konzentration an Scopolin und einer verminderten Resistenz gegen den Tabakmosaikvirus. In *Arabidopsis thaliana* wurden T-DNA *knock-out* Linien von Glycosyltransferasen auf Metabolitenebene untersucht (Jones et al., 2003). Dadurch konnte die Beteiligung von UGT73C6 und UGT78D1 an der Biosynthese von Flavonolglycosiden nachgewiesen werden. In Roter Beete führte die *antisense* Expression von *BvGT* zu erniedrigten Gehalten an Betanin, aber das entsprechende Protein wurde nicht biochemisch untersucht (Sepúlveda-Jiménez et al., 2005). Durch RNA-Interferenz wurde die Expression von *BnSGT1* in *Brassica napus* unterdrückt (Hüsken et al., 2005a). Die Samen transgener Pflanzen wiesen um bis zu 76 % reduzierte Gehalte an Sinapat-Estern auf.

Über die Herabregulation einer Anthocyanidin-3-glucosyltransferase wurde bisher noch nicht berichtet. Eine in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Methode, die auf der RNA-Interferenz Technologie basiert, wurde bereits erfolgreich zur Herabregulation der Chalcon-Synthase (*CHS*) in Erdbeerfrüchten eingesetzt (Hoffmann et al., 2006). Durch diese Methode sollte sich in Erdbeerfrüchten prinzipiell die Expression jedes reifekorrelierten Gens unterdrücken lassen.

#### 3.1.4.2 Phänotyp der injizierten Früchte

Die Genexpression der *FaGT1* konnte mittels RNA-Interferenz durch Verwendung von *intron-hairpin* (*ihp*)-Konstrukten wirksam unterdrückt werden. Allerdings wiesen die entsprechenden Früchte keinen besonders deutlichen Phänotyp auf. Obwohl der Gehalt an Anthocyanen signifikant erniedrigt war (2.2.3.4), veränderten sich Intensität und Farbton der Pigmentierung nur leicht.



Auch bei der stabilen Herabregulation der Chalcon-Synthase (*CHS*) in transgenen Erdbeerfrüchten wurde nicht in allen Linien ein sichtbarer Phänotyp beobachtet (Lunkenbein et al., 2006b). Nur in Früchten, die weniger als 25 % der ursprünglichen Transkriptmenge aufwiesen, war eine veränderte Pigmentierung zu erkennen. Obwohl in diesen Früchten der Gehalt des wichtigsten Farbstoffs Pelargonidin-3-glucosid auf 7,5 % reduziert war, zeigten die Früchte noch eine pink- bis orangefarbene Pigmentierung.

Für die Wahrnehmung der Farbe spielt nicht nur die Art und Menge der akkumulierten Anthocyane eine Rolle (Mol et al., 1998). Einen wichtigen Einfluss hat auch die Copigmentierung mit anderen Flavonoiden, die Anwesenheit von Metallionen, der pH-Wert der Vakuole und die Form der Zellen, die die Anthocyane akkumulieren.

Ein prinzipielles Problem bei der Herabregulation einer speziellen Glycosyltransferase stellt das Auftreten von Enzymen mit redundanter Funktion dar. Die hohe Anzahl der in *Arabidopsis thaliana* (Bowles, 2002), *Oryza sativa* (Ko et al., 2006) und *Medicago truncatula* (Achnine et al., 2005) gefundenen Glycosyltransferasen lässt es wahrscheinlich erscheinen, dass auch in Erdbeerfrüchten eine große Glycosyltransferase-Familie vorliegt. Diese Enzyme könnten teilweise die Funktion der FaGT1 übernehmen. In diesem Fall wäre es notwendig, mehrere Glycosyltransferasen gleichzeitig herabzuregulieren, um einen eindeutigen Phänotyp zu erhalten (Bowles et al., 2006).

#### 3.1.4.3 Funktionen von FaGT1 *in planta*

Die Früchte mit herabregulierter *FaGT1* Expression weisen signifikant erniedrigte Konzentrationen der auf Pelargonidin basierenden Anthocyane auf. Die Konzentration von Cyanidin-3-glucosid war zwar weniger deutlich erniedrigt, aber die Menge des entsprechenden malonylierten Derivats konnte durch Herabregulation der *FaGT1* deutlich gesenkt werden. Dies deutet darauf hin, dass *in planta* auch Cyanidin ein Substrat der FaGT1 ist. Damit konnte zum ersten Mal die Beteiligung einer Glycosyltransferase an der Biosynthese der Anthocyane *in planta* gezeigt werden.

Überraschenderweise war auch der Gehalt an Kämpferol-3-glucosid deutlich erniedrigt. Die biochemische Charakterisierung der FaGT1 hatte ergeben, dass Kämpferol und Quercetin *in vitro* deutlich schlechtere Substrate als die entsprechenden Anthocyanidine Pelargonidin und Cyanidin sind. Aufgrund ähnlicher

Daten wurde beispielsweise bei VvGT1 aus *Vitis vinifera* der Schluss gezogen, dass das Enzym *in planta* ausschließlich für die Glucosylierung von Anthocyanen zuständig ist (Ford et al., 1998). Unsere Ergebnisse zeigen dagegen, dass auf Grund der Substratspezifität und der relativen Aktivitäten *in vitro* keine Aussage über die Funktion eines Enzyms *in vivo* möglich ist. Interessanterweise haben bisher unveröffentlichte Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Konzentration von Kämpferol-3-glucosid im Gegensatz zu Quercetin-3-glucosid und den meisten anderen Flavonoiden (Cheng und Breen, 1991) reifekorreliert zunimmt. Diese Beobachtung bestätigt auch das Ergebnis der *in planta* Studie. Die Konzentration von Quercetin-3-glucosid wird durch Herabregulation der *FaGT1* nicht signifikant beeinflusst.

Interessanterweise wurden die Gehalte an Pelargonidin-3-glucosid-malonat und Cyanidin-3-glucosid-malonat ebenfalls deutlich erniedrigt. Achänen weisen deutlich höhere Gehalte an malonylierten Anthocyanen auf (Aaby et al., 2005; Yoshida und Tamura, 2005). Bei der verwendeten Aufreinigungsmethode bleiben die Achänen allerdings weitgehend intakt und es werden vorwiegend die Metabolite des Blütenbodens erfasst. Die Ergebnisse deuten aber darauf hin, dass zunächst das Anthocyanidin-Grundgerüst durch *FaGT1* glucosyliert und anschließend durch Malonsäure weiter modifiziert wird.

### **3.2 *Fragaria x ananassa* Glycosyltransferase 3 & 4 (FaGT3 & 4)**

#### **3.2.1 Sequenz und phylogenetische Analyse**

FaGT3 und FaGT4 sind Glycosyltransferasen mit jeweils 478 Aminosäuren, die von einem offenen Leserahmen mit 1437 bp codiert werden. FaGT3 ist Teil eines recht heterogenen Clusters. Die größte Ähnlichkeit besteht zu drei induzierbaren Glycosyltransferasen aus Tabak-Zellkulturen, die ein breites Spektrum an Substraten umsetzen. Außer UGT71B6 aus *Arabidopsis thaliana* akzeptieren alle Glycosyltransferasen dieser Gruppe *in vitro* Flavonole. Eine Vorhersage der Regiospezifität für FaGT3 ist nicht möglich, da die Enzyme des Clusters verschiedene Glycoside bilden.

FaGT4 bildet eine kleine Gruppe mit drei weiteren Glycosyltransferasen, die relativ stark von den anderen Enzymen abgegrenzt ist. Auch untereinander weisen die Glycosyltransferasen eine vergleichsweise niedrige Ähnlichkeit auf, was die Interpretation der phylogenetischen Analyse erschwert. Alle Enzyme dieser Gruppe akzeptieren Anthocyanidin-3-glucoside und bilden mit UDP-L-

Rhamnose oder UDP-D-Glucose entsprechende Sophoroside oder Rutinoside. Eine Vorhersage der Zuckerspezifität scheint aufgrund des phylogenetischen Baumes nicht möglich.

Die genomischen Sequenzen weisen in beiden Fällen in Übereinstimmung mit der Einordnung in den phylogenetischen Baum der Glycosyltransferasen aus *A. thaliana* keine Introns auf (Li et al., 2001).

### 3.2.2 Genexpressionsprofile

#### 3.2.2.1 Reifekorrelierte Expression und hormonelle Kontrolle

Sowohl *FaGT3* und *FaGT4* werden fruchtspezifisch und reifekorreliert exprimiert. Sie weisen die höchsten Transkriptmengen im Blütenboden reifer roter Früchte auf, unterscheiden sich allerdings in der Expression in pinkfarbenen Früchten, in denen *FaGT3* nur sehr gering exprimiert ist. Dies deutet trotz der reifekorrelierten Expression beider Gene auf eine unterschiedliche Kontrolle der Genexpression hin.

Die Expression von *FaGT4* steht unter negativer Kontrolle durch das Pflanzenhormon Auxin. Damit zeigt *FaGT4* ein ähnliches Expressionsmuster und die gleiche hormonelle Kontrolle wie *FaGT1* und viele andere reifekorrelierte Gene (Benítez-Burraco et al., 2003; Blanco-Portales et al., 2004; Lunkenbein et al., 2006a; Raab et al., 2006).

Die Expression der *FaGT3* wird zwar durch das Entfernen der Achänen induziert, aber nicht signifikant durch die Anwendung von Auxin beeinflusst. Es handelt sich also um ein reifekorreliertes Gen, das nicht durch Auxin kontrolliert wird. Auch die Zimtalkohol-Dehydrogenase (*CAD*) wird in Erdbeerfrüchten reifekorreliert exprimiert und durch das Entfernen der Achänen induziert (Blanco-Portales et al., 2002). Die Expression von *CAD* wird ebenfalls nicht durch Auxin beeinflusst. Auch ein Expansin-Gen aus Erdbeerfrüchten weist ein reifekorreliertes Expressionsmuster auf, wird aber weder durch das Entfernen der Achänen noch durch die Applikation von Auxin beeinflusst (Civello et al., 1999). Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von Microarray-Experimenten überein, die gezeigt haben, dass 60 % der reifekorrelierten Gene nicht durch Auxin kontrolliert werden (Aharoni et al., 2002). Das heißt, es muss während der Erdbeerfruchtreifung noch andere, Auxin-unabhängige Regulationsmechanismen geben.

### 3.2.2.2 Wundinduzierte Expression

Der beim Entfernen der Achänen beobachtete Anstieg der Expression von *FaGT3* könnte durch eine Verwundung des Blütenbodens mit dem Skalpell verursacht werden. Es wurde bereits berichtet, dass eine Flavonoid-7-glycosyltransferase aus *Scutellaria baicalensis* durch Verwundung und Behandlung mit Salicylsäure induziert werden kann (Hirotsu et al., 2000). Auch das *Tw1*-Gen aus Tomate wird durch Verwundung und Salicylsäure induziert und weist eine hohe Homologie zu Glycosyltransferasen auf (O'Donnell et al., 1998). Allerdings findet die Induktion der Genexpression in beiden Fällen innerhalb weniger Stunden statt und fällt anschließend wieder ab. Dagegen konnte nach mechanischer Beschädigung von *Beta vulgaris* Blättern auch nach vier Tagen noch eine deutliche und nach 5 Tagen noch eine leichte Induktion der Genexpression von *BvGT* nachgewiesen werden (Sepúlveda-Jiménez et al., 2005). Das entsprechende Gen weist eine hohe Ähnlichkeit zu Glycosyltransferasen auf und ist wahrscheinlich an der Biosynthese der Betacyane beteiligt. Prinzipiell ist es auch nicht auszuschließen, dass die Achänen noch ein weiteres Pflanzenhormon in den Blütenboden sekretieren, welches die Expression von *FaGT3* kontrolliert.

### 3.2.3 Heterologe Expression

#### 3.2.3.1 Probleme bei der heterologen Expression in *Escherichia coli*

Beide Glycosyltransferasen konnten in löslicher Form in *E. coli* exprimiert werden, wie durch einen *Western Blot* mit Anti-His Antikörper gezeigt wurde. Allerdings konnte weder für *FaGT3* noch für *FaGT4* enzymatische Aktivität nachgewiesen werden.

Dies kann im Wesentlichen auf zwei Ursachen beruhen. Entweder wurden die Enzyme nicht in aktiver Form exprimiert oder sie wurden unter falschen Bedingungen, insbesondere mit den falschen Substraten getestet. Es ist nicht unüblich, dass überexprimierte rekombinante Proteine in *E. coli* nicht die richtige Konformation erlangen oder durch Stress ihre aktive Struktur wieder verlieren (Baneyx und Mujacic, 2004). Bakterien wie *E. coli* können zudem nicht alle post-translationalen Modifikationen durchführen, die für eine richtige Faltung benötigt werden. Auch die Ausbildung von Disulfidbrücken ist im reduzierenden Cytoplasma von *E. coli* schwer möglich. Die unterschiedliche zelluläre Umgebung und die verschiedenen Mechanismen der Proteinfaltung in

Prokaryonten und Eukaryonten führen deshalb oft dazu, dass rekombinante Proteine nicht in biologisch aktiver Form exprimiert werden können.

### 3.2.3.2 Mögliche Akzeptor-Substrate und Zucker-Donoren

Aufgrund der phylogenetischen Analyse wurde FaGT3 mit UDP-D-Glucose und verschiedenen Flavonolen getestet. In der Regel ist die Vorhersage der Akzeptorspezifität aufgrund eines phylogenetischen Baumes relativ zuverlässig. Wie UGT71B6, eine Abscisinsäure-glucosyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* zeigt, kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne Enzyme eines Clusters eine vollständig andere Spezifität aufweisen (Lim et al., 2005b).

Die phylogenetische Analyse deutet darauf hin, dass FaGT4 *in vitro* Anthocyanidin-3-glucoside akzeptiert. Dies würde mit der beobachteten Genexpression korrelieren, da die Konzentration der Anthocyane parallel zur Transkriptmenge der *FaGT4* ansteigt (Given et al., 1988b). Die Genexpression der *FaGT4* wird wie bei der an der Glucosylierung der Anthocyanidine beteiligten *FaGT1* durch das Pflanzenhormon Auxin unterdrückt. Die phylogenetische Analyse wird also durch das beschriebene Expressionsprofil bestätigt. Allerdings konnte mit UDP-D-Glucose und Pelargonidin-3-glucosid keine Aktivität nachgewiesen werden. Als potentieller Zuckerdonor käme UDP-L-Rhamnose in Frage, da Pelargonidin-3-rutinosid in einigen Varietäten in nicht unerheblichen Mengen in der Erdbeerfrucht gefunden wird (Bakker et al., 1994).

Die Vorhersage der Zuckerspezifität einer Glycosyltransferase gestaltet sich sehr schwierig. Bereits die Mutation einer einzigen Aminosäure verändert die Spezifität für den Zuckerdonor (Kubo et al., 2004). Die letzte Aminosäure der PSPG-Box ist in Glucosyltransferasen (Gln) und Galactosyltransferasen (His) hochkonserviert. Durch den Ersatz von Histidin durch Glutamin konnte eine Galactosyltransferase aus *Aralia cordata* Glucosyltransferase-Aktivität erwerben. Allerdings konnte eine Glucosyltransferase aus *Scutellaria baicalensis* durch den Ersatz von Glutamin durch Histidin keine Galactosyltransferase-Aktivität erlangen.

Die Kristallstruktur der UGT71G1 aus *Medicago truncatula* bestätigte, dass die beiden letzten Aminosäuren der PSPG-Box (Glu-381 und Gln-382) eine wichtige Rolle bei der Bindung des Zuckerdonors spielen (Shao et al., 2005). Die ebenfalls kristallisierte VvGT1 aus *Vitis vinifera* beweist, dass Glu-381 durch

Aspartat ersetzt werden kann, ohne dass sich die Präferenz des Enzyms für UDP-D-Glucose ändert (Offen et al., 2006).

Durch die Aufklärung der Kristallstruktur der VvGT1 konnte auch gezeigt werden, dass Thr-141 mit dem Sauerstoff der Hydroxygruppe 6 der UDP-D-Glucose Wechselwirkungen eingeht (Offen et al., 2006). In UGT78D1 aus *A. thaliana* ist Thr-141 durch Alanin ersetzt. Das entsprechende Enzym kann auch UDP-L-Rhamnose, einen 6-Desoxyzucker, effektiv umsetzen (Jones et al., 2003). Beide Ergebnisse weisen darauf hin, dass Thr-141 eine entscheidende Rolle für die Zuckerspezifität spielt.

In FaGT3 sind sowohl die Aminosäuren am Ende der PSPG-Box (Glu und Gln) und die Thr-141 entsprechende Aminosäure konserviert (vgl. 2.1.6). Es gibt also keinen Hinweis, dass FaGT3 andere Zucker als UDP-D-Glucose bevorzugen könnte. Dies kann andererseits aber auch nicht ausgeschlossen werden, da die Ursachen der Zuckerspezifität erst ansatzweise verstanden werden.

In FaGT4 sind ebenfalls die letzten beiden Aminosäuren der PSPG-Box (Asp und Gln) konserviert und unterscheiden sich nicht von VvGT1 oder FaGT1 (vgl. 2.1.6). Dagegen ist die Thr-141 entsprechende Aminosäure nicht konserviert, sondern durch Isoleucin ersetzt. Allerdings weisen auch FaGT5 und FaGT7 an dieser Stelle kein Threonin auf, obwohl sie *in vitro* UDP-D-Glucose akzeptieren. Das *Alignment* der verschiedenen Glycosyltransferasen ist am N-Terminus aufgrund der geringen Sequenzhomologien in diesem Bereich nicht besonders zuverlässig und es ist möglich, dass einer der in unmittelbarer Nachbarschaft liegenden Threonin-Reste von FaGT5 und FaGT7 diese Funktion übernehmen kann. FaGT4 ist die einzige der untersuchten Glycosyltransferasen, die an dieser oder einer benachbarten Stelle kein Threonin aufweist. Dies könnte darauf hindeuten, dass FaGT4 Zuckerdonoren ohne Hydroxygruppe an Position 6 (z. B. L-Rhamnose) bevorzugt.

In Erdbeerfrüchten wurden bisher nur relativ selten Anthocyanidin-diglycoside berichtet. In der Sorte Camarosa wurde ein nicht näher identifiziertes Pelargonidin-diglucosid gefunden (Lopes-da-Silva et al., 2002). Pelargonidin-3-rutinosid wurde in verschiedenen Sorten, bisher aber nicht in der Varietät Elsanta nachgewiesen (Bakker et al., 1994). Da UDP-L-Rhamnose kommerziell nicht erhältlich ist, wurde *in vitro* nur UDP-D-Glucose als Zuckerdonor getestet. Möglicherweise ist also UDP-L-Rhamnose oder ein anderer aktivierter Zucker das eigentliche Substrat der FaGT4.

### 3.3 *Fragaria x ananassa* Glycosyltransferase 5 (FaGT5)

#### 3.3.1 Sequenz und phylogenetische Analyse

FaGT5 wird von einem offenen Leserahmen mit 1428 bp codiert und ist ein Protein mit 475 Aminosäuren. Die höchste Ähnlichkeit besteht zu Enzymen, die *in vitro* Glucose-Ester von Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren bilden. Dazu gehören vor allem Glycosyltransferasen aus *Arabidopsis thaliana*, aber auch ein Enzym aus *Brassica napus* und FaGT2. Auch diese phylogenetische Einordnung konnte durch die biochemische Charakterisierung bestätigt werden. Übereinstimmend mit der Tatsache, dass FaGT5 *in vitro* Glucose-Ester bildet, wird FaGT5 in Gruppe L der *A. thaliana* Glycosyltransferasen eingeordnet. Bisher wurden alle Glucose-Ester bildenden Glycosyltransferasen in dieses Cluster gruppiert (Bowles, 2002).

Die genomische Sequenz von *FaGT5* weist ein Intron von 164 bp auf. Alle Sequenzen in Gruppe L der *A. thaliana* Glycosyltransferasen sind von einem Verlust des häufig auftretenden Introns 2 gekennzeichnet (Li et al., 2001). Die Position des *FaGT5*-Introns und die Tatsache, dass es sich zwischen zwei Codons (Phase 0) befindet, deuten darauf hin, dass es sich um das *A. thaliana* Intron 3 entsprechende Intron handelt. Ein Teil der Glycosyltransferasen in Gruppe L ist ebenfalls durch das Vorhandensein von Intron 3 gekennzeichnet.

#### 3.3.2 Genexpressionsprofile

*FaGT5* wird vor allem fruchtspezifisch in den späten Reifungsphasen exprimiert und erreicht den höchsten Wert in roten Früchten. Dieses Expressionsmuster ähnelt stark dem bei *FaGT2* beobachteten Verlauf (Lunkenbein et al., 2006a). Die Expression von *FaGT5* weist zudem eine positive Korrelation mit den Konzentrationen von Zimtsäure-, *p*-Cumarsäure- und Kaffeesäureglucose-Ester während der Fruchtreifung auf.

Die Genexpression steht unter negativer Kontrolle durch das Pflanzenhormon Auxin. Wie bei *FaGT2* lässt sich die Genexpression der *FaGT5* durch das Entfernen der Achänen induzieren und durch Anwendung von 1-Naphthalinessigsäure (NAA) wieder unterdrücken (Lunkenbein et al., 2006a). Die Genexpressionsdaten und die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung deuten darauf hin, dass FaGT5 *in planta* eine ähnliche Funktion wie FaGT2 übernehmen könnte.

### 3.3.3 Biochemische Charakterisierung

#### 3.3.3.1 Aufreinigung des GST-Fusionsproteins

FaGT5 wurde nicht wie die bisher diskutierten Glycosyltransferasen mit einem His-Tag sondern als GST-Fusionsprotein exprimiert. Dadurch konnte eine wesentlich bessere Aufreinigung erreicht werden. Bereits durch einen chromatographischen Schritt wurde FaGT5 erfolgreich aufgereinigt. Gelelektrophoretisch konnte im Eluat nur noch das Fusionsprotein und abgespaltene GST nachgewiesen werden. Dies wird durch die hohe Affinität von GST und Glutathion bedingt, die eine spezifische Bindung des Fusionsproteins während der Aufreinigung ermöglicht. Bei der Affinitätschromatographie mit His-getaggen Proteinen werden dagegen auch andere Histidin-reiche Proteine gebunden und isoliert.

#### 3.3.3.2 Substratspezifität und Identifizierung der Reaktionsprodukte

Rekombinante FaGT5 akzeptiert *in vitro* Zimtsäure, Benzoessäure und eine Reihe von hydroxylierten und methoxylierten Derivaten. Ähnlich wie bei FaGT2 konnte mit Salicylsäure keine Aktivität festgestellt werden (Lunkenbein et al., 2006a). Obwohl in *Arabidopsis thaliana* insgesamt 14 Enzyme identifiziert wurden, die Benzoate umsetzen, akzeptierten davon nur zwei bevorzugt Salicylsäure (Lim et al., 2002). Die Glucosylierung dieses wichtigen Signalmoleküls scheint also strenger kontrolliert zu sein als die der übrigen Benzoate. Deshalb ist es nicht überraschend, dass weder FaGT2 noch FaGT5 Salicylsäure glucosylieren. Dagegen wurde *o*-Cumarsäure, welche kein Substrat der FaGT2 ist, von FaGT5 umgesetzt (Lunkenbein et al., 2006a).

Da Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoessäuren sowohl an der Hydroxy- als auch an der Säuregruppe glucosyliert werden können, wurde die Reaktion von Kaffeesäure mit UDP-D-Glucose näher betrachtet. Im Gegensatz zur Salicylsäure-glucosyltransferase aus Tabak wird nur ein Produkt gebildet (Lee und Raskin, 1999). Durch alkalische Hydrolyse konnte gezeigt werden, dass Kaffeesäureglucose-Ester und nicht das entsprechende Glucosid entsteht. Dies hat wichtige Konsequenzen für die funktionelle Bedeutung der FaGT5. Im Gegensatz zu Glucosiden sind Glucose-Ester von Hydroxyzimtsäuren energiereiche Verbindungen mit einem hohen Gruppenübertragungspotential (Mock und Strack, 1993). Auch FaGT2 bildet energiereiche Glucose-Ester, die als Vorstu-



fen für verschiedene Sekundärmetabolite betrachtet werden (Lunkenbein et al., 2006a).

Interessanterweise wurde auch eine geringe Nebenaktivität mit Quercetin, Kämpferol, 7-Hydroxyflavon und 7-Hydroxycumarin festgestellt. Aus Quercetin entstanden zwei Produkte, die über Referenzverbindungen als Quercetin-3-glucosid und Quercetin-4'-glucosid identifiziert werden konnten. FaGT5 ist also in der Lage mit Flavonolen die Bildung von Glucosiden und mit phenolischen Säuren die Entstehung von Glucose-Estern zu katalysieren. Ein ähnliches Verhalten war bereits bei einer induzierbaren Glycosyltransferase aus Tabak beobachtet worden, die Zimtsäure und Hydroxycumarine *in vitro* umsetzt (Fraissinet-Tachet et al., 1998).

### 3.3.3.3 Bevorzugte Substrate und kinetische Parameter

Hydroxyzimtsäuren sind insgesamt bessere Substrate der FaGT5 als Hydroxybenzoesäuren. Für beide Gruppen nahm die Aktivität beim Vorhandensein einer Hydroxygruppe von der *ortho*- über die *meta*- zur *para*-Stellung hin zu. Die Hydroxygruppe in *ortho*-Position scheint somit eine sterische Hinderung bei der Glucosylierung der benachbarten Säuregruppe darzustellen. Dies führt bei Salicylsäure zu einem vollkommenen Verlust der Aktivität. Die räumlich etwas weiter entfernte Säuregruppe von *o*-Cumarsäure wird zwar noch glucosyliert, aber mit geringerer Aktivität als Zimtsäure selbst.

Sowohl bei den Hydroxybenzoe- als auch bei den Hydroxyzimtsäuren weist FaGT5 mit Substraten mit Hydroxy- oder Methoxygruppen in *meta*- und *para*-Stellung die besten Aktivitäten auf. Die höchsten Umsatzraten wurden mit Kaffeesäure, Ferulasäure, Sinapinsäure und Vanillinsäure erzielt. Auch das Aglycon des in Erdbeerfrüchten dominierenden *p*-Cumarsäureglucose-Esters wurde bevorzugt umgesetzt. Die Glucose-Ester von Sinapin-, Ferula- und Kaffeesäure wurden in Erdbeerfrüchten bereits nachgewiesen (Herrmann, 1989; Lunkenbein et al., 2006a).

Die festgestellten  $K_m$ -Werte sind mit 101  $\mu\text{M}$  für Kaffeesäure und 77  $\mu\text{M}$  für Ferulasäure deutlich niedriger als für die gleichen Verbindungen mit FaGT2 (708  $\mu\text{M}$  bzw. 359  $\mu\text{M}$ ). Auch die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten waren mindestens doppelt so hoch wie für FaGT2 (Lunkenbein et al., 2006a). FaGT5 weist *in vitro* also eine höhere katalytische Wirksamkeit für diese beiden Substrate auf. Dies wird auch durch den Vergleich der  $K_{cat}/K_m$ -Werte deutlich. Mög-

licherweise trifft dies auch auf andere Hydroxyzimtsäuren zu, die mit vergleichbaren relativen Aktivitäten umgesetzt werden.

### 3.3.4 Mögliche Funktionen in planta

#### 3.3.4.1 Potentielle Substrate in planta

Die Herabregulation von *FaGT2* in transgenen *antisense* Linien führte zu um bis zu 75 % erniedrigten Gehalten an Zimtsäureglucose-Ester (Lunkenbein et al., 2006a). Auch der Gehalt an *p*-Cumarsäureglucose-Ester war um etwa 50 % erniedrigt. Die Konzentrationen der anderen, reifekorrelierten und nicht-reifekorrelierten Hydroxyzimtsäureglucose-Ester waren in den transgenen Erdbeerfrüchten dagegen nicht signifikant vermindert. Wie die biochemische Charakterisierung, die Genexpressionsanalyse und die phylogenetische Untersuchung ergeben haben, ist es wahrscheinlich, dass *FaGT5* und *FaGT2* in planta ähnliche Funktionen übernehmen. Die gleichzeitige reifekorrelierte Expression von *FaGT5* könnte erklären, warum der Gehalt an *p*-Cumarsäureglucose-Ester weniger deutlich als der von Zimtsäureglucose-Ester in den *FaGT2 anti-sense* Linien erniedrigt war. *FaGT5* könnte *in vivo* auch für die Bildung des reifekorreliert auftretenden Kaffeesäureglucose-Esters verantwortlich sein. Sowohl *p*-Cumarsäure als auch Kaffeesäure zählen *in vitro* zu den besten Substraten der *FaGT5*. Die Glucose-Ester von Ferula-, Sinapin- und *p*-Hydroxybenzoesäure werden zwar nicht reifekorreliert akkumuliert, aber *FaGT5* könnte zumindest teilweise an der Biosynthese in späten Phasen der Fruchtreifung beteiligt sein. Dies wird durch die hohen relativen Aktivitäten der *FaGT5* gegenüber Sinapinsäure und Ferulasäure gestützt. Die Funktion der *FaGT5* lässt sich aber nur durch die Herabregulation oder Überexpression des entsprechenden Gens in planta gesichert analysieren.

#### 3.3.4.2 Bedeutung der aktivierten Glucose-Ester

Es ist großteils unbekannt, für welche Sekundärmetabolite die Glucose-Ester der Hydroxyzimtsäuren Vorstufen sind. Aus *Physalis peruviana* wurde eine Acyltransferase isoliert, welche die Übertragung energiereicher Zimtsäureglucose-Ester auf kurzkettige Alkohole katalysiert (Latza und Berger, 1997). Die dadurch gebildeten Aromastoffe Zimtsäuremethylester und Zimtsäureethylester wurden bereits in Erdbeerfrüchten nachgewiesen (Schreier, 1980; Gomes da Silva und Chaves das Neves, 1999). Auch Benzoessäureethylester ist ein Be-

standteil des Erdbeeraromas. Allerdings zählen Benzoessäure und Zimtsäure *in vitro* nicht zu den bevorzugten Substraten der FaGT5.

Auch aus *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus* wurden Glycosyltransferasen kloniert, die Glucose-Ester von Hydroxyzimtsäuren bilden (Milkowski et al., 2000 und 2004; Lim et al., 2001). In *A. thaliana* führt der Phenylpropanoidweg zur Produktion von Sinapat-Estern, die als UV-Schutzstoffe diskutiert werden. In Blättern wird vor allem Sinapoylmalat und in Samen Sinapoylcholin akkumuliert. Der energiereiche Sinapinsäureglucose-Ester dient als direkte Vorstufe für die Biosynthese beider Verbindungen und wird durch das Enzym SNG1 in Sinapoylmalat umgewandelt (Lehfeldt et al., 2000). Allerdings ist dieser Biosyntheseweg nach jetzigem Stand nur für die Familie der *Brassicaceae* von Bedeutung. Aber auch in Erdbeerfrüchten wurden kürzlich geringe Mengen Sinapinsäureglucose-Ester nachgewiesen (Lunkenbein et al., 2006a).

Zur Aufklärung der Funktion der Hydroxyzimtsäureglucose-Ester in der Erdbeerfrucht muss gleichzeitig die Expression von *FaGT2* und *FaGT5* herabreguliert werden. Nur dadurch können deutlich erniedrigte Konzentrationen an Hydroxyzimtsäureglucose-Estern erhalten werden, die möglicherweise zu eindeutigen Auswirkungen auf den Phänotyp der Erdbeerfrüchte führen. Allerdings könnte das Auftreten weiterer Enzyme mit redundanter Funktion diesen Ansatz erschweren (Bowles et al., 2006).

### **3.4 *Fragaria x ananassa* Glycosyltransferase 6 & 7 (FaGT6 & 7)**

#### **3.4.1 Sequenz und phylogenetische Analyse**

FaGT6 und FaGT7 sind Proteine mit 479 bzw. 487 Aminosäuren und werden von offenen Leserahmen mit 1440 und 1464 bp codiert. FaGT6 weist die höchste Ähnlichkeit zu FaGT3 und einer Reihe von multifunktionellen Glycosyltransferasen auf, die sowohl Flavonoide und Hydroxycumarine an verschiedenen Hydroxygruppen glycosylieren. FaGT7 wird in ein Cluster mit einigen Stress-induzierbaren Glycosyltransferasen aus Tabak, *Arabidopsis thaliana* und anderen Pflanzen eingeordnet, die *in vitro* ein ähnliches Substratspektrum aufweisen. In beiden Fällen ist eine Vorhersage der Regioselektivität aufgrund der phylogenetischen Analyse nicht möglich. Die biochemische Charakterisierung bestätigte aber, dass Flavonoide und Hydroxycumarine Substrate der multifunktionellen FaGT6 und FaGT7 sind. Es wurde bereits vermutet, dass sich die Stress-induzierbaren Glycosyltransferasen, zu denen auch FaGT6 und FaGT7

gehören, unabhängig von den ein eher homogenes Cluster bildenden Flavonoid-3-glycosyltransferasen entwickelt haben (Taguchi et al., 2001; Vogt, 2002). Eine relativ späte Entstehung dieser Glycosyltransferasen nach Aufspaltung der verschiedenen Arten würde auch die unterschiedlichen Regiospezifitäten in diesen Gruppen erklären (Gachon et al., 2005).

Die genomischen Sequenzen der *FaGT6* und *FaGT7* weisen keine Introns auf. Bei *FaGT6* stimmt dies mit dem Fehlen von Introns bei *FaGT3* und den anderen homologen Sequenzen aus *A. thaliana* überein (Li et al., 2001). Bei *FaGT7* wäre jedoch das Auftreten eines Introns zu erwarten, da fast alle Glycosyltransferasen aus Familie 73B Intron 7 aufweisen. Allerdings ist der evolutionär relativ späte Gewinn oder Verlust eines Introns nicht ungewöhnlich und tritt beispielsweise auch bei UGT73B3 aus der gleichen Familie auf.

### 3.4.2 Genexpressionsprofile

#### 3.4.2.1 Expression in Achänen und Blütenboden

*FaGT6* und *FaGT7* weisen ein vollkommen anderes Genexpressionsprofil als die bisher untersuchten Glycosyltransferasen auf. *FaGT6* wird deutlich stärker in den Achänen als im Blütenboden exprimiert. Die Transkriptmengen in den Achänen grüner und roter Früchte unterscheiden sich nicht signifikant. In einem Microarray-Experiment wurden 441 verschiedene Sequenzen identifiziert, die in Achänen und Blütenboden unterschiedlich exprimiert werden (Aharoni und O'Connell, 2002). Davon weisen überraschenderweise 259 Gene (59 %) eine höhere Expression in Achänen auf. Allerdings wurden bisher vor allem Gene des Blütenbodens beschrieben. *FaGT6* ist das erste biochemisch charakterisierte Enzym, das in grünen und roten Früchten stärker in den Achänen als im Blütenboden exprimiert wird.

Auch *FaGT7* wird stärker in den Achänen als im Blütenboden grüner Früchte exprimiert. Allerdings sinkt die Expression in den Achänen roter Früchte etwas ab. Die Unterschiede in den Transkriptmengen sind aber deutlich geringer als bei den anderen Glycosyltransferasen, die hauptsächlich im Blütenboden exprimiert werden. Damit übereinstimmend wurde bereits berichtet, dass die Genexpression in den Achänen weniger stark schwankt als im Blütenboden (Aharoni und O'Connell, 2002).

Im Blütenboden werden *FaGT6* und *FaGT7* schwach reifekorreliert exprimiert. Die Induktion der Genexpression ist allerdings um einige Größenordnungen

geringer als bei den anderen untersuchten Glycosyltransferasen. Das Muster der Genexpression ist bei beiden Glycosyltransferasen in Achänen und Blütenboden unterschiedlich. Dies stimmt damit überein, dass die Transkription in Achänen und Blütenboden unterschiedlich reguliert wird (Aharoni und O'Connell, 2002).

#### 3.4.2.2 Induktion der Genexpression

Die Genexpression von *FaGT6* und *FaGT7* wird im Blütenboden durch das Pflanzenhormon Auxin kontrolliert. Der Anstieg der Expression durch das Entfernen der Achänen fällt zwar etwas geringer als bei den anderen Glycosyltransferasen aus, kann aber durch die Applikation des synthetischen Auxins 1-Naphthalinessigsäure reprimiert werden.

Microarray-Experimente mit Erdbeierzellkulturen haben gezeigt, dass die Expression beider Gene durch Salicylsäure induziert wird (Mari Luz Bellido und Juan Munoz-Blanco, Persönliche Mitteilung). *FaGT6* weist einen 14-fachen und *FaGT7* einen 4-fachen Anstieg der Genexpression nach Behandlung mit 0,75 mM Salicylsäure auf. Salicylsäure ist ein wichtiges Signal für die Expression von Genen, die an pflanzlichen Abwehrmechanismen beteiligt sind (Reymond und Farmer, 1998). Auch viele Glycosyltransferasen denen eine Funktion in der Pflanzenabwehr zugeschrieben wird, werden durch Salicylsäure induziert. Dazu zählen UGT73C5, UGT73B3 und UGT73B5 aus *Arabidopsis thaliana*. Die beiden letztgenannten Enzyme werden Salicylsäure-abhängig nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv *tomato* induziert (Langlois-Meurinne et al., 2005). UGT73C5 glucosyliert das Mykotoxin Desoxynivalenol (DON) und trägt zur Resistenz gegen DON bei (Poppenberger et al., 2003). Auch in Tabak wurden Glycosyltransferasen identifiziert, die durch Salicylsäure induziert werden und vermutlich an der Pflanzenabwehr beteiligt sind (Horvath und Chua, 1996; Fraissinet-Tachet et al., 1998; Taguchi et al., 2001, 2003a und 2003b). Die Induktion der Genexpression durch Salicylsäure deutet auch für *FaGT6* und *FaGT7* eine Funktion in pflanzlichen Abwehrmechanismen an.

#### 3.4.3 Biochemische Charakterisierung

##### 3.4.3.1 Substratspezifität und Identifizierung der Reaktionsprodukte

Beide Glycosyltransferasen weisen *in vitro* ein breites Substratspektrum auf und akzeptieren Verbindungen aus chemisch relativ unterschiedlichen Gruppen.

Von beiden Glucosyltransferasen werden Flavonole, Flavone, Flavanone, Flavonolglucoside, Hydroxycumarine und Naphthole glucosyliert. Anthocyanidine werden nur von FaGT6 umgesetzt, allerdings akzeptiert das Enzym nur die nicht in der Erdbeerfrucht vorkommenden Aglyca Malvidin, Peonidin und Petunidin (Bakker et al., 1994). Hydroxyzimtsäuren, Hydroxybenzoesäuren und der wichtige Aromastoff 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3-(2H)-furanon (HDMF) werden von beiden Enzymen nicht umgesetzt. Bis auf einige Flavonole wurden die Substrate bisher nicht in Erdbeerfrüchten nachgewiesen. Bei den Naphtholen handelt es sich um nicht natürlich vorkommende Verbindungen. Als Zucker-Donor wurde nur UDP-D-Glucose, nicht aber UDP-D-Glucuronsäure oder UDP-D-Galactose akzeptiert.

FaGT6 bildet *in vitro* vor allem Quercetin-3-glucosid. Es konnten aber auch mehrere monoglucosylierte Nebenprodukte und zusätzlich die Bildung eines Diglucosids beobachtet werden. Das MS<sup>2</sup>-Spektrum deutet an, dass beide Glucose-Moleküle an verschiedenen Hydroxygruppen gebunden sind. FaGT7 bildet aus Quercetin zu etwa gleichen Teilen zwei verschiedene Monoglucoside, die durch Referenzverbindungen als Quercetin-3-glucosid und Quercetin-4'-glucosid identifiziert werden konnten. Die Ergebnisse des Substratscreenings hatten vermuten lassen, dass neben Quercetin-3-glucosid vor allem Quercetin-7-glucosid gebildet wird. Dies konnte aber durch Verwendung der drei Referenzverbindungen ausgeschlossen werden. Unter ähnlichen chromatographischen Bedingungen wurde die gleiche Elutionsreihenfolge (Quercetin-7-glucosid < Quercetin-3-glucosid < Quercetin-4'-glucosid) bereits von verschiedenen Autoren berichtet (Kramer et al., 2003; Lim et al., 2004; Isayenkova et al., 2006).

Mehrere Glycosyltransferasen können ihr Substrat an verschiedenen Hydroxygruppen glycosylieren. UGT73G1 aus *Allium cepa* akzeptiert eine Reihe von Flavonoiden und bildet aus Quercetin drei Monoglucoside, vor allem Quercetin-3-glucosid neben geringeren Mengen an Quercetin-4'-glucosid und Quercetin-7-glucosid (Kramer et al., 2003). Auch die Bildung von zwei Diglucosiden wurde beobachtet. Die Regiospezifität der Glycosyltransferasen aus *Arabidopsis thaliana* ist mit Quercetin detailliert untersucht worden (Lim et al., 2004). Keines der 29 Enzyme, die Quercetin akzeptieren, glucosyliert die Hydroxygruppe an Position 5. Eines der Enzyme (UGT88A1) bildet vier verschiedene Monoglucoside mit allen anderen Hydroxygruppen (3, 3', 4', 7). Auch die Bildung von Diglucosiden wurde beobachtet.

In *Oryza sativa* und *Beta vulgaris* sind Glycosyltransferasen beschrieben worden, deren Regiospezifität von der Hydroxylierung des B-Rings abhängt. UGT73A4 aus *B. vulgaris* bevorzugt die Position 4' und 7 der Flavonoide (Isayenkova et al., 2006). Befindet sich an Position 3' eine Hydroxygruppe (Quercetin, Myricetin u. a.), so wird bevorzugt 4'-glucosid gebildet. Bei fehlender 3'-Hydroxygruppe (Kämpferol, Chrysin u. a.) entstehen 7-glucoside. RUGT-5, die erste aus *O. sativa* isolierte Glycosyltransferase, akzeptiert die Hydroxygruppen 3, 4' und 7 Flavonoide (Ko et al., 2006). Die Anwesenheit der Hydroxygruppe 3' führt hier ebenfalls zur bevorzugten Bildung von 4'-glucosiden. Bei Abwesenheit der Hydroxygruppe an Position 3' werden vor allem 3-glucoside gebildet. Die 3'-Hydroxygruppe dirigiert also in beiden Fällen die Glucosylierung an den B-Ring.

#### 3.4.3.2 Bevorzugte Substrate und kinetische Parameter

Bei der Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde im Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit charakterisierten Glycosyltransferasen für FaGT6 ein leicht erhöhtes und für FaGT7 ein relativ stark erhöhtes Temperaturoptimum festgestellt (35 °C bzw. 45 °C). Eine multifunktionelle Glycosyltransferase aus *Rauvolfia serpentina* weist bei 50 °C maximale Reaktionsgeschwindigkeit auf (Hefner et al., 2002). Dies könnte ein Zeichen für den Erhalt der Aktivität unter Stressbedingungen sein, der für Stress-induzierte Glycosyltransferasen notwendig wäre.

Beide Glucosyltransferasen setzen *in vitro* bevorzugt Verbindungen um, die nicht in der Erdbeere vorkommen. Zu den besten Substraten zählen Galangin, Isorhamnetin und 3-Hydroxycumarin. FaGT6 weist auch eine sehr hohe Aktivität mit 3-Hydroxyflavon auf und besitzt auch eine überraschend hohe Umsatzrate mit 2-Naphthol. Die relativen Aktivitäten von FaGT6 und FaGT7 deuten darauf hin, dass die Funktion beider Enzyme nicht ausschließlich die Biosynthese von Sekundärmetaboliten ist. Es könnte sich vielmehr um Glycosyltransferasen handeln, die an der Glucosylierung von Xenobiotika beteiligt sind. Allerdings hat die Herabregulation der *FaGT1* gezeigt, dass auch Verbindungen, die *in vitro* eine vergleichsweise geringe relative Aktivität aufweisen, *in planta* Substrate der betreffenden Glycosyltransferase sein können.

Die  $K_m$ -Werte für 3-Hydroxyflavon (FaGT6) und Isorhamnetin (FaGT7) sind im unteren  $\mu\text{M}$ -Bereich und zeigen die hohe Affinität der beiden Enzyme zu diesen

Substraten, obwohl diese nicht in Erdbeerfrüchten vorkommen. Die  $K_m$ -Werte für UDP-D-Glucose liegen im gleichen Bereich wie bei den anderen untersuchten Glycosyltransferasen.

#### 3.4.4 Mögliche Funktionen in planta

##### 3.4.4.1 Biosynthese von Flavonolglucosiden

Das Hauptprodukt der enzymatischen Umsetzung von FaGT6 mit Quercetin ist das entsprechende 3-Glucosid. Kämpferol- und Quercetin-3-glucoside sind bekannte Sekundärmetabolite in Erdbeerfrüchten (Ryan, 1971; Henning, 1981). Das Genexpressionsprofil der *FaGT6* korreliert auch mit der hohen Konzentration phenolischer Verbindungen in grünen Früchten (Wang und Lin, 2000) und den im Vergleich zum Blütenboden höheren Konzentrationen phenolischer Verbindungen in den Achänen (Aaby et al., 2005). Dies würde eine Beteiligung von FaGT6 an der Biosynthese von Flavonol-3-glucosiden in den Achänen grüner Früchte plausibel machen.

FaGT7 bildet dagegen zu gleichen Teilen Quercetin-3-glucosid und Quercetin-4'-glucosid. Flavonol-4'-glucoside wurden bisher noch nicht in Erdbeerfrüchten nachgewiesen (Ryan, 1971; Henning, 1981). Dies schließt zunächst eine Beteiligung an der Biosynthese von Sekundärmetaboliten aus. Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen haben aber ergeben, dass die Position der Glucosylierung auch von den Hydroxygruppen am B-Ring abhängt (Isayenkova et al., 2006; Ko et al., 2006). Es wäre also möglich, dass FaGT7 mit Kämpferol (ohne Hydroxygruppe 3') nicht Kämpferol-4'-glucosid bildet, sondern das in Erdbeeren nachgewiesene Kämpferol-7-glucosid (Ryan, 1971). Es ist auch möglich, dass die Achänen bisher noch unbekannte Flavonolglycoside enthalten, da bei den meisten Extraktionsmethoden nur die Sekundärmetabolite des Blütenbodens erfasst werden und die Achänen intakt bleiben.

Auch in *Arabidopsis thaliana* wurden Enzyme beschrieben, die *in vitro* die Hydroxygruppen 3' und 4' glucosylieren (Lim et al., 2004). Bisher wurden in *A. thaliana* aber ausschließlich 3,7-Diglycoside von Quercetin und Kämpferol nachgewiesen (Veit und Pauli, 1999; Tohge et al., 2005). Die Funktion der entsprechenden Glycosyltransferasen *in planta* wurde bisher größtenteils noch nicht aufgeklärt.



#### 3.4.4.2 Glucosylierung von Fremdstoffen

Pflanzen weisen ein erstaunlich flexibles System auf, das sie vor potentiell toxischen Fremdstoffen schützt (Sandermann, 1994; Kreuz et al., 1996). Es existieren bemerkenswerte Parallelen zum Fremdstoffwechsel in Säugetieren, weshalb oft von einer ‚grünen Leber‘ gesprochen wird. In Pflanzen wurden sowohl Phase-I-Enzyme wie Cytochrom-P-450-abhängige Monooxygenasen und Phase-II-Enzyme wie Glutathion-S-Transferasen und Glucosyltransferasen nachgewiesen. Im Gegensatz zu den Säugetieren werden allerdings bevorzugt Glucoside und nicht Glucuronide gebildet.

Viele Enzyme weisen *in vitro* Aktivität mit endogenen und exogenen Substraten auf. Besonders gut untersucht wurden wiederum die Enzyme aus *Arabidopsis thaliana*. UGT73C5 kann das Flavonol Quercetin (Lim et al., 2004), Pflanzenhormone aus der Gruppe der Brassinosteroide (Poppenberger et al., 2005) und das Mykotoxin Desoxynivalenol (DON) glycosylieren (Poppenberger et al., 2003). UGT72B1 setzt *in vitro* sowohl 3,4-Dihydroxybenzoesäure (Lim et al., 2002), aber auch die Fremdstoffe 2,4,5-Trichlorphenol (TCP) und 3,4-Dichloranilin (DCA) um (Loutre et al., 2003). In einer anderen Untersuchung wurde gezeigt, dass endogene Substrate die Umsetzung von Fremdstoffen teilweise hemmen können (Meßner et al., 2003). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Enzyme des Sekundärstoffwechsels im Fremdstoffwechsel neue Aufgaben übernommen haben und dass sich ihre Aktivitäten zumindest *in vitro* teilweise überschneiden.

Die Achänen der Erdbeerfrüchte sammeln eine Reihe von Vorräten und Abwehrstoffen an, um ein langfristiges Überleben der Samen sicherzustellen (Aharoni und O’Connell, 2002). In Microarray-Experimenten wurden zahlreiche cDNAs identifiziert, die stärker in den Achänen als im Blütenboden exprimiert und zu einer Gruppe Stress-assoziierten Gene gezählt werden. Übereinstimmend damit wurde beschrieben, dass ein Hitzeschockprotein in den Achänen von Erdbeerfrüchten reifekorreliert exprimiert wird (Medina-Escobar et al., 1998). Auch die Expression eines Lipid-Transfer-Proteins, dem unter anderem auch eine potentielle Funktion in pflanzlichen Abwehrmechanismen zugeschrieben wird, konnte durch *in situ* Hybridisation in den Achänen lokalisiert werden (Yubero-Serrano et al., 2003).

Es wurde vermutet, dass einige dieser Stress-assoziierten Gene in den Achänen für Enzyme codieren, die am Metabolismus von Xenobiotika beteiligt sind

(Aharoni und O'Connell, 2002). Dazu gehört eine potentielle Glutathion-S-Transferase, die als Phase-II-Enzym Fremdstoffe konjugieren kann. Eine Glycosyltransferase wurde in diesem Experiment nicht identifiziert. FaGT6 und FaGT7 könnten eine ähnliche Funktion wie die potentielle Glutathion-S-Transferase übernehmen und am Fremdstoffmetabolismus der Achänen beteiligt sein. Damit übereinstimmend wurde gezeigt, dass die von beiden Glycosyltransferasen umgesetzten, nicht natürlichen Substrate auch *in planta* glucosyliert werden können. Nach Injektion von 2-Naphthol, 3-Hydroxycumarin und 3-Hydroxyflavon konnten die entsprechenden Glucoside anschließend in der Erdbeerfrucht nachgewiesen werden.

Eine endgültige Aussage über die Aufgabe beider Glycosyltransferasen kann nur durch das Ausschalten der Gene oder ihrer Überexpression *in planta* gemacht werden. Die Anwendung der auf RNA-Interferenz basierenden Injektion eines *intron-hairpin* (ihp)-Konstrukts dürfte durch die Expression in Achänen und in frühen Entwicklungsstadien erschwert werden. Die Untersuchung transgener Pflanzen, in denen die Expression der FaGT6 und FaGT7 stabil unterdrückt wird, erscheint mehr Erfolg zu versprechen.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma, Aldrich, Fluka, Riedel de Haën (alle Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen. Anthocyanidine wurden bei Polyphenols Laboratories (Sandnes, Norwegen) erworben. Radioaktiv markierte [6-<sup>3</sup>H]UDP-D-Glucose (1 mCi/ml, 60 Ci/mmol) stammte von American Radiolabelled Compounds (St. Louis, USA). Quercetin-7-glucosid war eine Spende von Dr. Thilo Fischer (Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, Technische Universität München). Betanidin wurde aus einem kommerziellen Rote-Beete-Extrakt durch Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucosidase aus Mandeln (Fluka, 18 Std., 35 °C) gewonnen. Der hydrolysierte Extrakt enthielt keine Glycoside mehr und wurde direkt für die Enzymassays eingesetzt. Alle Lösungen wurden mit hochreinem Wasser aus einem Wasser-nachbehandlungssystem (Purelab Plus UV/UF, Ransbach-Baumbach) hergestellt. Zur Isolierung von RNA wurde hochreines Wasser mit 500  $\mu$ l DEPC/100 ml Wasser versetzt, über Nacht geschüttelt und anschließend autoklaviert. Für molekularbiologische Arbeiten wurde RNase- und DNase-freies Wasser verwendet (Gibco Ultra Pure Distilled Water, Invitrogen, Karlsruhe).

#### 4.1.2 Pflanzen

Erdbeeren (*Fragaria x ananassa*) cv. Elsanta wurden unter Standardbedingungen bei 25 °C und 16 Stunden Licht pro Tag bei einer Strahlung von 120  $\mu$ mol  $\times$  m<sup>-2</sup>  $\times$  s<sup>-1</sup> (Fluoro-Lampen, Osram, Augsburg) gehalten. Die Früchte wurden nach der Ernte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 4.1.3 Bakterienstämme

Für diese Arbeit wurden folgende Bakterienstämme mit den angegebenen Antibiotika-Resistenzen verwendet.

- *Escherichia coli* JM 109 (Promega, Mannheim)
- *E. coli* MACH1 (Invitrogen)
- *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen, Darmstadt)  
mit Chloramphenicol-Resistenz (34 mg/l)

- *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 (Lazo et al., 1991)  
mit Rifampicin-Resistenz (50 mg/l)

#### 4.1.4 Vektoren

Die folgenden Vektoren und vektorspezifischen Primer (4.1.6) wurden in dieser Arbeit verwendet. Die Selektion transformierter Organismen erfolgte durch die angegebenen Antibiotika-Resistenzen.

- pGEM-T (Promega) mit Ampicillin-Resistenz (100 mg/l).  
Verwendete vektorspezifische Primer: T7, SP6
- pET-29a(+) (Novagen) mit Kanamycin-Resistenz (15 mg/l).  
Verwendete vektorspezifische Primer: T7, T7\_Term
- pGEX-4T-1 (Amersham Bioscience, Freiburg) mit Ampicillin-Resistenz (100 mg/l). Verwendete vektorspezifische Primer: pGEX\_F, pGEX\_R
- pBI121 (Jefferson, 1987) mit Kanamycin-Resistenz (15 mg/l).  
Verwendete vektorspezifische Primer: T3, T7

#### 4.1.5 Enzyme

Reverse Transkriptasen: - Superscript III (Invitrogen)  
- iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, München)

DNA Polymerasen: - REDTaq Ready Mix (Sigma)  
- Taq Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt)  
- DNA polimerasa (Biotools, Madrid, Spanien)  
- Phusion DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland)

Restriktionsenzyme: - EcoRI, BamHI, XhoI, NotI (New England Biolabs)  
- SpeI, XbaI, NheI, Ecl136II (Fermentas, St. Leon-Rot)

Weitere Enzyme: - DNase I (Amersham Bioscience)  
- DNase I (Fermentas)  
- RNaseH (New England Biolabs)  
- Terminale Transferase (Promega)  
- Alkalische Phosphatase (New England Biolabs)  
- T4 DNA Ligase (Fermentas)

#### 4.1.6 Primer

##### Vektorspezifische Primer

T3	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'
SP6	5'-CATTTAGGTGACACTATAG-3'
T7	5'-AATACGACTCACTATAGGG-3'
T7_Term	5'-CTAGTTATTGCTCAGCGGT-3'
pGEX_F	5'-ATAGCATGGCCTTTGCAGG-3'
pGEX_R	5'-GAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'

##### Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Oligo(dT) <sub>18</sub>	5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGA CAGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
GeneRacer 3'	5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3'
GeneRacer 3' Nested	5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3'
FaGT5_3'RACE	5'-GTCTGTTATCCAGCACAAGGTCACA-3'
FaGT6_RT1	5'-GTTCAATATGGGTCCCACCGGATACA-3'
FaGT6_5'RACE1	5'-CTTACCGTCGGAAGTGGAGACTGAA-3'
FaGT6_RT2	5'-ATCACGTAAGGCTTGGAGGTGGAAC-3'
FaGT6_5'RACE2	5'-ATCCGCAGCTCCAGAGGTGTAGAAC-3'
FaGT7_RT1	5'-GTTCCACCCACAGTGAGTCACAAAT-3'
FaGT7_5'RACE1	5'-CACTTGAGGAGCCCAATCTCTTAT-3'
FaGT7_RT2	5'-CCATAGCTCCTTTCTTCAATCTCT-3'
FaGT7_5'RACE2	5'-CTGACTCATCAGGAAACACAGGTA-3'

##### Klonierung der offenen Leserahmen

FaGT1_EcoRI_F	5'-TGAATTCATGGCACCAGTATCAAACC-3'
FaGT1_XhoI_R	5'-TCTCGAGATTGGTTGTAGTCATTTCC-3'
FaGT3_BamHI_F	5'-TGGATCCATGGAGAAACCTGCAGAG 3'
FaGT3_XhoI_R	5'-TCTCGAGGATCTGATCAATAAAAATG-3'
FaGT4_BamHI_F	5'-TGGATCCATGAGCTCTTCCTCTGCA-3'
FaGT4_XhoI_R	5'-TCTCGAGAACCTCATGATGCGCATG-3'
FaGT5_EcoRI_F	5'-AAAGAATTCATGGGTTCTGTGGGATCTG-3'
FaGT5_XhoI_R	5'-AAACTCGAGAGCAATAGAAGTCCTAGCAATCTC-3'
FaGT6_EcoRI_F	5'-TGAATTCATGAAGAAAGCTTCAGAGC-3'
FaGT6_NotI_R	5'-TGCGGCCGCCGAGGTTTGAATTTGATCG-3'

FaGT7\_BamHI\_F 5'-TGGATCCATGGCCATGGAACTAAATCATGC-3'  
 FaGT7\_XhoI\_R 5'-TCTCGAGTTCAACTAAGCCTCCAAAAGCTAG-3'

#### *Quantitative PCR (qPCR)*

FaGT3\_qPCR\_F 5'-AGGTATAGGCCATCTAGTCTCA-3'  
 FaGT3\_qPCR\_R 5'-GATGAAGTTGATACGCTGTG-3'  
 FaGT4\_qPCR\_F 5'-CCGGATTGGATCATTACGAT-3'  
 FaGT4\_qPCR\_R 5'-CATCAGTCTCTTGGCCTCGAAA-3'  
 FaGT5\_qPCR\_F 5'-ATCGTCGACAACCACCCAACAC-3'  
 FaGT5\_qPCR\_R 5'-AGCAACATCACAAACCCAAGGAAT-3'  
 FaGT6\_qPCR\_F 5'-CGCAGCGCATCAGGTTTCGTC-3'  
 FaGT6\_pPCR\_R 5'-GATCCGCAGCTCCAGAGGTGTAGA-3'  
 FaGT7\_qPCR\_F 5'-CTCGCGGCCACAGCATA-3'  
 FaGT7\_qPCR\_R 5'-GTCGGCACTTTCGCAATCTT-3'  
 HK\_INSP\_F 5'-ACCGTTGATTCGCACAATTGGTCATCG-3'  
 HK\_INSP\_R 5'-TACTGCGGGTTCGGCAATCGGACG-3'

#### *Herabregulation von FaGT1*

Fa\_Intron\_F 5'-GAAGATCTGCTAGCAGGTACATTCTGATTTTCATTATCC-3'  
 Fa\_Intron\_R 5'-CTCACTAGTGCAAGCTGCATCACATAAAAGTACAC-3'  
 FaGT1\_qPCR\_F 5'-CACTCACGCCGCCCACTG-3'  
 FaGT1\_qPCR\_R 5'-CACACCATCCGCCACCTCACAC-3'  
 HK\_DBP\_F 5'-GGCATCGGAGATGGTACTGT-3'  
 HK\_DBP\_R 5'-CCAGCATTCCGAACTTCTTT-3'

#### *4.1.7 Kommerzielle Kits*

- Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen:  
Perfectprep Gel Cleanup Kit (Eppendorf, Hamburg)
- Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen:  
Wizard Plus SV Miniprep Kit (Promega)
- Isolierung von Nukleinsäuren aus enzymatischen Reaktionen:  
QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)
- Isolierung von DNA aus Erdbeerblättern:  
DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)

#### 4.1.8 Medien, Puffer und sonstige Lösungen

##### Medien

LB-Medium 10 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

pH 7,0

LB-Agar LB-Medium

1,5 % Agar

SOC-Medium 20 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

0,5 g/l NaCl

2,5 mM KCl

1 mM MgCl<sub>2</sub>

2 mM D-Glucose (separat steril filtrieren [0,22 µm])

MMA-Medium 10 mM MES

4,3 g/l MS-Salze

20 g/l Saccharose

pH 5,6

##### Arbeiten mit Nukleinsäuren

CTAB-Puffer 100 mM Tris

1,4 M NaCl

20 mM EDTA

2 % CTAB

pH 8,0

bei 65 °C lösen und 1 µl/ml β-Mercaptoethanol zugeben

TE-Puffer 10 mM Tris

1 mM EDTA

pH 8,0

TFB1-Puffer      30 mM Kaliumacetat  
                     10 mM CaCl<sub>2</sub>  
                     50 mM MnCl<sub>2</sub>  
                     100 mM RbCl  
                     15 % Glycerin  
                     pH 5,8 einstellen (1 M Essigsäure), steril filtrieren (0,45 µm)

TFB2-Puffer      100 mM MOPS  
                     75 mM CaCl<sub>2</sub>  
                     10 mM RbCl  
                     15 % Glycerin  
                     pH 6,5 einstellen (1 M KOH), steril filtrieren (0,45 µm)

#### SYBR Green

Vorratslösung    1 µl SYBR Green (Molecular Probes, Eugene, USA)  
                     1 µl Fluorescein Dye (Bio-Rad)  
                     98 µl DMSO  
Arbeitslösung    1 µl Vorratslösung mit 149 µl Wasser verdünnen

#### *Agarose-Gelelektrophorese*

10× TAE-Puffer    0,4 M Tris  
                     0,2 M Essigsäure  
                     0,01 M EDTA

10× Ladepuffer    0,21 % Orange G  
                     0,1 M EDTA  
                     50 % Glycerin  
                     pH 8,0

#### *Arbeiten mit Proteinen*

8× His-Binde-Puffer    160 mM Tris  
                                 4 M NaCl  
                                 40 mM Imidazol  
                                 pH 7,9





Bradford-Lösung 50 mg Coomassie in 25 ml Ethanol lösen  
50 ml 85 % Phosphorsäure zugeben  
mit Wasser auf 1 l auffüllen

#### *SDS-PAGE und Western Blot*

Elektrophorese-Puffer 1× Tris/Glycin/SDS (Bio-Rad)  
Proteingrößenstandard Prestained Protein Marker Broad Range (6-175 kDa)  
Protein Marker Broad Range (2-212 kDa)  
(beide von New England Biolabs)  
Entfärbelösung 7 % Essigsäure  
10 % Methanol  
Blotting-Puffer 1× Tris/Glycin (Bio-Rad)  
20 % Methanol

PBS 8,23 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2,35 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
4,0 g/l NaCl

PBS/Tween PBS  
1 ml/l Tween zugeben

TBS 6,057 g/l Tris  
8,766 g/l NaCl

Alkalische Phosphatase-Puffer 100 mM Tris  
100 mM NaCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
pH 9,5

10× Ponceau 20 g/l Ponceau S  
300 g/l Trichloressigsäure  
300 g/l Sulfosalicylsäure

NBT-Lösung 5 mg NBT in 100 µl 70 % DMF auflösen  
BCIP-Lösung 5 mg BCIP in 100 µl 100 % DMF auflösen

## 4.2 Geräte

### 4.2.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

System	LaChrom HPLC-DAD (Merck-Hitachi, Darmstadt)
Pumpe	Quarternäre Pumpe L-7100
Trennsäule	Luna C-8 (150 mm lang, 4,6 mm Innendurchmesser, Partikelgröße 3 µm) von Phenomenex (Aschaffenburg)
Fließmittel	A: 0,05 % Ameisensäure (Roth) in Wasser (Merck) B: Acetonitril (Roth)
Flussrate	1 ml/min
Gradient	0–30 min: 0-100 % B
Detektor	Diodenarraydetektor (DAD) L-7455
Auswertung	Chromatography Data Station Software 4.0 (Merck-Hitachi)

### 4.2.2 Flüssigkeitschromatographie-Elektrospray-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS)

HPLC	Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn)
Pumpe	Agilent 1100 Quarternäre Pumpe
Trennsäule	Luna C-18 (150 mm lang, 2 mm Innendurchmesser, Partikelgröße 5 µm) von Phenomenex
Vorsäule	Security Guard Cartridges (Phenomenex)
Säulentemperatur	25 °C
Fließmittel	A: Wasser (Merck) mit 0,1 % Ameisensäure (Roth) B: Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure (Riedel de Haën)
Flussrate	0,2 ml/min
Gradienten	<i>Untersuchung der Enzymassays:</i> 0-30 min: 0-100 % B <i>Untersuchung der Erdbeerextrakte:</i> 0-40 min: 0-40 % B 40-45 min: 40-100 % B
Detektor	Agilent UV Variable Wavelength Detector
Massenspektrometer	Bruker Daltonics esquire 3000 <sup>plus</sup> Ionenfalle (Bruker Daltonics, Bremen)
Ionisierungsspannung	-4000 V
Endplattenspannung	-500 V

Trockengas	Stickstoff (330 °C, 9 l/min)
Kollisionsgas	Helium (3,56 x 10 <sup>-6</sup> mbar)
Kollisionsenergie	1,0 V
Scan-Bereich	50 bis 800 m/z
Scan-Auflösung	13 000 m/z/s
ICC Target	30 000 oder 200 ms
Auswertung	DataAnalysis 3.1 Softwarepaket (Bruker Daltonics)

#### 4.2.3 Flüssigszintillationszähler (LSC)

Gerät	Rackbeta 1219 (Wallac, Turku, Finnland)
Messzeit	5 Minuten
Vials	Schraubgefäße 15 ml (Hartenstein, Würzburg)
Szintillationscocktail	Ultima Gold XR LSC (Perkin-Elmer, Boston, USA)

#### 4.2.4 Sonstige Geräte

Thermocycler	iCycler iQ mit Optical Systems Software 3.0a (Bio-Rad) Primus 96 advanced (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) Techgene FTGENE 2D (Techne, Cambridge, England)
Spektralphotometer	Specord 200 (Analytik Jena, Jena) Nicolet evolution 100 (Thermo, Cambridge, England) Nanodrop ND-1000 UV/Vis (Peqlab Biotechnologie)
Zentrifugen	Beckman Avanti J-25 (Beckman, Madrid, Spanien) Sorvall RC 5B Plus (Kendro, Hamburg) Sigma 4K15 (Sigma, Osterode) Eppendorf 5415R (Eppendorf)
Sterile Werkbank	Waldner FAZ 3 (Waldner Laboreinrichtung, Wangen)
Autoklav	HST 4-5-7 (Zirbus Technology, Bad Grund)
Geldokumentation	Alpha Imager 2200 mit Alpha Ease Software (Alpha Innotech, San Leandro, USA)
Lyophilisator	Christ Alpha 1-4 (Christ, Osterode)
Speed-Vac	Christ RVC 2-18 (Christ)
Waagen	Sartorius 1702 (Sartorius, Göttingen) Scout Pro SP U 4001 (Ohaus, Pine Brook, USA)
pH-Meter	CG 820 (Ingold, Hofheim)
Spannungsquelle	Consort E 835 (Consort, Turnhout, Belgien)

Blot-Kammer	Criterion-Blotter (Bio-Rad)
Ultraschallbad	RK103H (Bandelin Electronic, Berlin)
Ultraschall-Sonotrode	Bandelin Sonopuls UW2200 (Bandelin Electronic)
Schüttelinkubatoren	GFL3033 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) GFL3032 (Gesellschaft für Labortechnik)
Thermomixer	Eppendorf Comfort 1,5 ml (Eppendorf)
Wasserbad	HC 5/6 (Julabo Labortechnik, Seelbach)
Vortexer	REAX 2000 (Heidolph, Schwabach)

#### 4.2.5 Software und Internetressourcen

- EditSeq Version 4.0 (DNA STAR, Madison, USA)
- PrimerSelect Version 4.0 (DNA STAR)
- MegAlign Version 4.0 (DNA STAR)
- TreeView Version 1.6.6 (R. Page, England)
- SigmaPlot 8.0 (Systat Software, Erkrath)
- ACD/ChemSketch Version 5.12  
(Advanced Chemistry Development, Toronto, Kanada)
- BLAST (Altschul et al., 1990 und 1997):  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- Clustal W (Thompson et al., 1994): <http://www.ebi.ac.uk/clustaw/>
- The R project for statistical computing: <http://www.r-project.org/>

### 4.3 Methoden

#### 4.3.1 Grundlegende molekularbiologische Arbeitstechniken

##### 4.3.1.1 Isolierung von RNA

Das verwendete Verfahren basiert auf einem Protokoll, das ursprünglich für die Isolierung von RNA aus reifen Bananen entwickelt wurde (Asif et al., 2000). Das tiefgefrorene Pflanzenmaterial (1 g Frischgewicht) wurde unter flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill fein zerrieben, mit 10 ml CTAB-Puffer versetzt und eine Stunde bei 65 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 10 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, mit dem Vortexer gut gemischt und 15 Minuten bei 14 000 g zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und der Extraktionsvorgang mit der gleichen Menge Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wiederholt. Die RNA wurde mit Lithiumchlorid (Endkonzentration 3 M) aus dem wässrigen Überstand

über Nacht bei 4 °C gefällt und anschließend bei 14 000 g für 30 Minuten abzentrifugiert. Das Präzipitat ist in 200 µl Wasser gelöst und nacheinander mit 200 µl Phenol, Phenol/Chloroform (1:1) und Chloroform extrahiert worden. Anschließend wurden 1/30 Volumina 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 0,1 Volumina Ethanol zugegeben um die enthaltenen Poly- und Oligosaccharide 30 Minuten auf Eis auszufällen. Nach dem Sedimentieren des Niederschlags bei 4 °C und 16 100 g wurde dem Überstand 0,1 Volumina 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 3 Volumina Ethanol zugegeben um bei –80 °C mindestens drei Stunden lang die enthaltene RNA zu fällen. Anschließend wurde die RNA bei 4° C für 30 Minuten bei 16 100 g abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde nacheinander mit 500 µl 70 % und 100 % Ethanol gewaschen und anschließend in 100 µl Wasser gelöst. Diese Lösung ist für die photometrische Bestimmung 1:25 mit Wasser verdünnt worden. Die RNA-Konzentration wurde bei 260 nm gemessen und nach folgender Gleichung berechnet.

$$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$$

Aus dem Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$  lässt sich die Verunreinigungen mit Proteinen abschätzen, wobei eine reine RNA-Lösung den Wert 2,0 aufweist (Lottspeich und Zorbas, 1998).

#### 4.3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bekannte und unbekannte DNA-Sequenzen wurden mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Für unproblematische Standardanwendungen (z. B. Kolonie-PCR, 4.3.1.9) wurde ein kommerzieller PCR *Ready Mix* (RED-Taq) eingesetzt, der eine *Taq* Polymerase, dNTPs und einen Ladepuffer enthielt. Bei allen Anwendungen, die eine hohe Genauigkeit erfordern (z. B. Klonierung des offenen Leserahmens, 4.3.2.4), wurde die Phusion Polymerase verwendet, die eine geringere Fehlerrate als herkömmliche *Taq* Polymerasen aufweist. Wenn nicht anders beschrieben, wurden folgende Ansätze (Tab. 4) verwendet und auf Eis pipettiert.

**Tabelle 4:** Allgemeines Pipettierschema für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

<i>Ready Mix</i>	<i>Taq Polymerase</i>	<i>Phusion Polymerase</i>
12,5 µl 2× Ready Mix	2,5 µl 10× Thermopol Puffer	4 µl 5× HF Puffer
-	0,5 µl dNTPs (10 mM)	0,4 µl dNTPs (10 mM)
1 µl Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)	1 µl Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)	0,8 µl Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)
1 µl Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)	1 µl Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)	0,8 µl Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)
9,5 µl Wasser	18,75 µl Wasser	13 µl Wasser
1 µl Matrize	1 µl Matrize	0,8 µl Matrize
-	0,25 µl <i>Taq</i> Polymerase	0,2 µl Phusion Polymerase
Σ 25 µl	Σ 25 µl	Σ 20 µl

Die PCR wurde anschließend mit folgenden Temperaturprogrammen (Tab. 5) im vorgeheizten Thermocycler mit beheiztem Deckel durchgeführt.

**Tabelle 5:** Temperaturprogramme für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

	<i>Taq Polymerase</i>	<i>Phusion Polymerase</i>		
Vordenaturierung	2 Min. bei 94 °C	2 Min. bei 98 °C		
Denaturierung	32 × {	32 × {		
Primerhybridisierung			30 Sek. bei 94 °C	10 Sek. bei 98 °C
Elongation			30 Sek. bei 60 °C	20 Sek. bei 55 °C
	90 Sek. bei 72 °C	30 Sek. bei 72 °C		
Finale Elongation	10 Min. bei 72 °C	10 Min. bei 72 °C		

#### 4.3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Verwendung eines Größenstandards (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Fermentas) ermöglichte die Abschätzung der Größe und der Menge der DNA-Fragmente. Es wurden TAE-gepufferte Gele mit 1,5 % (w/v) Agarose und 0,05 % Ethidiumbromid verwendet. Die Proben wurden mit 10× Ladepuffer versetzt und für 30 bis 45 Minuten bei 10 V/cm entwickelt. Das Ergebnis wurde mit einem Geldokumentationssystem festgehalten. Zur Isolierung von DNA wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und mit einem kommerziellen Kit isoliert.

#### 4.3.1.4 Klonieren von PCR-Produkten

Zum Subklonieren von PCR-Produkten wurde der Vektor pGEM-T verwendet. Dieser Vektor ist in linearisierter Form mit einem T-Überhang erhältlich und er-

möglichst die schnelle und unkomplizierte Ligation von PCR-Produkten, die mit einer *Taq* Polymerase erzeugt wurden. Bei Verwendung der Phusion Polymerase wurde der notwendige A-Überhang nach folgendem Ansatz durch eine 20-minütige Inkubation bei 72 °C erzeugt.

- 7 µl PCR-Produkt
- 1 µl 10× Thermopol-Puffer (New England Biolabs)
- 1 µl dATP (2 mM)
- 1 µl *Taq* Polymerase (New England Biolabs)

Das mit einem A-Überhang versehene PCR-Produkt wurde anschließend mit folgendem Reaktionsansatz über Nacht bei 4 °C in den Vektor pGEM-T ligiert.

- 5 µl 2× Rapid Ligation Puffer (Promega)
- 3 µl PCR-Produkt mit A-Überhang
- 1 µl pGEM-T Vektor (Promega)
- 1 µl T4 DNA Ligase (Promega)

#### 4.3.1.5 Restriktionsverdau und Auffüllen klebriger Enden

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte mit den angegebenen Enzymen in den von den Herstellern empfohlenen Puffern. Es wurde mindestens eine *Unit* Restriktionsenzym pro µg DNA eingesetzt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Restriktionsenzyme für 15 Minuten bei 70 °C. Die erfolgreiche Restriktion wurde anschließend gelelektrophoretisch überprüft (4.3.1.3) und das gewünschte DNA-Fragment wurde mit einem kommerziellen Kit aus dem Agarose-Gel isoliert.

Für die Konstruktion von pBI-*FaGT1i* (4.3.5.2) mussten teilweise durch Restriktionsverdau entstandene klebrige Enden aufgefüllt werden. Die aus dem Restriktionsansatz mit einem kommerziellen Kit aufgereinigte DNA wurde dazu mit folgendem Reaktionsansatz 20 Minuten bei 72 °C inkubiert.

- 27 µl Aufgereinigte und geschnittene DNA
- 7 µl 5× HF-Puffer (Finnzymes)
- 0,7 µl dNTPs (10 mM)
- 0,3 µl Phusion Polymerase (Finnzymes)



#### 4.3.1.6 Vektor-Dephosphorylierung und Ligation klebriger Enden

Linearisierte Vektoren mit klebrigen Enden wurden vor der Ligation dephosphoryliert, um eine Selbstligation zu vermeiden. Dazu wurde der Restriktionsansatz mit 1 µl alkalischer Phosphatase versetzt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die geschnittenen und aus dem Gel aufgereinigten DNA-Fragmente wurden anschließend mit folgendem Ansatz in den dephosphorylierten Vektor ligiert.

- 2 µl 10× Ligations-Puffer (Fermentas)
- 0,4 µg Linearisierter Vektor
- x µl DNA-Fragment (mind. gleiche molare Konzentration)
- 1 µl T4 DNA Ligase (Fermentas)
- Wasser (Gesamtvolumen 20 µl)

#### 4.3.1.7 Herstellung kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden nach einer modifizierten Rubidiumchlorid-Methode hergestellt, da bessere Transformationseffizienzen als mit Calciumchlorid erreicht werden können (Hanahan, 1985). Von einer Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli* Stammes wurden 2,5 ml mit 250 ml LB-Medium (mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> supplementiert) versetzt und bei 37 °C geschüttelt bis die optische Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) 0,4 bis 0,6 erreicht hatte. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 4 500 g und 4 °C pelletiert und anschließend in 100 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 10 ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Aliquotieren wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 4.3.1.8 Transformation von *Escherichia coli*

Fünf µl Ligationsansatz wurden zu 50 µl der auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen (4.3.1.7) gegeben, vorsichtig gemischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (45 Sek., 42 °C) wurde die Reaktion erneut zwei Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 950 µl SOC-Medium wuchsen die Zellen bei 37 °C für 1,5 Stunden. Anschließend wurden verschiedene Aliquote auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 4.3.1.9 Kolonie-PCR und Isolierung von Plasmid-DNA

Um die nach einer Transformation erhaltenen Kolonien zu überprüfen, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurde ein Teil der Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher in ein PCR-Gefäß überführt. Mit vektorspezifischen Primern (4.1.6) und dem *Ready Mix* wurde eine PCR durchgeführt (4.3.1.2). Anhand der Größe des erhaltenen PCR-Produktes konnte darauf geschlossen werden, ob das gewünschte DNA-Fragment in den Vektor integriert wurde. Von positiven Kolonien wurden Übernachtskulturen (37 °C) mit den entsprechenden Antibiotika angesetzt. Aus 5-10 ml Übernachtskultur wurde mit Hilfe eines kommerziellen Kits Plasmid-DNA isoliert und anschließend elektrophoretisch überprüft.

#### 4.3.1.10 DNA-Fällung und Sequenzierung

Etwa 1 µg Plasmid-DNA wurde mit 0,1 Volumina 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumina Ethanol versetzt und die DNA wurde 15 Minuten bei –20 °C gefällt. Das Pellet wurde nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4 °C mit 200 µl 70 % Ethanol und 200 µl 100 % Ethanol gewaschen und bei 45 °C kurz getrocknet. Die Sequenzierung erfolgte durch einen kommerziellen Anbieter (MWG Biotech, Ebersberg) mit vektorspezifischen Primern (4.1.6).

#### 4.3.1.11 Anlegen von Glycerinkulturen

Zur sicheren Langzeitlagerung von Konstrukten wurden neben den Plasmiden auch Glycerinkulturen aufbewahrt. Dazu wurde die entsprechende Übernachtskultur mit der gleichen Menge 50 % Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

### 4.3.2 Klonierung der Vollängensequenzen

#### 4.3.2.1 Reverse Transkription (RT)

Die aus Erdbeerfrüchten isolierte RNA (4.3.1.1) wurde mit Superscript III revers transkribiert. Dazu wurde folgender Ansatz 5 Minuten bei 65 °C inkubiert.

1 µg RNA

1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer (50 pmol/µl, 4.1.6)

1 µl dNTPs (10 mM)

Wasser (Gesamtvolumen 13 µl)

Nach dem Abkühlen auf Eis wurden folgende Lösungen hinzugefügt.

- 4 µl 5× Superscript III Puffer
- 1 µl DTT (0,1 M)
- 1 µl RNase Inhibitor Gold (Peqlab Biotechnologie)
- 1 µl Superscript III

Die cDNA-Synthese erfolgte für 50 Minuten bei 50 °C, gefolgt von 15 Minuten bei 70 °C, um die enthaltene reverse Transkriptase zu inaktivieren. Zum Verdau des komplementären RNA-Stranges wurde 1 µl RNaseH (New England Biolabs) zugegeben und für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die erhaltene cDNA konnte direkt für 3' RACE und Klonierungsexperimente eingesetzt werden.

Bei der Verwendung genspezifischer Primer wurden nur 0,2 µl Oligonukleotid (10 pmol/µl) zugegeben und die cDNA-Synthese fand bei 55 °C für 20 Minuten statt. Nach dem RNaseH Verdau wurde die cDNA mit einem kommerziellen Kit aufgereinigt, um die enthaltenen Primer und Nukleotide zu entfernen.

#### 4.3.2.2 3' Rapid Amplification of cDNA Ends (3' RACE)

Bei der 3' RACE wird ein Oligonukleotid eingesetzt, das an den Anker des bei der cDNA-Synthese verwendeten Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primers (GeneRacer 3' Primer, Invitrogen, 4.1.6) hybridisieren kann (Mülhardt, 2006). Zusammen mit dem FaGT5\_3'RACE Primer (4.1.6) konnte mit *Taq* Polymerase das unbekannte 3'-Ende des offenen Leserahmens von *FaGT5* amplifiziert werden (4.3.1.2).

#### 4.3.2.3 5' Rapid Amplification of cDNA Ends (5' RACE)

Die Primer für die 5' RACE wurden so konstruiert, dass sie möglichst nah am 5'-Ende der bekannten Sequenz lagen und unter den letzten fünf Basen am 3'-Ende des Primers maximal zwei G oder C aufwiesen (Schaefer, 1995). Daneben wurde darauf geachtet, dass die Oligonukleotide nicht zur Bildung von Dimeren oder Haarnadel-Molekülen neigten. Um auch unbekannte Sequenzen am 5'-Ende des offenen Leserahmens zu amplifizieren, musste zunächst ein PolyA-Überhang am 5'-Ende der mit genspezifischen Primern (FaGT6\_RT1 bzw. FaGT7\_RT1, 4.1.6) synthetisierten cDNA angefügt werden. Im ersten Schritt der 5' RACE bindet der Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer an den neu generierten PolyA-Überhang und ermöglicht dadurch das Anhybridisieren des Gene

Racer 3' oder GeneRacer 3' Nested Primers (Invitrogen, 4.1.6) an den neu geschaffenen Anker.

Die aufgereinigte cDNA wurde mit folgendem Ansatz mit einem PolyA-Überhang am 5'-Ende versehen. Die Inkubation erfolgte 10 Minuten bei 37 °C, anschließend wurde die terminale Transferase 10 Minuten bei 70 °C inaktiviert.

- 14 µl cDNA
- 0,6 µl Wasser
- 0,4 µl dATP (10 mM)
- 4,0 µl 5× Terminale Transferase-Puffer (Promega)
- 1,0 µl Terminale Transferase (Promega)

Um die Spezifität der 5' RACE zu erhöhen, wurde eine *Touchdown*-PCR durchgeführt (Don et al., 1991). Dabei wird in den ersten Amplifikationszyklen eine hohe Hybridisierungstemperatur gewählt, die in jedem Zyklus gesenkt wird. Die verwendeten genspezifischen Primer (FaGT6\_5'RACE1 und FaGT7\_5'RACE1, 4.1.6) hybridisieren näher am 5'-Ende der bekannten Teilsequenz als die für die reverse Transkription benutzten und ermöglichen so die Durchführung einer geschichteten PCR. Für *FaGT6* wurde die *Taq* Polymerase mit dem in 4.3.1.2 beschriebenen Ansatz verwendet, der je 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub> (1 pmol/µl), GeneRacer 3' (10 pmol/µl) und FaGT6\_5'RACE1 Primer (10 pmol/µl) enthielt. Die Reaktion wurde mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt.

- 5 Min. bei 95 °C
- 2 Min. bei 50 °C
- 40 Min. bei 72 °C
- 12× {
  - 30 Sek. bei 94 °C
  - 30 Sek. bei 70 °C
  - 75 Sek. bei 72 °C
 [– 0,8 °C /Zyklus]
- 25× {
  - 30 Sek. bei 94 °C
  - 30 Sek. bei 60 °C
  - 75 Sek. bei 72 °C
- 10 Min. bei 72 °C

Da mit der ersten 5' RACE nur ein Teilstück des unbekanntes 5'-Endes amplifiziert werden konnte, wurden zwei neue genspezifische Primer (FaGT6\_RT2 und FaGT6\_5'RACE2, 4.1.6) konstruiert, die näher am 5'-Ende des offenen

Leserahmens lagen. Anschließend wurde die cDNA-Synthese und die 5' RACE wie oben beschrieben wiederholt. Dadurch konnte schließlich der gesamte offene Leserahmen der *FaGT6* amplifiziert und sequenziert werden.

Zur Amplifikation des unbekanntes 5'-Endes der *FaGT7* wurde die Phusion Polymerase nach dem in 4.3.1.2 beschriebenen Ansatz verwendet, der je 1  $\mu$ l Oligo(dT)<sub>18</sub> (1 pmol/ $\mu$ l), GeneRacer 3' Nested (10 pmol/ $\mu$ l) und *FaGT7\_5'RACE1* Primer (10 pmol/ $\mu$ l) enthielt. Das Temperaturprogramm wurde wie folgt angepasst.

	2 Min. bei 98 °C		
	2 Min. bei 55 °C		
	25 Min. bei 72 °C		
12×	{	10 Sek. bei 98 °C	[– 0,5 °C /Zyklus]
		20 Sek. bei 72 °C	
		20 Sek. bei 72 °C	
28×	{	10 Sek. bei 98 °C	
		20 Sek. bei 65 °C	
		20 Sek. bei 72 °C	
	10 Min. bei 72 °C		

Auch hier wurde bei der ersten 5' RACE nur ein Teilstück des gesuchten 5'-Endes vervielfältigt. Deshalb wurden ebenfalls zwei neue genspezifische Primer (*FaGT7\_RT2* und *FaGT7\_5'RACE2*, 4.1.6) konstruiert, die näher am 5'-Ende des offenen Leserahmens lagen und die cDNA Synthese und die 5' RACE wurden damit erneut durchgeführt. Auch hier gelang im zweiten Schritt die Amplifikation des gesuchten 5'-Endes des offenen Leserahmens.

#### 4.3.2.4 Klonierung der offenen Leserahmen

Zum Klonieren der vollständigen offenen Leserahmen wurden zunächst Primer konstruiert, die die zur Ligation in den Expressionsvektor benötigten Restriktionsschnittstellen beinhalten (4.1.6). Mit der Phusion Polymerase wurde anschließend ein PCR-Produkt generiert, das in den Vektor pGEM-T subkloniert und anschließend vollständig sequenziert wurde (4.3.1).

#### 4.3.2.5 Klonierung in den Expressionsvektor

FaGT1, FaGT3 und FaGT4 wurden in den Expressionsvektor pET29a(+) ligiert. Für FaGT5, FaGT6 und FaGT7 wurde das pGEX-4T-1 Expressionssystem verwendet. Das in den Vektor pGEM-T ligierte PCR-Produkt sowie der Expressionsvektor wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten (4.3.1.5). Die Ligation in den dephosphorylierten Expressionsvektor erfolgte mit dem unter 4.3.1.6 beschriebenen Ansatz. Mindestens ein Plasmid mit dem offenen Leserahmen wurde vollständig mit vektorspezifischen Primern sequenziert (4.3.1.10). Plasmide, die den korrekten und vollständigen offenen Leserahmen aufwiesen, wurden zur heterologen Expression in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformiert (4.3.1.8).

#### 4.3.2.6 Klonierung der genomischen Sequenzen

Genomische DNA wurde mit Hilfe eines kommerziellen Kits aus Erdbeerblättern isoliert. Mit der Phusion Polymerase (4.3.1.2) und den Primern, die auch zum Subklonieren der vollständigen offenen Leserahmen Verwendung fanden (4.1.6), wurden die genomischen Sequenzen amplifiziert. Um auch Sequenzen mit längeren Introns vervielfältigen zu können, wurde die Amplifikationszeit in der PCR auf 2 Minuten verlängert. Nach dem Subklonieren der PCR-Produkte in den Vektor pGEM-T erfolgte die vollständige Sequenzierung (4.3.1.10).

### 4.3.3 Genexpressionsanalyse

#### 4.3.3.1 Pflanzenmaterial und Auxin-Behandlung

Während der Fruchtreifung wurden kleine grüne (G1), große grüne (G3), weiße (W), pinkfarbene (P) und reife rote (R) Erdbeerfrüchte geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Daneben wurde auch von vegetativem Gewebe wie Blättern, Wurzeln, Ausläufern, Blüten und Wurzelhals Proben genommen. Um den hormonellen Einfluss auf die Fruchtreifung und Genexpression zu untersuchen, wurden die Achänen von mittelgroßen grünen Früchten (G2) mit einem Skalpell vorsichtig entfernt. Ein Teil der Früchte wurde mit einer Lanolinpaste bestrichen, die das synthetische Auxin 1-Naphthalinessigsäure (NAA) enthielt. Der andere Teil der Früchte wurde mit einer Lanolinpaste ohne NAA behandelt. Nach 5 Tagen wurden die Früchte geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 4.3.3.2 DNase-Behandlung und reverse Transkription (RT)

Zur Isolierung von RNA aus den verschiedenen Proben wurde das unter 4.3.1.1 beschriebene Protokoll mit jeweils sechs bis sieben Früchten verwendet. Um vor der reversen Transkription mögliche DNA-Kontaminationen zu entfernen, wurde die RNA nach folgendem Ansatz mit DNase I behandelt.

30 µg RNA  
2 µl 1 M Tris (pH 7,5)  
3 µl 0,1 M MgCl<sub>2</sub>  
1 µl DNase I (Amersham Bioscience)  
Wasser (Gesamtvolumen 50 µl)

Nach der einstündigen Inkubation bei 37 °C wurden 100 µl Wasser zugegeben und die DNase I wurde durch Extraktion mit 150 µl Phenol/Chloroform (1:1) wieder entfernt. Aus der wässrigen Lösung wurde die RNA mit 0,1 Volumina 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumina Ethanol gefällt, mit 70 % und 100 % Ethanol gewaschen und bei 37 °C kurz getrocknet. Das Pellet wurde in 10 µl Wasser resuspendiert und die RNA-Menge und Qualität wurde photometrisch bestimmt (4.3.1.1). Zusätzlich wurde die Integrität der RNA elektrophoretisch kontrolliert (4.3.1.3). Die reverse Transkription wurde mit 1 µg RNA und dem iScript cDNA Synthesis Kit durchgeführt. Dazu wurden 4 µl 5× iScript Reaction Mix, 1 µl iScript reverse Transkriptase und 1 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl zusammenpipettiert. Die Reaktion wurde mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt.

5 Min. bei 25 °C  
30 Min. bei 42 °C  
5 Min. bei 85 °C

Ein kleiner Teil der cDNA wurde mit Wasser 1:4000 verdünnt, um als Matrize für das Referenzgen (*Interspacer* 26S-18S RNA) eingesetzt zu werden.

#### 4.3.3.3 Quantitative PCR (qPCR)

Für jede Glycosyltransferase wurden zunächst sequenzspezifische Primer konstruiert, die ein Amplikon von etwa 200 bp ergaben. Mit Hilfe der Software PrimerSelect wurden Oligonukleotide ausgewählt, die nicht zur Bildung von Dimeren oder Haarnadeln neigen und einen relativ hohen Schmelzpunkt aufwei-

sen (4.1.6). Zur Kontrolle der gewählten Primer wurde das in einer konventionellen PCR mit cDNA erzeugte Amplikon in pGEM-T kloniert und vollständig sequenziert (4.3.1). Zum Normalisieren der Ergebnisse wurde ein *Interspacer* 26S-18S RNA Referenzgen verwendet (Benítez-Burraco et al., 2003; Raab et al., 2006; 4.1.6). Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Schema pipetiert.

3,0 µl 10× PCR-Puffer ohne Magnesium (Biotools)  
1,2 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>  
1,2 µl 5 mM dNTPs  
3,0 µl Vorwärts-Primer (2 pmol/µl)  
3,0 µl Rückwärts-Primer (2 pmol/µl)  
3,0 µl SYBR Green Arbeitslösung  
2,0 µl cDNA  
0,6 µl DNA polimerasa (Biotools)  
13 µl Wasser

Jede einzelne Reaktion wurde in Triplikaten im iCycler iQ mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde Wasser anstelle von cDNA eingesetzt.

3 Min. bei 94 °C  
40× { 15 Sek. bei 94 °C  
30 Sek. bei 55 °C  
30 Sek. bei 72 °C

Anschließend wurde eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt, um zu überprüfen, ob tatsächlich die gewünschten Sequenzen amplifiziert wurden. Zusätzlich wurden alle Reaktionen auch gelektrophoretisch kontrolliert (4.3.1.3).

#### 4.3.3.4 Datenauswertung

Mit der iCycler iQ Optical Systems Software wurden die C<sub>T</sub>-Werte bestimmt, bei denen die Fluoreszenz erstmals oberhalb des Hintergrundes (*Threshold Value* = 10) detektiert werden konnte. Die erhaltenen C<sub>T</sub>-Werte sind indirekt proportional zum log<sub>2</sub> der ursprünglichen Kopienzahl. Die Ergebnisse wurden mit dem Referenzgen normalisiert und nach Livak und Schmittgen (2001) mit folgender Formel als relative Expression ausgedrückt (bezogen auf grüne Erdbeeren oder



unbehandelte Kontrollen). Dabei wurde jeder Datenpunkt mindestens in Triplikaten mit zweimal unabhängig voneinander revers transkribierter cDNA aufgenommen.

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta(\Delta C_t)}$$

$$\Delta C_t = C_t (\text{Zielgen}) - C_t (\text{Referenzgen})$$

$$\Delta (\Delta C_t) = \Delta C_t (\text{Probe}) - \Delta C_t (\text{Kontrolle})$$

#### 4.3.4 Heterologe Expression und biochemische Charakterisierung

##### 4.3.4.1 Expression der rekombinanten Enzyme

Die entsprechende Übernachtskultur wurde mit LB-Medium so verdünnt, dass in einem Gesamtvolumen von 800 ml eine OD<sub>600</sub> von 0,06 vorlag. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 geschüttelt. Nach dem Abkühlen der Kultur auf 16 °C wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Kulturen wurden über Nacht bei 16 °C weitergeschüttelt und anschließend bei 4 °C 15 Minuten lang bei 3 000 g abzentrifugiert und bei –20 °C gelagert.

##### 4.3.4.2 Zellaufschluss

Die Zellen wurden in 4 ml Binde-Puffer/100 ml Kultur resuspendiert und dreimal je 30 Sekunden mit gleich langen Pausen auf Eis mit einer Ultraschallsonotrode (Intensität 30 %) behandelt. Die aufgeschlossenen Zellen wurden abzentrifugiert (15 000 g, 20 Min., 4 °C), der Proteinrohextrakt kurz filtriert (0,45 µm) und anschließend auf Eis gelagert.

##### 4.3.4.3 His-Tag Affinitätschromatographie

Rekombinante Proteine mit einem His-Tag wurden mit His Bind Quick 900 Kartuschen (Novagen) aufgereinigt. Alle Puffer wurden mit 1 mM THP (Novagen) versetzt. Um die Viskosität des Proteinrohextraktes zu reduzieren, wurde vor der Aufreinigung eine 30-minütige Inkubation mit 5 µl Nuklease (Benzonase, Novagen) durchgeführt. Die mit 6 ml His-Binde-Puffer konditionierten Kartuschen wurden mit dem Proteinrohextrakt geladen und anschließend mit 20 ml His-Binde-Puffer und 10 ml His-Wasch-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 4 ml His-Elutions-Puffer, der 1 M Imidazol enthielt. Insgesamt wurden vier Fraktionen zu je 1 ml erhalten, die auf Eis aufbewahrt wurden.

#### 4.3.4.4 GST Affinitätschromatographie

Die Proteinaufreinigung der GST-Fusionsproteine wurde mit GST-Binde-Harz (Novagen) durchgeführt. Alle verwendeten Puffer enthielten 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol. Zu dem äquilibrierten Harz wurde der Proteinrohextrakt gegeben und 30 Minuten in einem Überkopfmischer bei 4 °C inkubiert, um das Fusionsprotein an das Harz zu binden. Anschließend wurde 3 Minuten bei 4 °C und 700 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Harz zweimal mit 2,5 ml GST-Binde-Puffer gewaschen. Zur Elution des GST-Fusionsproteins wurden 500  $\mu$ l GST-Elutions-Puffer zugegeben, 10 Minuten bei 4 °C gemischt und zentrifugiert. Der Elutionsschritt wurde zweimal wiederholt und so wurden drei Eluate mit Fusionsprotein erhalten, die auf Eis gelagert wurden.

#### 4.3.4.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde nach der von Bradford (1976) entwickelten Methode bestimmt. Die entsprechend verdünnten Proben (100  $\mu$ l) wurden mit 1 ml Bradford-Lösung versetzt, gemischt und nach frühestens 2 Minuten photometrisch bei 595 nm vermessen. Zum Erstellen einer Kalibriergeraden wurde Rinderserumalbumin als Standard verwendet. Die Proteinkonzentration der Probe wurde mit folgender Formel berechnet.

$$\text{Protein } [\mu\text{g}] = (A_{595} - 0,0009) / 0,0364$$

#### 4.3.4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur qualitativen Untersuchung von Proteinlösungen wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dazu wurden 30  $\mu$ l Probelösung mit 30  $\mu$ l 4 % SDS und 20  $\mu$ l Ladepuffer (Roti-Load, Roth) versetzt, 10 Minuten bei 95 °C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Für die Trennung wurden Fertiggele mit 12 % Polyacrylamid (Anamed, Darmstadt) verwendet. Eingesetzt wurden jeweils 10  $\mu$ l der Probelösung und des Größenstandards. Die Auftrennung dauerte 60 Minuten bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA. Das Gel wurde mit Färbelösung (Roti-Blue, Roth) über Nacht gefärbt und mit Entfärbelösung bis zum Erhalt eines klaren Hintergrundes entfärbt. Da bei einigen Glycosyltransferasen nur eine partielle Aufreinigung erreicht werden konnte, wurde der Anteil rekombinanten Proteins mit dem

Geldokumentationssystem und der dazugehörigen Auswertesoftware quantifiziert.

#### 4.3.4.7 *Western Blot*

Zum Nachweis der rekombinanten Proteine wurden *Western Blots* mit Anti-GST (Sigma) bzw. Anti-His Antikörper (Novagen) durchgeführt. Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Proteine mit dem Criterion-Blotter auf eine 0,45 µm Nitrocellulosemembran (Bio-Rad) überführt. Der Sandwich wurde mit Blotting-Papier (Schleicher und Schuell, Dassel) nach den Angaben des Herstellers zusammengebaut. Der Transfer erfolgte in Blotting-Puffer bei einer konstanten Stromstärke von 500 mA für zwei Stunden. Zur Kontrolle des Blotting-Vorgangs wurde die Nitrocellulosemembran 15 Minuten mit Ponceau gefärbt und mit Wasser entfärbt. Anschließend wurde die Membran über Nacht in Blocklösung (Roti-Block, Roth) geschüttelt und mit 0,5 µl spezifischem Antikörper (Anti-His bei pET29a(+) bzw. Anti-GST bei pGEX-4T-1) in 500 µl Blocklösung eine Stunde inkubiert. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS/Tween entfernt. Anschließend wurde mit 1 µl Anti-Mouse Antikörper (Sigma) in 10 ml Blocklösung für eine weitere Stunde inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit PBS/Tween und zwei Waschschrte mit TBS. Die Membran wurde anschließend mit 10 ml alkalischer Phosphatase-Puffer, 66 µl NBT- und 33 µl BCIP-Lösung im Dunkeln für 5 bis 20 Minuten inkubiert, bis eine deutliche Farbreaktion sichtbar wurde.

#### 4.3.4.8 Enzymassays mit LC-ESI-MS Detektion

Um die Substratspezifität und die gebildeten Produkte zu untersuchen, wurden Enzymassays mit anschließender LC-ESI-MS Detektion durchgeführt. Ein Standardassay bestand aus 185 µl Tris-Puffer (pH 7,0), 10 µl 125 mM UDP-D-Glucose und 50 µl Proteinrohextrakt, der ungefähr 0,25 µg rekombinantes Protein enthielt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 µl 10 mM ethanolischer Substratlösung gestartet und 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 200 µl 5 % HCl (Anthocyanidine) oder 50 µl Essigsäure (alle anderen Substrate). Ungelöste Bestandteile wurden kurz abzentrifugiert (16 100 g, 5 Min.) und der klare Überstand wurde direkt mit LC-ESI-MS analysiert. Als Blindwerte wurden Proteinrohextrakte aus BL21 (DE3) pLysS Zellen verwendet, die den leeren Expressionsvektor (pET29a(+)) bzw.

pGEX-4T-1) enthielten. Als zusätzliche Kontrolle wurde hitzeinaktiviertes (5 Min., 95 °C) Protein eingesetzt. Die Identifizierung der Produkte erfolgte durch Analyse der entsprechenden Massenspuren und der MS<sup>2</sup>-Spektren.

Zur Identifizierung der Reaktionsprodukte der FaGT5, wurde eine alkalische Hydrolyse durchgeführt. Dazu wurden 90 µl eines nicht abgestoppten Standardassays mit 10 µl 1 M NaOH versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl 1 M HCl wurde der Assay per LC-ESI-MS analysiert. Als Kontrolle diente ein mit Wasser versetzter Standardassay, der unter gleichen Bedingungen inkubiert wurde.

#### 4.3.4.9 Enzymassays mit Radiodetektion

Für einen Standard-Assay wurden 166 µl Tris-Puffer (pH 7,0), 10 µl UDP-D-Glucose (1 % 0,016 mM [6-<sup>3</sup>H]UDP-D-Glucose und 99 % 101 mM UDP-D-Glucose) und 20 µl Enzymlösung mit 0,1 µg aufgereinigtem Protein verwendet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl 10 mM Substratlösung gestartet. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 30 °C und wurde durch Extraktion mit 1 ml wassergesättigtem n-Butanol gestoppt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden 800 µl der organischen Phase entnommen und mit 4 ml Szintillationscocktail gemischt und für 5 min im Szintillationszähler vermessen. Nicht umgesetzte UDP-Glucose verbleibt in der wässrigen Phase. Die Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte mit der nachfolgenden Formel. Alle angegebenen Ergebnisse sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

$$V = \frac{(DPM_{\text{Probe}} - DPM_{\text{Nullwert}}) \times 1000}{10 \times DPM_{\text{Maximalwert}} \times 0,8 \times t \times E}$$

<i>V</i>	Anfangsgeschwindigkeit [nkat/mg]
<i>t</i>	Inkubationszeit [s]
<i>E</i>	Enzymmenge [mg]
0,8	Umrechnungsfaktor, da nur 800 µl der organischen Phase (1000 µl) vermessen wurden
<i>DPM</i>	Messwert (Zerfälle pro Minute)
<i>DPM</i> <sub>Nullwert</sub>	Messwert der Blindprobe (Ethanol statt Substrat)
<i>DPM</i> <sub>Maximalwert</sub>	Messwert von 1 µl UDP-D-Glucose Lösung (1 % 0,016 mM [6- <sup>3</sup> H]UDPG und 99 % 101 mM UDPG)

Um die optimalen Reaktionsbedingungen zu bestimmen, wurde in den Assays der pH-Wert, die Inkubationstemperatur und die Inkubationszeit variiert. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde bei gleicher UDP-D-Glucose Konzentration die Konzentration an Akzeptor-Molekül verändert und umgekehrt. Die Auswertung der erhaltenen Sättigungskurven erfolgte mit dem *Regression Wizard* der Software SigmaPlot.

#### 4.3.5 Experimente zur Funktionalität in planta

##### 4.3.5.1 Injektion von Substratlösungen

Um zu demonstrieren, dass auch nicht in der Erdbeerfrucht vorkommende Substrate *in planta* glucosyliert werden, wurden verschiedene Substratlösungen in reife Erdbeerfrüchte injiziert. Dazu wurden 10 mM Lösungen von 3-Hydroxycumarin, 2-Naphthol (beide in 10 % Ethanol) und 3-Hydroxyflavon (in wässriger alkalischer Lösung) hergestellt. Ein Tag nach Injektion mit einer Sterican-Nadel (Gr. 20; 0,4 x 20 mm; Braun, Melsungen) erfolgte die Ernte der Erdbeeren, die wie unter 4.3.5.6 beschrieben aufgearbeitet und mit LC-ESI-MS analysiert wurden. Als Kontrolle erfolgte die Injektion des Lösungsmittels ohne das entsprechende Substrat. Die Kontrollen wurden analog aufgearbeitet und analysiert.

##### 4.3.5.2 Konstruktion von pBI-*FaGT1i*

Um die Genexpression der *FaGT1* herabzuregulieren, wurde ein *intron-hairpin* (ihp)-Konstrukt entworfen, das einen Teil der *FaGT1*-Sequenz in *sense* und *antisense* Richtung enthielt und durch ein Intron der Chinon-Oxidoreduktase (*FaQR*) aus Erdbeeren getrennt ist (Hoffmann et al., 2006; Raab et al., 2006). Dazu wurde zunächst mit der Phusion Polymerase und den Primern *FaGT1\_EcoRI\_F* und *FaGT1\_XhoI\_R* ein PCR-Produkt mit glatten Enden erzeugt (4.3.1.2). Durch anschließenden Restriktionsverdau mit *SpeI* (4.3.1.5) wurde ein Fragment von etwa 500 bp erzeugt, das sowohl in *sense* als auch in *antisense* Richtung in den Vektor pBI121 ligiert wurde, der bereits ein Intron aus Erdbeeren enthielt (Vancanneyt et al., 1990; Hoffmann et al., 2006). Der Vektor wurde zunächst mit *XbaI* linearisiert und die Restriktionsschnittstelle wurde aufgefüllt (4.3.1.5). Nach einem zweiten Restriktionsverdau mit *NheI* wurde das Fragment in *sense* Richtung ligiert (4.3.1.6). Der richtige Einbau des DNA-Fragments wurde in einer Kolonie-PCR (4.3.1.9) mit den Primern *FaGT1\_EcoRI\_F* und T7 überprüft. Anschließend wurde das erhaltene Plasmid

mit *Ecl*136II und *SpeI* geschnitten (4.3.1.5) und das DNA-Fragment wurde in *antisense* Richtung ligiert (4.3.1.6). Die Kontrolle der Ligation und Transformation erfolgte wiederum durch Kolonie-PCR mit den Primern Fa\_Intron\_F und T7 (4.3.1.9). Das entstandene Konstrukt wurde pBI-*FaGT1i* genannt.

#### 4.3.5.3 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Das Konstrukt pBI-*FaGT1i* wurde durch *Agrobacterium tumefaciens* AGLO Zellen in Erdbeerfrüchte eingebracht. Dazu wurden zunächst nach einem Protokoll von Weigel und Glazebrook (2002) kompetente *A. tumefaciens* Zellen hergestellt. Ein ml einer Übernachtskultur wurde in 200 ml LB-Medium verdünnt und bei 28 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 geschüttelt. Die Zellen wurden bei 4 000 g für 10 Minuten pelletiert und mit sterilem TE-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 0,1 Volumina LB-Medium resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Transformation von pBI-*FaGT1i* erfolgte ebenfalls nach einer Methode von Weigel und Glazebrook (2002). Kompetente *A. tumefaciens* Zellen (250 µl) wurden auf Eis aufgetaut und mit 20 µl einer Plasmid-Präparation aus *E. coli* versetzt. Die Mischung wurde 5 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 5 Minuten in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Daraufhin wurde der Ansatz für 5 Minuten in einem Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde die Mischung für 4 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Medium wurde durch kurzes Zentrifugieren wieder entfernt und die Zellen wurden auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die nach etwa zwei Tagen erhaltenen Kolonien wurden mit Kolonie-PCR (4.3.1.9) und den Primern FaGT1\_EcoRI\_F und Fa\_Intron\_R überprüft. Von positiven Kolonien wurden Glycerinkulturen (4.3.1.11) für die Langzeitlagerung und Flüssigkulturen für die Transfektion angelegt.

#### 4.3.5.4 Transfektion der Erdbeeren mit *Agrobacterium tumefaciens*

Die *A. tumefaciens* Flüssigkultur wurde drei Tage bei 28 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,8 geschüttelt. Etwa 50 ml Kultur wurden 10 min bei 4 000 g zentrifugiert und mit 10 ml MMA-Medium gewaschen (Spolaore et al., 2001; Hoffmann et al., 2006). Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 2,5 ml MMA-Medium resuspendiert und für die Transfektion verwendet. Etwa 14 Tage nach der Bestäubung sind die resuspendierten Zellen in mittelgroße grüne Früchte

mit einer 1 ml Spritze und einer Sterican-Nadel (Gr. 20; 0,4 x 20 mm; Braun) gleichmäßig injiziert worden. Reife Früchte mit dunklen Achänen wurden etwa 14 Tage nach der Injektion geerntet und bei -80 °C gelagert.

#### 4.3.5.5 Genexpressionsanalyse der transfizierten Früchte

Die transfizierten Früchte wurden einzeln gefriergetrocknet und mit Mörser und Pistill zerrieben. Aus etwa 50 mg lyophilisiertem Pulver wurde mit der unter 4.3.1.1 beschriebenen Methode RNA isoliert. Mögliche DNA-Kontaminationen wurden durch Inkubation mit DNase I entfernt (30 Min., 37 °C).

- 3 µg RNA
- 3 µl 10× Puffer (Fermentas)
- 3 µl DNase I (Fermentas)
- Wasser (Gesamtvolumen 30 µl)

Anschließend wurde die DNase durch Extraktion mit Phenol/Chloroform (1:1) entfernt, die RNA mit Natriumacetat gefällt und in 20 µl Wasser gelöst. Die reverse Transkription erfolgte mit dem iScript cDNA Synthesis Kit (4.3.3.2).

Zur Quantifizierung wurden analog zu 4.3.3.3 die Primer FaGT1\_qPCR\_F und FaGT1\_qPCR\_R konstruiert (4.1.6). Als Referenzgen ist eine Sequenz für ein *DNA Binding Protein (DBP)* verwendet worden (Schaart et al., 2002). Die PCR-Reaktion wurde wie folgt pipettiert.

- |         |   |
|---------|---|
| 6,0 µl  | 10× Thermopol-Puffer (New England Biolabs)  |
| 1,2 µl  | dNTPs (10 mM)                               |
| 2,4 µl  | Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)                |
| 2,4 µl  | Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)               |
| 5,0 µl  | cDNA  |
| 0,6 µl  | <i>Taq</i> Polymerase (New England Biolabs) |
| 42,4 µl | Wasser                                      |

Da für die Genexpressionsanalyse der transfizierten Früchte kein Thermocycler mit Fluoreszenz-Detektion zur Verfügung stand, wurden nach 25, 30, 35 und 40 Zyklen jeweils 10 µl der PCR-Reaktion entnommen und auf ein Agarose-Gel aufgetragen (4.3.1.3). Folgendes Temperaturprogramm wurde für die semi-quantitative RT-PCR verwendet.

2 Min. bei 94 °C  
40× { 15 Sek. bei 94 °C  
30 Sek. bei 58 °C  
30 Sek. bei 72 °C

#### 4.3.5.6 Metabolitenanalyse der transfizierten Früchte

50 mg des lyophilisierten Pulvers wurden mit 250 µl Methanol versetzt, das 0,2 mg/ml 4-Methylumbelliferyl-β-glucuronid als internen Standard enthielt. Die Extraktion erfolgte durch 1-minütiges Vortexen und 5 Minuten im Ultraschallbad. Anschließend wurde bei 16 100 g für 10 Minuten abzentrifugiert und 200 µl des Überstandes wurden vorsichtig entnommen. Das Lösungsmittel wurde im *Speed-Vac* entfernt und der Rückstand in 35 µl Wasser gelöst. Um ungelöste Bestandteile zu entfernen, wurde kurz zentrifugiert (16 100 g, 5 Min.) und der klare Überstand wurde direkt für die Analytik per LC-ESI-MS eingesetzt. Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeiten, Molekülionen und MS<sup>2</sup>-Spektren mit Referenzsubstanzen und Literaturdaten. Die Ionenspuren [M]<sup>+</sup>, [M+H]<sup>+</sup>, [M-H]<sup>-</sup> wurden mit der Software QuantAnalysis 1.5 (Bruker Daltonics) integriert und auf den internen Standard bezogen. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in *Box-Whisker-Plots* mit Hilfe der Software SigmaPlot. Signifikanztests wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test durchgeführt (Hart, 2001), der mit der Software R berechnet wurde.



## 5 LITERATUR

**Aaby, K., Skrede, G. und Wrolstad, R.E.** (2005) Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4032-4040.

**Achnine, L., Huhman, D.V., Farag, M.A., Sumner, L.W., Blount, J.W. und Dixon, R.A.** (2005) Genomics-based selection and functional characterization of triterpene glycosyltransferases from the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.* **41**, 875-887.

**Aharoni, A. und O'Connell, A.P.** (2002) Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *J. Exp. Bot.* **53**, 2073-2087.

**Aharoni, A., Keizer, L.C.P., Bouwmeester, H.J., Sun, Z., Alvarez-Huerta, M., Verhoeven, H.A., Blaas, J., van Houwelingen, A.M.M.L., de Vos, R.C.H., van der Voet, H., Jansen, R.C., Guis, M., Mol, J., Davis, R.W., Schena, M., van Tunen A.J. und O'Connell, A.P.** (2000) Identification of the *SAAT* gene involved in strawberry flavour biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell*, **12**, 647-661.

**Aharoni, A., Keizer, L.C.P., van den Broeck, H.C., Blanco-Portales, R., Munoz-Blanco, J., Bois, G., Smit, P., de Vos, R.C.H. und O'Connell, A.P.** (2002) Novel insights into vascular, stress, and auxin-dependent and -independent gene expression programs in strawberry, a non-climacteric fruit. *Plant Physiol.* **129**, 1019-1031.

**Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J.** (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.

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

**Andersen, Ø.M., Fossen, T., Torskangerpoll, K., Fossen, A. und Hauge, U.** (2004) Anthocyanin from strawberry (*Fragaria ananassa*) with the novel aglycone, 5-carboxypyranopelargonidin. *Phytochemistry*, **65**, 405-410.

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

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

**Asif, M.H., Dhawan, P. und Nath, P.** (2000) A simple procedure for the isolation of high quality RNA from ripening banana fruit. *Plant Mol. Biol. Rep.* **18**, 109-115.

**Bakker, J., Bridle, P. und Bellworthy, S.J.** (1994) Strawberry juice colour: a study of the quantitative and qualitative pigment composition of juices from 39 genotypes. *J. Sci. Food Agric.* **64**, 31-37.

**Baneyx, F. und Mujacic, M.** (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnol.* **22**, 1399-1408.

**Bartholomew, D.M., van Dyk, D.E., Lau, S.-M.C., O'Keefe D.P., Rea, P.A. und Viitanen, P.V.** (2002) Alternate energy-dependent pathways for the vacuolar uptake of glucose and glutathione conjugates. *Plant Physiol.* **130**, 1562-1572.

**Benítez-Burraco, A., Blanco-Portales, R., Redondo-Nevado, J., Bellido, M.L., Moyano, E., Caballero, J.-L. und Munoz-Blanco, J.** (2003) Cloning and characterization of two ripening related strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) pectate lyase genes. *J. Exp. Bot.* **54**, 633-645.

**Blanco-Portales, R., Medina-Escobar, N., López-Ráez, J.A., González-Reyes, J.A., Villalba, J.M., Moyano, E., Caballero, J.L. und Munoz-Blanco, J.** (2002) Cloning, expression and immunolocalization pattern of a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler). *J. Exp. Bot.* **53**, 1723-1734.

**Blanco-Portales, R., López-Ráez, J.A., Bellido, M.L., Moyano, E., Dorado, G., González-Reyes, J.A., Caballero, J.L. und Munoz-Blanco, J.** (2004) A strawberry fruit-specific and ripening-related gene codes for a HyPRP protein involved in polyphenol anchoring. *Plant Mol. Biol.* **55**, 763-780.

**Boss, P.K., Davies, C. und Robinson, S.P.** (1996a) Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol.* **111**, 1059-1066.

**Boss, P.K., Davies, C. und Robinson, S.P.** (1996b) Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Mol. Biol.* **32**, 565-569.

**Bowles, D.** (2002) A multigene family of glycosyltransferases in a model plant, *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Soc. Transact.* **30**, 301-306.

**Bowles, D., Isayenkova, J., Lim, E.-K. und Poppenberger, B.** (2005) Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 254-263.

**Bowles, D., Lim, E.-K., Poppenberger, B. und Vaistij, F.E.** (2006) Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 567-597.

**Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

**Brazier-Hicks, M. und Edwards, R.** (2005) Functional importance of the family 1 glucosyltransferase UGT72B1 in the metabolism of xenobiotics in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **42**, 556-566.

**Brugliera, F., Holton, T.A., Stevenson, T.W., Farcy, E., Lu, C.-Y. und Cornish E.C.** (1994) Isolation and characterization of a cDNA clone corresponding to the *Rt* locus of *Petunia hybrida*. *Plant J.* **5**, 81-92.

**Campbell, J.A., Davies, G.J., Bulone, V. und Henrissat, B.** (1997) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* **326**, 929-942.

**Cheng, G.W. und Breen, P.J.** (1991) Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentration of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **116**, 865-869.

**Cheng, G.W., Malencik, D.A. und Breen, P.J.** (1994) UDP-glucose:flavonoid O-glucosyltransferase from strawberry fruit. *Phytochemistry*, **35**, 1435-1439.

**Chong, J., Baltz, R., Schmitt, C., Beffa, R., Fritig, B. und Saindrenan, P.** (2002) Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc:phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *Plant Cell*, **14**, 1093-1107.

**Civello, P.M., Powell, A.L.T., Sabehat, A. und Bennett, A.B.** (1999) An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiol.* **121**, 1273-1279.

**Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J. und Henrissat, B.** (2003) An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* **328**, 307-317.

**Davies, C., Boss, P.K. und Robinson, S.P.** (1997) Treatment of grape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. *Plant Physiol.* **115**, 1155-1161.

**Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K. und Mattick, J.S.** (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4008.

**Fedoroff, N.V., Furtek, D.B. und Nelson, O.E.** (1984) Cloning of the *bronze* locus in maize by a simple and generalizeable procedure using the transposable controlling element *Activator (Ac)*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 3825-3829.

**Fire, A., Xu, S.Q., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. und Mello, C.C.** (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.

**Ford, C.M., Boss, P.K. und Høj, P.B.** (1998) Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize *Bronze-1* locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **273**, 9224-9233.

**Forkmann, G. und Martens, S.** (2001) Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 155-160.

**Fossen, T., Rayyan, S. und Andersen, Ø.M.** (2004) Dimeric anthocyanins from strawberry (*Fragaria ananassa*) consisting of pelargonidin 3-glucoside covalently linked to four flavan-3-ols. *Phytochemistry*, **65**, 1421-1428.

**Fraissinet-Tachet, L., Baltz, R., Chong, J., Kauffmann, S., Fritig, B. und Saindrenan, P.** (1998) Two tobacco genes induced by infection, elicitor and salicylic acid encode glucosyltransferases acting on phenylpropanoids and benzoic acid derivatives, including salicylic acid. *FEBS Lett.* **437**, 319-323.

**Franke, W.** (1997) Nutzpflanzenkunde. Nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

**Frohmann, M.A., Dush, M.K. und Martin, G.R.** (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 8998-9002.

**Frydman, A., Weisshaus, O., Bar-Peled, M., Huhman, D.V., Sumner, L.W., Marin, F.R., Lewinsohn, E., Fluhr, R., Gressel, J. und Eyal, Y.** (2004) Citrus fruit bitter flavours: isolation and functional characterization of the gene *Cm1,2RhaT* encoding a 1,2 rhamnosyltransferase, a key enzyme in the biosynthesis of the bitter flavonoids of citrus. *Plant J.* **40**, 88-100.

**Fukuchi-Mizutani, M., Okuhara, H., Fukui, Y., Nakao, M., Katsumoto, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Kusumi, T., Hase, T. und Tanaka, Y.** (2003) Biochemical and molecular characterization of a novel UDP-glucose:anthocyanin 3'-O-glucosyltransferase, a key enzyme for blue anthocyanin biosynthesis, from gentian. *Plant Physiol.* **132**, 1652-1663.

**Gachon, C., Baltz, R. und Saindrenan, P.** (2004) Over-expression of a scopoletin glucosyltransferase in *Nicotiana tabacum* leads to precocious lesion formation during hypersensitive response to tobacco mosaic virus but does not affect virus resistance. *Plant Mol. Biol.* **54**, 137-146.

**Gachon, C.M.M., Langlois-Meurinne, M. und Saindrenan, P.** (2005) Plant secondary glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends Plant Sci.* **10**, 542-549.

**Giovannoni, J.** (2001) Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 725-749.

**Giusti, M.M., Rodriguez-Saona, L.E., Griffin, D. und Wrolstadt, R.E.** (1999) Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4657-4664.

**Given, N.K., Venis, M.A. und Grierson, D.** (1988a) Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta*, **174**, 402-406.

**Given, N.K., Venis, M.A. und Grierson, D.** (1988b) Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis in ripening strawberry fruit. *J. Plant Physiol.* **133**, 25-30.

**Gomes da Silva, M.D.R. und Chaves das Neves, H.J.** (1999) Complementary use of hyphenated purge-and-trap gas chromatography techniques and sensory analysis in the aroma profiling of strawberries (*Fragaria ananassa*). *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4568-4573.

**Grubb, C.D., Zipp, B.J., Ludwig-Müller, J., Masuno, M.N., Molinski, T.F. und Abel, S.** (2004) Arabidopsis glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *Plant J.* **40**, 893-908.

**Häkkinen, S.H. und Törrönen, A.R.** (2000) Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Res. Int.* **33**, 517-524.

**Halbwirth, H., Puhl, I., Haas, U., Jezik, K., Treutter, D. und Stich, K.** (2006) Two-phase flavonoid formation in developing strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit. *J. Agric. Food. Chem.* **54**, 1479-1485.

**Hanahan, D.** (1985) DNA Cloning. Volume 1, London, IRL Press.

**Hancock, J.F.** (1999) Strawberries. New York, CABI Publishing.

**Hannum, S.M.** (2004) Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **44**, 1-17.

**Hart, A.** (2001) Mann-Whitney test is not just a test of medians: differences in spread can be important. *BMJ*, **323**, 391-393.

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

**Heldt, H.W.** (2003) Pflanzenbiochemie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.

**Henning, W.** (1981) Flavonolglykoside der Erdbeeren (*Fragaria x ananassa* Duch.), Himbeeren (*Rubus idaeus* L.) und Brombeeren (*Rubus fruticosus* L.). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **173**, 180-187.

**Heo, H.J und Lee, C.Y.** (2005) Strawberry and its anthocyanins reduce oxidative stress-induced apoptosis in PC12 cells. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1984-1989.

**Herrmann, K.** (1989) Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **28**, 315-347.

**Hirotsani, M., Kuroda, R., Suzuki, H. und Yoshikawa, T.** (2000) Cloning and expression of UDP-glucose:flavonoid 7-O-glucosyltransferase from hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis*. *Planta*, **210**, 1006-1013.

**Hoffmann, T., Kalinowski, G. und Schwab, W.** (2006) RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*) by agroinfiltration. A rapid assay for gene function analysis. *Plant J.* **48**, 818-826.

**Horvath, D.M. und Chua, N.-H.** (1996) Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. *Plant Mol. Biol.* **31**, 1061-1072.

**Hou, B., Lim, E.-K., Higgins, G.S. und Bowles, D.J.** (2004) N-Glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol. Chem.* **279**, 47822-47832.



**Hughes, J. und Hughes, M.A.** (1994) Multiple secondary plant product UDP-glucose glucosyltransferase genes expressed in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cotyledons. *DNA Seq.* **5**, 41-49.

**Hüsken, A., Baumert, A., Strack, D., Becker, H.C., Möllers, C. und Milkowski, C.** (2005a) Reduction of sinapate ester content in transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) by dsRNAi-based suppression of *BnSGT1* gene expression. *Mol. Breeding*, **16**, 127-138.

**Hüsken, A., Baumert, A., Milkowski, C., Becker H.C., Strack, D. und Möllers, C.** (2005b) Resveratrol glucoside (piceid) synthesis in seeds of transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **111**, 1553-1562.

**Iannetta, P.P.M., Laarhoven, L.-J., Medina-Escobar, N., James, E.K., McManus, M.T., Davies, H.C. und Harren, F.J.M.** (2006) Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. *Physiol. Plant.* **127**, 247-259.

**Isayenkova, J., Wray, V., Nimtz, M., Strack, D. und Vogt, T.** (2006) Cloning and functional characterisation of two regioselective flavonoid glucosyltransferases from *Beta vulgaris*. *Phytochemistry*, **67**, 1598-1612.

**Jackson, R.G., Lim, E.-K., Li, Y., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Hoggett, J., Ashford, D.A. und Bowles, D.J.** (2001) Identification and biochemical characterization of an *Arabidopsis* indol-3-acetic acid glucosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **276**, 4350-4356.

**Jackson, R.G., Kowalczyk, M., Li, Y., Higgins, G., Ross, J., Sandberg, G. und Bowles, D.J.** (2002) Over-expression of an *Arabidopsis* gene encoding a glucosyltransferase of indole-3-acetic acid: phenotypic characterisation of transgenic lines. *Plant J.* **32**, 573-583.

**Jefferson, A.R.** (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**, 387-405.

**Jiménez-Bermúdez, S., Redondo-Nevado, J., Muñoz-Blanco, J., Caballero, J.L., López-Aranda, J.M., Valpuesta, V., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M.A. und Mercado, J.A.** (2002) Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiol.* **128**, 751-759.

**Jones, P. und Vogt, T.** (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta*, **213**, 164-174.

**Jones, P.R., Møller, B.L. und Høj, P.B.** (1999) The UDP-glucose:*p*-hydroxymandelonitrile-O-glucosyltransferase that catalyzes the last step in synthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor*. *J. Biol. Chem.* **274**, 35483-35491.

**Jones, P., Messner, B., Nakajima, J.-I., Schäffner, A.R. und Saito, K.** (2003) UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavonol glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **278**, 43910-43918.

**Kaminaga, Y., Nagutsu, A., Akiyama, T., Sugimoto, N., Yamazaki, T., Maitani, T. und Mizukami, H.** (2003) Production of unnatural glucosides of curcumin with drastically enhanced water solubility by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *FEBS Lett.* **555**, 311-316.

**Kita, M., Hirata, Y., Moriguchi, T., Endo-Inagaki, T., Matsumoto, R., Hasegawa, S., Suhayda, C.G. und Omura, M.** (2000) Molecular cloning and characterization of a novel gene encoding limonoid UDP-glucosyltransferase in *Citrus*. *FEBS Lett.* **469**, 173-178.

**Ko, J.H., Kim, B.G., Hur, H.-G., Lim, Y. und Ahn, J.-H.** (2006) Molecular cloning, expression and characterization of a glycosyltransferase from rice. *Plant Cell Rep.* **25**, 741-746.

**Kramer, C.M., Prata, R.T.N., Willits, M.G., de Luca, V., Steffens, J.C. und Graser, G.** (2003) Cloning and regiospecificity studies of two flavonoid glucosyltransferases from *Allium cepa*. *Phytochemistry*, **64**, 1069-1076.

**Kreuz, K., Tommasini, R. und Martinoia, E.** (1996) Old enzymes for a new job. Herbicide detoxification in plants. *Plant Physiol.* **111**, 349-353.

**Kristensen, C., Morant, M., Olsen, C.E., Ekstrøm, C.T., Galbraith, D.W., Møller, B.L. und Bak, S.** (2005) Metabolic engineering of dhurrin in transgenic *Arabidopsis* plants with marginal inadvertent effects on the metabolome and transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 1779-1784.

**Kroon, J., Souer, E., de Graaff, A., Xue, Y., Mol, J. und Koes, R.** (1994) Cloning and structural analysis of the anthocyanin pigmentation locus *Rt* of *Petunia hybrida*: characterization of insertion sequences in two mutant alleles. *Plant J.* **5**, 69-80.

**Kubo, A., Arai, Y., Nagashima, S. und Yoshikawa, T.** (2004) Alteration of sugar donor specificities of plant glycosyltransferases by a single point mutation. *Arch. Biochem. Biophys.* **429**, 198-203.

**Langlois-Meurinne, M., Gachon, C.M.M. und Saindrenan, P.** (2005) Pathogen-responsive expression of glycosyltransferase genes *UGT73B3* and *UGT73B5* is necessary for resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tomato* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **139**, 1890-1901.

**Lanot, A., Hodge, D., Jackson, R.G., George, L.E., Lim, E.-K., Vaistij, F.E. und Bowles, D.J.** (2006) The glucosyltransferase *UGT72E2* is responsible for monolignol 4-O-glucoside production in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **48**, 286-295.

**Latza, S. und Berger, R.G.** (1997) 1-O-*trans*-cinnamoyl- $\beta$ -D-glucopyranose: alcohol cinnamoyltransferase activity in fruits of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Z. Naturforsch.* **52**, 747-755.

**Lazo, G.R., Pascal, A.S. und Ludwig, R.A.** (1991) A DNA transformation competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *BioTechnol.* **9**, 963-967.

**Lee, H. und Raskin, I.** (1999) Purification, cloning and expression of a pathogen inducible UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *J. Biol. Chem.* **274**, 36637-36642.

**Lehfeldt, C., Shirley, A.M., Meyer, K., Ruegger, M.O., Cusumano, J.C., Viitanen, P.V., Strack, D. und Chapple, C.** (2000) Cloning of the *SNG1* gene of *Arabidopsis* reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. *Plant Cell*, **12**, 1295-1306.

**Li, Y., Baldauf, S., Lim, E.-K. und Bowles, D.J.** (2001) Phylogenetic analysis of the UDP-glucosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **276**, 4338-4343.

**Lim, E.-K.** (2005) Plant glycosyltransferases and their potential as novel biocatalysts. *Chem. Eur. J.* **11**, 5486-5494.

**Lim, E. und Bowles, D.J.** (2004) A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *EMBO J.* **23**, 2915-2922.

**Lim, E., Li, Y., Parr, A., Jackson, R., Ashford, D.A. und Bowles, D.J.** (2001) Identification of glucosyltransferase genes involved in sinapate metabolism and synthesis in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **276**, 4344-4349.

**Lim, E., Doucet, C.J., Li, Y., Elias, L., Worrall, D., Spencer, S.P., Ross, J. und Bowles, D.J.** (2002) The activity of *Arabidopsis* glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and other benzoates. *J. Biol. Chem.* **277**, 586-592.

**Lim, E., Baldauf, S., Li, Y., Elias, L., Worrall, D., Spencer, S.P., Jackson, R.G., Taguchi, G., Ross, J. und Bowles, D.J.** (2003a) Evolution of substrate recognition across a multigene family of glycosyltransferases in *Arabidopsis*. *Glycobiology*, **13**, 139-145.

**Lim, E.-K., Higgins, G.S., Li, Y. und Bowles, D.J.** (2003b) Regioselectivity of glucosylation of caffeic acid is maintained *in planta*. *Biochem. J.* **373**, 987-992.

**Lim, E.-K., Ashford, D.A., Hou, B., Jackson, R.G. und Bowles, D.J.** (2004) *Arabidopsis* glycosyltransferases as biocatalysts in fermentation for regioselective synthesis of diverse quercetin glucosides. *Biotechnol. Bioeng.* **87**, 623-631.

**Lim, E.-K., Jackson, R.G. und Bowles, D.J.** (2005a) Identification and characterisation of *Arabidopsis* glycosyltransferases capable of glucosylating coniferyl aldehyde and sinapyl aldehyde. *FEBS Lett.* **579**, 2802-2806.

**Lim, E., Doucet, C.J., Hou, B., Jackson, R.G., Abrams, S.R. und Bowles, D.J.** (2005b) Resolution of (+)-abscisic acid using an *Arabidopsis* glycosyltransferase. *Tetrahedron: Asymmetry*, **16**, 143-147.

**Lim, E.-K., Ashford, D.A. und Bowles, D.J.** (2006) The synthesis of small-molecule rhamnosides through the rational design of a whole-cell biocatalysis system. *ChemBioChem*, **7**, 1181-1185.

**Livak, K.J. und Schmittgen T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, **25**, 402-408.

**Lopes-da-Silva, F., de Pascual-Teresa, S., Rivas-Gonzalo, J. und Santos-Buelga, C.** (2002) Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection. *Eur. Food. Res. Technol.* **214**, 248-253.

**Lottspeich, F. und Zorbas, H.** (1998) Bioanalytik. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.

**Loutre, C., Dixon, D.P., Brazier, M., Slater, M., Cole, D.J. und Edwards, R.** (2003) Isolation of a glycosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* active in the metabolism of the persistent pollutant 3,4-dichloroaniline. *Plant J.* **34**, 485-493.

**Lunkenbein, S.** (2006) Reifekorrelierte Enzyme des Sekundärstoffwechsels von Erdbeeren (*Fragaria x ananassa*). Expression und Funktion. Dissertation, Technische Universität München.

**Lunkenbein, S., Bellido, M.L., Aharoni, A., Salentijn, E.M.J., Kaldenhoff, R., Coiner, H.A., Munoz-Blanco, J. und Schwab, W.** (2006a) Cinnamate metabolism in ripening fruit. Characterization of a UDP-glucose:cinnamate glucosyltransferase from strawberry. *Plant Physiol.* **140**, 1047-1058.

**Lunkenbein, S., Coiner, H.A., de Vos, R.C.H., Schaart, J.G., Boone M.J., Krens, F.A., Schwab, W. und Saletijn, E.M.J.** (2006b) Molecular characterization of a stable antisense chalcone synthase phenotype in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *J. Agric. Food Chem.* **54**, 2145-2153.

**Macheix, J.-J., Fleuriet, A. und Billot, J.** (1990) Fruit Phenolics. Boca Raton, CRC Press.

**Mackenzie, P.I., Owens, I.S., Burchell, B., Bock, K.W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D.W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Chowdhury, J.R., Ritter, J.K., Schachter, H., Tephly, T.R., Tipton, K.F. und Nebert, D.W.** (1997) The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics*, **7**, 255-269.

**Manning, K.** (1998) Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta*, **205**, 622-631.

**Marrs, K.A., Alfenito, M.R., Lloyd, A.M. und Walbot, V.** (1995) A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature*, **375**, 397-400.

**Martin, R.C., Mok, M.C. und Mok, D.W.S.** (1999a) A gene encoding the cytokinin enzyme zeatin O-xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* **120**, 553-557.

**Martin, R.C., Mok, M.C. und Mok, D.W.S.** (1999b) Isolation of a cytokinin gene, *ZOG1*, encoding zeatin *O*-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 284-289.

**Martin, R.C., Mok, M.C., Habben, J.E. und Mok, D.W.S.** (2001) A maize cytokinin gene encoding an *O*-glucosyltransferase specific to *cis*-zeatin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 5922-5926.

**Mato, M., Ozeki, Y., Itoh, Y., Higeta D., Yoshitama, K., Teramoto, S., Aida, R., Ishikura, N. und Shibata, M.** (1998) Isolation and characterization of a cDNA clone of UDP-galactose:flavonoid 3-*O*-galactosyltransferase (UF3GaT) expressed in *Vigna mungo* seedlings. *Plant Cell Physiol.* **39**, 1145-1155.

**Matros, A. und Mock, H.-P.** (2004) Ectopic expression of a UDP-glucose:phenylpropanoid glucosyltransferase leads to increased resistance of transgenic tobacco plants against infection with *potato virus Y*. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1185-1193.

**Mazza, G. und Miniati, E.** (1993) Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. Boca Raton, CRC Press.

**Medina-Escobar, N., Cárdenas, J., Valpuesta, V., Munoz-Blanco, J. und Caballero, J.L.** (1997a) Cloning and characterization of cDNAs from genes differentially expressed during the strawberry fruit ripening process by a MAST-PCR-SBDS method. *Anal. Biochem.* **248**, 288-296.

**Medina-Escobar, N., Cárdenas, J., Moyano, E., Caballero, J.L. und Munoz-Blanco, J.** (1997b) Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants. *Plant Mol. Biol.* **34**, 867-877.

**Medina-Escobar, N., Cárdenas, J., Munoz-Blanco, J. und Caballero, J.L.** (1998) Cloning and molecular characterization of a strawberry fruit ripening-related cDNA corresponding a mRNA for a low-molecular-weight heat-shock-protein. *Plant Mol. Biol.* **36**, 33-42.

**Meßner, B., Thulke, O. und Schöffner, A.R.** (2003) Arabidopsis glucosyltransferases with activities toward both endogenous and xenobiotic substrates. *Planta*, **217**, 138-146.

**Mikkonen, T.P., Hukkanen, K.R., Määttä, K.R., Kokko, H.I., Törrönen, A.R., Kärenlampi, S.O. und Karjalainen, R.O.** (2002) Flavonoid content in strawberry cultivars. *Acta Hort.* **567**, 815-818.

**Milkowski, C., Baumert, A. und Strack, D.** (2000) Identification of four *Arabidopsis* genes encoding hydroxycinnamate glucosyltransferases. *FEBS Lett.* **486**, 183-184.

**Milkowski, C., Baumert, A., Schmidt, D., Nehlin, L. und Strack, D.** (2004) Molecular regulation of sinapate ester metabolism in *Brassica napus*: expression of genes, properties of the encoded proteins and correlation of enzyme activities with metabolite accumulation. *Plant J.* **38**, 80-92.

**Miller, K.D., Guyon, V., Evans, J.N.S., Shuttleworth, W.A. und Taylor, L.P.** (1999) Purification, cloning, and heterologous expression of a catalytically efficient flavonol 3-O-galactosyltransferase expressed in the male gametophyte of *Petunia hybrida*. *J. Biol. Chem.* **274**, 34011-34019.

**Mock, H.-P. und Strack, D.** (1993) Energetics of the uridine 5'-diphosphoglucose:hydroxycinnamic acid acyl-glucosyltransferase reaction. *Phytochemistry*, **32**, 575-579.

**Moehs, C.P., Allen, P.V., Friedman, M. und Belknap, W.R.** (1997) Cloning and expression of solanidine UDP-glucose glucosyltransferase from potato. *Plant J.* **11**, 227-236.

**Mol, J., Grotewold, E. und Koes, R.** (1998) How genes paint flowers and seeds. *Trends Plant Sci.* **3**, 212-217.



**Moraga, A.R., Nohales, P.F., Pérez, J.A.F. und Gómez-Gómez, L.** (2004) Glucosylation of the saffron apocarotenoid crocetin by a glucosyltransferase isolated from *Crocus sativus* stigmas. *Planta*, **219**, 955-966.

**Morita, Y., Hoshino, A., Kikuchi, Y., Okuhara, H., Ono, E., Tanaka, Y., Fukui, Y., Saito, N., Nitasaka, E., Noguchi, H. und Iida, S.** (2005) Japanese morning glory *dusky* mutants displaying reddish-brown or purplish-gray flowers are deficient in a novel glycosylation enzyme for anthocyanin biosynthesis, UDP-glucose:anthocyanidin 3-O-glucoside-2''-O-glucosyltransferase, due to 4-bp insertions in the gene. *Plant J.* **42**, 353-363.

**Moyano, E., Portero-Robles, I., Medina-Escobar, N., Valpuesta, V., Muñoz-Blanco, J. und 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.

**Mülhardt, C.** (2006) Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.

**Murota, K., Mitsukuni, Y., Ichikawa, M., Tsushida, T., Miyamoto, S. und Terao, J.** (2004) Quercetin-4'-glucoside is more potent than quercetin-3-glucoside in protection of rat intestinal mucosa homogenates against iron ion-induced lipid peroxidation. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1907-1912.

**O'Donnell, P.J., Truesdale, M.R., Calvert, C.M., Dorans, A., Roberts, M.R. und Bowles, D.J.** (1998) A novel tomato gene that rapidly responds to wound- and pathogen-related signals. *Plant J.*, **14**, 137-142.

**Offen, W., Martinez-Fleites, C., Yang, M., Kiat-Lim, E., Davis, B.G., Tarling, C.A., Ford, C.M., Bowles, D.J. und Davies, G.J.** (2006) Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification. *EMBO J.* **25**, 1396-1405.

**Ogata, J., Itoh, Y., Ispida, M., Yoshida, H. und Ozeki, Y.** (2004) Cloning and heterologous expression cDNAs encoding flavonoid glucosyltransferases from *Dianthus caryophyllus*. *Plant Biotechnol. J.* **21**, 367-375.

**Ogata, J., Kanno, Y., Itoh, Y., Tsugawa, H. und Suzuki, M.** (2005) Anthocyanin biosynthesis in roses. *Nature*, **435**, 757-758.

**Olthof, M.R., Hollmann, P.C.H., Vree, T.B. und Katan, M.B.** (2000) Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *J. Nutr.* **130**, 1200-1203.

**Ono, E., Fukuchi-Mizutani, M., Nakamura, N., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Yamaguchi, M., Nakayama, T., Tanaka, T., Kusumi, T. und Tanaka, Y.** (2006) Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 11075-11080.

**Osbourn, A.E.** (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell*, **8**, 1821-1831.

**Paquette, S., Møller, B.L. und Bak, S.** (2003) On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. *Phytochemistry*, **62**, 399-413.

**Perkins-Veazie, P.** (1995) Growth and ripening of strawberry fruit. *Hortic. Rev.* **17**, 267-297.

**Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., Krska, R., Kuchler, K., Glössl, J., Luschnig, C. und Adam, G.** (2003) Detoxification of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **278**, 47905-47914.

**Poppenberger, B., Fujioka, S., Soeno, K., George, G.L., Vaistij, F.E., Hiranuma, S., Seto, H., Takatsuto, S., Adam, G., Yoshida, S. und Bowles, D.** (2005) The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 15253-15258.

**Raab, T., López-Ráez, J.A., Klein, D., Caballero, J.L., Moyano, E., Schwab, W. und Munoz-Blanco, J.** (2006) FaQR, required for the biosynthesis of the strawberry flavor compound 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, encodes an enone oxidoreductase. *Plant Cell*, **18**, 1023-1037.

**Reymond, P. und Farmer, E.E.** (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 404-411.

**Richman, A., Swanson, A., Humphrey, T., Chapman, R., McGarvey, B., Pocs, R. und Brandle, J.** (2005) Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. *Plant J.* **41**, 56-67.

**Ross, J., Li Y., Lim, E.-K. und Bowles, D.J.** (2001) Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biol.* **2**, 3004.1-3004.6.

**Ryan, J.J.** (1971) Flavonol glycosides of the cultivated strawberry. *J. Food Sci.* **36**, 867-870.

**Sandermann, H.** (1994) Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. *Pharmacogenetics*, **4**, 225-241.

**Sawada, S., Suzuki, H., Ichimaida, F., Yamaguchi, M., Iwashita, T., Fukui, Y., Hemmi, H., Nishino, T. und Nakayama, T.** (2005) UDP-glucuronic acid:anthocyanin glucuronosyltransferase from red daisy (*Bellis perennis*) flowers. *J. Biol. Chem.* **280**, 899-906.

**Schaart, J.G., Salentijn, E.M.J. und Krens, F.A.** (2002) Tissue-specific expression of the  $\beta$ -glucuronidase reporter gene in transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa*) plants. *Plant Cell Rep.* **21**, 313-319.

**Schaefer, B.C.** (1995) Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: New strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal. Biochem.* **227**, 255-273.

**Schieberle, P. und Hofmann, T.** (1997) Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixtures. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 227-232.

**Schreier, P.** (1980) Quantitative composition of volatile constituents in cultivated strawberries, *Fragaria ananassa* cv. Senga Sengana, Senga Litessa and Senga Gourmella. *J. Sci. Food Agric.* **31**, 487-494.

**Sepúlveda-Jiménez, G., Rueda-Benítez, P., Porta, H. und Rocha-Sosa, M.** (2005) A red beet (*Beta vulgaris*) UDP-glucosyltransferase gene induced by wounding, bacterial infiltration and oxidative stress. *J. Exp. Bot.* **56**, 605-611.

**Shao, H., He, X., Achnine, L., Blount, J.W., Dixon, R.A. und Wang, X.** (2005) Crystal structures of a multifunctional triterpene/flavonoid glycosyltransferase from *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, **17**, 3141-3154.

**Spolaore, S., Trainotti, L. und Casadoro, G.** (2001) A simple protocol for transient gene expression in ripe fleshy fruit mediated by *Agrobacterium*. *J. Exp. Bot.* **52**, 845-50.

**Suutarinen, J., Änäkäinen, L. und Autio, K.** (1998) Comparison of light microscopy and spatially resolved fourier transform infrared (FT-IR) microscopy in the examination of cell wall components of strawberries. *Lebensm. Wiss. Technol.* **31**, 595-601.

**Szerszen, J.B., Szczyglowski, K. und Bandurski, R.S.** (1994) *laglu*, a gene from *Zea mays* involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic-acid. *Science*, **265**, 1699-1701.

**Taguchi, G., Yazawa, T., Hayashida, N. und Okazaki, M.** (2001) Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyltransferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin. *Eur. J. Biochem.* **268**, 4086-4094.

**Taguchi, G., Nakamura, M., Hayashida, N. und Okazaki, M.** (2003a) Exogenously added naphthols induce three glycosyltransferases, and are accumulated as glucosides in tobacco cells. *Plant Sci.* **164**, 231-240.

**Taguchi, G., Ubukata, T., Hayashida, N., Yamamoto, H. und Okazaki, M.** (2003b) Cloning and characterization of a glycosyltransferase that reacts on 7-hydroxyl group of coumarin from tobacco cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **420**, 95-102.

**Tanaka, Y., Yonekura, K., Fukuchi-Mizutani, M., Fukui, Y., Fujiwara, H., Ashikari, T. und Kusumi, T.** (1996) Molecular and biochemical characterization of three anthocyanin synthetic enzymes from *Gentiana triflora*. *Plant Cell Physiol.* **37**, 711-716.

**Tattersall, D.B., Bak, S., Jones, P.R., Olsen, C.E., Nielsen, J.K., Hansen M.L., Høj, P.B. und Møller, B.L.** (2001) Resistance to an herbivore through engineered cyanogenic glucoside synthesis. *Science*, **293**, 1826-1828.

**Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.

**Tohge, T., Nishiyama, Y., Hirai, M.Y., Yano, M., Nakajima, J.-I., Awazuhara, M., Inoue, E., Takahashi, H., Goodenowe, D.B., Kitayama, M., Noji, M., Yamazaki, M. und Saito, K.** (2005) Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over-expressing a MYB transcription factor. *Plant J.* **42**, 218-235.

**Törrönen, R. und Määtä, K.** (2002) Bioactive substances and health benefits of strawberries. *Acta Hort.* **567**, 797-803.

**Trainotti, L., Pavanello, A. und Casadoro, G.** (2005) Different ethylene receptors show an increased expression during the ripening of strawberries: does such an increment imply a role for ethylene in the ripening of these non-climacteric fruits? *J. Exp. Bot.* **56**, 2037-2046.

**Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L. und Rocha-Sosa, M.** (1990) Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* **220**, 245-250.

**Veit, M. und Pauli, G.F.** (1999) Major flavonoids from *Arabidopsis thaliana* leaves. *J. Nat. Prod.* **62**, 1301-1303.

**Vogt, T.** (2000) Glycosyltransferases involved in plant secondary metabolism. *In: Evolution of metabolic pathways.* Romeo, J.T. (Hrsg.) Amsterdam, Elsevier, 317-347.

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

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

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

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

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

**Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R., Schuch, W. und Giovannoni, J.** (2002) A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato *Ripening-Inhibitor (Rin)* locus. *Science*, **296**, 343-346.

**Wang, S.Y. und Lin H.-S.** (2000) Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 140-146.

**Warnecke, D.C und Heinz, E.** (1994) Purification of a membrane-bound UDP-glucose:sterol  $\beta$ -D-glucosyltransferase based on its solubility in diethyl ether. *Plant Physiol.* **105**, 1067-1073.

**Warnecke, D.C., Baltrusch, M., Buck, F., Wolter, F.P. und Heinz, E.** (1997) UDP-glucose:sterol glucosyltransferase: cloning and functional expression in *Escherichia coli*. *Plant Mol. Biol.* **35**, 597-603.

**Weigel, D. und Glazebrook, J.** (2002) *Arabidopsis. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbour, Cold Spring Harbour Laboratory Press.

**White, P.J.** (2002) Recent advances in fruit development and ripening: an overview. *J. Exp. Bot.* **53**, 1995-2000.

**Willits, M.G., Giovanni, M., Prata, R.T.N., Kramer, C.M., de Luca, V., Steffens, J.C. und Graser, G.** (2004) Bio-fermentation of modified flavonoids: an example of in vivo diversification of secondary metabolites. *Phytochemistry*, **65**, 31-41.

**Winkel-Shirley, B.** (1999) Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiol. Plant.* **107**, 142-149.

**Winkel-Shirley, B.** (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* **126**, 485-493.

**Xu, Z.-J., Nakajima, M., Suzuki, Y. und Yamaguchi, I.** (2002) Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from adzuki bean seedlings. *Plant Physiol.* **129**, 1285-1295.

**Yamazaki, M., Gong, Z., Fukuchi-Mizutani, M., Fukui, Y., Tanaka, Y., Kusumi, T. und Saito, K.** (1999) Molecular cloning and biochemical characterization of a novel anthocyanin 5-O-glucosyltransferase by mRNA differential display for plant forms regarding anthocyanin. *J. Biol. Chem.* **274**, 7405-7411.

**Yan, Y., Chemler, J., Huang, L., Martens, S. und Koffas, M.A.G.** (2005) Metabolic engineering of anthocyanin biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3617-3623.

**Yoshida, Y. und Tamura, H.** (2005) Variation in concentration and composition of anthocyanins among strawberry cultivars. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **74**, 36-41.

**Yubero-Serrano, E.-M., Moyano, E., Medina-Escobar, N., Munoz-Blanco, J. und Caballero, J.-L.** (2003) Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress. *J. Exp. Bot.* **54**, 1865-1877.



**6 ANHANG**

*Intron des FaGT1-Gens (nach bp 493 des offenen Leserahmens)*

GTACGTGTTACATAATGTTTTGATTCATCACTATCATATTGAAATGCTTCATT  
TAGTTTTATCATGTGTATCCGAACAAAGCAGACATATAACATATAAAGCTCC  
ACATATAAAAGCAGATGGTTTTTTTACTAGCTACCTAACTTGTTGGTCCAAA  
TAAATACAG

*Intron des FaGT5-Gens (nach bp 603 des offenen Leserahmens)*

GTAATGTTTGAATATCTCTTTCAAGCTATTATTGTTAATATTGCAAGAAGTAA  
TGTCCTTCATTCCAATAATATTAGTGGAATTAAGCTATAAACTTTTGCCTAT  
CTGTTTCATGAAAGCTATATATGTTTTGTTCTGACATATCATTTGGTGATATAT  
TTCAG

## LEBENS LAUF

### Persönliche Angaben

Name	Markus Grießer
Anschrift	Buchenstr. 14 89250 Senden
Geburtsdatum	26. Februar 1977
Geburtsort	Ulm

### Hochschulausbildung

März 2003 - August 2006	Promotion am Fachgebiet Biomolekulare Lebensmittel- technologie der Technischen Universität München bei Prof. W. Schwab. Thema der Dissertation: Funktionelle Charakterisierung von Glycosyltransferasen der Erdbeerfrucht ( <i>Fragaria x ananassa</i> ).
August 2002 - Januar 2003	Lebensmittelchemisches Praktikum am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Erlangen. Abschluss: 2. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker.
Januar 2002 - Juni 2002	Praktikum am Australian Wine Research Institute in Adelaide (Australien) bei Prof. M. Herderich.
November 1997 - November 2001	Studium der Lebensmittelchemie an der Julius-Maximilians- Universität Würzburg bei Prof. P. Schreier. Abschluss: 1. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker.

### Schulbildung

1987-1996	Nikolaus-Kopernikus-Gymnasium Weißenhorn. Abschluss: Allgemeine Hochschulreife.
1983-1987	Rektor-Reinhard-Meyer-Grundschule Wullenstetten.

### Zivildienst

1996-1997	Landesbund für Vogelschutz (LBV), Kreisgruppe Neu-Ulm.
-----------	--