



**Hydroxycinnamoyl-Transferasen für UV-B-
Schutzpigmente in der Kiefer, *Pinus sylvestris* L.**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von
Florian Kaffarnik
aus Würzburg

Mai 2001

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Heinrich Sandermann

2. Berichtstatter: Prof. Dr. Jürgen Ebel

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2001

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bisher veröffentlicht:

- **Kaffarnik, F., Heller, W., Sandermann, H.** (2000) Characterization of hydroxycinnamoyl-transferases from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). In: *Polyphenols Communications 2000*. Martens, S., Treutter, D., Forkmann, G. (Hrsg), Technische Universität München.
- **Kaffarnik, F., Heller, W., Sandermann, H.** (1999) UV-B-induzierte Flavonoid-Biosynthese in der Kiefer: Reinigung und Charakterisierung von Hydroxyzimtsäure-Transferasen. 2. Sektionstreffen der Sektion Pflanzliche Naturstoffe der Deutschen Botanischen Gesellschaft in Bonn, Mai 1999 (Vortrag)
- **Kaffarnik, F., Heller, W., Sandermann, H.** (2000) Characterization of hydroxycinnamoyl-transferases from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). XXth International Conference on Polyphenols in Freising-Weihenstephan, September 2000 (Poster).
- **Kaffarnik, F., Heller, W., Sandermann, H.** (2000) Hydroxycinnamoyl-transferases for UV-B-screening pigments in Scots pine. 3. Kurt-Mothes-Doktoranden-Workshop „Sekundärstoffwechsel“ in Halle, September 2000 (Vortrag).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>UV-B-Strahlung</i>	2
1.1.1	Allgemeines	2
1.1.2	UV-B und Ozonschicht	3
1.1.3	UV-B und Pflanzen	7
1.2	<i>Die Kiefer (Pinus sylvestris L.)</i>	14
1.2.1	Systematik	14
1.2.2	Ökologie der Wald-Kiefer	15
1.2.3	Die Kiefer in der Forstwirtschaft	16
1.3	<i>Der allgemeine Phenylpropanstoffwechsel</i>	16
1.3.1	Übersicht	16
1.3.2	Die verschiedenen Substanzklassen und ihre Funktionen	19
1.3.2.1	Flavonoide	19
1.3.2.2	Stilbene	23
1.3.2.3	Lignin	24
1.3.2.4	Hydroxyzimtsäuren	25
1.3.3	Hydroxycinnamoyl-Transferasen	25
1.4	<i>Aufgabenstellung</i>	29
2	Material und Methoden	31
2.1	<i>Geräte</i>	31
2.2	<i>Chemikalien, Säulenmaterial und Verbrauchsmaterial</i>	32
2.2.1	Laborchemikalien und Verbrauchsmaterial	32
2.2.2	Säulenmaterialien	32
2.2.3	Referenzsubstanzen	33
2.3	<i>Synthese von p-Cumaroyl- und Feruloyl-CoA</i>	33
2.4	<i>Enzymtest zum Nachweis der Aktivität der HCT</i>	36
2.4.1	Aufschluss von Pflanzenmaterial	36
2.4.2	Messung des Proteingehalts	36
2.4.3	Durchführung des Enzymtests	36
2.4.4	Analytik der Enzymprodukte mittels HPLC	37
2.4.5	Berechnung der spezifischen Aktivität	38
2.5	<i>Strukturaufklärung von Enzymprodukten</i>	39
2.5.1	Kochromatographie	39
2.5.2	Enzymatische Präparation von monoacylierten Kämpferol 3-glukosiden	39
2.5.3	Reinigung der Produkte mittels präparativer HPLC	40
2.5.4	NMR-Spektroskopie	41
2.6	<i>Analyse der Kiefern-Inhaltsstoffe</i>	41
2.6.1	Aufschluss des Pflanzenmaterials	41
2.6.2	Extraktion der löslichen phenolischen Inhaltsstoffe (Methanol-Extraktion)	41
2.6.3	Extraktion der zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffe	42
2.6.4	Analytik mittels HPLC	42
2.6.5	Analyse von Anthocyanen	43
2.7	<i>Freilandbäume</i>	46

2.7.1	Beschreibung der Versuchsbäume	46
2.7.2	Ernte der Nadeln.....	47
2.7.3	Ermittlung von Nadeloberfläche und -volumen.....	48
2.8	<i>Sonnensimulator-Experimente</i>	48
2.8.1	Aufbau des Sonnensimulators.....	48
2.8.2	Anzucht von Kiefernkeimlingen	51
2.8.3	UV-B-Behandlung	53
2.8.4	Erntetermine	56
2.9	<i>Biochemische Charakterisierung der Enzyme</i>	57
2.9.1	Proteinabhängigkeit.....	57
2.9.2	Abhängigkeit von der Inkubationszeit	58
2.9.3	Temperaturabhängigkeit.....	58
2.9.4	pH-Abhängigkeit.....	58
2.9.5	Divalente Kationen und Enzyminhibitoren.....	58
2.9.6	Substratabhängigkeit	59
2.9.7	Substratspezifität	59
2.10	<i>Reinigung der 3''-HCT</i>	61
2.10.1	Ernte und Aufbereitung des Nadelmaterials	61
2.10.2	Aufschluss des Nadelmaterials.....	61
2.10.3	Ammoniumsulfat-Fällung	61
2.10.4	Flüssig-Chromatographie	62
2.10.4.1	Entsalzung mit Sephadex G-25	62
2.10.4.2	Anionenaustauscher Q-Sepharose ff	63
2.10.4.3	Farbstoffgel Reactive Brown 10	63
2.10.4.4	Hydroxyapatit.....	64
2.10.4.5	Chromatofokussierung mit Mono P	65
2.10.4.6	Anionenaustauscher Mono Q	66
2.10.4.7	Gelfiltration mit Superose	67
2.10.5	Elektrophorese.....	68
2.10.5.1	SDS-Gelelektrophorese.....	68
2.10.5.2	Native Elektrophorese	68
2.10.5.3	Silberfärbung.....	71
2.10.5.4	Coomassie-Färbung.....	72
2.10.5.5	Auswertung von Polyacrylamid-Gelen	73
2.11	<i>Sequenzierung von Peptiden</i>	73
3	Ergebnisse	74
3.1	<i>Vorbemerkung</i>	74
3.2	<i>Nachweis der Hydroxycinnamoyl-Transferase-Aktivität</i>	74
3.3	<i>Strukturaufklärung von Enzym-Produkten</i>	78
3.3.1	Kochromatographie	78
3.3.2	Enzymatische Synthese von monoacylierten Kämpferol 3-glukosiden.....	80
3.3.3	Reinigung mittels präparativer HPLC.....	80
3.3.4	NMR-Spektroskopie.....	81
3.4	<i>Inhaltsstoff-Analyse</i>	84
3.4.1	Lösliche phenolische Verbindungen	84
3.4.1.1	Methanol-Gradient	85
3.4.1.2	Acetonitril-Gradient (diacylierte Flavonol-glukoside).....	88

3.4.2	Zellwandgebundene phenolische Verbindungen	90
3.4.3	Anthocyane.....	92
3.5	<i>Freilandbäume</i>	96
3.5.1	Verlauf der Aktivitäten der HCT's im Jahresgang.....	96
3.5.1.1	6''-HCT	96
3.5.1.2	3''-HCT	97
3.5.2	Verlauf des Gehalts phenolischer Inhaltsstoffe im Jahresgang.....	100
3.5.2.1	Lösliche phenolische Inhaltsstoffe (Methanol-Gradient).....	100
3.5.2.2	Acylierte Flavonolglukoside (Acetonitril-Gradient).....	104
3.5.2.3	Zellwandgebundene phenolische Inhaltsstoffe	107
3.5.3	Das Verhältnis von Nadeloberfläche zu Nadelgewicht im Jahresgang.....	110
3.6	<i>Sonnensimulator-Experimente</i>	111
3.6.1	V 623b	111
3.6.1.1	Enzymaktivitäten.....	111
3.6.1.2	Lösliche phenolische Inhaltsstoffe (Methanol-Gradient).....	113
3.6.1.3	Acylierte Flavonolglukoside (Acetonitril-Gradient).....	115
3.6.2	V 658	116
3.6.2.1	Enzymaktivitäten.....	116
3.6.2.2	Lösliche phenolische Inhaltsstoffe (Methanol-Gradient)	117
3.6.2.3	Acylierte Flavonolglukoside (Acetonitril-Gradient).....	120
3.6.2.4	Zellwandgebundene phenolische Inhaltsstoffe	121
3.6.2.5	Anthocyane.....	124
3.7	<i>Biochemische Charakterisierung der Enzyme</i>	126
3.7.1	Proteinabhängigkeit.....	126
3.7.2	Abhängigkeit von der Inkubationszeit	127
3.7.3	Temperaturabhängigkeit.....	127
3.7.4	pH-Abhängigkeit.....	128
3.7.5	Apparentes Molekulargewicht der nativen Enzyme	129
3.7.6	Isoelektrischer Punkt.....	131
3.7.7	Einfluß von divalenten Kationen und Inhibitoren auf die Enzymaktivität ...	133
3.7.8	Substratabhängigkeit	135
3.7.8.1	Donorsubstrate	135
3.7.8.2	Akzeptorsubstrate.....	138
3.7.9	Substratspezifität	141
3.7.9.1	Donorsubstrate	141
3.7.9.2	Akzeptorsubstrate.....	143
3.8	<i>Reinigung der 3''-HCT</i>	145
3.8.1	Aufschluss der Kiefernnadeln	145
3.8.2	Ammoniumsulfat-Fällung	145
3.8.3	Anionenaustauscher-Chromatographie an Q-Sepharose ff.....	145
3.8.4	Chromatographie mit Reactive Brown 10.....	148
3.8.5	Chromatographie mit Hydroxyapatit (HAP).....	150
3.8.6	Chromatofocussierung mit Mono P	152
3.8.7	Chromatographie mit Mono Q	154
3.8.8	Native Gelelektrophorese.....	155
3.9	<i>Sequenzierung von Peptiden</i>	160
4	Diskussion	162
4.1	<i>Nachweis der Hydroxycinnamoyl-Transferase-Aktivität</i>	162

4.2	<i>Messung der HCT-Aktivität im Freiland und in UV-B-Expositionsexperimenten.</i>	164
4.3	<i>Inhaltsstoffanalyse.....</i>	166
4.4	<i>Rolle der untersuchten Inhaltsstoffe für den UV-B-Schutz der Kiefer.....</i>	174
4.5	<i>Anthocyane in Kiefer.....</i>	175
4.6	<i>Biochemische Charakterisierung der Enzyme.....</i>	177
4.7	<i>Reinigung der 3''-HCT.....</i>	184
5	Zusammenfassung.....	192
6	Literaturverzeichnis.....	195
7	Anhang.....	213
7.1	<i>NMR-Spektren und -Daten.....</i>	213
7.2	<i>Ergebnisse der BLAST-Suche.....</i>	217
7.3	<i>Sequenzen bekannter Hydroxycinnamoyl-Transferasen.....</i>	229
	Danksagung.....	231

Abkürzungsverzeichnis

AP	Aufschlusspuffer
a.u.	<i>arbitrary units</i> (relative Einheiten)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CHS	Chalkon-Synthase
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i>
FG	Frischgewicht
GF	Gelfiltration
HCT	Hydroxycinnamoyl-CoA:flavonol 3- <i>O</i> -glukosid Hydroxycinnamoyl-Transferase
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Hz	Hertz
IEX	Ionenaustauscher-Chromatographie
K3G	Kämpferol 3-glukosid
kat	Katal [mol s^{-1}], Enzymeinheit
K_m	Michaelis-Konstante
MeOH	Methanol
M	molar
MG	Molekulargewicht
NaPi	Natriumphosphat
NEM	N-Ethylmaleimid
NMM	N-Methylmaleimid
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PAS300	<i>Plant Action Spectrum</i> , normiert auf 300 nm
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	<i>parts per million</i>
PSM	Pinosylvinmethylether
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S	Siemens, Substrat
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin
THT	Hydroxycinnamoyl-CoA:tyramin <i>N</i> -(hydroxycinnamoyl)transferase
URL	<i>Uniform Resource Locators</i>
UV-A	Ultraviolett A-Strahlung (315 - 400 nm)
UV-B	Ultraviolett B-Strahlung (280 - 315 nm)
V_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
WWW	<i>World Wide Web</i>

1 Einleitung

Vorbemerkung

Thema dieser Arbeit sind Hydroxycinnamoyl-Transferasen, die an der Synthese der UV-B-Schutzpigmente in der Kiefer beteiligt sind, indem sie den letzten Schritt der Biosynthese, die Acylierung von Flavonol 3-glukosiden mit aromatischen Säuren, katalysieren. Diese Verbindungen sind somit Flavonoide und ihre Synthese gehört zum allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel.

Der erste Teil der Einleitung beschäftigt sich mit UV-B-Strahlung, voran ein allgemeiner Abschnitt (1.1.1) mit Definitionen des UV-Bereichs des Lichtspektrums und der Messung und Bewertung von UV-B, gefolgt von einer Beschreibung der Strahlungsverhältnisse auf der Erde unter besonderer Berücksichtigung der Ozonloch-Problematik (1.1.2). Der Schwerpunkt dieses Teils liegt im Abschnitt 1.1.3 auf der Wirkung von UV-B auf Pflanzen und deren (Schutz-)Reaktionen.

Im zweiten Teil wird das Forschungsobjekt selbst, die Waldkiefer, *Pinus sylvestris*, beschrieben. Dort werden die Systematik (1.2.1) und Ökologie (1.2.2) des Baumes dargestellt und im dritten Abschnitt (1.2.3) folgt eine kurze Beschreibung der wirtschaftlichen Bedeutung der Kiefer.

Der Biosyntheseweg von phenolischen, sekundären Pflanzeninhaltsstoffen wird im dritten Teil besprochen. Beginnend mit einem Überblick über den Phenylpropanstoffwechsel (1.3.1), werden anschließend die Eigenschaften und Funktionen der wichtigsten in der Kiefer vorkommenden Verbindungsklassen dargestellt, mit Schwerpunkt auf den in der Arbeit analysierten Verbindungen (1.3.2). Dritter Abschnitt dieses Teils (1.3.3) ist eine Übersicht über den aktuellen Forschungsstand bezüglich der pflanzlichen Hydroxycinnamoyl-Transferasen mit einer Darstellung der Funktionen der Enzymprodukte sowie einem kurzen Überblick über andere Acyl-Transferasen.

Abschließend wird im vierten Teil der Einleitung (1.4) die Aufgabenstellung dieser Arbeit erläutert.

1.1 UV-B-Strahlung

1.1.1 Allgemeines

Die von der Sonne emittierte elektromagnetische Strahlung wird in einen ultravioletten (< 400 nm), einen sichtbaren (400 bis 780 nm) und einen infraroten (> 780 nm) Spektralbereich eingeteilt. Der kurzwellige ultraviolette Bereich wird nochmals in einen UV-C- (< 280 nm), einen UV-B- (280 bis 315 nm) und einen UV-A-Teil (315 bis 400 nm) unterteilt. Die Photonen des ultravioletten Spektralbereichs sind so energiereich, dass sie chemische Bindungen anregen und aufbrechen können. Dies hat photochemische Reaktionen zur Folge. Der kurzwellige Bereich der solaren Strahlung wird durch die Atmosphäre, vor allem durch Sauerstoff und Ozon, bei Wellenlängen unterhalb von ca. 280 nm sehr effektiv absorbiert. Durch diese Eigenschaft der Erdatmosphäre wird überhaupt erst Leben auf dem Land möglich, da die zerstörerische UV-C-Strahlung nicht den Erdboden und damit die Biosphäre erreicht. Abb. 1.1 zeigt das Sonnenspektrum, wie es in Mitteleuropa an einem Sonnentag messbar ist.

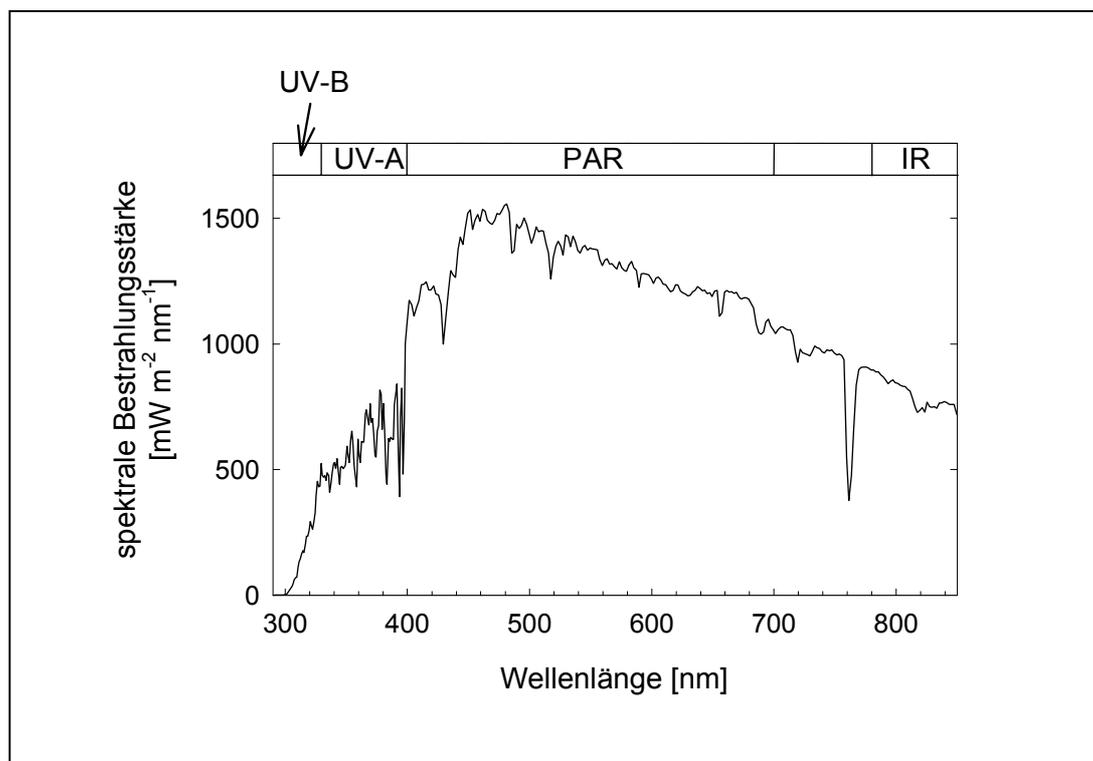


Abb. 1.1: Terrestrisches Sonnenspektrum.

Das Spektrum wurde auf der Erdoberfläche an einem Frühjahrs- tag bei klarem Himmel in Neuherberg, 48° N, 490 m ü. NN, gemessen. Am oberen Rand sind die Spektralbereiche angegeben (UV-B: 280-315 nm, UV-A: 315-400 nm, PAR: 400-700 nm, IR: > 780 nm). Der starke Abfall der Bestrahlungsstärke im kurzwelligen Bereich wird vor allem von der Absorption durch O₂ und O₃ in der Erdatmosphäre verursacht. Aus Thiel *et al.* 1997.

Letztlich ist das Sonnenlicht Energiequelle für alle biologischen Prozesse und wird von Photosynthese treibenden Organismen - Pflanzen und Bakterien - zum Aufbau von organischer Substanz genutzt. Für die Photosynthese sind hauptsächlich die Wellenlängen zwischen 400 und 700 nm wirksam, weswegen dieser Spektralbereich als *photosynthetically active radiation* (PAR) bezeichnet wird. Licht liefert aber nicht nur Energie, sondern steuert auch wichtige morphogenetische Prozesse.

UV-B-Strahlung hat nur einen Anteil von unter 5 % am Energiegehalt der terrestrischen Globalstrahlung, doch wegen der hohen Photonenenergie und der damit verbundenen photochemischen Wirksamkeit ist dieser Spektralbereich von großer Wichtigkeit für die Biosphäre. Die Einwirkung von UV-B-Strahlung auf Biomoleküle wie Proteine und DNA, die UV-B absorbieren, führt zu Schädigungen, eine andere offensichtliche Wirkung ist die Rötung der menschlichen Haut durch übermäßige Exposition (Erythem).

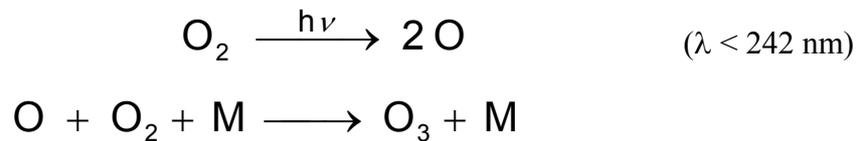
Aufgrund dieser biologischen Wirksamkeit erfolgen Messung und Bewertung der UV-B-Strahlung nicht nur als Bestrahlungsstärke in W m^{-2} , sondern auch als gewichtete Parameter. Dabei wird das Wirkungsspektrum eines bestimmten biologischen Prozesses, z. B. Hautrötung oder generelle Pflanzenschädigung, auf eine bestimmte Wellenlänge normiert. Bei der Wirkungsfunktion der Hautrötung, dem UV-Erythem, erfolgt die Normierung auf 298 nm. Als Einheit wird das MED h^{-1} (*minimal erythemal dosis*) verwendet, wobei die minimale Erythemdosis einer Dosis von 210 bis 250 J m^{-2} entspricht. Die Dosis von 1 MED h^{-1} besagt, dass ein Mensch mit Hauttyp II (eurasischer Hauttyp) nach einer Stunde mit einem UV-Erythem rechnen muss.

Eine zweite Wirkungsfunktion ist die generelle Pflanzenschädigung. Hier erfolgte die Normierung auf 300 nm. Das Wirkungsspektrum wurde durch eine Mittelung der Pflanzenschädigung durch UV-B-Strahlung über verschiedene Pflanzenarten erstellt und wird als PAS300 (*plant action spectrum*, normiert auf 300 nm) oder UV-B_{BE} (*biologically effective*) bezeichnet (Caldwell 1971).

1.1.2 UV-B und Ozonschicht

Die Atmosphäre der Erde lässt sich in verschiedene Zonen einteilen, die durch Sprungschichten voneinander getrennt sind: (i) Die Troposphäre reicht bis in eine Höhe von 10 km in mittleren und 18 km in äquatorialen Breiten. Daran schließt sich (ii) die Stratosphäre an, die sich bis in eine Höhe von 25 bis 50 km erstreckt. Darüber liegen Meso- und Thermosphäre, die den Übergang in den Weltraum bilden. Die Sprungschichten zwischen den einzelnen Schichten behindern einen Luftaustausch und stabilisieren dadurch die Schichtung der Atmo-

sphäre. In der Stratosphäre wird unter dem Einfluss kurzwelliger UV-Strahlung mit Wellenlängen unterhalb von 242 nm Ozon gebildet. Dabei erfolgt die Ozonbildung durch die Spaltung von molekularem Sauerstoff in atomaren Sauerstoff und anschließender Reaktion der Sauerstoffatome mit -molekülen, an der eine dritte Komponente wie z. B. N₂ (M) beteiligt ist (Chapman-Mechanismus):



Ein Abbau des Ozons erfolgt durch Absorption von sichtbarem Licht (Photolyse) und durch katalytische Prozesse, wobei natürlich vorkommende Stickoxide, Wasserstoff, Chlor oder Brom als Katalysatoren fungieren. Normalerweise befinden sich Auf- und Abbau des Ozons im Gleichgewicht und die Ozonschicht bildet einen effektiven Filter vor UV-C- und kurzwelliger UV-B-Strahlung (Crutzen 1996, Frederick 1990).

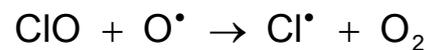
Die Ozonschichtdicke wird in Dobson-Units angegeben (DU). Dabei ist eine Dobson-Unit definiert als eine Schicht von reinem gasförmigen Ozon mit einer Dicke von 0.001 cm bei 1013 hPa und 0°C. Dies wiederum entspricht 2.69×10^{16} Molekülen pro cm² (Madronich *et al.* 1998). Die Ozonkonzentration variiert global zwischen 100 und 500 DU, in Süddeutschland werden beispielsweise im Juli 320 bis 350 DU gemessen (Seckmeyer & McKenzie 1992), das langjährige Mittel für März sind 366 DU (Sussmann *et al.* 1998).

Eine Absorption der UV-B-Strahlung erfolgt zwar zum größten Teil durch die stratosphärische Ozonschicht, aber auch durch Wolken, Aerosole und troposphärisches Ozon. Dabei wird das troposphärische Ozon mittels UV-B-Strahlung aktiviert und trägt so zur Bildung der so genannte Photooxidantien (Kley *et al.* 1999) bei. Diese wiederum können Pflanzen und die Gesundheit des Menschen schädigen.

Das dynamische Gleichgewicht von Ozonauf- und -abbau wird durch den Eintrag anthropogener Spurengase in der Atmosphäre gestört. Vor allem Fluorchlorkohlenwasserstoffe (FCKW), die als Kühlmittel und Treibgase benutzt werden, sind am Abbau des stratosphärischen Ozons beteiligt. Dabei erweisen sich Eigenschaften, aufgrund derer diese Verbindungen in Industrie und Haushalt verwendet werden, als fatal. Ihre chemische Stabilität erlaubt den FCKW, unbeschadet die Troposphäre zu passieren und in die Stratosphäre zu gelangen. Dabei

spielt auch die geringe Wasserlöslichkeit der Verbindungen eine Rolle, die verhindert, dass sie aus der Atmosphäre ausgewaschen werden.

In der Stratosphäre werden die FCKW unter dem Einfluss von kurzwelliger Strahlung gespalten, wobei Chlorradikale entstehen. Diese Chlorradikale wiederum reagieren mit Ozon unter Bildung von Chlormonoxid und molekularem Sauerstoff. Chlormonoxid wird durch die Reaktion mit Sauerstoffradikalen, die aus der Photolyse von Ozon oder O_2 entstehen, gespalten und die dadurch wieder freigesetzten Chlorradikale stehen weiterem Ozonabbau zur Verfügung (McFarland & Kaye 1992, Molina & Rowland 1974):



Dieser Chlor-katalysierte Ozonabbau wird durch weitere Reaktionen, an denen Stickoxide und polare stratosphärische Wolken beteiligt sind, verstärkt und findet vor allem in einer Höhe von 15 bis 20 km statt, wo die Temperatur unter $-80^{\circ}C$ fällt. Diese niedrigen Temperaturen sind für die Bildung der polaren stratosphärischen Wolken notwendig. Oberhalb von 25 km, wo die Temperatur wieder ansteigt, kann keine Eisbildung erfolgen und der Ozonabbau ist geringer (Kerr 1988). Die Abnahme des Ozongehalts wurde Mitte der achtziger Jahre zuerst über der Antarktis beobachtet (Farman *et al.* 1985). Das monatliche Mittel der Ozonkonzentration für Oktober, dessen Durchschnittswert seit Beginn der Messungen 1957 bei ca. 300 DU lag, betrug 1984 ca. 180 DU, also nur noch 60 % des Durchschnittswertes. Die weitere Abnahme des Ozongehalts wurde auch in den 90er Jahren beobachtet, wobei eine durchschnittliche Abnahme von ca. 7.3 DU pro Jahr erkennbar war (Jones & Shanklin 1995). Die niedrigsten Ozonwerte wurden im Oktober 1993 mit 112 DU gemessen, das bedeutet eine Abnahme um 63 % gegenüber dem historischen Mittel. Diese extrem geringen Werte wurden allerdings auch durch die Eruption des Mt Pinatubo 1991 verursacht, durch die große Mengen Aerosol in die Stratosphäre gelangten, was zu einer zusätzlichen Abnahme des Ozongehalts führte (Gleason *et al.* 1993, McCormick *et al.* 1995).

Der Grund für die besonders starke Abnahme des Ozongehalts über der Antarktis ist ein stabiler Luftwirbel im antarktischen Winter mit sehr niedrigen Temperaturen. Diese niedrigen Temperaturen zusammen mit Sonnenlicht während des antarktischen Frühlings ermöglichen die katalytische Zerstörung des Ozons, weshalb die geringsten Ozonkonzentrationen über der Antarktis im Oktober gemessen werden. Der antarktische Wirbel, der für eine Ausdünnung des Ozons über der gesamten Antarktis sorgt, wird ab Oktober instabil und führt so zu einer

Ozonabnahme in bewohnten Gebieten der Südhalbkugel in Australien und Südamerika. Dadurch erhöht sich die UV-B-Strahlung, wobei angenommen wird, dass eine Ozonabnahme von 1 % eine Zunahme der UV-B-Strahlung von ca. 2 % zur Folge hat (Roy *et al.* 1990). Damit betrifft der drastische Ozonabbau über der Antarktis sowohl Mensch und Tier als auch die Vegetation in diesen Gebieten.

Auch auf der Nordhalbkugel wurde eine Reduktion des Ozongehalts festgestellt. Über der Arktis wurde in einer Höhe von 16 bis 18 Kilometern eine Verringerung von bis zu 50 % gemessen (Masood 1995). Die Abnahme der Ozonschicht auf der Nordhalbkugel ist gegenüber der Südhalbkugel aufgrund der andersartigen geographischen Gegebenheiten geringer. Dies wird vor allem durch höhere Temperaturen und die asymmetrische Land-Wasser-Verteilung bedingt, sodass der polare arktische Wirbel weniger stabil ist. Diese Asymmetrie und Instabilität des polaren Wirbels kann aber durch die Verschiebung von Luftmassen mit niedrigen Ozonkonzentrationen zu kurzfristigen starken Abnahmen der Ozonschichtdicke, so genannten *miniholes*, in mittleren Breiten im Frühjahr führen (Sussmann *et al.* 1998).

Zum Schutz der Ozonschicht wurde 1987 im Montreal-Protokoll beschlossen, die globalen Emissionen von Ozon-schädigenden Chemikalien zu reduzieren. Dies führte zu einer leichten Verringerung der Halogenverbindungen in der unteren Atmosphäre, doch wird angenommen, dass erst zwischen 2010 und 2020 die maximale Konzentration von Chlor aus FCKW's in der Atmosphäre erreicht sein wird (Fraser & Prather 1999) und anschließend eine langsame Wiederherstellung der Ozonschicht auf vorindustrielles Niveau erfolgt. Ein weiterer Faktor, der die Ozonkonzentration in der Stratosphäre in Zukunft beeinflussen kann, ist die Emission von Abgasen durch Flugverkehr, besonders von hoch fliegenden Flugzeugen. Dabei spielen nicht nur die emittierten Stickoxide eine Rolle, sondern auch die Bildung von stratosphärischen Aerosolen (Fahey *et al.* 1995).

Neben der Erhöhung der UV-B-Strahlung durch die Zerstörung der Ozonschicht führt auch die Freisetzung großer Mengen von Treibhausgasen, vor allem CO₂ und Methan, durch menschliche Aktivitäten zu einer weltweiten Klimaveränderung. Diese Einflüsse auf das Weltklima werden als *global change* bezeichnet. Die Erhöhung der Temperatur der unteren Atmosphäre durch den Treibhauseffekt hat eine Abkühlung der Stratosphäre zur Folge. Niedrigere Temperaturen wiederum führen vor allem durch die Bildung von polaren stratosphärischen Wolken zu einem verstärkten Ozonabbau (Waibel *et al.* 1999). Aufgrund der komplexen Zusammenhänge ist eine Vorhersage der Entwicklung der Ozonschicht in den nächsten Jahrzehnten mit großer Unsicherheit behaftet.

Die Korrelation eines Anstiegs der UV-B-Strahlung mit einer Verringerung der Ozonkonzentration in der Stratosphäre ist aufgrund der hohen natürlichen Variabilitäten der UV-B-Strahlung und des Ozons schwierig. Die Intensität der UV-B-Strahlung auf der Erdoberfläche hängt nicht nur von der Ozonschichtdicke, sondern auch von anderen Faktoren wie Wolken, Aerosolen, Dunst, Luftverschmutzung und der Oberflächenalbedo ab (Kerr & McElroy 1993, Thiel *et al.* 1997). Unter Albedo versteht man das Rückstrahlvermögen eines Körpers. Gerade in mittleren Breiten, wo die Ozonabnahme relativ gering ist, ist es schwierig, eine Erhöhung der UV-B-Strahlung mit dem Ozonverlust in Verbindung zu bringen. Verschiedene Messungen zeigen aber einen Anstieg der UV-B-Strahlung am Boden. So konnte in den Schweizer Alpen auf 3600 m Höhe, unter Vermeidung von Störfaktoren wie Aerosolen und Wolken, in den achtziger Jahren ein Anstieg von ca. 1 % pro Jahr beobachtet werden (Blumthaler & Ambach 1990). Neuere Messungen in den neunziger Jahren in Kanada und Europa zeigen ebenfalls einen jährlichen Anstieg der UV-Bestrahlung (Kerr & McElroy 1993, Zerefos *et al.* 1997). Ein Vergleich zwischen zwei Orten ähnlicher geographischer Breite auf der Nord- und Südhalbkugel in Deutschland bzw. Neuseeland hat zudem einen fast doppelt so hohen Anteil von UV-B-Strahlung auf der Südhalbkugel gegenüber der Nordhalbkugel ergeben (Seckmeyer & McKenzie 1992). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass eine Ozonabnahme zu einer Erhöhung der UV-B-Strahlung führt.

Man geht davon aus, dass mit Erreichen des maximalen Gehalts von Ozon zerstörenden Substanzen in der Stratosphäre zu Beginn des 21. Jahrhunderts eine Zunahme der mittleren erythemwirksamen UV-B-Strahlung in mittleren nördlichen Breiten von 7 % im Winter und Frühling und 4 % im Sommer und Herbst und in mittleren südlichen Breiten von durchschnittlich 6 % erfolgen wird. An den Polen liegen die Werte erheblich höher (Madronich *et al.* 1998). Doch ist diese Vorhersage wegen der enormen Variabilitäten der UV-B-Strahlung unsicher.

1.1.3 UV-B und Pflanzen

Die Beobachtung, dass ultraviolettes Licht eine besonders starke Wirkung auf Pflanzenzellen hat und zu Schäden führen kann, ist seit Anfang des letzten Jahrhunderts bekannt. Seitdem werden Experimente zu Reaktionen von Pflanzen auf UV-Licht durchgeführt (Schulze 1910). Aufgrund der Ausdünnung der stratosphärischen Ozonschicht und der damit einhergehenden Erhöhung der UV-B-Strahlung wird die Frage diskutiert, ob und wie Pflanzen mit dieser erhöhten Strahlungsbelastung umgehen können. Gerade in Bezug auf den Ertrag von landwirtschaftlich genutzten Pflanzen wird intensive Forschung betrieben, aber auch die Frage

nach ökologischen Gesichtspunkten (Veränderungen gegenüber Herbivorie, Konkurrenz oder Pathogenen) rückt zunehmend in den Blickpunkt. Dabei müssen aber oft erst grundlegende Wirkungsmechanismen von (natürlicher) UV-B-Strahlung auf Pflanzen untersucht werden, bevor Vorhersagen bezüglich erhöhter UV-B-Belastung gemacht werden können. Die große Anzahl von Übersichts-Artikeln, die in der letzten Zeit zu diesem Themenkomplex erschienen sind, zeigt, wie wichtig die Forschung zu der Wirkung von UV-B auf Pflanzen ist (Allen *et al.* 1998, Caldwell & Flint 1994b, Greenberg *et al.* 1997, Jansen *et al.* 1998, Jordan 1996, Tevini 1993).

Für Untersuchungen zur Wirkung von UV-B-Strahlung auf Pflanzen werden verschiedene Ansätze gewählt. So ist es möglich, die Reaktionen von Pflanzen durch den Vergleich von Behandlungen mit und ohne UV-B zu beobachten. Dies geschieht meist durch den Einsatz passend gewählter UV-B-Filter. Mit Hilfe solcher Experimente, die im Freiland ebenso durchgeführt werden können wie in Phytokammern, lassen sich die Anpassungsmechanismen an natürliche UV-B-Strahlung untersuchen. Die zweite Möglichkeit ist eine Behandlung mit zusätzlichem UV-B, wobei eine Behandlungsvariante durch den Einsatz von UV-B-Lampen einer erhöhten UV-B-Dosis ausgesetzt wird. Diese Experimente werden ebenso im Freiland wie in Klimakammern durchgeführt und erlauben, die Folgen von erhöhter UV-B-Strahlung, wie sie aufgrund des stratosphärischen Ozonverlusts postuliert wird, auf Pflanzen abzuschätzen.

Es hat sich allerdings herausgestellt, dass Schäden bei starklichtangepassten Pflanzen in Feldversuchen oder im Gewächshaus geringer sind als bei Kammerexperimenten mit relativ niedrigen PAR-Verhältnissen. Von entscheidender Bedeutung ist dabei das Verhältnis von UV-B zu UV-A und PAR, das in Kammerversuchen oft zu groß ist (Caldwell & Flint 1994b). In UV-B-Experimenten muss also versucht werden, ein natürliches Verhältnis der spektralen Verteilung zu erreichen. Dies erfordert einen hohen technischen Aufwand, doch sind Ergebnisse, die unter derartigen annähernd natürlichen und kontrollierten Bedingungen erzielt werden, wesentlich aussagekräftiger als Ergebnisse von Experimenten, die unter artifiziellen Bedingungen stattgefunden haben (Caldwell & Flint 1994a, 1994b, Caldwell *et al.* 1995).

Die Sonnensimulatoren des GSF-Forschungszentrums bieten die Möglichkeit, Expositionsexperimente durchzuführen, bei denen sowohl mit UV-B-Ausschluss als auch mit erhöhten UV-B-Strahlungsverhältnissen unter hohen Lichtintensitäten und einer der spektralen Verteilung des Sonnenlichts ähnlichen Lichtqualität gearbeitet werden kann (Döhring *et al.* 1996, Thiel *et al.* 1996). Dadurch lassen sich verschiedene „Ozonloch-Szenarien“ simulieren und die pflanzlichen Reaktionen darauf überprüfen.

UV-B-Strahlung hat vielfältige Wirkungen auf Pflanzen (Abb. 1.2). Die Absorption der UV-B-Strahlung ruft Schäden bei DNA, Proteinen und Membranlipiden hervor. Diese Schäden wiederum beeinflussen Genexpression, Photosynthese und Sekundärmetabolismus und damit Wachstum und Entwicklung. Pflanzen haben aber im Laufe der Evolution Anpassungsmechanismen entwickelt, mit denen sie in der Lage sind, die Belastungen der UV-B-Strahlung zu tolerieren. Dazu gehören DNA-Reparaturmechanismen, die Entwicklung von spezifischen Photorezeptoren sowie die Biosynthese von UV-B-Schutzpigmenten und Antioxidantien.

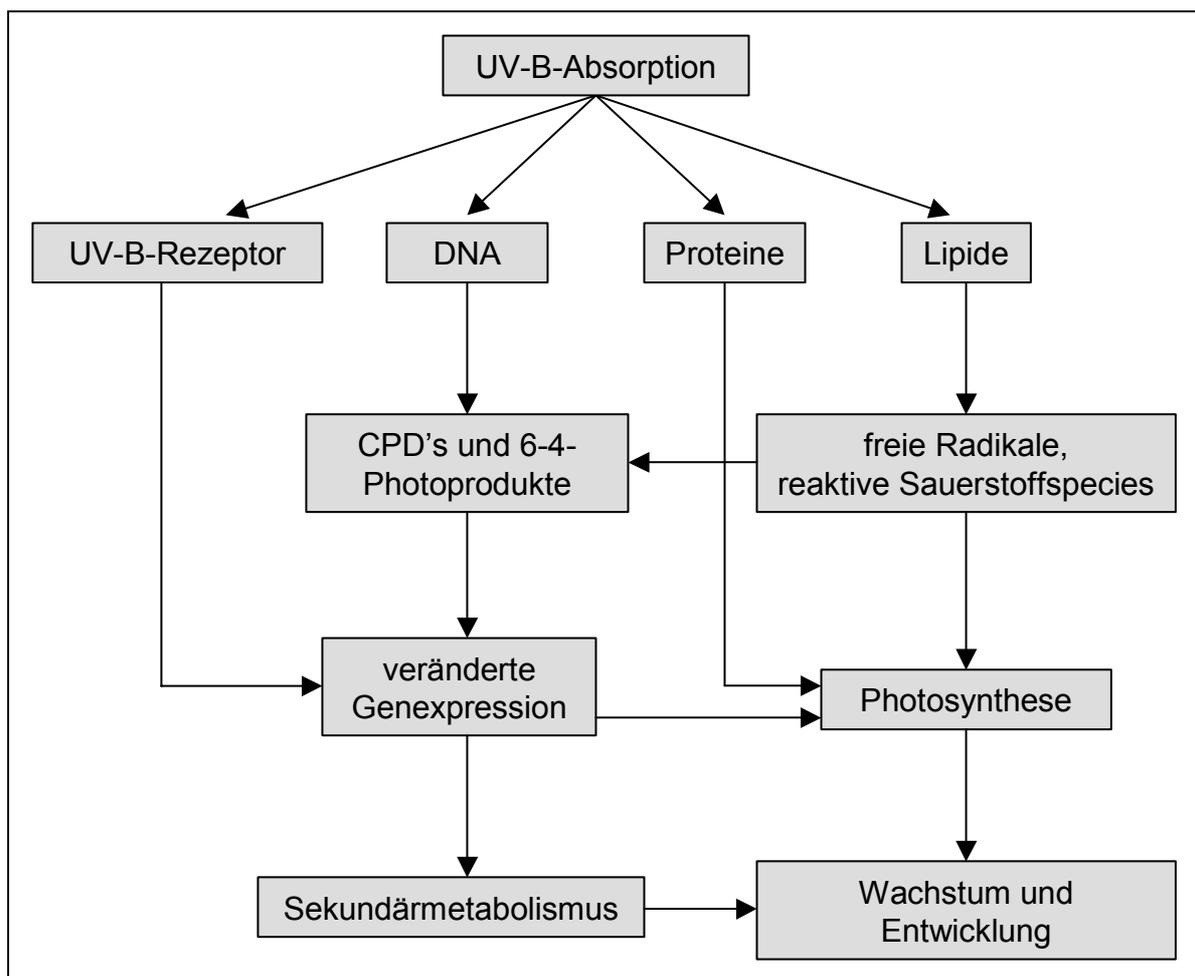


Abb. 1.2: Der Einfluss von UV-B-Strahlung auf Pflanzen.

Verändert nach Caldwell *et al.* 1998, Jansen *et al.* 1998; CPD: Cyclobutylpyrimidin-Dimer.

DNA-Schäden werden durch die Absorption von kurzwelliger Strahlung bis ca. 320 nm hervorgerufen, was zur Bildung von Cyclobutylpyrimidin-Dimeren (CPD) und 6-4-Photoprodukten führen kann. Diese blockieren die DNA-Replikation und -Transkription, indem sie DNA- und RNA-Polymerasen inhibieren (Britt 1995). Aus Pflanzen sind verschiedene

Reparaturmechanismen für derartige Schäden bekannt: Bei der Photoreaktivierung binden Photolyasen spezifisch an CPD's und 6-4-Photoprodukte und katalysieren unter Absorption von Licht zwischen 300 und 600 nm Wellenlänge die Reparatur. Diese Enzyme haben eine große Ähnlichkeit mit prokaryotischen und tierischen Typ-II-Photolyasen (Ahmad *et al.* 1997). Ein zweiter Mechanismus, der nicht lichtabhängig ist, ist die so genannte *excision repair*. Dabei werden einzelne Basen oder Nucleotide, die beschädigt sind, von Glycosylase bzw. Endonucleasen ausgeschnitten und in mehreren Schritten ersetzt (Britt 1995, Sancar 1996). Als dritter Weg, UV-B induzierte Schäden zu kompensieren, werden durch Rekombination mit homologen DNA-Regionen schadhafte Sequenzbereiche, die durch fehlerhafte Replikation entstanden sind, ersetzt (Britt 1996).

Die Photosynthese kann durch die Inaktivierung des Photosystems II und die Degradation der D1- und D2-Proteine durch UV-B direkt beeinträchtigt werden (Jansen *et al.* 1996, Olsson *et al.* 2000). Ebenso können der Chlorophyllgehalt und die Aktivität der RUBISCO abnehmen (Jordan *et al.* 1994, Strid *et al.* 1990). Die Photosynthese-Rate ist aber auch indirekt durch UV-B-induzierten Stomataschluss betroffen (Eisinger *et al.* 2000, Jansen & van den Noort 2000, Nogués *et al.* 1999). Eine Verringerung der Photosyntheserate durch eine erhöhte UV-B-Intensität, die zu einem Verlust der Produktivität landwirtschaftlich genutzter Pflanzen führen würde, ist jedoch unter Freilandbedingungen (hohes PAR, UV-A und UV-B) umstritten (Allen *et al.* 1998, Fiscus & Booker 1995).

Ein weiterer Angriffspunkt der UV-B-Strahlung sind Membranlipide. So wird unter dem Einfluss von UV-B die Ionenpermeabilität der Thylakoidmembran erhöht (Strid *et al.* 1994), was über die Entladung des Membranpotentials wiederum die Photosynthese beeinträchtigt. Ebenso wird eine erhöhte Lipidperoxidation beobachtet (Kramer *et al.* 1991, Tevini 1993). Die Bildung von freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) an Membranen wiederum aktiviert Signaltransduktionswege, die zu einer veränderten Genexpression führen (Mount 1996, Surplus *et al.* 1998). Die Induktion von oxidativem Stress durch UV-B wurde in verschiedenen Experimenten beobachtet. So ist eine Ascorbat-defiziente *Arabidopsis*-Mutante hypersensitiv gegenüber UV-B (Conklin *et al.* 1996). Eine Erhöhung der Aktivität von antioxidativen Enzymen wie Catalase und Glutathion-Peroxidase wurde bei *Nicotiana glauca* beobachtet (Willekens *et al.* 1994). Dies zeigt, dass in verschiedenen Stresssituationen ähnliche Schutzmechanismen aktiviert werden, da die Erhöhung der Aktivitäten der oben genannten antioxidativen Enzyme auch durch die Exposition mit Ozon oder SO₂ gemessen werden kann.

Komplexe Änderungen der Genexpression, wie sie durch UV-B in *Pisum* gezeigt wurden (Brosché *et al.* 1999), haben wiederum physiologische und morphologische Änderungen in der Pflanze zur Folge. Bei *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass an der ROS-vermittelten Signaltransduktion Jasmonat und Ethylen beteiligt sind. Daraus wurde geschlossen, dass die durch UV-B oder Pathogeninfektion aktivierten Signaltransduktionswege ähnlich sind, d.h. die gleichen Signalsubstanzen verwenden (A.-H.-Mackerness *et al.* 1999). Ähnliches wurde auch bei Tomate gefunden, wo die Beteiligung von Jasmonat an der Reaktion auf UV nachgewiesen wurde (Conconi *et al.* 1996). Dass UV-B und Pathogene die Transkription der gleichen Gene des Sekundärmetabolismus aktivieren, wurde auch schon in Petersilien-Zellkulturen gezeigt (Chappell & Hahlbrock 1984).

Die Aktivierung der Transkription von Schutzgenen erfolgt nicht nur über ROS-induzierte oder direkt durch DNA-Schäden induzierte Signaltransduktionswege, sondern auch über Photorezeptoren. Eine Reihe von Prozessen während der Entwicklung, wie Keimung, Keimlingsentwicklung, Phototropismus und Blühinduktion, wird bei Pflanzen durch Licht gesteuert. Dafür haben Pflanzen verschiedene Photorezeptoren entwickelt, die unterschiedliche spektrale Bereiche des Sonnenlichts detektieren: Phytochrome, die hell- und dunkelrotes Licht wahrnehmen, Blaulicht/UV-A-Rezeptoren und UV-B-Rezeptoren.

Phytochrome sind eine Familie von Polypeptiden, die ein Chromophor aus einem kovalent gebundenen linearen Tetrapyrrol tragen. Sie liegen in zwei Formen vor, dem Rot-absorbierenden P_r ($\lambda_{\max} = 660$ nm) und dem Dunkelrot-absorbierenden P_{fr} ($\lambda_{\max} = 730$ nm), wobei die beiden Formen bei Absorption des entsprechenden Lichts in die jeweils andere Form übergehen. P_{fr} ist dabei die physiologisch aktive Form (Batschauer 1999).

In *Arabidopsis* wurden mehrere Blaulicht/UV-A-Rezeptoren identifiziert, die z. B. die Chalkonsynthese-Aktivität oder Phototropismus regulieren. Diese Rezeptoren sind ebenfalls Proteine, haben Ähnlichkeit mit DNA-Photolyasen aus *E. coli* und *Saccharomyces* und werden „Cryptochrome“ genannt (Ahmad & Cashmore 1993, 1996). Die Chromophore dieser Proteine sind noch nicht bekannt, es werden aber Flavine oder Pterine als Blaulicht-absorbierende Komponenten diskutiert (Batschauer 1999).

Die detaillierte Untersuchung der Chalkonsynthese (CHS), einem wichtigen Enzym der Flavonoidbiosynthese, in *Arabidopsis* zeigte, dass dort zwei verschiedene Signaltransduktionswege für UV-A/Blaulicht und UV-B vorhanden sein müssen und diese von Phytochrom unabhängig sind (Christie & Jenkins 1996). Experimente mit *Sorghum* zeigten außerdem, dass für die Induktion der Anthocyan-Biosynthese in Keimlingen ein UV-B-Rezeptor verantwortlich ist, der einen Induktionspeak bei 293 nm hat (Hashimoto *et al.* 1991). Die Natur

dieses spezifischen UV-B-Rezeptors ist jedoch noch nicht bekannt (Greenberg *et al.* 1997, Jenkins 1998, Jordan 1996). Als UV-B-Rezeptor, der nicht auf der Funktion von Proteinen beruht, wird aber auch die UV-abhängige Isomerisierung von *trans*- zu *cis*-Cumarsäure diskutiert, da das *cis*-Isomer ein Schlüsselenzym der Biosynthese phenolischer Inhaltsstoffe, die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL), weniger stark hemmt als das *trans*-Isomer und damit zu erhöhter PAL-Aktivität und Flavonoidbiosynthese führen kann (Braun & Tevini 1993).

Die Signaltransduktionsketten von den Photorezeptoren zur jeweiligen Antwort sind noch nicht im Detail bekannt. Es wurden aber verschiedene Elemente in *Arabidopsis* gefunden, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, z. B. Transkriptionsfaktoren und Repressoren, die durch das Lichtsignal inaktiviert werden (Jenkins 1997, Short & Briggs 1994). Auch der cytosolische Ca^{2+} -Spiegel scheint bei der Weiterleitung des Signals eine Rolle zu spielen, da eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration durch die Stimulierung der Blaulichtrezeptoren beobachtet wurde (Baum *et al.* 1999). Die Stimulation der Expression der CHS durch UV-B konnte bereits mit sehr kurzen Lichtpulsen von 300 ms erreicht werden. Auch dabei erfolgte die Signaltransduktion möglicherweise durch Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels, zumindest konnte die Beteiligung von DNA-Schäden ausgeschlossen werden (Frohnmeier *et al.* 1999).

Wie sich erhöhte UV-B-Strahlung langfristig auswirken kann, haben Expositionsexperimente in den Sonnensimulatoren des GSF-Forschungszentrum mit *Arabidopsis* über mehrere Generationen gezeigt. Dabei wurde eine erhöhte somatische Rekombinationsfrequenz beobachtet, die zu einer reduzierten genomischen Stabilität von Pflanzen(-Populationen) führen kann (Ries *et al.* 2000).

Pflanzen haben, da sie als sessile Organismen der Exposition von UV-B nicht entgehen können, Schutzmechanismen wie die Bildung von UV-B-Schutzpigmenten entwickelt. Diese Substanzen absorbieren im Bereich von 280 bis 315 nm, sind in der Epidermis, in oder auf der Kutikula eingelagert und schützen so das Blattmesophyll vor UV-B (Greenberg *et al.* 1997, Jansen *et al.* 1998). Die Funktion derartiger Schutzpigmente übernehmen vor allem Flavonoide und Hydroxyzimtsäureester, die im UV-B-Bereich, nicht aber im sichtbaren Bereich des Lichts absorbieren. Dieser Schutz ist sehr effektiv, da weniger als 10 % der UV-B-Strahlung durch die Epidermis dringt (DeLucia *et al.* 1992). In marinen Organismen wurden ebenfalls UV-B-Schutzpigmente gefunden, die aber auf einer anderen Verbindungsklasse, den sogenannten Mycosporin-ähnlichen Aminosäuren, basieren (Dunlap & Shick 1998).

In verschiedenen Studien konnten bei unterschiedlichen Pflanzen unter Verwendung mannigfacher Methoden die Funktion von Flavonoiden und Hydroxyzimtsäuren als UV-B-Schutzpigmente unter Beweis gestellt werden. So wurde mit Hilfe von faseroptischen Lichtmessungen die Akkumulation von Flavonoiden und Hydroxyzimtsäuren in der Epidermis von *Brassica* durch UV-B-Strahlung nachgewiesen. Dabei erfolgte ein Anstieg um fast 50 % durch die UV-B-Behandlung in der adaxialen Epidermis (Alenius *et al.* 1995). Bei Petersilie konnte der Nachweis erbracht werden, dass die lichtinduzierte Flavonoidbiosynthese in der Epidermis auf Transkriptionsebene reguliert wird (Schmelzer *et al.* 1988). Bei *Zea mays*-Mutanten, die defizient in der Synthese von Flavonoiden waren, wurden mehr DNA-Schäden als im Wildtyp beobachtet (Stapleton & Walbot 1994).

Arabidopsis akkumuliert Flavonoide und Sinapatester als UV-B-Schutz (Chapple 1994, Lois & Buchanan 1994). Aus diesem Grund wurden *Arabidopsis tt*-Mutanten sehr intensiv bearbeitet, die einen reduzierten Flavonoid- und Sinapatgehalt haben, was an einer durchsichtigen Samenschale (*tt* = *transparent testa*) erkennbar ist. Z. B. hat die *tt4*-Mutante einen reduzierten Flavonoid- bei normalem Sinapatgehalt und ist empfindlicher gegenüber UV-B als der Wildtyp; *tt5*- und *tt6*-Mutanten haben einen reduzierten Flavonoid- und Sinapatgehalt und sind extrem empfindlich gegenüber UV-B (Chapple 1994, Landry *et al.* 1995, Li *et al.* 1993).

Auch der Kutikula kommt eine Funktion als UV-B-Schutz zu. Es gibt Pflanzenarten, deren Kutikula sehr effektiv UV-B absorbiert (*Citrus*: Transmission < 3 %), aber auch solche, deren Kutikula durchlässig ist (*Prunus persica*: Transmission > 64 %). Als Schutzpigmente werden auch hier Hydroxyzimtsäuren vermutet (Baur *et al.* 1998). Daneben konnte bei *Gnaphalium* ein Anstieg des Flavonoidgehalts durch zusätzliches UV-B auf der Blattoberfläche beobachtet werden (Cuadra *et al.* 1997).

Von besonderem Interesse für diese Arbeit sind zweifach mit Hydroxyzimtsäuren acylierte Flavonolglykoside als UV-B-Schutzpigmente, wie sie in der Kiefer nachgewiesen wurden (Jungblut *et al.* 1995). Sie werden im Detail im Abschnitt 1.3.2 dargestellt. Es hat sich gezeigt, dass immergrüne Bäume, vor allem Koniferen, besser vor UV-B geschützt sind als Laub abwerfende Bäume (Day 1993). Die Schutzmechanismen sind bei immergrünen Bäumen effektiver, was verständlich wird, wenn man die wesentlich höhere kumulative Belastung im Laufe eines „Blattlebens“ in Betracht zieht. Das Verständnis dieser Schutzmechanismen ist deswegen von großer Bedeutung. Obwohl die voll entwickelten Nadeln von Koniferen also gut gegen UV-B geschützt sind (Laakso & Huttunen 1998), wurden Schäden durch erhöhte UV-B-Strahlung während der Keimlingsentwicklung festgestellt, wobei vor allem Photosynthese und Biomasse untersucht wurden (eine Zusammenstellung von

Untersuchungen zum Einfluss von UV-B auf Koniferen findet sich bei Laakso & Huttunen (1998). So wurden bei verschiedenen Koniferenkeimlingen eine verringerte Höhe der Pflanzen (Sullivan & Teramura 1988), bei *Pinus taeda* eine verringerte Biomasse bei einem Experiment über drei Jahre mit einer UV-B-Belastung, die einem 25-prozentigen stratosphärischen Ozonverlust entspricht, beobachtet (Sullivan & Teramura 1992). Die geringere Zunahme der Biomasse bei erhöhter UV-B-Strahlung scheint aber weniger auf eine direkte Schädigung der Photosynthese als vielmehr auf eine stärkere Allokation von Kohlenstoff in den UV-B-Schutz auf Kosten des Wachstums zurückzugehen. So wurde bei *Pinus sylvestris* eine Verdickung der Kutikula und der äußeren Epidermiszellwand sowie eine Akkumulation von Tanninen beobachtet (Laakso *et al.* 2000). Auch die Neusynthese und Akkumulation der diacylierten Schutzpigmente durch UV-B (Schnitzler *et al.* 1997) führt zu einem Kohlenstofffluss vom Primär- in den Sekundärstoffwechsel.

Die Gefahr, die für Kiefern von erhöhter UV-B-Strahlung ausgeht, betrifft also in erster Linie Keimlinge während der Entwicklung und austreibende Nadeln im Frühjahr, da der UV-B-Schutz zu diesem Zeitpunkt noch nicht voll entwickelt ist.

Weniger klar sind die Auswirkungen von gleichzeitiger Exposition von troposphärischem Ozon und UV-B auf Kiefern. So wurde festgestellt, dass niedrige UV-B-Strahlung zu einer Verstärkung der Schäden bei gleichzeitiger Ozonexposition führt, da vor allem die Aktivität antioxidativer Enzyme wie Catalase und Superoxid-Dismutase und der Gehalt von Dehydroascorbat abnahm (Baumbusch *et al.* 1998). Demgegenüber konnte bei ambienter UV-B-Strahlung die Schädigung von Ozon verringert werden, da hier eine Induktion der antioxidativen Schutzmechanismen durch UV-B erfolgte (Schnitzler *et al.* 1999).

1.2 Die Kiefer (*Pinus sylvestris* L.)

1.2.1 Systematik

Die Waldkiefer, *Pinus sylvestris*, gehört zur Familie der *Pinaceae*. Diese Familie, zu der auch die Fichten (*Picea*) und Tannen (*Abies*) zählen, bildet die größte Gruppe Wald bildender Nadelhölzer. Innerhalb dieser Familie ist die Gattung *Pinus* mit über 100 Arten die artenreichste. Zusammen mit den *Taxodiaceae*, *Cupressaceae* und *Podocarpaceae* bilden die *Pinaceae* die Gruppe der Koniferen. Die Koniferen wiederum gehören zu den Gymnospermen, die sich durch das Fehlen eines Fruchtblattgehäuses auszeichnen und ausschließlich vieljährige Holzpflanzen mit geringer Differenzierungshöhe umfassen. Innerhalb der Samen-

pflanzen bilden die Gymnospermen mit rund 800 Arten nur eine kleine Gruppe gegenüber den 240 000 bekannten Angiospermen-Arten (Strasburger 1991).

1.2.2 Ökologie der Wald-Kiefer

Die Kiefer ist ein viel Licht erfordernder, ansonsten anspruchsloser Baum, was ihn befähigt, an der Steppengrenze ebenso wie in Sibirien und bis zur alpinen Waldgrenze oder in nassen Mooren zu siedeln. Das Verbreitungsareal ist demzufolge in Eurasien sehr ausgedehnt (Abb. 1.3).

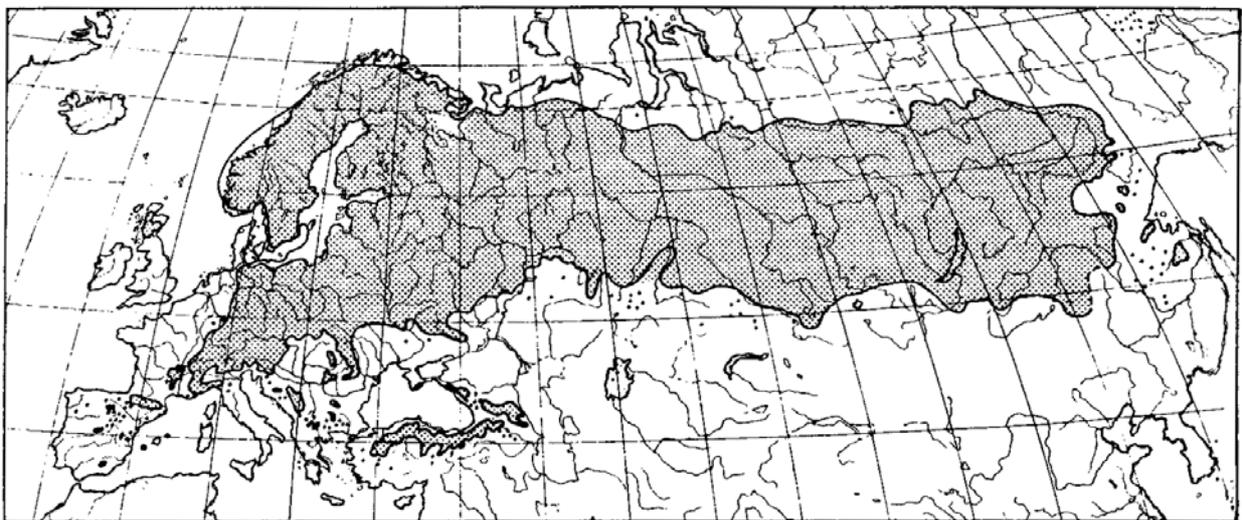


Abb. 1.3: Die Verbreitung der Waldkiefer (*Pinus sylvestris* L.).
Aus Kindel 1995.

Unter optimalen Bedingungen ist die Kiefer konkurrenzschwach, was sie in Mitteleuropa einerseits an die extrem sauren und feuchten und andererseits an die extrem trockenen Standorte verdrängt. Sie kommt dort am häufigsten vor, wo anspruchsvollere Baumarten versagen (Strasburger 1991).

Der Baum kann bis zu 30 m hoch werden, hat eine konische bis pyramidale Form, die im Alter abflacht und unregelmäßiger wird. Der Stamm ist im oberen Teil rötlich, im unteren Teil graubraun und rissig in Schuppen oder Platten. Die Nadeln liegen paarweise an jedem Kurztrieb zusammen und sind von bläulich-grüner Farbe (Kindel 1995). Die Bestäubung und Ausbreitung erfolgt durch den Wind (Anemophilie). Die Samen entwickeln sich innerhalb von zwei Jahren in den Zapfen, wobei die Befruchtung ein Jahr nach der Bestäubung erfolgt (Strasburger 1991).

1.2.3 Die Kiefer in der Forstwirtschaft

Die Kiefer ist in Deutschland und Europa nicht nur von ökologischer, sondern auch von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Dies soll durch einige Daten aus dem „Statistischen Jahrbuch über Ernährung, Landwirtschaft und Forsten 2000“ des Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (BMVEL) verdeutlicht werden. So umfasst der Kiefernbestand in Deutschland eine Fläche von 2.8 Millionen Hektar. Dies entspricht einem Anteil von 27.7 % der Gesamtfläche des Wirtschaftswaldes. Die Kiefer ist damit nach der Fichte der zweithäufigste Baum. Die Vorratsmenge von Holz beträgt für die Kiefer in Deutschland über 630 Millionen Festmeter, was einem Anteil von 22.5 % am Gesamtholzvorrat entspricht. Das Holz der Kiefer wird nicht nur als Bau- und Möbelholz verwendet, sondern auch zur Papier- und Sperrholzherstellung.

Ein ganz anderer Aspekt ist die pharmazeutische Nutzung von Terpinol, das aus der Kiefer gewonnen wird und ätherische Öle und Monoterpene enthält. Es wird gegen chronische Erkrankungen der Bronchien und als „Fichtennadelöl“ für Badeessenzen verwendet (Hänsel & Hölzl 1996). Daneben ist die Kiefer auch von großem dekorativen Wert und wird häufig in Parks und Gärten angepflanzt.

1.3 Der allgemeine Phenylpropanstoffwechsel

1.3.1 Übersicht

Die Produkte des Phenylpropanstoffwechsels haben phenolischen Charakter und gehören zu den sekundären Inhaltsstoffen der Pflanze. Der Begriff „sekundäre Inhaltsstoffe“ wurde ursprünglich eingeführt, um pflanzliche Verbindungen des primären Stoffwechsels, d. h. in jeder Zelle vorkommende, lebensnotwendige Metabolite des Grund- und Aufbaustoffwechsels (Proteine, Lipide und Kohlenhydrate), von solchen, die nicht essentiell für das Pflanzenleben sind, zu unterscheiden (Kossel 1891, zitiert nach Rhodes 1994). Diese Unterscheidung wurde bis heute beibehalten, obwohl sich herausstellte, dass auch die sekundären Inhaltsstoffe wichtige Funktionen in der Pflanze übernehmen (Rhodes 1994; Shirley 1996).

In Abb. 1.4 ist eine Übersicht des Phenylpropanstoffwechsels dargestellt (Forkmann & Heller 1999, Heller 1994, Heller & Forkmann 1993). Die Verbindung zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel wird von dem Enzym Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) hergestellt, das die Desaminierung der aromatischen Aminosäure Phenylalanin zur *trans*-Zimtsäure katalysiert. Die Zimtsäure besteht aus einem Benzolring mit einer Seitenkette aus drei

Kohlenstoffatomen. Diese Struktur eines Phenylpropan ist für den Biosyntheseweg und auch für die daraus entstehenden Produkte namensgebend. Die aromatischen Aminosäuren, neben Phenylalanin auch Tyrosin und Tryptophan, werden aus Kohlenhydraten über den Shikimatweg bereitgestellt (Herrmann & Weaver 1999).

Die Reaktion der PAL ist die Schlüsselreaktion zur Synthese der phenolischen Inhaltsstoffe in der Pflanze. Dementsprechend gut untersucht ist dieses Enzym (Camm & Towers 1973, Forkmann & Heller 1999, Heller & Forkmann 1993). Es handelt sich um ein Tetramer, das eine komplexe Struktur auf Protein- wie auch auf Genebene aufweist (Hahlbrock & Scheel 1989; speziell in *Pinus*: Butland *et al.* 1998). Das Produkt dieser Reaktion, die oben genannte *trans*-Zimtsäure, wird in zwei Schritten von der Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) und der 4-Cumarsäure:CoA-Ligase (4CL) zu der aktivierten Vorstufe Cumaroyl-CoA umgesetzt. Cumaroyl-CoA wiederum ist einerseits die Ausgangsverbindung der Synthese von Stilbenen, Cumarinen, Lignin und Flavonoiden, andererseits bildet es auch Konjugate mit Aminen, Säuren, Zuckern, Alkaloiden und Terpenoiden. Aus der Zimtsäure werden neben der Cumarsäure durch Hydroxylierungs-, Methylierungs- und Dehydrierungs-Reaktionen auch andere phenolische Säuren (Kaffee-, Ferula- und Sinapinsäure) und Benzoessäure-Derivate (Vanillin-, Salicylsäure) gebildet.

Das Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese ist die Chalkon-Synthase (CHS), die Cumaroyl-CoA und drei Malonyl-CoA-Einheiten zu dem Grundgerüst der Flavonoide, dem Chalkon, umsetzt. Vom Chalkon ausgehend erfolgt die Synthese der Flavonole über die Enzyme Chalkon-Isomerase (CHI), Flavanon-3-Hydroxylase (FHT) und Flavonol-Synthase (FLS). Von diesem Weg zweigen die Biosynthesewege unter anderem der Flavone, Isoflavonoide, Flavane und Anthocyanidine ab. Flavonoide können durch verschiedene Reaktionen modifiziert werden. Dazu gehören z. B. Glykosylierungen durch Glykosyltransferasen (FGT), aber auch Hydroxylierungen, Methylierungen, und Acylierungen.

Es wird angenommen, dass die Enzyme des Phenylpropanmetabolismus so genannte Metabolons bilden, Multienzymkomplexe, an denen die Biosynthese stattfindet und die membranassoziiert sind (Dixon & Paiva 1995, Winkel-Shirley 1999). Diese Organisation hat Konsequenzen für die Effizienz, Spezifität und Regulation des Biosynthesewegs, da die Intermediate direkt von einem Enzym zum nächsten weitergereicht werden können (*channeling*) bis hin zum Transport in die Vakuole. Die löslichen Enzyme sind in diesem Modell mit P-450-Enzymen wie C4H und F3'H (Flavonoid-3'-Hydroxylase), die in der Membran verankert sind, assoziiert.

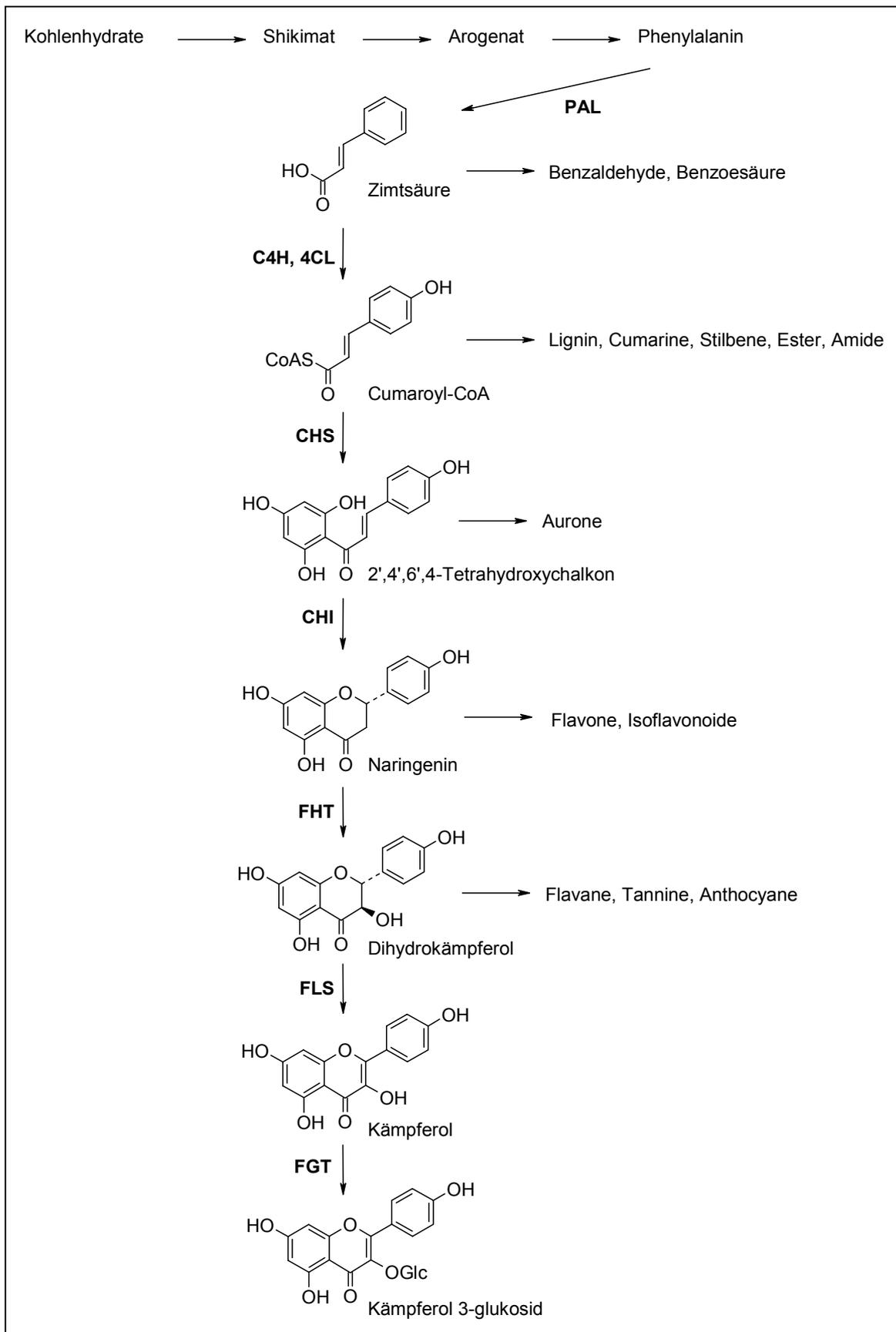


Abb. 1.4: Schematische Übersicht des Phenylpropanstoffwechsels am Beispiel der Kämpferol 3-glukosidsynthese.
 Erläuterung der Enzymakronyme im Text. Verändert nach Heller & Forkmann 1993 und Heller 1994.

Die Produkte des Phenylpropanstoffwechsels haben mannigfaltige Funktionen (Harborne 1993, Harborne & Williams 2000, Swain 1977). Sie sind Blütenfarbstoffe (Anthocyane und andere Flavonoide) und struktureller Bestandteil der Zellwand (Lignin), bieten vor allem aber Schutz vor biotischen und abiotischen Stressfaktoren wie Pathogenen (Phytoalexine, z. B. Stilbene und Flavonole), Insektenfraß (Cumarine, Chlorogensäure) und UV-B-Strahlung (Anthocyane, Flavonole und Sinapoyl-ester), agieren als Signalmoleküle (Salicylsäure) und wirken als Antioxidantien (Flavonoide). Viele Verbindungen werden durch Stress induziert (Dixon & Paiva 1995; Lee *et al.* 1995), wobei die Regulation der Biosynthese vielfach auf transkriptioneller Ebene erfolgt (Hahlbrock & Scheel 1989, Weisshaar & Jenkins 1998).

Neben den Funktionen der phenolischen Inhaltsstoffe innerhalb des Organismus in der Pflanze ist die Wirkung dieser Substanzen für den Menschen von Bedeutung, da er große Mengen von ihnen mit der Nahrung zu sich nimmt (Herrmann 1976). So beeinflussen diese Inhaltsstoffe nicht nur die Qualität von Nahrungsmitteln, sondern sind auch von medizinischer Bedeutung, wie z. B. der Zusammenhang zwischen Polyphenolen und Herzkrankheiten zeigt (*french paradoxon*, Schneider *et al.* 1996). Aus diesen Gründen wird versucht, den Gehalt von phenolischen Metaboliten mittels bio- und gentechnologischer Methoden (*metabolic engineering*, Dixon & Steele 1999, Yeoman & Yeoman 1996) zu beeinflussen, was nur mit umfangreicher Kenntnis der Zusammenhänge der Biosynthese phenolischer Verbindungen möglich ist. Die vorliegende Arbeit möchte dazu einen Beitrag leisten.

1.3.2 Die verschiedenen Substanzklassen und ihre Funktionen

Im Folgenden werden die in der Kiefer vorkommenden, phenolischen Inhaltsstoffe mit ihren Funktionen dargestellt, soweit sie in dieser Arbeit analysiert wurden. Einen Überblick über die in Holzpflanzen vorkommenden Verbindungen, ihre Biosynthese und Eigenschaften gibt Rowe 1989.

1.3.2.1 Flavonoide

Die Flavonoide haben eine gemeinsame Grundstruktur aus einem C₆-C₃-C₆-Skelett, das aus zwei aromatischen (A und B) und einem heterozyklischen Ring (C) mit einem Sauerstoffatom besteht (Abb. 1.5). Die Synthese geht, wie oben dargestellt, von der schrittweisen Kondensation dreier Malonyl-CoA-Einheiten mit einer Cumaroyl-CoA-Einheit zu einem Chalkon durch die CHS aus. Die verschiedenen Flavonoidklassen unterscheiden sich durch das Oxidationsniveau des C-Rings. In den folgenden Abschnitten werden Flavonole, Anthocyane und Fla-

vane (Proanthocyanidine) beschrieben. Aus Koniferen sind noch andere Flavonoidklassen wie Dihydroflavone, Dihydroflavonole und Flavone bekannt (*Picea abies*, Slimestad 1997), die jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden.

Flavonole

Die Flavonole kommen in Koniferen in großer Vielfalt vor, da das Grundgerüst oft Modifikationen durch Hydroxylierungen und Methylierungen aufweist. Häufig liegen Flavonole als Glykoside vor, wobei der Zuckerrest in 3- oder 7-Position liegen kann. Für diese Arbeit besonders wichtig sind die zweifach mit Hydroxyzimtsäuren an 3''- und 6''-Position acylierten Flavonol 3-glukoside (Abb. 1.5 A). Diese sind schon länger für *Pinus* beschrieben (Niemann 1979), doch konnte erst vor kurzem gezeigt werden, dass diese Verbindungen für den UV-B-Schutz in der Kiefer verantwortlich sind (Jungblut *et al.* 1995, Schnitzler *et al.* 1997). Ein wichtiger Hinweis für diese Funktion ist das Absorptionsverhalten, da durch die Acylreste das Absorptionsmaximum in den UV-B-Bereich verschoben wird (Abb. 1.5 B). Ferner konnte gezeigt werden, dass UV-B-Strahlung die Neusynthese der Verbindungen induziert und dass die Verbindungen in der Epidermis der Kiefernadel lokalisiert sind (Schnitzler *et al.* 1996). In *Pinus sylvestris* kommen als Flavonoleinheiten Kämpferol, Quercetin und Isorhamnetin, als Zucker β -D-Glukose und als Hydroxyzimtsäuren Cumar- und Ferulasäure vor. Ferulasäure konnte nur in 6''-Position, Cumarsäure in 3''- und 6''-Position des Glukoserests nachgewiesen werden (Jungblut *et al.* 1995). Das Vorkommen von diacylierten Flavonol 3-glykosiden als UV-B-Schutzpigmente scheint ein in Bäumen häufiges Phänomen zu sein, da sie nicht nur in *Pinus sylvestris*, sondern auch in *Pinus contorta* (Higuchi & Donnelly 1970), in *Picea abies* (Fischbach *et al.* 1999) und in verschiedenen *Quercus*-Arten nachgewiesen wurden, wo sie in Blättern (Romussi *et al.* 1983, Romussi *et al.* 1991) und Blatthaaren gefunden wurden (Skaltsa *et al.* 1994). Aber auch in *Brassica napus* wurden solche Verbindungen gefunden (Wilson *et al.* 1998).

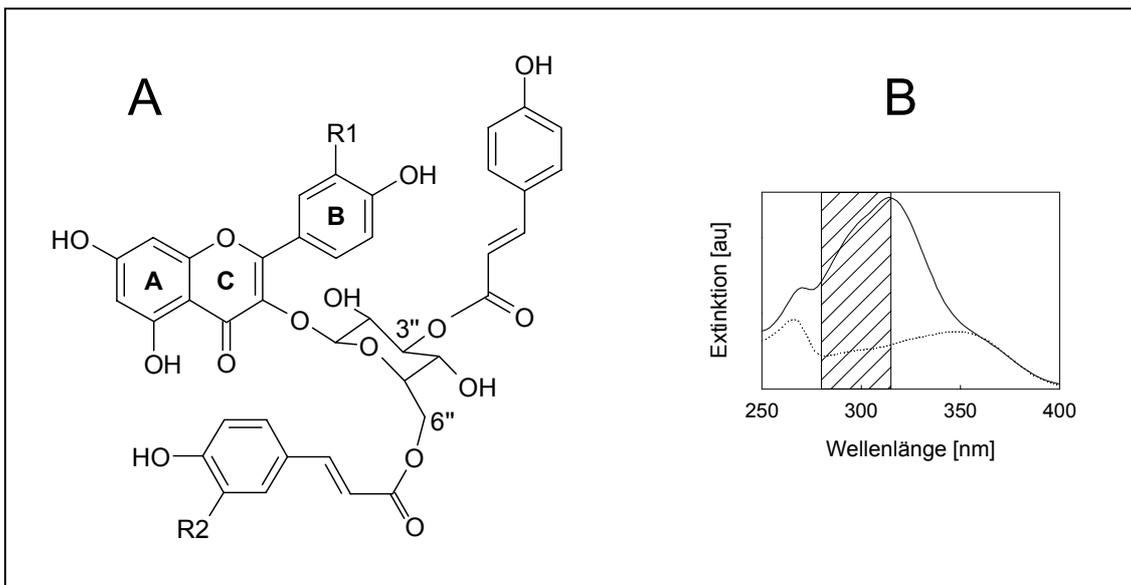


Abb. 1.5: Diacylierte Flavonol 3-glukoside.

A: Strukturformel der diacylierten Flavonol 3-glukoside in der Kiefer. R1: H = Kämpferol, OH = Quercetin, OMe = Isorhamnetin; R2: H = Cumarsäure, OMe = Ferulasäure.

B: Absorptionsspektrum von diacylierten (ausgezogen) und nichtacylierten (gepunktet) Flavonolglykosiden. Der UV-B-Bereich ist durch die Schraffur markiert.

Aus Jungblut *et al.* 1995.

Acylierte Flavonolglykoside spielen nicht nur für den UV-B-Schutz eine wichtige Rolle, sondern besitzen auch pilzhemmende Aktivität, wie von Verbindungen aus *Myrica* gezeigt wurde (Carlton *et al.* 1991).

Dass nicht nur acylierte Flavonolglykoside, sondern auch nichtacylierte Verbindungen für den UV-B-Schutz in Pflanzen wichtig sind, konnte bei *Arabidopsis* gezeigt werden (Li *et al.* 1993, Lois & Buchanan 1994). So genannte *tt*-Mutanten, bei denen bestimmte Enzyme des Biosynthesewegs von Flavonoiden defekt sind, zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber UV-B (siehe 1.1.3).

Neben der Funktion der Flavonole als UV-B-Schutzpigmente sind die antioxidativen Eigenschaften hervorzuheben. Quercetin besitzt z. B. eine außerordentlich hohe antioxidative Aktivität (Rice-Evans *et al.* 1997).

Flavonolglykoside kommen nicht nur in löslicher Form in der Pflanzenzelle vor, sondern können auch, vermutlich in einem „Lignin-Kohlenhydrat-Komplex“, als Ester in der Zellwand vorliegen (Strack *et al.* 1988a). Sie lassen sich mittels alkalischer Hydrolyse aus der Zellwand freisetzen.

Anthocyane

Anthocyane sind auffällig gefärbte Flavonoide und dienen vielen Pflanzen als rote, violette und blaue Blütenfarbstoffe, um Insekten anzulocken. Sie werden von der Dihydroflavonol-Reductase (DFR) und der Anthocyanidin-Synthase (ANS) über die Leucoanthocyanidine aus Dihydroflavonolen synthetisiert, wobei am B-Ring durch Hydroxylierungen und Methylierungen Modifikationen vorgenommen werden, die die Farbe beeinflussen (Forkmann & Heller 1999, Holton & Cornish 1995). Anthocyane kommen meist als Glykoside (Anthocyanine, Abb. 1.6) vor, weil sie unter physiologischen Bedingungen stabiler als die Aglyka (Anthocyanidine) sind. Die Modifikationen durch Zuckerreste sind ausgesprochen vielseitig, es kommen neben 3-Glykosiden auch 5-Glykoside vor, ebenso Di- und Triglykoside. Durch Acylierungen wird die Variationsmöglichkeit und damit die Anzahl der bisher gefundenen Verbindungen nochmals stark erhöht (siehe z. B. Tatsuzawa *et al.* 2000).

Anthocyane werden nicht nur in Blütenblättern gefunden, sondern akkumulieren auch in anderen Organen in Folge verschiedener Stresssituationen, wie tiefen Temperaturen, Phosphatmangel oder Starklicht bzw. UV-B (Chalker-Scott 1999, Dixon & Paiva 1995).

Die Schutzfunktion von Anthocyanen gegenüber UV-B ist umstritten (Chalker-Scott 1999). Einerseits wurde eine Akkumulation durch UV-B z. B. in *Pinguicula* beobachtet (Mendez *et al.* 1999) und ein Schutz der DNA durch Anthocyane in Mais nachgewiesen (Stapleton & Walbot 1994), andererseits zeigt das Absorptionsspektrum im UV-B-Bereich kein Maximum, wenn nicht Acylierungen mit Hydroxyzimtsäuren vorhanden sind (siehe 1.3.3). Aufgrund ihres Absorptionsverhaltens wird von Anthocyanen aber angenommen, dass sie Blätter vor Photoinhibition schützen, was die Akkumulation bei Starklicht und Kältestress erklärt (Gould *et al.* 1995).

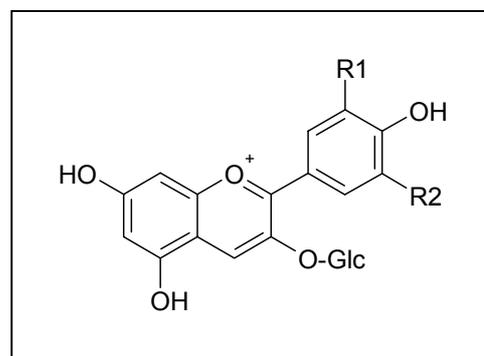


Abb. 1.6: Die Struktur von Anthocyanen.
 R1 = H, R2 = H Pelargonidin 3-glc;
 R1 = OH, R2 = H Cyanidin 3-glc;
 R1 = OH, R2 = OH Delphinidin 3-glc.

Proanthocyanidine

Unter dem Begriff Proanthocyanidine werden diejenigen farblosen Verbindungen zusammengefasst, aus denen durch Säurebehandlung Anthocyanidine entstehen. Dazu gehören neben den Leucoanthocyanidinen auch die kondensierten Tannine (Hemingway 1989).

Aus den Leucoanthocyanidinen (Flavan-3,4-diole) werden nicht nur, wie oben gezeigt, die Anthocyanidine, sondern auch die Flavan-3-ole wie Catechin (Abb. 1.7) synthetisiert. Dies erfolgt durch die Reduktion der 4-Hydroxygruppe durch die Leucoanthocyanidin-4-Reductase (LAR) (Forkmann & Heller 1999). Flavan-3-ole und Flavan-3,4-diole können zu Oligomeren, den kondensierten Tanninen, polymerisieren.

Catechin und Epicatechin sind bei Angiospermen und Gymnospermen weit verbreitet. Sie wirken als Antioxidantien (Rice-Evans *et al.* 1997), Fraßschutz (Harborne 1993) und Schutz vor Pilzen (Porter 1989).

Neben den kondensierten Tanninen gibt es auch hydrolysierbare Tannine, heterogene Polymere, die aus Phenolcarbonsäuren, besonders Gallussäure, und Zuckern bestehen. Gemeinsame Eigenschaft der Tannine ist die Fähigkeit, Proteine zu fällen, weswegen sie auch als Gerbstoffe zur Lederherstellung verwendet werden.

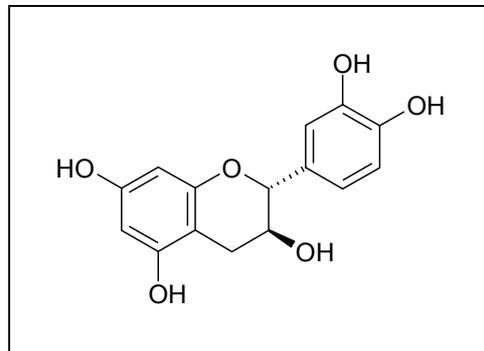


Abb. 1.7: Die Struktur von Catechin.

1.3.2.2 Stilbene

Stilbene werden aus Cumaroyl- bzw. Cinnamoyl-CoA und drei Malonyl-CoA-Einheiten von der Stilben-Synthase (STS) in einer der Chalkonsynthese ähnlichen Reaktion zu Resveratrol bzw. Pinosylvin (Abb. 1.8) umgesetzt. Der erste Weg wird in Wein (*Vitis*), der zweite in *Pinus sylvestris* besprochen.

Funktionell gehören Stilbene zu den Phytoalexinen und sind an der Abwehr von Pathogenen beteiligt (Smith 1996). In der Kiefer kommen Pinosylvin und Pinosylvinmethyl-

ether im Kernholz vor (Bergström *et al.* 1999), wo sie fungistatisch wirken und den Abbau von Holz durch Pilze verhindern (Norin 1989).

In der Nadel der Kiefer werden Stilbene normalerweise nicht gefunden, doch kann die Biosynthese durch Ozon induziert werden, woraufhin die Verbindungen in relativ großer Menge akkumulieren (Rosemann *et al.* 1991, Zinser *et al.* 2000).

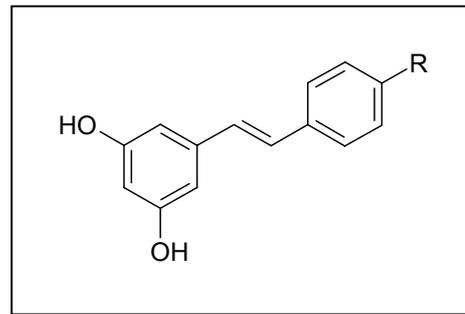


Abb.1.8: Die Struktur von Stilbenen.
R = H Pino-sylvin;
R = OH Resveratrol.

1.3.2.3 Lignin

Lignin ist ein Polymer, das aus den Monolignolen Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol besteht. Diese Grundeinheiten werden aus den entsprechenden CoA-Estern von Cumar-, Ferula- und Sinapinsäure durch Reduktion in zwei Schritten von der Cinnamoyl-CoA-Reduktase (CCR) und der Zimtalkohol-Dehydrogenase (CAD) synthetisiert (Whetten & Sederoff 1995).

Da die Monolignole instabil und giftig sind, werden sie als gut wasserlösliche, ungiftige β -Glukoside gespeichert und aus der Zelle an die Orte der Ligninbiosynthese transportiert. Die Polymerisierung der Monolignole zu Lignin erfolgt nach Abspaltung des Zuckerrestes durch β -Glukosidasen durch die Aktivität von Laccasen, Peroxidasen und H_2O_2 . Die Aktivität dieser Enzyme generiert durch die Oxidation der Alkohole freie Radikale, die sich dann spontan zu größeren Einheiten verbinden. Dabei werden auch kovalente Bindungen zu den polymeren Kohlenhydraten der Zellwand geknüpft (Strack & Mock 1993).

In Gymnospermen besteht der größte Teil des Lignins aus Coniferyl-Einheiten, während in Dikotylen Coniferyl- und Sinapyl-Einheiten in etwa gleicher Menge vertreten sind. In Monokotylen ist auch Cumarylalkohol in größerer Menge vorhanden (Strasburger 1991). Lignin gehört neben Cellulose und Chitin zu den häufigsten Polymeren auf der Erde (Whetten

& Sederoff 1995); Lignifizierung ist Bestandteil der normalen Entwicklung, kann aber auch durch Stress wie z. B. Verwundung induziert werden.

Lignin hat wegen der ausgeprägten Quervernetzung die Eigenschaft, die Zellwand druckfest zu machen, während die Cellulosefasern für die Zugfestigkeit verantwortlich sind. Durch die Lignifizierung verliert die Zellwand ihre Plastizität und erhält eine höhere Festigkeit. Lignin spielt daher eine wichtige Rolle für die Stabilität und Formgebung der Pflanzenzelle, erschwert dadurch auch das Eindringen von Pathogenen und dient zudem als Schutz vor Herbivoren. Dem entspricht die Induktion der Ligninbiosynthese durch Verwundung und Pathogenbefall (Whetten & Sederoff 1995). Aufgrund der Hydrophobizität der Ligninbestandteile werden Zellwände durch den Einbau von Lignin weniger wasserdurchlässig, weshalb gerade die Xylemgefäße stark lignifiziert sind.

1.3.2.4 Hydroxyzimtsäuren

Wie in Abschnitt 1.3.1 gezeigt wurde, sind Hydroxyzimtsäuren wichtige Intermediate bei der Biosynthese vieler phenolischer Inhaltsstoffe wie der Flavonoide, Stilbene oder des Lignins. Sie spielen aber auch selbst eine wichtige Rolle und kommen als Ester oder Amide, selten auch als Glykoside in Pflanzen vor (Strack & Mock 1993).

Neben den schon beschriebenen Estern mit Flavonol 3-glukosiden und Anthocyanen können Hydroxyzimtsäureester auch mit C₂₂- und C₂₄-Alkoholen in Wachsen von *Pinus sylvestris* und anderen Bäumen (Kolattukudy & Espelie 1989) oder als Diferulate in der Zellwand nachgewiesen werden. Diese Diferulate vernetzen Polysaccharide der Zellwand wie beispielsweise Arabinoxylane in Mais (Fry 1986, Fry *et al.* 2000) oder in Ananas (Smith & Harris 2001). Auch in Koniferen können zellwandgebundene Hydroxyzimtsäuren gefunden werden. Sie lassen sich durch alkalische Hydrolyse freisetzen und liegen möglicherweise zusammen mit Flavonolglykosiden als „Lignin-Kohlenhydrat-Komplexe“ vor (Strack *et al.* 1988a).

Weitere Verbindungen wie Amide, acylierte Protein oder Fettsäuren werden im nächsten Kapitel, das sich mit Hydroxycinnamoyl-Transferasen beschäftigt, detaillierter beschrieben.

1.3.3 Hydroxycinnamoyl-Transferasen

Bei der enzymatischen Acylierung mit Hydroxyzimtsäuren wird das Donorsubstrat, also die in aktivierter Form vorliegende Hydroxyzimtsäure, über eine Ester- oder Amidbindung an

eine Hydroxyl- oder Amino-Gruppe des Akzeptorsubstrats gebunden. Die Aktivierung der Säure kann durch Bindung an CoA als Thiolester oder an Glucose als Glucoseester erfolgen (Heller & Forkmann 1993). Die entsprechenden Enzyme lassen sich demnach anhand ihres Akzeptorsubstrats als *O*- oder *N*-Acyl-Transferasen oder anhand ihres Donorsubstrats unterscheiden. Im Folgenden werden die in Pflanzen gefundenen Hydroxycinnamoyl-Transferasen (HCT) vorgestellt, die zahlreiche verschiedene Substrate umsetzen und deren Produkte vielfältige Funktionen haben.

Eine Acylierung mit Hydroxyzimtsäuren ist für die Pigmentierung von Pflanzen wichtig, da acylierte Anthocyane dunklere Farben annehmen (bathochrome Verschiebung, Fujiwara *et al.* 1998a), was zu blauen und violetten Blütenfarben führt. Durch die Acylgruppe(n) werden die Farbpigmente außerdem stabilisiert (Fujiwara *et al.* 1997).

Aufgrund dieser auffälligen Wirkung und des Interesses, Blütenfarben bei Zuchtpflanzen zu beeinflussen, sind HCT's, die Anthocyane acylieren, sehr gut untersucht. So wurden diese Enzyme in *Ajuga reptans* (Callebaut *et al.* 1996), *Silene dioica* (Kamsteeg *et al.* 1980), *Matthiola incana* (Teusch *et al.* 1987), *Perilla frutescens* (Yonekura-Sakakibara *et al.* 2000), *Gentiana triflora* (Fujiwara *et al.* 1997) und *Iris ensata* (Yabuya *et al.* 2001) gefunden und charakterisiert. Von einigen sind inzwischen, wie noch näher ausgeführt wird, die Aminosäuresequenzen bekannt.

Eine weitere Gruppe von HCT's, die gut untersucht ist, setzt Amine zu Amiden um. Die Synthese solcher Amide wird durch Pathogeninfektion induziert, sie wirken als Phytoalexine bei der Abwehr von Pathogenen. Zu den Substraten, die mit Hydroxyzimtsäuren verestert werden, gehört neben Agmatin (Bird & Smith 1983) und Oktopamin (Matsuda *et al.* 2000) vor allem Tyramin. Tyramin-Hydroxycinnamoyl-Transferasen (THT) werden durch TMV-Infektion bei Tabak (Fleurence & Negrel 1989), durch Elicitoren bei *Solanum tuberosum* (Hohlfeld *et al.* 1996a, Hohlfeld *et al.* 1995) und *Nicotiana glutinosa*-Zellkulturen (Villegas & Brodelius 1990) aktiviert. Sie können aber auch in Weizen und Gerste (Louis & Negrel 1991) sowie in Schlafmohn (*Papaver somniferum*, Yu & Facchini 1999) gefunden werden. Von den Amiden wird angenommen, dass sie in die Zellwand eingebaut werden (Fleurence & Negrel 1989, Hohlfeld *et al.* 1996a).

Zu den oben genannten Amiden gehören auch die Avenanthramide, d. h. Phytoalexine aus *Avena* (Ishihara *et al.* 1997, Ishihara *et al.* 1998, Matsukawa *et al.* 2000), und Dianthramide, d. h. Phytoalexine aus *Dianthus* (Reinhard & Matern 1989, Yang *et al.* 1997). Die Acyl-Transferase, die an der Synthese der Dianthramide beteiligt ist, kann sowohl Hydroxycinna-

moyl- als auch Benzoyl-CoA als Donorsubstrat verwenden, obwohl in *Dianthus* nur die Benzoylierung von Anthranilat zu *N*-Benzoylanthranilat nachweisbar ist (Yang *et al.* 1997).

Neben diesen sehr gut untersuchten HCT's gibt es weitere, die aromatische Säuren wie Shikimat oder Quinat umsetzen. Von diesen Transferasen sind die Produkte allerdings oft nicht nachweisbar (Lotfy *et al.* 1994). Enzymaktivitäten wurden aber in *Raphanus sativus* und *Cichorium endivia* wie auch in *Equisetum* (Hohlfeld *et al.* 1996b) gefunden, scheinen also weit verbreitet zu sein, da sie sowohl bei Angiospermen als auch bei Pteridophyten vorkommen. Untersuchungen mit *Solanum tuberosum* haben gezeigt, dass die Acyl-Transferase sowohl die Hin- als auch die Rückreaktion katalysiert, was zu der Hypothese geführt hat, dass das Enzym für die Katabolisierung von Quinatestern verantwortlich ist (Rhodes *et al.* 1979). In *Nicotiana glauca* und *Stevia rebaudiana* konnte die Synthese von Chlorogensäure (Caffeoylquinat) durch HCT's nachgewiesen werden (Ulbrich & Zenk 1979), einem häufigen Metabolit, der antioxidative Eigenschaften besitzt (Grace & Logan 2000).

Weitere Produkte von HCT's sind acylierte Fettsäuren, d. h. Intermediate der Suberin-synthese (Lotfy *et al.* 1996), aber auch acylierte Alkaloide, die in *Lupinus* gefunden wurden (Suzuki *et al.* 1996), und acylierte Proteine, deren Funktion unbekannt ist (Kohler & Kaus 1997). Bei diesen Proteinen handelt es sich wahrscheinlich um Glykoproteine. Mit Hydroxycinnamoyl-säuren veresterte Proteine sind auch in Bakterien nachgewiesen worden, wo der Acylrest als Chromophor dient (Baca *et al.* 1994, Hoff *et al.* 1994). In einer aktuellen Publikation wurde die Aktivität einer HCT nachgewiesen, die an der Synthese der oben genannten zellwandvernetzenden Arabinoxylan-Verbindungen beteiligt ist (Yoshida-Shimokawa *et al.* 2001).

Eine weitere Funktion von Acylierungen ist die eines Signals für den Transport in die Vakuole, wie es für Malonylierungen von Flavonoiden gezeigt werden konnte (Matern *et al.* 1986).

Von einigen der oben erwähnten Hydroxycinnamoyl-CoA-abhängigen Transferasen sind in der letzten Zeit die Aminosäuresequenzen aufgeklärt worden. Dabei zeigte sich anhand von Homologievergleichen, dass es zwei verschiedene Familien von Hydroxycinnamoyl-Transferasen geben muss: (i) eine große Gruppe von HCT's, die eine Acyl-Transferase-Überfamilie bilden, welche zuerst von St-Pierre *et al.* 1998 beschrieben wurde. Dazu gehören sowohl *O*- und *N*-HCT's, die Anthocyane und Anthranilat acylieren (Fujiwara *et al.* 1998b, Yang *et al.* 1997, Yonekura-Sakakibara *et al.* 2000), als auch Acetyl-CoA übertragende Transferasen (Dudareva *et al.* 1998, Shaw & Leslie 1991, St-Pierre *et al.* 1998, Walker & Croteau 2000);

(ii) eine kleine Gruppe von Tyramin-Hydroxycinnamoyl-Transferasen, von der bis jetzt zwei Mitglieder sequenziert wurden und die ebenfalls CoA-Ester als Donorsubstrate verwendet (Farmer *et al.* 1999, Schmidt *et al.* 1999). Letztere sind im Gegensatz zur ersten Gruppe Dimere und haben keine Sequenzhomologie zu dieser. Die Zugehörigkeit von *O*-HCT's, deren Akzeptorsubstrate Anthocyane sind, und einer *N*-HCT, deren Akzeptorsubstrat Anthranilat ist, zu der ersten Gruppe zeigt, dass die Einteilung dieser Enzyme in Gruppen nach dem Akzeptoratom nicht sinnvoll ist.

Die Existenz einer Überfamilie von Acyl-CoA-übertragenden Enzymen zeigt einige interessante Aspekte. Der Mechanismus scheint sehr alt zu sein, da er schon bei der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) in Bakterien zu finden ist, wo er für die Entgiftung von Antibiotika verantwortlich ist (Harwood *et al.* 1983, Shaw & Leslie 1991). Dieses Enzym ist strukturell sehr gut bekannt, so sind z. B. die räumliche Struktur der CoA-Bindungstasche und die Funktion einzelner Aminosäuren aufgeklärt (Lewendon *et al.* 1994, Shaw & Leslie 1991). Dies sollte die Aufgabe erleichtern, den Mechanismus der pflanzlichen Acyl-Transferasen zu untersuchen.

Neben der Übertragung von Acyleinheiten durch CoA-Ester gibt es auch Hydroxycinnamoyl-Transferasen, die Glucoseester verwenden. Solche Enzyme wurden für Betacyanine und Anthocyane nachgewiesen (Bokern *et al.* 1992, Gläßgen & Seitz 1992). Anthocyane stellen damit die einzige Gruppe von Verbindungen dar, bei denen beide Mechanismen gefunden wurden. Auch von diesen Enzymen sind bislang zwei Sequenzen bekannt. Der Vergleich mit anderen Proteinen zeigt eine große Ähnlichkeit mit Carboxypeptidase-ähnlichen Proteinen (Lehfeldt *et al.* 2000, Li & Steffens 2000), aber keine mit einer der beiden oben genannten Gruppen. Das bedeutet, dass es sich bei diesen Enzymen um eine dritte Gruppe von Acyl-Transferasen handeln muss.

Diese Ergebnisse sind Hinweise darauf, dass einerseits die Acylierung mit CoA-Estern auf zwei voneinander unabhängigen Wegen entstanden ist, andererseits die Acylierung mit Glucoseestern nicht nur mechanistisch von der Acylierung mit CoA-Estern verschieden ist, sondern sich auf einem dritten Weg entwickelt haben muss.

Ergänzend sei hier noch angemerkt, dass es auch andere CoA-abhängige Acyl-Transferasen gibt, die aliphatische Acylgruppen übertragen und sowohl im Primär- als auch im Sekundärstoffwechsel zu finden sind. Dazu gehören Malonyl-Transferasen, die bei *Petersilie* nachgewiesen wurden und Flavone acylieren (Hahlbrock 1972), aber auch Acyl-CoA-Transferasen,

die langkettige Acylreste übertragen und an der Synthese von vielen Produkten verschiedener Stoffwechselwege beteiligt sind. Z. B. werden sie im Lipidstoffwechsel bei dem Aufbau von Fettsäuren, der Synthese von Phosphoglyceriden und Triacylglycerinen (Stryer 1995), aber auch bei der Synthese anderer Membranbestandteilen (Deka *et al.* 1986) benötigt. Speziell bei Pflanzen wurden solche Transferasen für die Synthese von Speicherlipiden in Früchten und Ölsaaten untersucht (Avocado, Eccleston & Harwood 1995; Ölpalme, Manaf & Harwood 2000; Arabidopsis, Hobbs *et al.* 1999).

Die Erforschung der HCT's ist sehr stark auf die an der Synthese von Blütenfarbstoffen (Acylierung von Anthocyanen) und Phytoalexinen (Acylierung von Aminen) beteiligten Enzyme konzentriert. Die Synthese von UV-B-Schutzpigmenten, also die Acylierung von Flavonol 3-glykosiden durch HCT's, ist dagegen noch nicht untersucht worden. Es gibt meines Wissens nach nur eine ältere Arbeit, bei der der Nachweis einer HCT geführt wurde (Saylor & Mansell 1977), die an der Acylierung eines Flavonoltriglykosids beteiligt ist. Doch wurde dort keine Charakterisierung des Enzyms beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurden also zum ersten Mal Hydroxycinnamoyl-Transferasen untersucht, die Flavonol 3-glukoside als Substrate acylieren und damit für den UV-B-Schutz verantwortlich sind.

1.4 Aufgabenstellung

Berücksichtigt man die vorherigen Ausführungen und die in ihnen angeklungenen Forschungsdesiderata, dann erscheinen zwei Themenkomplexe im Zusammenhang mit der Untersuchung von Hydroxycinnamoyl-Transferasen in der Kiefer besonders wichtig:

- (i) Der Stand der Forschung zu HCT's allgemein zeigt, dass es sich um eine wichtige Enzymklasse handelt, deren Bedeutung für den Sekundärstoffwechsel gerade erst erkannt wird. Es ist im Grunde nichts über Flavonol 3-glukosid-Hydroxycinnamoyl-Transferasen bekannt. In dieser Richtung sollen in der vorliegenden Arbeit die proteinbiochemischen und enzymatischen Kenntnisse erweitert werden. Dazu gehört neben der Entwicklung eines Nachweistests der Aktivität der Transferasen und einer biochemischen Charakterisierung auch die Reinigung und Aminosäure-Sequenzierung als Grundlage für weiterführende molekularbiologische Arbeiten.

- (ii) Kenntnisse über die UV-B-Schutzmechanismen bei Pflanzen werden in Hinblick auf die Ozonloch-Problematik zunehmend wichtiger. Wenig ist darüber bekannt, ob Pflanzen in der Lage sind, sich höheren UV-B-Strahlungsintensitäten anzupassen, zumal wenige Untersuchungen unter natürlichen Bedingungen im Freiland angestellt wurden. Die Kiefer kann dabei, als Wald bildender Baum mit einiger wirtschaftlicher Bedeutung, als ein wichtiges Forschungsobjekt gelten. Um die Ergebnissen zu ergänzen, die auf Inhaltsstoffebene bei Keimlingen bereits bekannt sind, sollten einerseits Experimente unter kontrollierten Bedingungen mit Keimlingen in Sonnensimulatoren, andererseits Messungen an adulten Freilandbäumen durchgeführt werden, um das Verhalten von Enzymaktivität und Inhaltsstoffakkumulation unter natürlichen Bedingungen besser zu verstehen. Erst wenn man das Verhalten unter natürlichen Bedingungen kennt, lassen sich Experimente planen, durchführen und interpretieren, die ein Szenario der erhöhten UV-B-Belastung simulieren, wie es für die nächsten Jahrzehnte vorausgesagt wird.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

ÄKTA Explorer 10s mit Software UNICORN	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Analysenmühle A 10	IKA Labortechnik, Staufen
Elektrophorese-Apparatur Mini-PROTEAN® II Cell Mini Prep Cell	BioRad, München BioRad, München
Fertigsäulen	
HiPrep Desalting 26/10	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Mono P HR 5/20	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Mono Q HR 5/5	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Superose 6	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Source Phe 4.6/100	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
FPLC	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Geltrockner 2003	LKB Bromma, S
HPLC	
Analytisch und Präparativ	Beckman, München
Image Master VDS mit Software Imagemaster 1D Elite 2.0	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Inkubatoren	
	Eppendorf, Hamburg
	Liebisch, Bielefeld
Konzentratoren (Ausschlussgröße 10000 Da)	
Ultrafree-15-Einheiten	Millipore, Eschborn
Centricon YM-10	Millipore, Eschborn
Leersäulen	
XK 16/20	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
XK 50/20	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
XK 26/40	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
C 10/10	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Lyophilisator Alpha I-5	Christ, Osterode
Microdismembrator II bzw. S	B. Braun, Melsungen
Microplate-Reader Thermomax mit Software Softmax	Molecular Devices, USA
pH-Meter	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Rotationsverdampfer	Büchi, CH
Spektralphotometer DU 7	Beckman, München
Ultraschallbad Sonorex Super 10P	Bandelin, Berlin
Zentrifugen	
Tischkühlzentrifuge 3K12	SIGMA, Osterode
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge J2-21	Beckman, München
Tischzentrifuge UNIVERSAL	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge Biofuge B	Heraeus Christ, Osterode

2.2 Chemikalien, Säulenmaterial und Verbrauchsmaterial

Alle gebräuchlichen Chemikalien und Lösungsmittel hatten Analysequalität (p.a.) oder besser und sind nicht einzeln aufgeführt.

2.2.1 Laborchemikalien und Verbrauchsmaterial

Aluminiumoxid (basisch, Aktivitätsstufe 1), Nr. A-1647	Sigma, Steinheim
Celite, Diatomaceous Earth, Nr. D-5384	Sigma, Steinheim
Celluloseplatte zur DC Nr. 5714	Merck, Darmstadt
CoA, freie Säure	Amersham, Freiburg
Colloidal Coomassie Roti [®] -Blue	Roth, Karlsruhe
Dithioerythritol, Nr. D-8255	Sigma, Steinheim
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
HPLC-Mikrogefäße	Gilson, F
HPLC-Säule 250x4.6 mm Spherisorb ODS2 5.0 µm	Bischoff
Jodacetamid	Sigma, Steinheim
Kieselgelplatte 60 zur DC, Nr. 5714	Merck, Darmstadt
Mikrotiterplatte	Nunc, Wiesbaden
NAP-5 Säulen (Sephadex G-25)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Natriumborhydrid	Riedel-de-Haën, Seelze
N-Hydroxysuccinimid	Merck, Darmstadt
N-Methylmaleimid	Sigma, Steinheim
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	Fluka, CH
o-Phosphorsäure, Nr. P-6560	Sigma, Steinheim
Perlite, Agriperl	Perlite-Dämmstoffe, Dortmund
Polybuffer 74	Amersham Pharmacia, Freiburg
Polybuffer 96	Amersham Pharmacia, Freiburg
Polyethylenglycol 1450 (PEG 1450), Nr. P-5402	Sigma, Steinheim
Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), unlöslich, Nr. P-6755	Sigma, Steinheim
Rinderserumalbumin (BSA), Nr. A-6003	Sigma, Steinheim
Seesand	Merck, Darmstadt
Serva Blau G	Serva, Heidelberg
Strataclean [®] Resin	Stratagene, USA

2.2.2 Säulenmaterialien

Blue Sepharose CL-6B	Amersham Pharmacia, Freiburg
Butylsepharose	Amersham Pharmacia, Freiburg
CoA-Agarose, Nr. C-7013	Sigma, Steinheim
Dowex 50 WX 8	Aldrich, Steinheim
Fractogel EMD DEAE 650 (s)	Merck, Darmstadt
Macro-Prep [®] Ceramic Hydroxyapatite Type II (40 µm)	BioRad, München
Matrex Green A	Amicon, USA
Matrex Orange A	Amicon, USA
Phenylsepharose	Amersham Pharmacia, Freiburg
Q-Sepharose ff	Amersham Pharmacia, Freiburg
Reactive Brown 10, Nr. R-2757	Sigma, Steinheim
Reactive Yellow 3, Nr.-3757	Sigma, Steinheim

Reactive Yellow 86, Nr.-2382
Sephadex G-25

Sigma, Steinheim
Amersham Pharmacia, Freiburg

2.2.3 Referenzsubstanzen

Cyanidin	Extrasynthese, F
Cyanidin 3-glukosid (Kuromanin)	Extrasynthese, F
Cyanidin 3,5-diglukosid (Cyanin)	Polyphenols, N
Cyanidin 3,2''-diglukosid	Polyphenols, N
Cyanidin di- und triglykoside	Polyphenols, N
Delphinidin	Extrasynthese, F
Ferulasäure, Nr. F-3500	Sigma, Steinheim
Isorhamnetin 3- β -D-glukopyranosid	Extrasynthese, F
Kämpferol 3- β -D-glukopyranosid (Astragalin)	Extrasynthese, F
<i>p</i> -Cumarsäure	Fluka, CH
Päonidin 3-glukosid	Extrasynthese, F
Pelargonidin 3-glukosid (Callistephin)	Extrasynthese, F
Pinosylvinmonomethylether	Apin, GB
Quercetin 3- α -D-arabinopyranosid	Roth, Karlsruhe
Quercetin 3- β -D-galaktopyranosid (Hyperosid)	Apin Chemicals, GB
Quercetin 3- β -D-glukopyranosid (Isoquercitrin)	Extrasynthese, F
Quercetin 3- α -L-rhamnopyranosid (Quercitrin)	Apin Chemicals, GB
Tilirosid (6''-(<i>p</i> -Cumaroyl)-kämpferol 3-glukosid)	Extrasynthese, F

2.3 Synthese von *p*-Cumaroyl- und Feruloyl-CoA

Für den Nachweis der Aktivität der Hydroxycinnamoyl-CoA: Flavonol 3-glukosid Hydroxycinnamoyl-Transferasen (HCT's) wurden die CoA-Ester von Hydroxyzimtsäuren als Donor-substrate benötigt. Da diese nicht käuflich erhältlich waren, wurden die Ester von *p*-Cumarsäure und Ferulasäure nach der verbesserten, ursprünglich von Stöckigt & Zenk 1975 stammenden Methode synthetisiert.

Für die Synthese der CoA-Ester von *p*-Cumarsäure und Ferulasäure wurden in einem ersten Schritt die N-Hydroxysuccinimidester hergestellt. Dafür wurden 15 ml Dioxan über eine kleine Säule mit 10 g Aluminiumoxid getrocknet und gereinigt, 1 mmol der Hydroxyzimtsäure und 1 mmol N-Hydroxysuccinimid darin gelöst und 1.1 mmol N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid hinzugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Ansatz mit 15 ml Ethylacetat versetzt, über eine Säule mit Seesand (2 cm) und Celite (1 cm) filtriert und das Filtrat im Rotationsverdampfer *in vacuo* zur Trockene eingedampft.

Zur Kontrolle der Reaktion wurde eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Dafür wurde auf eine Kieselgelplatte (Merck, Typ 60) etwas Reaktionsprodukt sowie die entspre-

chende Hydroxyzimtsäure und N-Hydroxysuccinimid aufgetragen und die Platte mit Methanol:Chloroform (1:20) entwickelt. Unter UV-Licht (366 nm) konnten die einzelnen Substanzen sichtbar gemacht werden. Es zeigte sich, dass keine Ausgangsstoffe in dem Reaktionsprodukt vorhanden und die Reaktion somit quantitativ abgelaufen war.

Im nächsten Schritt erfolgte die Umesterung der erhaltenen N-Hydroxysuccinimidester mit freiem CoA. Dafür wurden 40 ml Aceton und 50 ml H₂O aufgeköcht und unter Argon abgekühlt. Der N-Hydroxysuccinimidester des ersten Syntheseschritts (1 mmol) wurde in ca. 40 ml Aceton gelöst. Nach Zugabe von ca. 50 ml H₂O, 0.25 mmol CoA (freie Säure) und ca. 1.2 mmol NaHCO₃ wurde das Reaktionsgemisch 24 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 2 M Ameisensäure auf pH 3-4 eingestellt und zweimal mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde *in vacuo* im Rotationsverdampfer auf ca. 10 ml konzentriert.

In einem dritten Schritt wurde der entstandene Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester mittels Säulenchromatographie aus dem erhaltenen Reaktionsgemisch gereinigt. Dies erfolgte an einer Fractogel EMD DEAE 650 (s)-Säule mit 12 ml Gelvolumen unter folgenden Bedingungen (Tab. 2.1).

Tab. 2.1: Reinigung von Hydroxyzimtsäure-CoA-Estern.

Säule	Pharmacia XK 16/20
Säulenmaterial	Fractogel EMD DEAE 650 (s)
System	ÄKTA Explorer 10s
Lösung A	0.1 M Ameisensäure
Lösung B	1.5 M Na-Formiat, pH 3.5
Detektion	Cumaroyl-CoA: 256 nm, 330 nm Feruloyl-CoA: 256 nm, 340 nm
Flussrate	2 ml min ⁻¹
Fraktionsgröße	6 ml
Laufbedingungen	100 ml 0.5 M NaOH 100 ml B Äquilibrieren mit 100 ml A 50 ml Lösung der Reaktionsprodukte auf die Säule geben Spülen mit 50 ml A Gradient: 0-100 % B in 110 ml Spülen mit 320 ml B

Die Säule wurde mit 100 ml 0.5 M NaOH-Lösung und 100 ml Lösung B gereinigt. Nach der Äquilibrierung mit Lösung A wurde das Reaktionsprodukt, das in 50 ml H₂O gelöst war, auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 50 ml Lösung A gespült. Zur

Elution der Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester wurde ein Gradient von 0 % auf 100 % Lösung B in 110 ml verwendet. Die Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester waren in den Fraktionen zwischen dem Ende des Gradienten und ca. 60 ml 100 % B zu finden. Die Fraktionen wurden mittels Spektralphotometer und Dünnschichtchromatographie (Cellulose, Laufmittel: Butanol:Eisessig:H₂O 5:2:3, $R_f = 0.30$, die CoA-Ester zeigen unter Ammonikatmosphäre bei 366 nm eine grüngelbe Fluoreszenz) überprüft. Alle Fraktionen, die das Absorptionsspektrum des Hydroxyzimtsäure-CoA-Esters zeigten (Abb. 2.1), wurden vereinigt und mit Hilfe einer Dowex 50 WX 8-Säule (ca. 80 ml) entsalzt, die mit 400 ml 2 M HCl-Lösung äquilibriert und mit H₂O bis zu einem neutralen pH-Wert gewaschen wurde. Die entsalzte Lösung wurde im Rotationsverdampfer *in vacuo* bis zur Trockene eingengt.

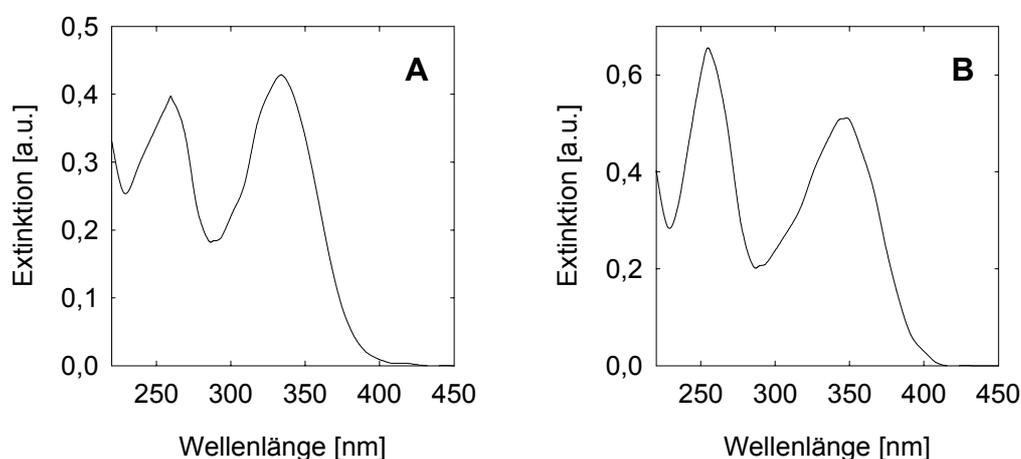


Abb. 2.1: Absorptionsspektrum von Cumaroyl-CoA (A) und Feruloyl-CoA (B) jeweils in H₂O.

Cumaroyl-CoA zeigt zwei Absorptionsmaxima bei 259 und 334 nm, Feruloyl-CoA bei 256 und 346 nm, wobei jeweils das erste Maximum vom CoA-Anteil und das zweite Maximum vom Hydroxyzimtsäure-Anteil verursacht wird.

Zur Entfernung der Ameisensäure wurde der Rückstand zweimal in je 10 ml H₂O aufgenommen und bis zur Trockene eingengt. Anschließend wurde der Ester in einem definierten Volumen aufgenommen, die Konzentration mittels der Absorption des zweiten Absorptionsmaximums bestimmt ($\epsilon = 20000$) und die Ausbeute (bezogen auf CoA) berechnet (Cumaroyl-CoA: 43-82 %, Feruloyl-CoA: 43 %). Für die Lagerung wurde die Lösung auf 10 mg/ml (ca. 10 mM) verdünnt, in 1ml-Aliquots in flüssigem N₂ eingefroren und bei -20°C gelagert.

2.4 Enzymtest zum Nachweis der Aktivität der HCT

2.4.1 Aufschluss von Pflanzenmaterial

Für den Nachweis der HCT's wurden frisch geerntete Nadeln in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und vorgemörsert. Von diesem Material wurden ca. 100 mg mit 3 x 0.5 ml Aufschlusspuffer (AP: 0.1 M NaPi, pH 6.8, 10 % (w/v) Saccharose, 1.5 % (w/v) PEG 1450, 5 mM DTE), 50 mg PVPP und ca. 4 mg Celite auf Eis im Mörser homogenisiert und zweimal zentrifugiert (ca. 20000 g, 4°C, 5 min). Der Überstand wurde mit Hilfe von NAP-5-Säulen (Amersham Pharmacia Biotech), die mit 10 ml AP äquilibriert waren, entsalzt.

2.4.2 Messung des Proteingehalts

Von dem entsalzten Proteinextrakt wurde nach der modifizierten Methode von Bradford 1976 der Proteingehalt bestimmt. Dazu wurden von jeder Probe 10 µl, als Nullwert 10 µl H₂O sowie vier Proteinstandards (je 10 µl 50, 100, 150 und 200 µg ml⁻¹ BSA in H₂O) in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben, 200 µl Färbelösung (70 mg Serva Blau G, 50 ml Ethanol und 100 ml 85 % (v/v) *o*-Phosphorsäure auf 1 l wässrige Lösung) zugegeben und 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Jeder Ansatz erfolgte in dreifacher Wiederholung.

Die Messung wurde mit einem Microplate-Reader vorgenommen, der die Absorption bei 590 nm bestimmte. Die Auswertung (Abzug des Nullwertes, Berechnung der Eichgeraden und der Mittelwerte der Proteinkonzentrationen mit Standardabweichungen) wurde von der dazugehörigen Software SOFTMAX durchgeführt. Proben, deren zu erwartende Proteinkonzentration über 200 µg ml⁻¹ lag, wurden vor der Messung entsprechend mit Puffer oder H₂O verdünnt.

2.4.3 Durchführung des Enzymtests

Für den Enzymtest von Nadelrohextrakten wurde der entsalzte Proteinextrakt mit AP auf eine Proteinkonzentration von 50-100 µg ml⁻¹ eingestellt. 200 µl davon wurden mit 6 µl Cumaroyl-CoA (3.5 mM in H₂O) und 4.5 µl Isorhamnetin 3-glukosid, Kämpferol 3-glukosid oder 5.9 µl Tilirosid (je 2 mg ml⁻¹ in MeOH) versetzt, sodass die Endkonzentration bei 0.1 mM lag.

Der Test von Fraktionen der Proteinreinigung erfolgte analog, die Proben wurden je nach erwarteter Aktivität verdünnt. Bei Reinigungsschritten mit kleinen Fraktionen, bei denen wenig Volumen zur Verfügung stand, wurde der Ansatz auf 100 µl verkleinert. Jeder Ansatz

wurde 60 min bei 37°C inkubiert, anschließend mit 5.7 µl Pinosylvinmethylether (PSM; 40 µg ml⁻¹ in MeOH) als internem Standard versetzt und zweimal mit je 200 µl Ethylacetat ausgeschüttelt. Zur Trennung der Phasen wurde jeweils 3 min mit ca. 15000 g bei RT zentrifugiert. Die organischen Phasen wurden vereint und unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Der Rückstand wurde in 80 µl Acetonitril/Wasser (1:1) aufgenommen und mit ca. 20000 g zentrifugiert.

2.4.4 Analytik der Enzymprodukte mittels HPLC

Die in Acetonitril/Wasser (1:1) aufgenommenen Enzymprodukte wurden mittels HPLC getrennt und quantifiziert. Die Trennung erfolgte mit zwei verschiedenen HPLC-Systemen (abgekürzt Sys 1 und Sys 3), die sich geringfügig in der Ausstattung unterschieden (siehe Tab. 2.2). Bei beiden HPLC-Systemen wurde die in Tab. 2.3 dargestellte Methode verwendet.

Tab. 2.2: Ausstattung der analytischen HPLC-Systeme.

	Sys 1: Beckman System Gold	Sys 3: Beckman System Gold
Pumpen	114M (analytische Pumpenköpfe)	Pumpenmodul 125 (analytische Pumpenköpfe)
Steuerung	Interface 406	
Manuelle Probenaufgabe	System Organizer	-
Autosampler	507	507e
Dioden Array Detektor	168	
Säulenofen	Spark Holland 880	
Säule	250x4.6 mm Spherisorb ODS2 5.0 µm mit Vorsäule	
Software	GOLD 6	GOLD 8

Tab. 2.3: HPLC-Methode zur Trennung von mono- und diacylierten Flavonol 3-glukosiden.

Lösung A	98.0 % (v/v) H ₂ O 1.9 % (v/v) Ameisensäure 0.1 % (w/v) Ammoniumformiat
Lösung B	88.4 % (v/v) Acetonitril 9.6 % (v/v) H ₂ O 1.9 % (v/v) Ameisensäure 0.1 % (w/v) Ammoniumformiat
Flussrate	1 ml min ⁻¹
Gradient	0-3 min isokratisch 0 % B 3-10 min von 0 % auf 35 % B 10-17 min von 35 % auf 44 % B 17-22 min von 44 % auf 79 % B 22-23 min von 79 % auf 100 % B 23-25 min von 100 % auf 0 % B 25-29 min isokratisch 0 % B
Detektion	314 nm
Dioden Array	Scan mode 2, 250-450 nm
Injektionsvolumen	20 µl

2.4.5 Berechnung der spezifischen Aktivität

Mit Hilfe der durch die HPLC-Messung ermittelten Werte wurde die spezifische Aktivität der HCT's nach folgender Formel errechnet:

$$\text{spez. Aktivität} \left[\frac{\mu\text{kat}}{\text{kg}} \right] = \frac{4 \cdot \text{PA}_{\text{Prod}} \cdot \text{PA}_{\text{int Stand 100\%}}}{\text{PA}_{\text{int Stand}}} \cdot \text{EF} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{PA}} \right] \cdot \frac{1}{c_{\text{Prot}} [\text{mg/ml}] \cdot 0.2 [\text{ml}] \cdot 10^{-6}} \cdot \frac{1}{3600 [\text{s}]}$$

wobei gilt:

PA_{Prod} Peakfläche des Enzymprodukts

$\text{PA}_{\text{int Stand 100\%}}$ theoretische Peakfläche des internen Standards

$\text{PA}_{\text{int Stand}}$ Peakfläche des gemessenen internen Standards

c_{Prot} Proteinkonzentration des eingesetzten Enzymextrakts

EF Eichfaktor bei 314 nm in $\mu\text{mol pro PA}$, abhängig von System und Produkt

	monoacyliert	diacyliert
Sys 1	$6.0 \cdot 10^{-5}$	$4.3 \cdot 10^{-5}$
Sys 3	$2.5 \cdot 10^{-5}$	$1.7 \cdot 10^{-5}$

Die Ermittlung des Eichfaktors erfolgte für monoacylierte Flavonol 3-glukosid-Derivate direkt mit Tilirosid (6''-(*p*-Cumaroyl) kämpferol 3-glukosid), für diacylierte Flavonol 3-glukoside mit 2'',6''-Di-(*p*-cumaroyl)-kämpferol 3-glukosid, das freundlicherweise von Prof. Romussi, Genua, zur Verfügung gestellt wurde.

Der Faktor 4 berücksichtigt, dass ein Aliquot von 20 μl aus 80 μl gemessen wurden, mit dem Faktor $0.2 \cdot 10^{-6}$ wird die Proteinkonzentration von mg ml^{-1} in die Gesamtproteinmenge in kg umgerechnet, die Inkubationszeit von 1 h wird mit dem Faktor 3600 in Sekunden umgerechnet.

Bei den Messungen der Enzymaktivitäten in den verschiedenen Experimenten wurden spezifische Aktivitäten bis $25 \mu\text{kat kg}^{-1}$ ermittelt. Bei einer Proteinkonzentration von maximal $100 \mu\text{g ml}^{-1}$, einer Substratkonzentration von $100 \mu\text{M}$, einem Testansatzvolumen von $200 \mu\text{l}$ und einer Inkubationszeit ergibt sich eine maximale Produktmenge von 1.8 nmol . Bei einer eingesetzten Substratmenge von 20 nmol wurden also maximal 9 % des Substrats umgesetzt. Die Tests liefen stets bei Substratsättigung (4-7-fach K_m) ab.

Während der Proteinreinigung wurden wesentlich höhere Enzymaktivitäten gemessen. Diese Messungen erfolgten deswegen mit stärker verdünnten Proben als die Messungen an Freilandbäumen, Keimlingen etc. Dadurch konnte auch bei der Proteinreinigung gewährleistet werden, dass die Substrate in Sättigung vorlagen.

2.5 Strukturaufklärung von Enzymprodukten

Bei dem Enzymtest der Acyltransferasen entstanden aus Kämpferol 3-glukosid (K3G) und *p*-Cumaroyl-CoA mehrere monoacylierte und ein diacyliertes Produkt. Für ein monoacyliertes und das diacylierte Produkt konnten mit Kochromatographie die Acylierungspositionen zugeordnet werden. Da es für andere monoacylierte Kämpferol 3-glukoside aber keine Referenzsubstanzen gab, wurden für die Untersuchung der Acylierungsposition einige 100 µg der jeweiligen Substanz enzymatisch hergestellt und mit ¹H-NMR analysiert.

2.5.1 Kochromatographie

Das diacylierte Produkt wurde durch die Koinjektion von Enzymprodukten mit einem MeOH-Extrakt aus Primärnadeln von Kiefernkeimlingen identifiziert. Dafür wurden Enzymtests mit K3G und Tilirosid als Substrate verwendet. Dadurch konnte gleichzeitig überprüft werden, ob das diacylierte Produkt aus den beiden Tests identisch war und welches der monoacylierten Produkte mit Tilirosid übereinstimmte.

Die Enzymtests wurden wie in 2.4.3 beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, dass jeder Ansatz eine Größe von 1 ml hatte und die extrahierten Produkte in 200 µl AcN/H₂O aufgenommen wurden. Als Enzymquelle diente Nadelmaterial von Kiefern aus dem Freiland, das am 20.04.1999 geerntet worden war. Zum Vergleich der Produkte wurde ein MeOH-Extrakt von Primärnadeln aus dem Sonnensimulator-Experiment V 623b ausgewählt. Von diesem Extrakt wurden 150 µl mit 50 µl H₂O und 200 µl 75 % MeOH in H₂O verdünnt. Davon wurden 40 µl pro Lauf für die HPLC eingesetzt. Die drei Extrakte (Enzymtest mit K3G, Enzymtest mit Tilirosid und MeOH-Extrakt von Primärnadeln) wurden erst allein, dann in den verschiedenen Kombinationen miteinander im Verhältnis 1:1 gemischt mit dem Acetonitril-Gradienten (2.6.4) gemessen. Die Detektion erfolgte bei 314 nm.

2.5.2 Enzymatische Präparation von monoacylierten Kämpferol 3-glukosiden

Für die enzymatische Synthese von monoacylierten Kämpferol 3-glukosiden wurden Proteinpräparationen benutzt, die durch drei Reinigungsschritte, Ammoniumsulfat-Fällung, Entsalzung und Chromatographie an Q-Sepharose, angereichert waren (siehe 2.10.4.2). Nach dem dritten Reinigungsschritt waren die Aktivitäten der Acyltransferasen in drei Fraktionen (DL, P1 und P2) weitgehend getrennt. Für die Strukturaufklärung wurden die monoacylierten Produkte der HCT-Präparationen P1 und P2 verwendet.

Der Enzymtestansatz entsprach dem in 2.4.3 beschriebenen, es wurden allerdings die Ansatzgröße von 0.2 auf 2.0 ml und die Inkubationszeit von 60 auf 100 min verlängert, um eine optimale Ausbeute des Enzymprodukts zu erzielen. Insgesamt wurden 90 Ansätze parallel inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die 90 Ansätze in einem 1 l Rundkolben vereint und viermal mit je 120 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetat-Phasen wurden vereint und *in vacuo* zur Trockene eingengt.

2.5.3 Reinigung der Produkte mittels präparativer HPLC

Für die NMR-Analyse der Enzymprodukte wurden diese von Nebenprodukten und Substraten getrennt. Dafür wurde eine präparative HPLC eingesetzt, deren Ausstattung Tab. 2.4 zeigt. Die chromatographischen Bedingungen sind in Tab. 2.5 dargestellt. Die einzelnen Peaks wurden manuell gesammelt, anschließend *in vacuo* im Rotationsverdampfer konzentriert und mittels analytischer HPLC (siehe 2.4.4) geprüft.

Tab. 2.4: Ausstattung der präparativen HPLC (Beckman).

Pumpen	114M (präparative Pumpenköpfe)
Controller	420
Manuelle Probenaufgabe	System Organizer 340
Detektor	165
Schreiber / Integrator	Shimadzu C-R3A Chromatopac
Säule	Bischoff Spherisorb ODS 2 5.0 μm 250 x 8.0 mm mit Vorsäule

Tab. 2.5: HPLC-Methode zur Trennung der Enzymtestprodukte.

Lösung A	H ₂ O
Lösung B	Acetonitril
Flussrate	2.8 ml min ⁻¹
Gradient	0-2 min isokratisch 20 % B 2-17 min von 20 % auf 50 % B 17-20 min isokratisch 50 % B 20-22 min von 50 % auf 20 % B 22-27 min isokratisch 20 % B
Detektion	314 nm
Injektionsvolumen	60 - 100 μl

2.5.4 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden am Institut für ökologische Chemie des GSF-Forschungszentrums durch Dr. Norbert Hertkorn mit einem DMX-500 NMR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) aufgenommen. Von allen Proben wurden 1D- ^1H -NMR- und 2D- ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektren gemessen. Die Messungen erfolgten in CD_3CN bei 30°C bzw. 0°C .

2.6 Analyse der Kiefern-Inhaltsstoffe

Die Analyse der Methanol-löslichen phenolischen Inhaltsstoffe erfolgte nach der Methode von Schnitzler *et al.* 1996.

2.6.1 Aufschluss des Pflanzenmaterials

Für die Extraktion löslicher Inhaltsstoffe wurden tiefgefrorenes, vorgemörsertes Nadelmaterial (ca. 150 mg) und Celite (Diatomaceous Earth) in einem Verhältnis von 1:2 (Freilandbäume) bzw. 1:1 (Keimlinge) in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten 20ml-Teflon-Schüttelbehälter eingewogen. Das Gefäß wurde verschlossen und 3 min mit einem Mikro-Dismembrator bei 2500 rpm homogenisiert. Von diesem Homogenat wurden für die Messung von Doppelproben je ca. 80 mg in vorgekühlte 2ml-Eppendorf-Gefäße eingewogen und die Proben bis zur Extraktion in flüssigen Stickstoff gestellt.

2.6.2 Extraktion der löslichen phenolischen Inhaltsstoffe (Methanol-Extraktion)

Die einzelnen Proben wurden mit 500 μl , sehr junge Nadeln mit 250 μl (Freilandbäume) bzw. mit 400 μl Methanol (Keimlinge) versetzt, gut gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde wiederum gut gemischt und mit ca. 9000 g 10 min bei RT zentrifugiert. Die klaren Überstände wurden in neue Gefäße überführt und die Extrakte bis zur Messung mittels HPLC bei -80°C gelagert. Die Rückstände wurden mit 500 μl Methanol versetzt und bis zur Extraktion der zellwandgebundenen Inhaltsstoffe ebenfalls bei -80°C gelagert.

2.6.3 Extraktion der zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffe

Zur Extraktion der zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffe wurde eine alkalische Zellwandhydrolyse durchgeführt (nach Strack *et al.* 1988b). Dafür wurden die Rückstände der Methanol-Extraktion dreimal mit je 1 ml Methanol und einmal mit 1 ml H₂O gewaschen, zwischen jedem Schritt wurde jeweils 8 min mit ca. 9000 g bei RT zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Rückstände mit 150 µl Extraktionslösung (1 M NaOH, 100 mM Ascorbinsäure und 53 mM Natriumborhydrid) versetzt und die Gemische über Nacht bei RT inkubiert. Nach gründlichem Mischen wurden 150 µl 1.5 M Ameisensäure und 300 µl Methanol dazugegeben, anschließend wurde 10 min mit ca. 9000 g zentrifugiert. Die klaren Überstände wurden in ein neues Gefäß überführt und bis zur Messung bei -80°C gelagert.

2.6.4 Analytik mittels HPLC

Von den Methanol-Extrakten wurden für die Messung 75 µl mit 25 µl H₂O versetzt, gut gemischt und 10 min mit ca. 9000 g bei RT zentrifugiert. Die klaren Überstände wurden dann direkt in HPLC-Mikrogefäße überführt. Die Extrakte der alkalischen Hydrolyse wurden unverdünnt nach Zentrifugation (10 min, ca. 9000 g) in HPLC-Mikrogefäße überführt. Sowohl Methanol-Extrakte als auch alkalische Hydrolysate wurden an Sys 1 (siehe 2.4.4) mit der in Tab. 2.6 zusammengestellten Methode gemessen.

Tab. 2.6: HPLC-Methode zur Trennung phenolischer Inhaltsstoffe aus Kiefernnadeln (Methanol-Gradient).

Lösung A	98.0 % (v/v) H ₂ O 1.9 % (v/v) Ameisensäure 0.1 % (w/v) Ammoniumformiat
Lösung B	88.4 % (v/v) Methanol 9.6 % (v/v) H ₂ O 1.9 % (v/v) Ameisensäure 0.1 % (w/v) Ammoniumformiat
Flussrate	1 ml min ⁻¹
Gradient	0-5 min isokratisch 0 % B 5-45 min von 0 % auf 100 % B 45-48 min isokratisch 100 % B 48-50 min von 100 % auf 0 % B 50-58 min isokratisch 0 % B
Detektion	280 nm
Fluoreszenzdetektor (Shimadzu RF-530)	Excitation: 300 nm; Emission: 400 nm Range 1; sens high
Dioden Array (nur bei einigen Proben)	Scan mode 2, 250-450 nm
Injektionsvolumen	Methanol-Extrakte: 10 µl Alkalische Hydrolysate: 20µl

Zur Analyse der acylierten Flavonolglukoside wurden die Methanol-Extrakte mit einer zweiten Methode zusätzlich an Sys 1 gemessen (Tab. 2.7). Neben Acetonitril als organischer Lösungsmittelkomponente wurde eine Waters Novapak C18-Säule (3.9 x 300 mm, 4 µm, ohne Vorsäule) verwendet.

Tab. 2.7: HPLC-Methode zur Trennung diacylierter Flavonolglukoside aus Kiefernnadeln (Acetonitril-Gradient).

Lösung A	98.0 % (v/v) H ₂ O 1.9 % (v/v) Ameisensäure 0.1 % (w/v) Ammoniumformiat
Lösung B	88.4 % (v/v) Acetonitril 9.6 % (v/v) H ₂ O 1.9 % (v/v) Ameisensäure 0.1 % (w/v) Ammoniumformiat
Flussrate	1 ml min ⁻¹
Gradient	0-5 min isokratisch 30 % B 5-30 min von 30 % auf 45 % B 30-30.2 min von 45 % auf 100 % B 30.2-38.2 min isokratisch 100 % B 38.2-38.4 min von 100 % auf 30 % B 38.4-40 min isokratisch 30 % B
Detektion	280 nm
Dioden Array (nur bei einigen Proben)	Scan mode 2, 250-450 nm
Injektionsvolumen	10 µl

Mit Hilfe folgender Umrechnungsfaktoren wurden die Konzentrationen auf das Nadel-Frischgewicht bezogen (Methanol-Extrakt mit H₂O verdünnt, siehe oben):

$$10 \mu\text{l Methanol-Extrakt} = 0.4 \text{ mg Nadeln (500 } \mu\text{l MeOH)}$$

$$10 \mu\text{l Methanol-Extrakt} = 0.8 \text{ mg Nadeln (250 } \mu\text{l MeOH)}$$

$$20 \mu\text{l alk. Hydrolysat} = 0.888 \text{ mg Nadeln}$$

Die Zuordnung und Quantifizierung erfolgte mittels authentischer Standards (Jungblut *et al.* 1995, Schnitzler *et al.* 1996, Turunen *et al.* 1999). Flavan-Derivate werden in Catechin-Äquivalenten, *cis*-Cumarsäure in *trans*-Cumarsäure-Äquivalenten angegeben.

2.6.5 Analyse von Anthocyanen

Die Analyse von Anthocyanen hatte zum Ziel, einerseits das Vorhandensein von möglicherweise acylierten Anthocyanen, andererseits die Wirkung von UV-B-Strahlung auf den Anthocyanengehalt in Kiefernnadeln zu überprüfen. Aufgrund des chemischen Aufbaus der Anthocyane - die Grundstruktur der Anthocyanidine (Aglyka) ist ein positiv geladenes

Flavylium-Ion - war es für die Untersuchung notwendig, die Extraktion im Unterschied zu der von anderen phenolischen Inhaltsstoffen im Säuren durchzuführen.

Zur Analyse der Anthocyane in Kiefer wurden weibliche Kiefernblütenzapfen geerntet, um größere Mengen von Anthocyanen zu gewinnen. Diese akkumulieren Anthocyane, was leicht an der deutlich roten Färbung zu erkennen ist. Die Ernte der Blütenzapfen erfolgte an Bäumen auf dem GSF-Gelände im Mai 1999. Es wurden nur voll entwickelte, rot gefärbte Blütenzapfen geerntet. Diese wurden direkt nach der Ernte in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

Zur Untersuchung des Einflusses von UV-B auf eine mögliche Anthocyanakkumulation bei Kiefernkeimlingen wurden Keimnadeln und Hypokotyle von Pflanzen aus dem Sonnensimulatorexperiment V 658 (siehe 2.8.3) analysiert. Bei vorangegangenen Experimenten zeigte sich eine stärkere Rotfärbung der Hypokotyle bei Lichtvarianten mit hohen UV-B- im Vergleich zu solchen mit niedrigen UV-B-Werten. Zum Nachweis einer UV-B-abhängigen Akkumulation wurden Keimnadeln und Hypokotyle mit einem photometrischen Test untersucht, bei dem der Gehalt an Gesamtanthocyanen gemessen wird.

Photometrische Messung (nach Oren-Shamir *et al.* 1999)

Für den photometrischen Test wurden 50 mg Pflanzenmaterial abgewogen, mit 1 ml kaltem Methanol-Eisessig-Wasser (MAW, 11:1:5, v/v/v) versetzt und 1 h lang im Kühlschrank extrahiert. Dabei wurde regelmäßig gemischt. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 11.000 rpm abzentrifugiert und die klaren Überstände in frische Eppendorf-Gefäße überführt.

In einem Vorversuch waren photometrisch Spektren von 250 bis 700 nm gemessen und dabei ein Maximum bei 535 nm ermittelt worden. Dementsprechend wurden die Hypokotyl- und Keimnadelproben bei 535 nm gemessen, wobei die Quantifizierung mit $\epsilon = 20000$ (535 nm, Cyanidinderivate) vorgenommen wurde.

Messung mittels HPLC

Die Isolierung und Analyse der Anthocyane aus weiblichen Kiefernblütenzapfen erfolgte nach Gläßgen *et al.* 1992. Dafür wurden Blütenzapfen mit Methanol-Eisessig-Wasser (MAW, 50:8:42, v/v/v) gemörsert und zweimal mit je 5 ml pro g Frischgewicht (FG) je 30 min extrahiert. Anschließend wurde das Gemisch über einen Papierfilter filtriert und zentrifugiert (ca. 1500 g, 4°C). Der Überstand wurde vom Pellet abgenommen und bei 35°C *in vacuo* konzentriert. Das Konzentrat wurde dreimal mit Petroleumbenzin ($40-60^{\circ}\text{C}$ Siedebereich) zur Entfernung lipophiler Substanzen ausgeschüttelt, die wässrige Phase dann zur Entfernung von

Flavonoiden dreimal mit Ethylacetat ausgeschüttelt und anschließend bei 35°C *in vacuo* bis zur Trockene konzentriert. Der Rückstand wurde in wenig MAW aufgenommen und bis zur Messung bei -80°C gelagert.

Aus Hypokotylen von Keimlingen wurden Anthocyane mit einer vereinfachten Methode extrahiert. Dazu wurde homogenisiertes Material (siehe 2.6.1) 1 h mit HCl:MeOH (1:99, v/v) bei 4°C inkubiert, abzentrifugiert, in ein HPLC-Mikrogefäß überführt und direkt injiziert.

Für die weitere Analyse der Anthocyane aus Blütenzapfen war es notwendig, neben den Anthocyanglykosiden auch die Aglyka zu untersuchen. Dafür wurden die Glykoside durch saure Hydrolyse gespalten. Zu diesem Zweck wurden 1 ml Anthocyanlösung mit 1 ml 4 N HCl 1 h bei 95°C inkubiert. Diese Proben wurden bei -20°C gelagert und direkt ohne weitere Verdünnung mit der HPLC gemessen.

Für alle Anthocyan-Analysen wurde die in Tab. 2.8 beschriebene HPLC-Methode verwendet. Diese lehnt sich ebenfalls an Gläßgen *et al.* 1992 an. Es wurde die gleiche HPLC-Anlage wie zur Analyse der Flavonoide genutzt (System 1, siehe 2.4.4).

Tab. 2.8: HPLC-Methode zur Analyse von Anthocyanen.

Lösung A	90.0 % (v/v) H ₂ O 10.0 % (v/v) Ameisensäure
Lösung B	90.0 % (v/v) Methanol 10.0 % (v/v) Ameisensäure
Flussrate	1 ml min ⁻¹
Gradient	0-5 min isokratisch 0 % B 5-45 min von 0 % auf 100 % B 45-48 min isokratisch 100 % B 48-50 min von 100 % auf 0 % B 50-58 min isokratisch 0 % B
Detektion	280 + 535 nm
Dioden Array	Scan mode 2, 250-600 nm
Injektionsvolumen	20µl

2.7 Freilandbäume

2.7.1 Beschreibung der Versuchsbäume

Die Ernten zur Messung des Jahresverlaufs von Inhaltsstoffen und Enzymaktivitäten erfolgten an zwei Bäumen (A und B) auf dem Gelände des GSF-Forschungszentrums (Abb. 2.2). Von Baum A wurden in den Jahren 1997-1999 Proben genommen, von Baum B 1998 und 1999. Baum A war ca. 30 Jahre alt und stand zwischen anderen Kiefern. Er war süd-westlich exponiert. Baum B war ca. 15 Jahre alt und stärker südlich exponiert. Nördlich und östlich des Baumes standen jeweils andere Bäume (Ebereschen und Kiefern). Beide Bäume waren nicht sichtbar von Schädlingen befallen, blühten in allen beobachteten Jahren und trugen Zapfen.



Baum A



Baum B

Abb. 2.2: Freiland-Bäume.

Baum A: Blick von Westen, Standort: GSF-Gelände (Neuherberg), zwischen Geb. 22 und 23;

Baum B: Blick von Südwesten, Standort: wie A, nördlich von Geb. 57.

Die Ernten erfolgten bei beiden Bäumen in einer Höhe von 1 bis 3 m.



Abb. 2.3: Entwicklung der Nadeln von Baum B während des Austriebs im Jahr 1998.

Es ist deutlich zu erkennen, dass sich Ende April das häutige Nebenblatt, das die jungen Nadeln bedeckt, ablöste. Mitte Mai waren die Nadeln vollkommen frei, an der oberen Spitze des Triebs sind die noch grünen Blütenzapfen zu erkennen. Mitte Juli hatten die neuen Nadeln ihre volle Länge erreicht, waren aber noch heller als die Vorjahresnadeln.

Am Beispiel von Baum B ist die Nadelentwicklung während des Austriebs gezeigt (Abb. 2.3). Bei der ersten Aufnahme zu Beginn der Vegetationsperiode ist noch deutlich die Bedeckung der jungen Nadeln durch die häutigen Tragblätter erkennbar. Bei der zweiten Aufnahme, 16 Tage nach der ersten Aufnahme, sind die Nadeln noch hellgrün, aber schon deutlich vom Trieb abgesetzt, an den Sprossspitzen sind die unreifen weiblichen Blütenanlagen (Zapfen) zu erkennen. Bei der dritten Aufnahme haben die Nadeln fast die endgültige Länge erreicht, heben sich aber von den Vorjahresnadeln durch die hellere Färbung ab.

2.7.2 Ernte der Nadeln

Die Ernte von Nadelmaterial der Freilandbäume erfolgte während der Vegetationsperiode (April bis August) ein- bis zweiwöchentlich, außerhalb der Vegetationsperiode vierwöchentlich. Es wurde jeweils von jedem Baum pro Erntetermin ein Zweig mit Nadeln von zwei oder drei Nadeljahrgängen abgeschnitten. Die Nadeln wurden vom Zweig abgelöst und sofort, nach Jahrgang und Baum getrennt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Anschließend wurden sie unter flüssigem Stickstoff grob vorgemörsert und bis zur weiteren Aufarbeitung in verschließbaren Kunststoffgefäßen bei -80°C gelagert.

2.7.3 Ermittlung von Nadeloberfläche und -volumen

Zur Messung von Nadeloberfläche und -volumen wurden Zweige geerntet, die Nadeln abgezupft und sofort einzeln auf einer Analysenwaage gewogen. Anschließend wurden Länge und größter Durchmesser auf 0.5 mm genau gemessen. Die Berechnung von Volumen und Oberfläche der Einzelnadeln erfolgte in Form eines längs halbierten Zylinders nach den Formeln:

$$\text{Volumen: } V = \frac{1}{2} \pi r^2 h \text{ ; Oberfläche: } \pi r h + r h$$

2.8 Sonnensimulator-Experimente

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden zwei Versuche mit Kiefernkeimlingen in den Sonnensimulatoren der Arbeitsgruppe EPOKA der GSF durchgeführt. Diese Experimente hatten in der fortlaufenden Nummerierung aller Versuche die Bezeichnungen V 623b und V 658, die auch in der Arbeit beibehalten werden. V 623b war ein Vorversuch für V 658 und diente der Optimierung der Versuchsbedingungen.

2.8.1 Aufbau des Sonnensimulators

Der Aufbau der Sonnensimulatoren erlaubt es, Pflanzen unter sonnenähnlichen Lichtbedingungen aufzuziehen und durch die Variation des UV-B-Strahlungsanteils verschiedenen UV-B-Szenarien auszusetzen (Thiel *et al.* 1996). Zusätzlich zum Licht wurden die klimatischen Faktoren Temperatur und Luftfeuchte kontrolliert. Um die Exposition der Pflanzen so naturnah wie möglich zu gestalten, wurden die Parameter Licht, Temperatur und Luftfeuchtigkeit in einem Tagesgang variiert, der den natürlichen Verhältnissen entsprach.

Das sonnenähnliche Spektrum wurde durch die Kombination verschiedener Lampentypen erreicht: Metall-Halogenlampen (Osram HQI/D 400W), Quartz-Halogenlampen (Osram Halostar 300W und 500W), blaue Fluoreszenzlampen (Philips TLD 18, 36W) und UV-B-Lampen (Philips TL 12 40W). Mit Hilfe von Filtern wurden Infrarot- und UV-C-Strahlung absorbiert und der Anteil von UV-B-Strahlung variiert. Abb. 2.4 stellt den schematischen Aufbau der Lampen- und Filteranordnung des Sonnensimulators dar, Abb. 2.6 zeigt das Innere des Sonnensimulators während V 658.

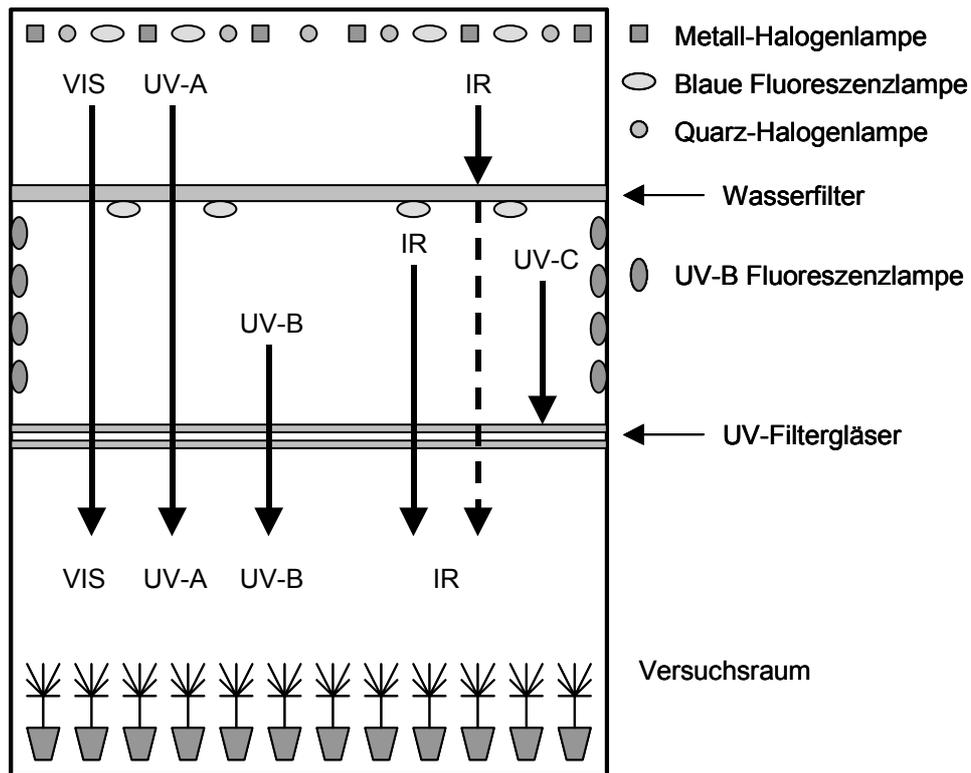


Abb. 2.4: Schematischer Aufbau des Sonnensimulators.

Nicht dargestellt sind die Einrichtungen zur Kühlung und Belüftung des Versuchsraums und die verschiedenen Sensoren zur Überwachung der klimatischen Parameter. Die Lampen sind in mehreren Schaltkreisen angeordnet, sodass durch die Steuerung der Lichtschaltkreise die Strahlungsbedingungen variiert werden können. Nach Thiel *et al.* 1996.

Durch diese Kombination von Lampen und Filtern wurde die spektrale Verteilung der Globalstrahlung sehr genau simuliert (Abb. 2.5 A). Durch die Verwendung von verschiedenen Gläsern (Fensterglas, Pyran, Sanalux, Plexiglas) als UV-B-Filter wurde die *cut-off*-Wellenlänge der Strahlung, d. h. die Wellenlänge, bei der die Bestrahlungsstärke unter 0.1 mW m^{-2} sinkt, im kurzwelligen Bereich verändert und damit den entsprechenden Versuchsvoraussetzungen angepasst (Abb. 2.5 B). Dadurch ließen sich unterschiedliche UV-Szenarien simulieren (Döhring *et al.* 1996).

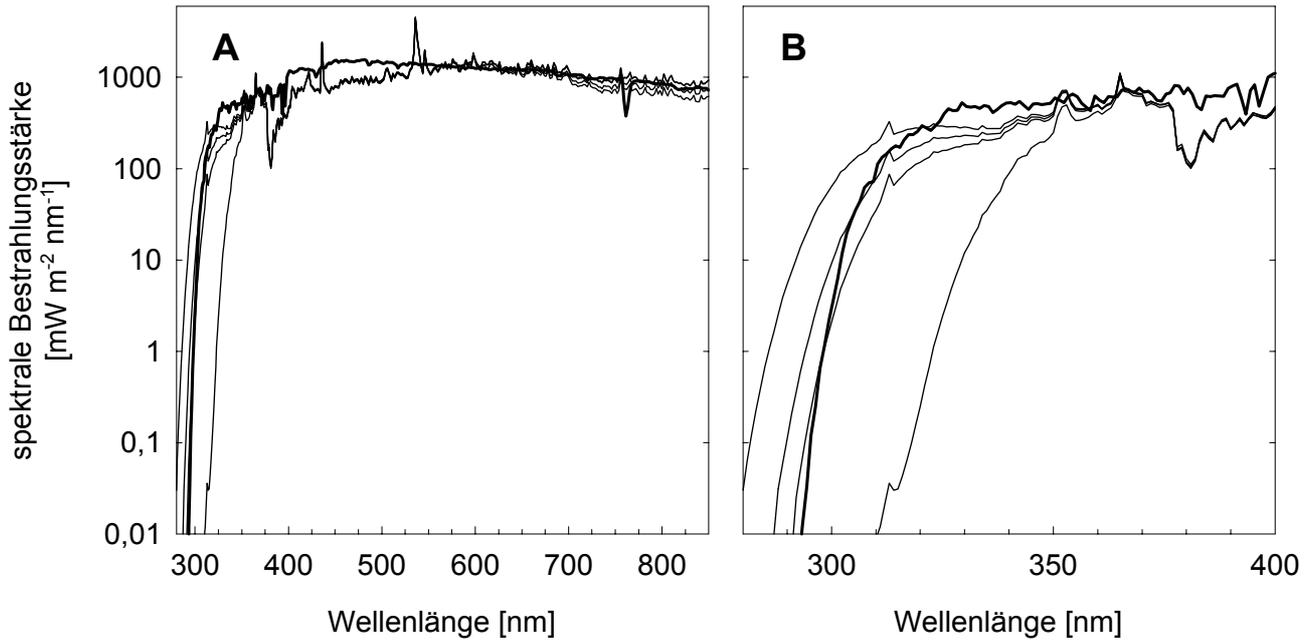


Abb. 2.5: Spektrum der natürlichen Globalstrahlung (fett) und der vier Lichtvarianten des Sonnensimulators aus V 623b.

A: Gesamtspektrum von 280 bis 850 nm, B: Ausschnitt des UV-Bereichs.

UV-B: 280-315 nm, UV-A: 315-400 nm, PAR: 400-700 nm, Infrarot: > 800 nm.

Die Klima- und Strahlungsparameter und die verwendeten Filterkombinationen der beiden Sonnensimulatorexperimente V 623b und V 658 sind unter 2.8.3 für beide Versuche aufgeführt.



Abb. 2.6: Blick in den Sonnensimulator.

Oberhalb der Keimlinge im Versuchsraum des Simulators sind die UV-Filtergläser und darüber die UV-B-Fluoreszenzröhren zu erkennen. Die übrigen Lampen und der Wasserfilter befinden sich nochmals oberhalb der UV-B-Lampen außerhalb des Bildes.

2.8.2 Anzucht von Kiefernkeimlingen

Die Kiefern Samen wurden von der Staatlichen Samenklinge Laufen bezogen. Sie hatten die Bezeichnung „85122 Plantage Laufen“ und waren vom Reifejahr 1992. Sie wurden kurz vor Beginn des Experiments angefordert.

Vor der Aussaat wurden 250 g Samen über Nacht in Leitungswasser gequollen, dann zur Oberflächensterilisierung 30 min lang in 1 l 30 %iger H₂O₂-Lösung gerührt und anschließend dreimal mit je 1 l H₂O gewaschen. Nach kurzem Abtrocknen wurden die Samen in Kunststoffbehältern (22.5 x 7.5 cm) ausgesät, die mit zweimal mit Leitungswasser gewaschenem Perlite gefüllt waren. Diese Kunststoffbehälter wurden dann in Anzuchtschalen gestellt, die 1 cm hoch mit dest. H₂O gefüllt und mit einer Plexiglashaube verschlossen wurden. Zur Keimung wurden die Samen in eine Phytokammer mit Tag/Nachtbedingungen von 14 h Licht einer Intensität von ca. 170 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und einer Temperatur von 22 bzw. 18°C gestellt. Während Anzucht und Behandlung wurden die Keimlinge mit vollentsalztem Wasser gegossen. Zur Gewährleistung einer optimale Nährstoffversorgung wurde 11 bzw. 32 Tage nach Aussaat mit modifiziertem Ingestad-Medium (nach Ingestad 1959, Tab. 2.9) gegossen.

Tab. 2.9: Medium für die Anzucht von Kiefern- und Fichtenkeimlingen (modifiziert nach Ingestad 1959).

Makroelemente	[mM]
NH ₄ NO ₃	1,79
NaCl	0,22
KCl	0,96
MgSO ₄	0,62
MnSO ₄	0,003
CaCl ₂	1,00
KH ₂ PO ₄	0,32
FeEDTA-Stammlsg MS (Zellkultur)	0.5 ml l ⁻¹ Gesamtlsg.
Spurenelemente	[μM]
H ₃ BO ₃	15,7
ZnSO ₄	0,31
CuSO ₄	0,32
Na ₂ MoO ₄	0,33

Um einen Ausschluss von UV-B-Strahlung während der Aufzucht zu gewährleisten, wurde in V 658 unterhalb der Lichtfelder aus handelsüblichen Neonröhren (Sylvania VHO F195 Cool White und Philips TLD 58W / 29) jeweils ein Plexiglasschirm (5 mm Dicke, Fa. PS-Plastic, Eching) angebracht. Tab. 2.10 zeigt das Ergebnis der Lichtmessung in der Anzuchtkammer.

Tab. 2.10: Lichtbedingungen in der Anzuchtammer („Kammer 9“) während des Versuchs V 658 (in Tagesdosen).

PAR	6.42 mol m ⁻²
UV-B ₃₁₅	2.22 kJ m ⁻²
PAS300	0.14 kJ m ⁻² _{BE}

Zur Belüftung der Anzuchtschalen waren in den Hauben Öffnungen angebracht, die bei der Aussaat vollständig geschlossen waren. Nach neun Tagen wurden die Öffnungen leicht, weitere zwei Tage später ganz geöffnet. Nach 13 Tagen wurden die Hauben entfernt. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Kunststoffbehälter in regelmäßigen Abständen von nicht gekeimten Samen, Samenschalen und eingegangenen Keimlingen gereinigt, um Pilzbefall auszuschließen.

Acht (V 623b) bzw. vier (V 658) Wochen nach Aussaat wurden die Keimlinge in den Anzuchtschalen von der Anzuchtammer in den Sonnensimulator umgestellt. Zu diesem Zeitpunkt waren die Keimnadeln voll entwickelt und die Samenhüllen abgeworfen. Die Pflanzen waren ca. 6 cm hoch. Abb. 2.7 zeigt Kiefern Samen direkt nach der Aussaat und Keimlinge nach vierwöchiger Anzucht.

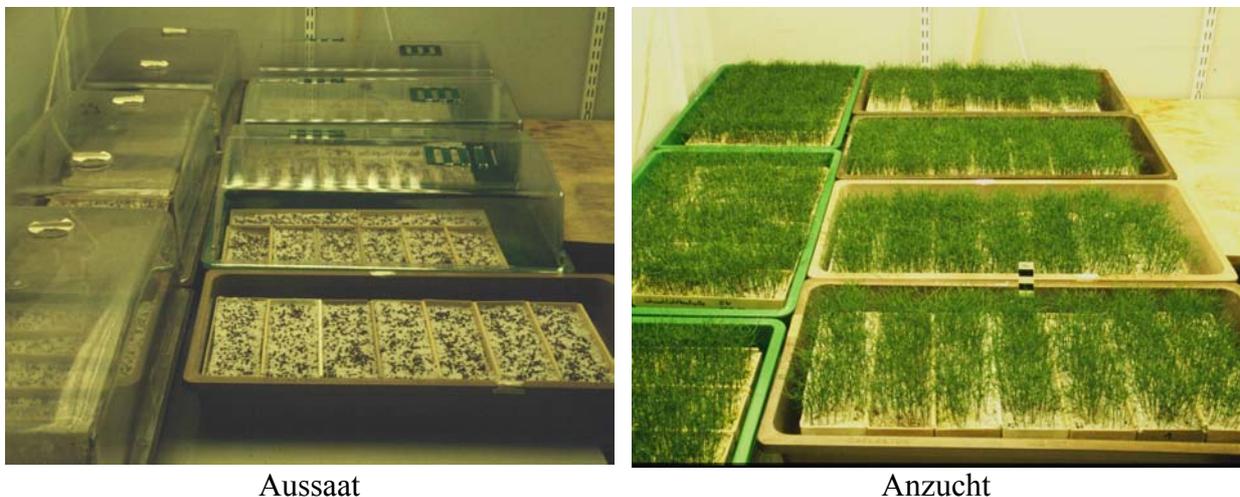


Abb. 2.7: Entwicklung der Keimlinge in der Anzuchtammer.

Rechts: Kiefern Samen direkt nach der Aussaat; links: vier Wochen alte Kiefernkeimlinge in der Anzuchtammer vor Umstellen in den Sonnensimulator.

2.8.3 UV-B-Behandlung

V 623b

Im Alter von ca. acht Wochen wurden die Keimlinge in den Sonnensimulator gestellt. Zur Akklimatisierung an die Starklichtbedingungen standen die Pflanzen eine Woche in der UV-B 0-Variante, danach wurden die Pflanzen in die verschiedenen UV-B-Varianten verteilt. In diesem Experiment wurden vier Behandlungsvarianten getestet, deren Lichtbedingungen in Tab. 2.11 zusammengefasst sind.

Tab. 2.11: Bestrahlungsverhältnisse von V 623b.

Mit *cut-off* ist diejenige Wellenlänge bezeichnet, bei der die Bestrahlungsstärke 0.1 mW m^{-2} unterschreitet.

Variante	Filterkombination	<i>cut-off</i> [nm]	PAR [mol m ⁻²]	Tagesdosen			Verhältnis
				UV-B ₃₁₅ [kJ m ⁻²]	UV-A ₃₁₅ [kJ m ⁻²]	PAS300 [kJ m ⁻²]	
UV-B 0	Fensterglas 8 mm	318	32	0.0*	470	0.0*	
UV-B 1	Pyran / Sanalux	294	32	7.9	636	1.3	
UV-B 2	Sanalux / Sanalux	290	34	16.6	636	4.4	
UV-B 3	Plexiglas / Sanalux	282	34	43.9	690	16.7	
			Maximalwerte				
			[μmol m ⁻² s ⁻¹]	[W m ⁻²]	[W m ⁻²]	[mW m ⁻²]	
UV-B 0	Fensterglas 8 mm		1590	0.0*	21	0*	1:21400:341000
UV-B 1	Pyran / Sanalux		1600	0.5	29	85	1:28:331
UV-B 2	Sanalux / Sanalux		1650	1.0	30	232	1:16:193
UV-B 3	Plexiglas / Sanalux		1650	2.8	32	1094	1:8:85

* unterhalb der Nachweisgrenze

Zur Simulation eines natürlichen Tagesgangs wurden Temperatur und Feuchtigkeit dem Lichtprogramm entsprechend geregelt (Abb. 2.8). Die niedrigste Temperatur (10°C) und die höchste Luftfeuchtigkeit (85 %) wurden bei Einschalten des Lichts, entsprechend dem Sonnenaufgang, die höchste Temperatur (18°C) und niedrigste Luftfeuchtigkeit (60 %) kurz nach dem Lichtmaximum (Mittag) erreicht. Die Lichtintensität wurde durch Zu- oder Abschalten von Lampenkreisen stufenweise reguliert.

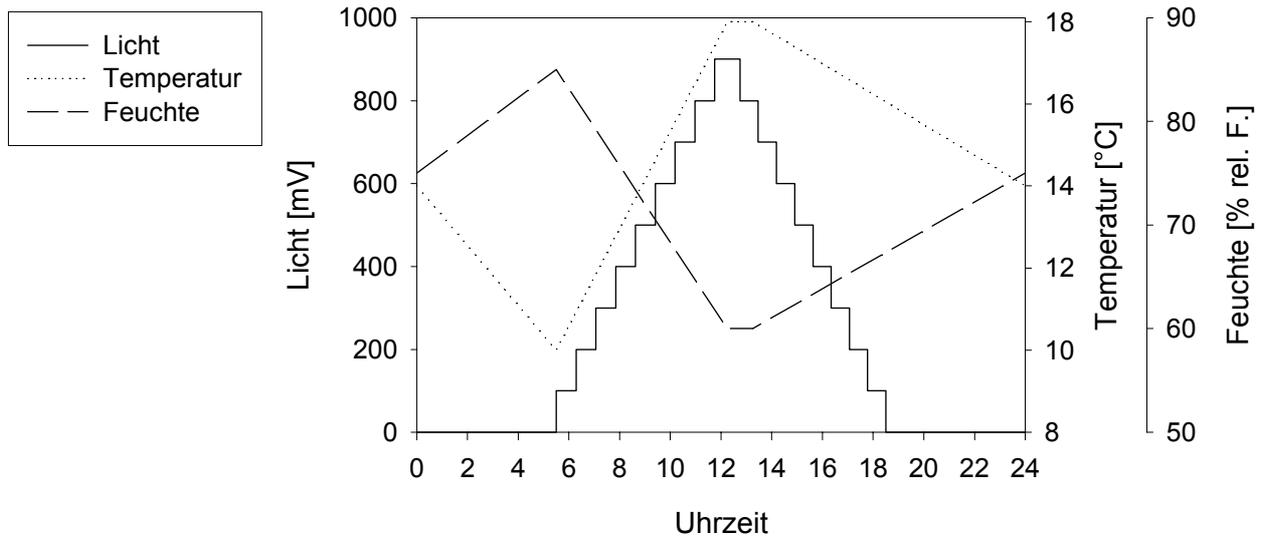


Abb. 2.8: Klimaprogramm von V 623b.

Aus technischen Gründen sind die Werte für die Lichtintensität in mV angegeben.

V 658

In V 658 erfolgte nach dem Umstellen der Keimlinge von der Anzuchtammer in den Sonnensimulator eine zweiwöchigen Akklimatisierungsphase, in der die Lichtintensität schrittweise erhöht wurde. In Abb. 2.9 ist das Klimaprogramm gezeigt, bei dem die Temperatur, abweichend von V623b, zwischen 18°C und 22°C eingestellt war.

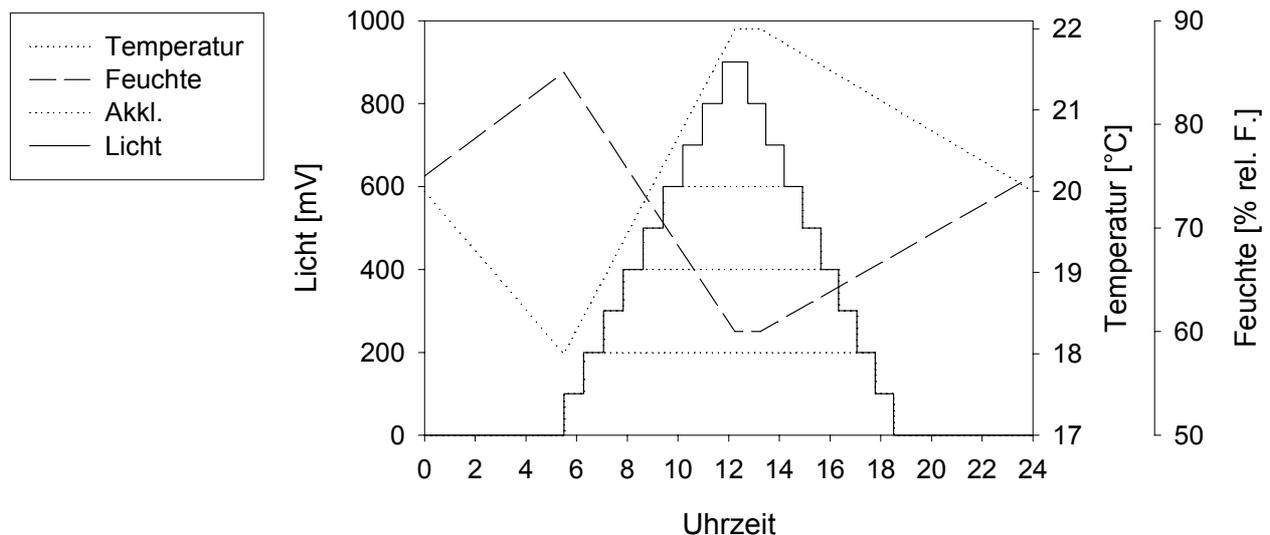


Abb. 2.9: Klimaprogramm von V 658.

In der Lichtkurve sind die Stufen der Akklimatisierungsphasen (siehe Tab. 2.12) gestrichelt eingezeichnet.

Während der Akklimatisierung war in allen Bereichen des Simulators Fensterglas eingebaut, sodass keine UV-B-Strahlung die Pflanzen erreichte. Zu Beginn der UV-B-Behandlung

wurden dann die Fensterglas-Filter bei der +UV-B-Variante gegen Sanalux-Scheiben ausgetauscht, mit denen die gewünschten spektralen Eigenschaften erzielt wurden. Tab. 2.12 zeigt die Tagesdosen der Lichtwerte, die während der Akklimatisierung und der Behandlung bei den beiden Lichtvarianten in dem Sonnensimulator herrschten.

Tab. 2.12: Bestrahlungsverhältnisse bei V 658.

Gemessen ca. 20 cm unter der Filterscheibe. +UV-B ist die Lichtvariante, bei der für die UV-B-Behandlung das Fensterglas gegen Sanalux-Glas ersetzt wurde, -UV-B ist entsprechend die Lichtvariante, bei der das Fensterglas beibehalten wurde. Während der maximalen Bestrahlungsstärke am Mittag ergab sich ein Verhältnis UV-B₃₁₅ : UV-A₃₁₅ : PAR von 1 : 33 : 300.

	PAR		UV-B ₃₁₅		UV-A ₃₁₅		PAS300	
	+UV-B	-UV-B	+UV-B	-UV-B	+UV-B	-UV-B	+UV-B	-UV-B
Tagesdosen								
	[mol m ⁻²]		[kJ m ⁻²]		[kJ m ⁻²]		[kJ m ⁻² _{BE}]	
Anzucht (28d)	6.4		2.2		-		0.1	
Akklimatisierung								
Stufe 1 (2d)	10.7	10.5	0*	0*	119	80	0.0	0*
Stufe 2 (2d)	22.2	22.0	0.02	0*	302	203	0.0	0*
Stufe 3 (2d)	35.3	34.9	0.05	0*	540	362	0.01	0*
Stufe 4 (7d)	45.7	45.3	0.05	0*	834	560	0.01	0*
UV-B-Behandlung (13d)	46.0	44.6	28.0	0*	1060	700	6.1	0*
Maximalintensitäten								
	[μmol m ⁻² s ⁻¹]		[W m ⁻²]		[W m ⁻²]		[mW m ⁻²]	
UV-B-Behandlung	1700	1700	1.3	0.0*	42	28	290	0*

* unterhalb der Nachweisgrenze.

Zu Beginn der zweiwöchigen Akklimatisierung nach vierwöchiger Anzucht waren die Keimnadeln voll entwickelt (Abb. 2.10). Während der Akklimatisierung wuchsen die Primärnadeln heran, ohne dass die Gesamthöhe des Keimlings zunahm (eine Charakterisierung des Wachstums von Kiefernkeimlingen findet sich in Trost 1994). In den zwei Wochen während der UV-B-Behandlung war weiterhin ein Längenwachstum der Nadeln zu erkennen. Es waren keine Schäden bei den Keimlingen der beiden Variante sichtbar.

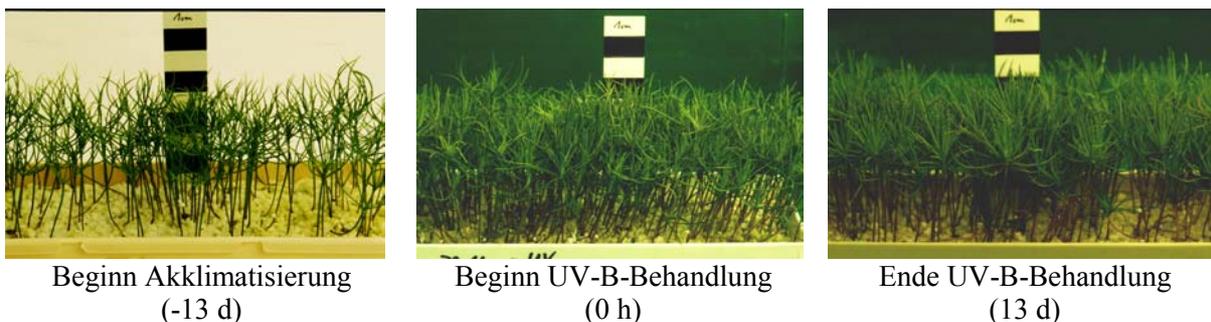


Abb. 2.10: Kiefernkeimlinge während des UV-B-Experiments V 658.

Die Nadelkränze wurden während der Akklimatisierung durch das Wachstum der Primärnadeln dichter. Am Ende der UV-B-Behandlung ist die Rotfärbung des Hypokotyls deutlich sichtbar.

2.8.4 Erntetermine

V 623b

Pro Erntetermin (Tab. 2.13) wurden von jeder Behandlungsvariante ca. 25 Pflanzen geerntet. Sofort nach dem Abschneiden der Pflanze wurden Keim- und Primärnadeln getrennt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Nadeln aller Pflanzen pro Variante wurden vereint und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Tab. 2.13: Übersicht über die Ernten von V 623b.

SLK: Schwachlichtkontrolle; UV-B-Var.: UV-B-Behandlungsvarianten

Erntetermin	Dauer der UV-B-Behandlung	Geerntete Varianten
Beginn der Akklimatisierung	-7 d	SLK
24 h Akklimatisierung	-6 d	UV-B-Var.
Beginn der UV-B-Behandlung, morgens	0 h	SLK, UV-B-Var.
morgens, 2. Tag	24 h	UV-B-Var.
morgens, 3. Tag	48 h	UV-B-Var.
morgens, 4. Tag	72 h	UV-B-Var.
morgens, 5. Tag	96 h	UV-B-Var.
morgens, 9. Tag	8 d	UV-B-Var.
morgens, 11. Tag	10 d	SLK, UV-B-Var.

V 658

Pro Erntetermin wurden von jeder Lichtvariante je drei Kunststoffschälchen aus drei verschiedenen Anzuchtschalen entnommen. Die Ernte erfolgte, indem die Keimlinge am Wurzelhals abgeschnitten, sofort in Primärnadeln, Keimnadeln und Hypokotyl getrennt und jeweils in flüssigem Stickstoff tiefgefroren wurden. Dabei wurden von jedem Schälchen sämtliche Keimlinge (ca. 200 Stück) vereint. Die tiefgefrorenen Proben wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert. Es ergaben sich somit pro Variante und Termin von jedem Pflanzenteil drei parallele Mischproben. Von jeder Probe wurden die Enzymaktivitäten der 3''- und der 6''-HCT sowie die Gehalte der Methanol-löslichen und der zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffe sowie der Anthocyane bestimmt. Aus den Werten der drei Mischproben wurden dann Mittelwert und Standardabweichung errechnet.

In Tab. 2.14 sind die Zeitpunkte der einzelnen Ernten sowie deren Benennung und die jeweils geernteten Varianten aufgeführt.

Tab. 2.14: Übersicht über die Ernten von V 658.

Die Dauer der UV-B-Behandlung ergab jeweils die Benennung der Proben, wobei die parallelen Proben von 1 bis 3 durchnummeriert wurden. Die Abkürzungen der Varianten bedeuten: SLK = Schwachlichtkontrolle („Kammer 9“), -UV-B = Sonnensimulatorvariante mit Fensterglas, +UV-B = Sonnensimulatorvariante mit Sanalux.

Erntetermin	Dauer der UV-B-Behandlung = Benennung der Probe	Varianten
Beginn der Akklimatisierung	-13 d	SLK
Beginn der UV-B-Behandlung, morgens	0 h	SLK, -UV-B, +UV-B
abends, 1. Tag	12 h	-UV-B, +UV-B
morgens, 2. Tag	24 h	-UV-B, +UV-B
abends, 2. Tag	36 h	-UV-B, +UV-B
morgens, 3. Tag	48 h	-UV-B, +UV-B
morgens, 4. Tag	3 d	-UV-B, +UV-B
morgens, 5. Tag	4 d	-UV-B, +UV-B
morgens, 7. Tag	6 d	SLK, -UV-B, +UV-B
morgens, 11. Tag	10 d	-UV-B, +UV-B
morgens, 14. Tag	13 d	SLK, -UV-B, +UV-B

2.9 Biochemische Charakterisierung der Enzyme

Die biochemische Charakterisierung der HCT's wurde mit verschiedenen Enzympräparationen durchgeführt. Die Abhängigkeit von der Gesamtproteinkonzentration und der Inkubationsdauer wurde mit einem entsalzten Rohextrakt durchgeführt. Für die übrigen Untersuchungen wurden Enzympräparationen verwendet, bei denen die 3''- und 4''-HCT-Aktivität von der 6''-HCT-Aktivität durch Chromatographie mit Q-Sepharose getrennt waren (siehe 2.10.4.2).

Soweit nicht anders angegeben, wurde jede Messung mit drei Parallelen durchgeführt, aus denen Mittelwert und Standardabweichung errechnet wurden. Alle Tests, außer der Bestimmung der pH-Optima und der Abhängigkeit von Kationen, wurden in 100 mM NaPi-Puffer, pH 6.8, durchgeführt.

2.9.1 Proteinabhängigkeit

Zur Optimierung des Enzymtests im Rohextrakt wurde die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Gesamtproteinkonzentration gemessen. Diese Tests wurden mit AP (siehe 2.4.1) in Doppelansätzen mit Proteinkonzentrationen von 0, 20, 40, 60, 100, 120, 150, 200 und 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ durchgeführt.

2.9.2 Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Neben der Proteinkonzentration ist es notwendig, die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationsdauer des Tests zu untersuchen, um die optimalen Voraussetzungen für den Test wählen zu können. Dafür wurde die Enzymaktivität ebenfalls im Rohextrakt in Doppelansätzen nach verschiedenen Zeiten (0, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 300 min) gemessen.

2.9.3 Temperaturabhängigkeit

Zur Ermittlung des Temperaturoptimums der HCT's wurden die Enzymtests bei sechs verschiedenen Temperaturen (23, 30, 35, 40, 44, 49°C) durchgeführt, nachdem ein Vorexperiment mit einem Temperaturbereich von 0°C bis 60°C ein Optimum von ca. 37°C ergeben hatte.

2.9.4 pH-Abhängigkeit

Um die Abhängigkeit der Enzymaktivität der HCT's vom pH-Wert zu testen, wurden die Tests für die 3''- und die 4''-HCT in 100 mM NaPi, pH 6.5-8.5, und für die 6''-HCT in 100 mM NaPi, pH 6.0-8.0 und 50 mM Tris/HCl, pH 7.0-9.5 durchgeführt. Die einzelnen Ansätze wurden mit NAP-5-Säulen in die jeweiligen Puffer umgepuffert.

2.9.5 Divalente Kationen und Enzyminhibitoren

Tab. 2.15 zeigt die eingesetzten Kationen und Inhibitoren mit den jeweiligen Konzentrationen. Die Tests wurden mit Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Hg²⁺ und Cu²⁺ jeweils in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7.5), sonst in NaPi-Puffer (100 mM, pH 6.8) durchgeführt. PMSF wurde in DMSO gelöst zugesetzt, die dazugehörige Kontrolle hatte die gleiche DMSO-Konzentration (5 % (v/v)).

Tab. 2.15: Konzentrationen der getesteten Kationen und Enzyminhibitoren.

	Konzentration [mM]
NaCl	10
CaCl ₂	10
MgCl ₂	10
HgCl ₂	1
CuCl ₂	1
EDTA	5
PMSF	1
Mercaptoethanol	5
DTE	5
N-Methylmaleimid	1
Jodacetamid	1
CoA	1

2.9.6 Substratabhängigkeit

Die Abhängigkeit der HCT-Aktivitäten von den Substraten wurde für die Donorsubstrate Cumaroyl- und Feruloyl-CoA und die Akzeptorsubstrate Kämpferol 3-glukosid, Tilirosid und 3''-(*p*-Cumaroyl)-kämpferol 3-glukosid ermittelt. Dafür wurde die Konzentration von jeweils einem Substrat variiert, während das zweite in konstanter Konzentration (100 µM) vorlag.

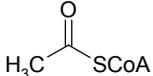
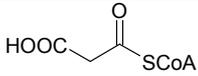
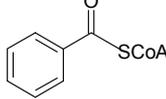
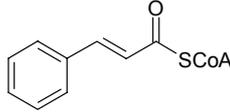
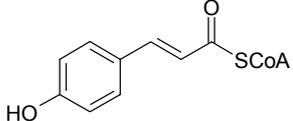
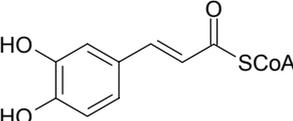
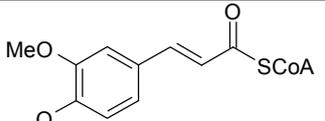
Die Ermittlung der kinetischen Parameter K_m und V_{max} erfolgte durch die Angleichung der erhaltenen Daten an die Michaelis-Menten-Funktion ($v = V_{max} S / (K_m + S)$) mit Hilfe des Programms SIGMA PLOT (Jandel Scientific, USA). Zur Überprüfung wurden die Daten zusätzlich durch eine doppelt-reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk linearisiert und einer Regressionsanalyse unterzogen. Eine ausführliche Darstellung von Theorie und Praxis der Enzymkinetik findet sich in Bisswanger 1994.

2.9.7 Substratspezifität

Donorsubstrate

Einige weitere CoA-Ester wurden qualitativ auf ihre Eigenschaft als Donorsubstrate für die HCT's getestet. Tab. 2.16 zeigt die verwendeten CoA-Ester, ihre Herkunft und ihre Strukturformeln.

Tab. 2.16: Aliphatische und aromatische CoA-Ester, die als Donorsubstrate eingesetzt wurden.

CoA-Ester	Herkunft	Strukturformel
Acetyl-	Sigma, Deisenhofen	
Malonyl-	Sigma, Deisenhofen	
Benzoyl-	Sigma, Deisenhofen	
Cinnamoyl-	Instituts-Sammlung	
Cumaroyl-	synthetisiert	
Caffeoyl-	Instituts-Sammlung	
Feruloyl-	synthetisiert	

Die Experimente wurden für die 3''-HCT mit K3G und Tilirosid, für die 6''-HCT mit K3G durchgeführt, wobei die Endkonzentration der Donorsubstrate im Enzymtest 100 μ M betrug.

Akzeptorsubstrate

Die Spezifität der HCT's hinsichtlich der Akzeptorsubstrate wurde mit verschiedenen Flavonolderivaten (Kämpferol, Isorhamnetin und Quercetin), die jeweils als 3- β -D-Glukopyranoside vorlagen, und mit vier 3-Glykosiden des Quercetins (Quercetin 3- β -D-glukosid (= Isoquercitrin), - α -L-rhamnopyranosid (= Quercitrin), - β -D-galaktopyranosid (= Hyperosid) und - α -D-arabinopyranosid) überprüft.

Daneben wurden außerdem noch die 7- β -D-Glukoside je eines Isoflavons (Genistin), eines Flavons (Cosmosiin) und eines Flavanons (Naringenin 7-glukosid = Prunin) sowie einige Anthocyanoglukoside (Cyanidin 3- β -D-glukosid (= Kuromanin), Cyanidin 3, 5-di- β -D-glukosid (= Cyanin) und Cyanidin 3, 2''-di- β -D-glukosid) getestet.

Die Akzeptorsubstrate wurden jeweils mit einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt.

Um die Substratpalette zu erweitern, wurden auch xenobiotische, also nicht in Pflanzen natürlicherweise vorkommende Glukoside eingesetzt. Die Enzymtests mit diesen Substraten wurden mit einer angereinigten 3''-HCT-Enzympräparation gemacht. Es wurden die β -D-Glucopyranoside von Phenol, 4-Nitrophenol, Methylumbelliferon, Umbelliferon (Skimmin) und 6-Bromo-2-naphthol in einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt.

2.10 Reinigung der 3''-HCT

Die Literatur zu Theorie und Praxis der Proteinreinigung ist sehr umfangreich. Aus diesem Grund werden hier einige eher praktisch orientierte Literaturhinweise vorangestellt: Cooper 1981, Deutscher 1990, Harris & Angal 1990, Janson & Rydén 1989.

2.10.1 Ernte und Aufbereitung des Nadelmaterials

Für die Reinigung der 3''-HCT wurden ca. 1700 g (FG) Nadelmaterial verwendet, das von Freilandbäumen zur Zeit höchster spezifischer Aktivität (Juni-Juli) geerntet, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Das Material wurde vor der weiteren Bearbeitung unter flüssigem Stickstoff grob vorgemörsert und anschließend 48 h gefriergetrocknet. Dabei verloren die Nadeln ca. zwei Drittel ihres Frischgewichts. Die lyophilisierten Nadeln wurden dann in einer Analysenmühle 3 min bei 4°C gemahlen.

2.10.2 Aufschluss des Nadelmaterials

Das Nadelpulver wurde in Portionen von 25-30 g (TG) zusammen mit 60 g PVPP, 4 g Celite und 700 ml Aufschlusspuffer (0.1 M NaPi pH 6.8, 1 mM DTE, 10 % (w/v) Saccharose, 1.5 % (w/v) PEG 1450, 1 mM EDTA) auf Eis ca. 20 min lang gemörsert. Dann wurde der Extrakt zweimal 10 min mit ca. 30000 g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Überstände von drei Aufschlüssen wurden vereint und 0.5 ml für Proteinbestimmung und Aktivitätstest abgetrennt. Die Ausbeute betrug ca. 3 mg Gesamtprotein pro g Nadel (auf das Frischgewicht bezogen).

2.10.3 Ammoniumsulfat-Fällung

Die Ammoniumsulfat-Fällung wurde nach England & Seifter 1990 durchgeführt. Dazu wurden die vereinten Überstände von drei Aufschlüssen (Gesamtvolumen ca. 1950 ml) auf

Eis bis 25 % Sättigung innerhalb von 30 min mit fein gemahlenem Ammoniumsulfat versetzt (134 mg pro ml Lösung), dann 30 min lang gerührt und 30 min mit ca. 30000 g bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden in einem zweiten Schritt bis 60 % Sättigung (211 mg Ammoniumsulfat pro ml Lösung) mit Ammoniumsulfat versetzt und wie im ersten Schritt weiterbehandelt. Nach der Zentrifugation hatte sich das ausgefällte Protein, das die 3''-HCT-Aktivität enthielt, zusammen mit dem PEG 1450 des Aufschlusspuffers als zweite Phase auf der Ammoniumsulfatlösung abgeschieden und konnte durch Filtration durch Miracloth von der Lösung abgetrennt werden. Die Protein-PEG-Phase wurde für die weitere Bearbeitung in 40-50 ml Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM DTE, 1 mM EDTA) gelöst.

2.10.4 Flüssig-Chromatographie

Für die Flüssigchromatographie wurden eine FPLC-Anlage und ein ÄKTA-System (Explorer 10s) eingesetzt (jeweils von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Alle Läufe wurden bei 4°C durchgeführt, die Detektion von Proteinen erfolgte durch die Messung der Absorption bei 280 nm.

2.10.4.1 Entsalzung mit Sephadex G-25

Im nächsten Schritt nach der Ammoniumsulfatfällung wurde der Proteinextrakt mit Sephadex G-25 entsalzt. Dabei kamen aufgrund der großen Menge des zu entsalzenden Materials zwei verschiedene Säulen zum Einsatz. Die erste war eine fertig gepackte HiPrep Desalting 26/10-Säule mit einem Gelvolumen von 56 ml und einer Kapazität von ca. 8 ml Proteinextrakt, die auf dem ÄKTA-System betrieben wurde. Die zweite war eine XK 50/20-Säule mit einem Gelvolumen von ca. 250 ml und einer Kapazität von ca. 25 ml Proteinextrakt, die auf der FPLC-Anlage betrieben wurde. Die Säulen wurden mit Laufpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM DTE und 1 mM EDTA) mit einer Flussrate von 8 bzw. 10 ml min⁻¹ äquilibriert, die Proteinlösung mit Hilfe eines Superloops auf die Säule aufgegeben und der erste Peak aufgefangen. Bei Beginn des Anstiegs der Leitfähigkeit wurde die Sammlung beendet und die Säulen wurden wieder mit Laufpuffer äquilibriert.

2.10.4.2 Anionenaustauscher Q-Sepharose ff

Die weitere Reinigung erfolgte mit dem Anionenaustauscher Q-Sepharose ff. Tab. 2.17 zeigt die Laufbedingungen. Im ersten Lauf wurden 10 ml-Fractionen gesammelt und die Enzymaktivitäten der einzelnen Fractionen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Aktivitäten von drei verschiedenen HCT's getrennt werden konnten. Anhand dieser Ergebnisse wurden bei den nachfolgenden Läufen drei Fractionen gesammelt, die die Aktivitäten von jeweils einer HCT enthielten. Diese drei Fractionen wurden als DL (Durchlauf), P1 (Peak 1) und P2 (Peak 2) bezeichnet.

Tab. 2.17: Methode zur Reinigung der 3''-HCT mit Q-Sepharose ff.

Puffer A	20 mM Tris/HCl, pH 7.5 10 % (v/v) Glyzerin 1 mM DTE 1 mM EDTA
Puffer B	wie A + 1 M NaCl
Flussrate	7.5 ml min ⁻¹
Gradient	128 ml isokratisch 0 % B 320 ml von 0 % auf 50 % B 0 ml von 50 % auf 100 % B 160 ml isokratisch 100 % B 256 ml isokratisch 0 % B
Detektion	Absorption bei 280 nm. Leitfähigkeit
Säule	XK 26/20
Säulenvolumen	64 ml
Injektionsvolumen	ca. 190 ml

2.10.4.3 Farbstoffgel Reactive Brown 10

Als nächster Schritt nach der Anionenaustauscherchromatographie wurde eine Reinigung mit einem Farbligandengel durchgeführt. In Vorversuchen wurde das Bindungsverhalten der 3''-HCT gegenüber verschiedenen Gelen getestet. In Tab. 2.18 ist die Durchführung dieser Tests zusammengefasst.

Tab. 2.18: Untersuchung des Bindungsverhalten der 3''-HCT an verschiedene Farbligandengele und CoA-Agarose.

	CoA-Agarose	Blue Sepharose	Matrex Green A	Matrex Orange A	Reactive Brown 10	Reactive Yellow 3	Reactive Yellow 86
Verfahren	Batch				Säulen		
Gel	1.3 ml	1 g	2 ml	2,5 ml	je 1 ml		
Puffer	20 mM Tris/HCl, pH 7.0				20 mM Tris/HCl, pH 7.5		
Extrakt	AS-Fällung, entsalzt				Q-Sepharose P2		
Elution	1 M NaCl	1 M NaCl 10 mM CoA 1 mM CoumCoA	1 M NaCl	1 M NaCl	1 M NaCl	1 M NaCl	1 M NaCl

Für die Reinigung wurde schließlich Reactive Brown 10 ausgewählt. Tab. 2.19 zeigt die Laufbedingungen für die Chromatographie an diesem Farbligandengel. Es wurde der gleiche Puffer wie im vorherigen Schritt verwendet. Die Fraktionen mit der 3''-HCT-Aktivität vom Anionenaustauscherschritt (P2) wurden vereint und mit Hilfe eines Ultrafree 15-Konzentrators mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa entsprechend den Herstellerangaben konzentriert und entsalzt.

Tab. 2.19: Methode zur Reinigung der 3''-HCT mit Reactive Brown 10.

Puffer A	20 mM Tris/HCl, pH 7.5 10 % (v/v) Glycerin 1 mM DTE 1 mM EDTA
Puffer B	wie A + 1 M NaCl
Flussrate	2 ml min ⁻¹
Gradient	154 ml isokratisch 0 % B 385 ml von 0 % auf 100 % B 38.5 ml isokratisch 100 % B 154 ml isokratisch 0 % B
Detektion	Absorption bei 280 nm, Leitfähigkeit
Säule	XK 26/40
Säulenvolumen	77 ml
Injektionsvolumen	5 ml
Fraktionsgröße	10 ml

2.10.4.4 Hydroxyapatit

Der dritte säulenchromatographische Schritt erfolgte mit Hydroxyapatit. Dazu wurde MacroPrep[®] Ceramic Hydroxyapatit Type II (40µm) der Firma BioRad verwendet. Die angereicherten Fraktionen des vorherigen Schritts wurden mit Ultrafree 15-Konzentratoren konzen-

triert und entsprechend den Herstellerangaben in Äquilibriumspuffer umgepuffert. Tab. 2.20 zeigt die Laufbedingungen für die Chromatographie mit Hydroxyapatit.

Tab. 2.20: Methode zu Reinigung der 3''-HCT mit Macro-Prep® Ceramic Hydroxyapatit Type II (40µm).

Puffer A	2 mM NaPi, pH 7.2 10 % (v/v) Glycerin 1 mM DTE
Puffer B	400 mM NaPi, pH 6.7 10 % (v/v) Glycerin 1 mM DTE
Flussrate	0.2 ml min ⁻¹
Gradient	17.2 ml isokratisch 0 % B 43 ml von 0 % auf 50 % B 0 ml von 50 % auf 100 % B 17.2 ml isokratisch 100 % B 17.2 ml isokratisch 0 % B
Detektion	Absorption bei 280 nm, Leitfähigkeit
Säule	C 10/10
Säulenvolumen	8.6 ml
Injektionsvolumen	ca. 5.5 ml
Fraktionsgröße	1 ml

2.10.4.5 Chromatofokussierung mit Mono P

Bei der Chromatofokussierung werden Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes (pI) getrennt. Dafür wurde eine Mono-P-Säule verwendet, an deren Matrix die Proteine bei hohem pH-Wert binden und durch einen absteigenden pH-Gradienten eluiert werden. Dabei konnte gleichzeitig der pI-Wert ermittelt werden, da die Proteine bei dem pH-Wert ihres pI-Wertes eluierten. Tab. 2.21 zeigt die Laufbedingungen für die Chromatographie an Mono P. Dabei wurden drei verschiedene pH-Bereiche verwendet, ein enger und ein weiter pH-Bereich im leicht sauren und ein dritter im alkalischen Bereich. Um die Proteine so kurz wie möglich extremen pH-Werten auszusetzen, wurden bei den Läufen unter sauren Bedingungen in jeder Fraktion 200 µl Puffer vorgelegt (0.5 M Tris/HCl pH 7.5, 5 mM DTE, 25 % (v/v) Glycerin). Nach Zulauf der Fraktionen ergab sich ein pH-Wert von ca. 7.0.

Die verwendeten Proteinlösungen wurden jeweils mit Centricon 10- oder Ultrafree 15-Einheiten konzentriert und in Startpuffer umgepuffert.

Tab. 2.21: Methoden zur Reinigung und Ermittlung der pI-Werts der HCT's mit Chromatofokussierung mit Mono P.

Die Proteinprobe gibt die Reinigungsstufe an, von der Proteinlösung auf die Mono P-Säule aufgetragen wurde.

	pH 7.4 - 4.0	pH 5.2 - 4.0	pH 9.5 - 6.0
Startpuffer	25 mM bis-Tris / Iminodiessigsäure pH 7.4 10 % (v/v) Glycerin 1 mM DTE	25 mM Piperazin / HCl pH 5.2 10 % (v/v) Glycerin 1 mM DTE	25 mM Diethanolamin / HCl pH 9.5 10 % (v/v) Glycerin 1 mM DTE
Elutionspuffer	10 % (v/v) Polybuffer 74 / Iminodiessigsäure pH 4.0 10 % (v/v) Glycerin 1 mM DTE	10 % (v/v) Polybuffer 74 / HCl pH 4.0 10 % (v/v) Glycerin 1 mM DTE	10 % (v/v) Polybuffer 96 / HCl pH 6.0 10 % (v/v) Glycerin 1 mM DTE
Flussrate	0.5 ml min ⁻¹		
Detektion	Absorption bei 280 nm, pH-Wert		
Säule	Mono P HR 5/20		
Proteinprobe	MiniPrep Cell	Hydroxyapatit	Reactive Brown 10
Proteinmenge	200 µg	1.3 mg	ca. 1 mg
Fraktionsgröße	0.8 ml	0.5 ml	0.8 ml

2.10.4.6 Anionenaustauscher Mono Q

Der zweite Anionenaustauscherschritt wurde bei einem höheren pH-Wert als die Chromatographie mit Q-Sepharose (siehe 2.10.4.2) mit einer Mono Q-Fertigsäule durchgeführt. Tab. 2.22 zeigt die Laufbedingungen.

Tab. 2.22: Methode zur Reinigung der 3''-HCT mit Mono Q.

Puffer A	20 mM Tris/HCl, pH 8.2 10 % (v/v) Glycerin 1 mM DTE
Puffer B	A + 1 M NaCl
Flussrate	0.5 ml min ⁻¹
Gradient	9 ml isokratisch 0 % B 20 ml von 0 % auf 100 % B 3 ml isokratisch 100 % B
Detektion	Absorption bei 280 nm, Leitfähigkeit
Säule	Mono Q HR 5/5
Säulenvolumen	1 ml
Injektionsvolumen	1.8 ml
Fraktionsgröße	0.5 ml

2.10.4.7 Gelfiltration mit Superose

Zur Ermittlung der Molekularmasse mittels Gelfiltration (oder Gelpermeation) wurde eine Superose 6-Fertigsäule eingesetzt. Die Säule wurde mit Laufpuffer über Nacht äquilibriert. Daraufhin wurde das Ausschlussvolumen V_0 mit Dextranblau bestimmt und die Säule mit fünf Standardproteinen von bekanntem Molekulargewicht geeicht (siehe Tab. 2.23). Die Laufbedingungen sind in Tab. 2.24 dargestellt. Durch Zugabe von NaCl in den Laufpuffer wurden unspezifische Wechselwirkungen mit der Gelmatrix minimiert.

Die Berechnung der Eichkurve erfolgte durch Auftragen des Molekulargewichts gegen den Quotienten aus Elutionsvolumen V_e der Standardproteine und V_0 der Säule. Aus der Eichkurve ließ sich mit dem gemessenen V_e der untersuchten Enzyme deren Molekularmasse berechnen.

Tab. 2.23: Standardproteine für die Gelfiltration

Standardprotein	Molekularmasse [kDa]
Cytochrom C	12.4
Carboanhydrase	29
Albumin	66
Alkohol-Dehydrogenase	150
β -Amylase	200

Tab. 2.24: Laufbedingungen der Gelfiltration mit einer Superose 6-Säule.

Laufpuffer	100 mM NaPi, pH 6.8 10 % (v/v) Glycerin 100 mM NaCl 1 mM DTE
Flussrate	0.25 ml min ⁻¹
Detektion	Absorption bei 280 nm
Säule	Superose 6
Injektionsvolumen	100 μ l
Fraktionsgröße	200 μ l

2.10.5 Elektrophorese

2.10.5.1 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde mit einer Mini-PROTEAN® II Cell der Firma BioRad nach Laemmli 1970 durchgeführt. Tab. 2.25 zeigt die Zusammensetzung eines diskontinuierlichen Gels mit einer Größe von 7 x 8 cm.

Tab. 2.25: Zusammensetzung eines diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgels nach Laemmli 1970.

Stammlösung	Trenngel (12.5 %)		Sammelgel (5 %)	
	Volumen (µl)	Endkonzentration	Volumen (µl)	Endkonzentration
1.0 M Tris-HCl pH 8.8	3375	0.375 M	---	---
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	---	---	600	0.125 M
Acrylamid:Bisacrylamid (30 : 0.8)	3750	12.5 % (w/v)	400	5 % (w/v)
10 % (w/v) SDS	90	0.1 % (v/v)	24	0.1 % (v/v)
50 % (v/v) Glycerin	225	1.25 % (v/v)	---	---
H ₂ O	1500	---	1400	---
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat	45	0.05 % (w/v)	12	0.05 % (w/v)
TEMED	9	0.1 % (v/v)	2.4	0.1 % (v/v)

Zur Probenvorbereitung wurden 20 µl Probe mit 10 µl Probenpuffer (0.1 M Tris-HCl pH 6.8, 20 % (v/v) Glycerin, 4 % (w/v) SDS, 0.002 % (w/v) Bromphenolblau) und 3 µl Mercaptoethanol versetzt, 6 min bei 95°C inkubiert, 5 min mit ca. 20000 g bei 4°C zentrifugiert und bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gelagert. Davon wurden je nach verwendetem Kamm 10 bis 20 µl auf das Gel aufgetragen.

Als Molekulargewichtsmarker dienten fünf Proteine mit den Massen 66 (BSA), 48.5 (Fumarase), 29 (Carbo-Anhydrase), 18.4 (β-Lactoglobulin) und 14.2 kDa (α-Lactoglobulin), die nach Herstellerangaben eingesetzt wurden (Low Molecular Weight Standard, Sigma, Nr. M-5630). Die Elektrophorese erfolgte mit einem Tris-Glycin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1 % SDS, pH 8.4) ca. 1 h mit 18 mA bei einem Gel, mit 36 mA bei zwei Gelen.

2.10.5.2 Native Elektrophorese

Zur Reinigung der 3''-HCT erwies es sich als notwendig, neben den chromatographischen Schritten zusätzlich auch einen nativen elektrophoretischen Schritt durchzuführen.

Als geeignete Methode für eine native Elektrophorese erwies sich ein Imidazol/HEPES-Puffersystem nach McLellan 1982 mit einem pH-Wert von 7.4. Der pH-Wert ist bei einer

nativen Elektrophorese der entscheidende Parameter, da nur bei einem pH oberhalb des isoelektrischen Punkts des gesuchten Proteins dieses negativ geladen ist und damit im elektrischen Feld wandern kann. Allerdings darf der pH-Wert nicht zu alkalisch sein, um die Aktivität des Enzyms nicht zu zerstören, zumal der pH-Wert im Gel während der Elektrophorese höher ist als im Laufpuffer (Chrambach & Jovin 1983).

Die Bedingungen für die native Elektrophorese wurden erst mit einem Minigel getestet und dann auf die präparative Mini Prep Cell (BioRad) übertragen. Tab. 2.26 zeigt die Zusammensetzung der Gele. Das Minigel wurde ohne Sammelgel, d. h. kontinuierlich gegossen, für die Mini Prep Cell wurde dann ein diskontinuierliches System gewählt, um die Auftrennung zu verbessern.

Tab. 2.26: Zusammensetzung von Minigel und dem Gel der Mini Prep Cell für die native Elektrophorese nach McLellan 1982.

Der Imidazol/HEPES-Puffer wurde 5-fach konzentriert eingesetzt und hatte eine Endkonzentration von 43 mM Imidazol und 35 mM HEPES, bei einem pH-Wert von 7.4.

Lösung	Minigel, 7.5 %	Mini Prep Cell	
		Trenngel (7.5 %, Länge 7 cm)	Sammelgel (3 %, Länge 2 cm)
5x Imidazol / HEPES	1800 µl	800 µl	400 µl
Acrylamid:Bisacrylamid (30 : 0.8)	2250 µl	1000 µl	200 µl
H ₂ O	4900 µl	2200 µl	1400 µl
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat	45 µl	20 µl	10 µl
TEMED	9 µl	4 µl	2 µl

Vor dem Auftragen der Probe wurde das Gel mindestens eine Stunde einer Elektrophorese unterzogen. Darauf wurde der Puffer gewechselt und die Probe aufgetragen. Gel- und Elektrodenpuffer waren identisch (43 mM Imidazol / 35 mM HEPES, pH 7.4). Die Probe wurde vor dem Auftragen auf das Gel mit 3 µl 50 % (v/v) Glycerin pro 20 µl Probe versetzt, um eine Durchmischung mit Elektrodenpuffer zu vermeiden.

Die Laufbedingungen für ein Minigel waren 150 V, 11 mA und eine Laufzeit von ca. 1.5 h. Aufgrund der Wärmeentwicklung während der Elektrophorese wurde diese bei 4°C durchgeführt. Um festzustellen, wo sich das gesuchte Protein befand, wurde sofort nach Beendigung der Elektrophorese das Gel in die einzelnen Spuren geteilt, eine Spur mit Coomassie gefärbt (siehe 2.10.5.4) und die anderen in Streifen von ca. 5 mm Breite geschnitten. Die Elution des Proteins erfolgte durch Diffusion, indem das Gel in 400 µl Elektrophoresepuffer mit einem Potter fein zerteilt und für eine Stunde bei RT inkubiert wurde. Nach Zentrifugation (15 min, 4°C, ca. 20000 g) wurde der Überstand abgenommen, von dem 50 µl für den Aktivitätstest und 20 µl für eine SDS-Gelelektrophorese verwendet wurden.

Bei den Minigelen stellte sich heraus, dass die Elution aus dem Gel ein kritischer Punkt war, wobei nur eine geringe Ausbeute erzielt werden konnte. Dieses Problem wurde durch die Anwendung der Mini Prep Cell gelöst. Bei dieser fand während der Elektrophorese eine kontinuierliche Elution statt, indem die einzelnen Proteine beim Austreten aus dem Gel von einem Pufferstrom zu einem Fraktionssammler transportiert wurden (Abb. 2.11).

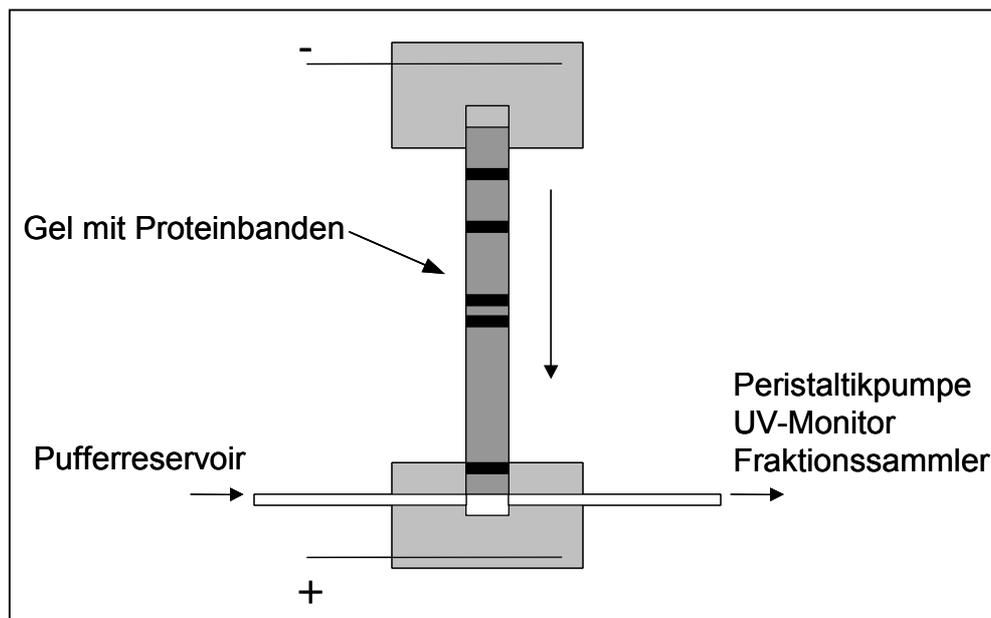


Abb. 2.11: Schematische Funktionsweise der Mini Prep Cell von BioRad.

Das Proteingemisch wird auf das röhrenförmige Gel aufgetragen, durch Anlegen einer Spannung wandern alle negativ geladenen Proteine ($pI < pH$ des Puffers) durch das Gel (senkrechter Pfeil). Die Geschwindigkeit ist abhängig von Ladung (d. h. dem pI) und Größe bzw. Form des Proteins. Dadurch wird das Proteingemisch getrennt, die aus dem Gel herauswandernden Proteinbanden (schwarz) werden von einem Pufferstrom aufgefangen und mit Hilfe einer Peristaltikpumpe zu einem UV-Monitor zur Detektion und dann weiter zu einem Fraktionssammler transportiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden dann auf Aktivität getestet.

Die Elektrophorese mit der Mini Prep Cell wurde mit 500 V (entsprechend ca. 1.5 - 2.5 W) durchgeführt. Es wurde, wie bei den nativen Minigelen, mindestens eine Stunde lang eine Spannung angelegt, dann wurden die Elektrodenpuffer gewechselt, die Probe aufgetragen und die Elektrophorese gestartet. Die Pufferflussrate betrug ca. $50 \mu\text{l min}^{-1}$ und die Fraktionsgröße 5 min. Peristaltikpumpe, UV-Monitor und Fraktionssammler waren von dem FPLC-System der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg).

Die gesammelten Fraktionen wurden auf Aktivität getestet, die Fraktionen mit entsprechend hoher Aktivität vereint und anschließend zur weiteren Reinigung verwendet. Das Aktivitätsmaximum wurde nach ca. 6-8 h erreicht. Aufgrund der großen Verdünnung durch die Elution musste anschließend an die Elektrophorese jede Probe entweder mit Hilfe von Kon-

zentratoren oder mit der unten beschriebenen Methode nach Ziegler *et al.* 1997 (Tab. 2.27) konzentriert werden.

Tab. 2.27: Methode zur Konzentrierung stark verdünnter Proteinlösungen nach Ziegler *et al.* 1997.

Zum Ausfällen des Proteins wurde das stark hydrophobe Harz StrataClean[®] Resin der Firma Stratagene (La Jolla, USA) verwendet. Für die Elution wurden die Proteine durch Zugabe von SDS denaturiert, sodass anschließend keine Aktivitätstests möglich waren. Nach Angaben der Literatur ist die Konzentrierung bis zu einer Verdünnung von 100 ng Protein ml⁻¹ möglich.

-
1. Strataclean[®] Resin aufschütteln.
 2. 1 µl StrataClean[®] Resin / 100 µl Proteinlösung.
 3. 20 min schütteln bei RT.
 4. Zentrifugieren (5 min, ca. 20000 g, 4°C).
 5. Überstand abnehmen und verwerfen.
 6. 10 µl SDS-Probenpuffer (siehe 2.10.5.1) und 1 µl Mercaptoethanol dazugeben.
 7. 2 min bei 95°C inkubieren.
 8. Zentrifugieren (5 min, ca. 20000 g, 4°C).
 9. Überstand direkt auf das SDS-Gel geben.
-

2.10.5.3 Silberfärbung

Anschließend an die SDS-Gelelektrophorese wurden die Gele mit der Methode nach Blum *et al.* 1987 gefärbt. Tab. 2.28 zeigt die einzelnen Färbeschritte mit der jeweiligen Zeitdauer. Die Nachweisgrenze wurde mit BSA als Standardprotein auf ca. 10 ng Bande⁻¹ bei einem Minigel bestimmt.

Tab. 2.28: Silberfärbung nach Blum *et al.* 1987.

Schritt	Lösung	Dauer
1. Fixierung	10 % (v/v) Essigsäure 50 % (v/v) Methanol	mind. 1 h
2. Waschen	30 % (v/v) Ethanol	30 min
3. Sensibilisierung	0.02 % (w/v) Na-Thiosulfat	exakt 1 min
4. Färbung	0.2 % (w/v) AgNO ₃ 0.015 % HCHO	20 min (abdunkeln!)
5. Entwicklung	(ca. 37 % Formaldehyd 6 % (w/v) NaCO ₃ 0.05 % HCHO	
6. Abstoppen	2 % Lsg. von Schritt 3 18 % (v/v) Essigsäure 75 % (v/v) Methanol	5-10 min
7. Konservierung	0 - 5 % (v/v) Glycerin	über Nacht

Nach jedem Schritt wurde mit H₂O gespült, die Entwicklungszeit hing von der gewünschten Intensität ab. Wurde diese erreicht, wurde der Entwicklungsvorgang durch Zugabe der

Abstopplösung beendet. Nach gründlichem Wässern in der Konservierungslösung wurde das Gel zwischen zwei gequollenen Cellophan-Folien im Gelrockner getrocknet.

2.10.5.4 Coomassie-Färbung

Standard-Coomassie-Färbung

Für analytische native Minigele wurde eine Coomassie-Färbung verwendet, deren Zusammensetzung in Tab. 2.29 dargestellt ist. Die Gele wurden 2-3 h bei RT gefärbt, anschließend 2 h bei RT mit Entfärberlösung (10 % (v/v) Eisessig, 10 % (v/v) Methanol in H₂O) entfärbt. Nach Entfärbung wurden auch diese Gele, wie nach der Silberfärbung, einige Zeit in H₂O gelagert und anschließend in Cellophan getrocknet. Die Nachweisgrenze betrug mit dieser Methode mit BSA als Standardprotein ca. 100 ng pro Bande.

Tab. 2.29: Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung.

0.05 % (w/v) Coomassie R-250	0.5 g
5 Teile Methanol	450 ml
1 Teil Eisessig	90 ml
5 Teile H ₂ O	450 ml

Colloidale Coomassie-Färbung nach Neuhoff *et al.* 1988

SDS-Gele, die zur Sequenzierung genutzt wurden, wurden mit einer Methode gefärbt, bei der der Farbstoff in colloidalen Form vorlag. Dies wurde durch die Zugabe von Ammoniumsulfat erreicht und führte zu einer zweifach höheren Sensitivität (bis 50 ng Protein pro Bande). Die Zusammensetzung der Färbelösung ist in Tab. 2.30 dargestellt. Direkt vor Beginn der Färbung wurde die Färbelösung mit Methanol (20 ml Methanol + 80 ml Lösung) versetzt. Die Färbung war nach 1-2 h beendet, die Entfärbung erfolgte mit H₂O. Entsprechend gefärbte Gele wurden entweder in 20 % (w/v) Ammoniumsulfat oder getrocknet in Cellophan gelagert. Alternativ zu dieser Färbung wurde auch mit Colloidal Coomassie „Roti[®]-Blue“ gefärbt.

Tab. 2.30: Zusammensetzung der Färbelösung nach Neuhoff *et al.* 1988.

<i>o</i> -Phosphorsäure	4 g
H ₂ O	200 ml
Ammoniumsulfat	20.4 g
Coomassie Brilliant Blue	4 ml
G-250-Lsg (0.05 g / ml)	

2.10.5.5 Auswertung von Polyacrylamid-Gelen

Die Gele wurden vor dem Trocknen mit einem Image Master VDS digitalisiert. Die Scans standen als TIFF-Dateien zur Verfügung und wurden als solche in die Arbeit eingefügt. Mit Hilfe der Auswertungssoftware Imagemaster 1D Elite konnten die Molmassen der detektierten Banden und die Bandenintensitäten berechnet werden.

2.11 Sequenzierung von Peptiden

Die Sequenzierung wurde von der Firma TOPLAB (Martinsried) durchgeführt. Dafür wurden die entsprechenden Banden aus SDS-Gelen ausgeschnitten, in Eppendorf-Reaktionsgefäßen zur Verhinderung von Austrocknung mit einigen µl H₂O versetzt und der Firma zur Verfügung gestellt. Dort wurden die Gelstücke gewaschen, das Protein mit der Protease LysC im Gel gespalten und die Peptide mit Acetonitril eluiert. Das eluierte Peptidgemisch wurde dann mittels RP-HPLC (HP 1100, Hewlett Packard) getrennt und einzelne Peptide sequenziert (Procise 492, PE Biosystems). Mit den erhaltenen Sequenzdaten wurde anschließend eine Datenbankanalyse (MS-Edman Search) durchgeführt. Einen Überblick über die Proteinsequenz-Analyse gibt Kellner *et al.* 1999.

Sowohl mit den Peptidsequenzen als auch mit den Sequenzen, die bei einem Sequenzvergleich mit MS-Edman Search Ähnlichkeiten zu den Peptiden gezeigt hatten, wurden mit dem Programm BLAST (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) nochmals ein Homologievergleich durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Vorbemerkung

Der Ergebnis-Teil läßt sich inhaltlich in drei Abschnitte einteilen. Im ersten Teil wurden die methodischen Grundlagen geschaffen, um einerseits die Aktivität der Hydroxycinnamoyl-Transferasen messen und bestimmten Produkten zuordnen und andererseits die Inhaltsstoffe in der Kiefer in Keimlingen und adulten Bäumen analysieren zu können (3.1 bis 3.3). Im zweiten Teil wurden physiologisch/ökologische Untersuchungen vorgenommen, in denen die Wirkung von UV-B-Strahlung auf Keimlinge unter kontrollierten Bedingungen in Sonnensimulatoren beobachtet und die Aktivitäten der Transferasen sowie der Verlauf der diacylierten UV-B-Schutzpigmente und einiger anderer Inhaltsstoffe in Freilandbäumen über mehrere Jahre verfolgt wurde (3.4 und 3.5). Der dritte Teil besteht aus proteinbiochemischen Experimenten, in denen die Enzyme biochemisch charakterisiert und eine HCT gereinigt wurden (3.6 bis 3.8).

3.2 Nachweis der Hydroxycinnamoyl-Transferase-Aktivität

Zum Nachweis der Aktivität der Hydroxycinnamoyl-Transferasen (HCT's) in Proteinextrakten von Kiefernadeln wurde ein Enzymtest entwickelt, bei dem standardmäßig Cumaroyl-CoA als Donorsubstrat und Kämpferol 3-glukosid, Isorhamnetin 3-glukosid oder Tilirosid (6''-(*p*-Cumaroyl)-kämpferol 3-glukosid) als Akzeptorsubstrate eingesetzt wurden (Abb. 3.1). Dabei zeigte die HPLC-Analyse, dass in einem Nadel-Rohextrakt mehrere acylierte Produkte entstehen. In Abb. 3.2 sind Beispiele für HPLC-Chromatogramme von Enzymtests dargestellt, bei denen Isorhamnetin 3-glukosid (A) und Tilirosid (B) als Substrate eingesetzt wurden. Wurde ein nichtacyliertes Flavonol 3-glukosid als Substrat eingesetzt, waren drei monoacylierte (Peaks 6, 8 und 9) und eine diacylierte Verbindung (Peak 10) nachweisbar, wobei das monoacylierte Produkt Peak 9 das Hauptprodukt bildete. Wurde Tilirosid als Substrat eingesetzt, entstand ein diacyliertes Hauptprodukt (10) und ein weiteres diacyliertes Nebenprodukt in sehr geringer Menge (10a).

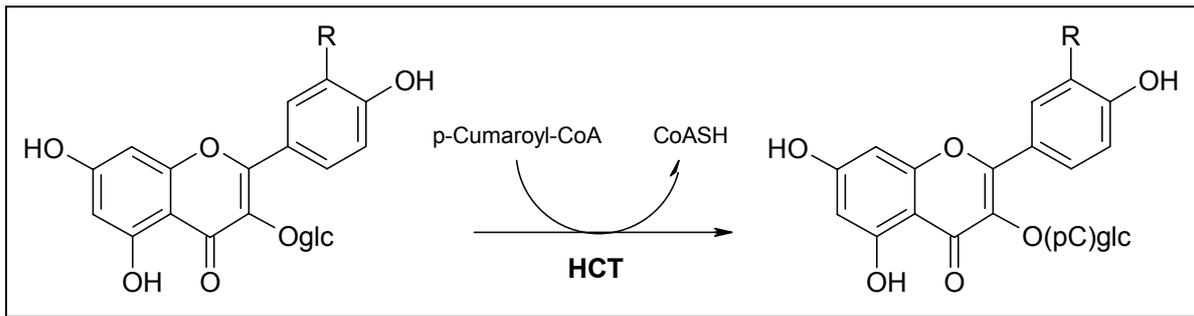


Abb. 3.1: Reaktionsschema der Biosynthese acylierter Flavonolglukoside.

R: H, Kämpferol; OH, Quercetin; OMe, Isorhamnetin. Das hier nicht dargestellte Tilirosid trägt an 6''-Position des Glukosids einen Cumarsäurerest; die Enzymprodukte sind demnach diacyliert (siehe auch Abb. 1.5 und Abb. 3.7).

In geringer Menge konnte Cumarsäure (Peak 2) nachgewiesen werden. Diese stammte jedoch aus der Cumaroyl-CoA-Lösung, wo sie als Verunreinigung vorhanden war. Da auch keine zeitabhängige Zunahme der Cumarsäuremenge beobachtet wurde, ist eine Entstehung durch die Aktivität einer Hydrolase auszuschließen.

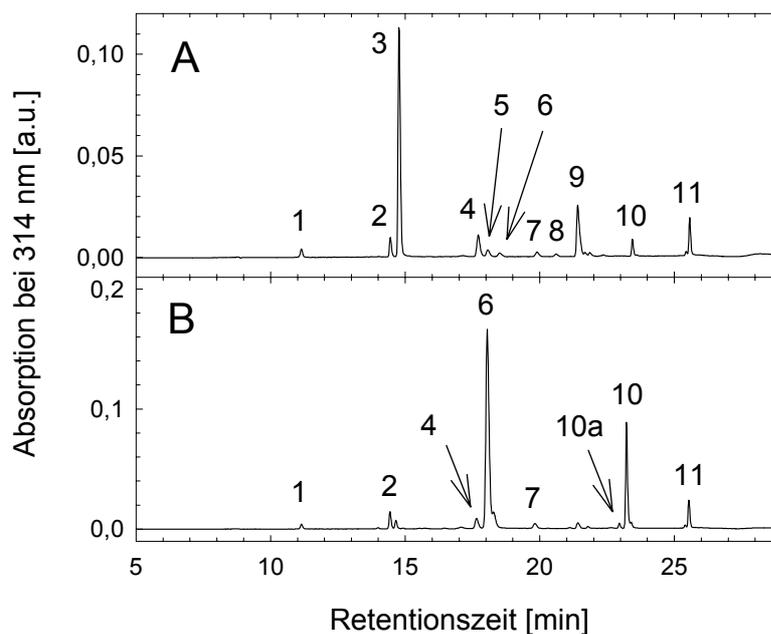


Abb. 3.2: HPLC-Diagramm von Enzymtests mit einem Nadel-Rohextrakt.

A: Isorhamnetin 3-glukosid als Akzeptorsubstrat (Peak 3), B: Tilirosid als Akzeptorsubstrat (Peak 6). In A sind die Peaks 6, 8 und 9 monoacylierte und Peak 10 ein diacyliertes Produkt, in B sind die Peaks 10 und 10a diacylierte Produkte. Die weiteren Peaks sind: 1: Abbauprodukt von DTE, 2: Cumarsäure, 4 und 5: keine Zuordnung möglich, 7: Cumarsäure-Derivat, 11: interner Standard PSM. Die Retentionszeit von Verbindungen mit Kämpferol als Aglykon (B, Peaks 6 und 10) ist kürzer als die von solchen mit Isorhamnetin (A), da die Methoxygruppe in 3'-Position die Lipophilie der Verbindungen erhöht.

Die Identifizierung der Produkte erfolgte in einem HPLC-Lauf anhand der Diodenarray-Spektren der Substanzen. Mit Cumarsäure acylierte Flavonol 3-glukoside zeigen ein

charakteristisches Spektrum (Abb. 3.3), das sich durch zwei Maxima bei 268 und 314 nm und eine Schulter bei ca. 356 nm auszeichnet. Diese ist bei diacylierten Verbindungen im Verhältnis zum Maximum niedriger.

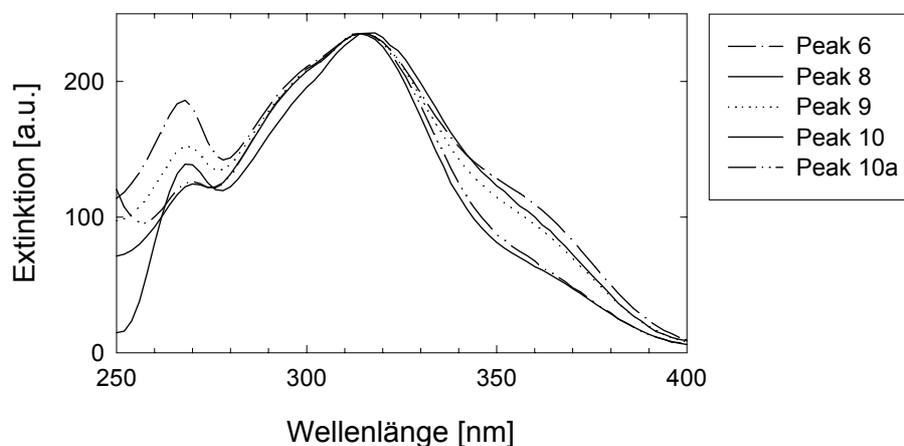


Abb. 3.3: Absorptionsspektren acylierter Kämpferol 3-glukoside.

Die Spektren wurden mit einem Diodenarray-Detektor während des HPLC-Laufs aufgenommen und sind auf 314 nm normiert. Das erste Maximum bei 268 nm und die Schulter bei 356 nm werden von dem Flavonol-Anteil, das Maximum bei 314 nm von den Cumarsäure-Resten bestimmt. Die Peaks 6, 8 und 9 sind monoacyliert, die Peaks 10 und 10a sind diacyliert. Die Unterschiede werden vor allem bei der Schulter bei 356 nm deutlich.

Der Nachweis einer enzymatischen Aktivität wurde damit erbracht, dass der Enzymtestansatz ohne Proteinextrakt und mit einer abgekochten Proteinlösung inkubiert wurde. In diesen Ansätzen konnten keine acylierten Produkte gefunden werden.

Die Bildung mehrerer mono- bzw. diacylierter Verbindungen aus einem Donor- und einem Akzeptorsubstrat in einem Nadel-Rohextrakt zeigte, dass die enzymatische Acylierung an verschiedenen Positionen des Zuckerrests stattfinden konnte. Aus diesem Ergebnis ergaben sich zwei Fragen: An welcher Position sind die Produkte acyliert und sind ein oder mehrere Enzyme für die Acylierungen verantwortlich? Zur Beantwortung dieser Fragen war es notwendig, die Acylierungspositionen der entstandenen Produkte zu untersuchen und festzustellen, ob sich die Aktivitäten von verschiedenen Enzymen nachweisen ließen. Im Verlauf der Reinigung der Acyltransferasen stellte sich heraus, dass sich drei verschiedene Transferaseaktivitäten mit Anionenaustauscher-Chromatographie trennen ließen (Abb. 3.4), die sich anhand ihrer Produkte unterscheiden.

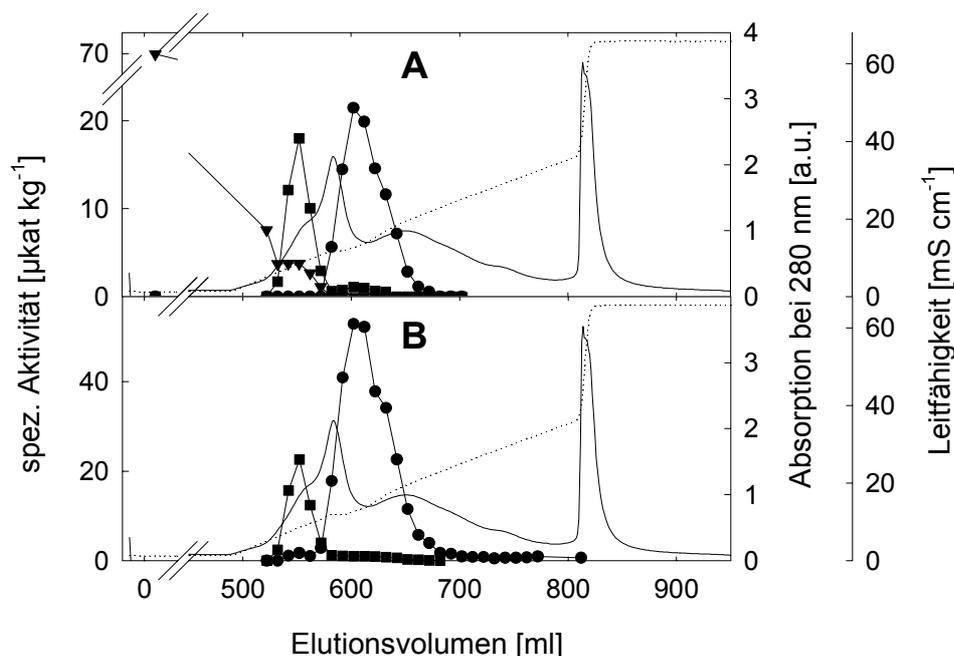


Abb. 3.4: Säulenchromatographische Trennung verschiedener HCT-Aktivitäten mit Q-Sepharose ff. In A wurden die Fraktionen mit K3G, in B mit Tilirosid getestet. Neben den spezifischen Aktivitäten der HCT's sind der Verlauf der Absorption bei 280 nm (durchgezogen) und die Leitfähigkeitsänderung (gepunktet) durch den Gradienten dargestellt, Einzelheiten zur Chromatographie siehe 2.10.4.2. Die Acyltransferasen sind nach ihren später bestimmten Acylierungspositionen benannt. Dabei ist die 6''-HCT (▼) für die Synthese von Peak 6 aus Abb. 3.2, die 4''-HCT (■) für die Synthese von Peak 8 und die 3''-HCT (●) für die Synthese von Peak 9 verantwortlich, wenn ein Flavonol 3-glukosid als Substrat eingesetzt wird. Mit Tilirosid als Substrat ist die 4''-HCT für die Synthese von Peak 10a und die 3''-HCT von Peak 10 verantwortlich.

Es zeigte sich, dass ein Enzym für die Synthese von Peak 6, ein zweites für die Synthese von Peak 8 und 10a und ein drittes für die Synthese des Peak 9 und 10 verantwortlich waren, je nach dem, ob Kämpferol 3-glukosid oder Tilirosid als Akzeptorsubstrat eingesetzt wurde. Somit waren in dem Nadel-Rohextrakt drei positionsspezifische Acyltransferasen vorhanden, die jeweils ein bestimmtes monoacyliertes bzw. das korrespondierende diacylierte Produkt herstellen konnten. Die Acylierungspositionen der verschiedenen Produkte wurden durch Kochromatographie und $^1\text{H-NMR}$ näher charakterisiert.

3.3 Strukturaufklärung von Enzym-Produkten

3.3.1 Kochromatographie

Die Kochromatographie erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen Standard Tilirosid und einem Extrakt Methanol-löslicher phenolischer Inhaltsstoffe aus Primärnadeln von Kiefernkeimlingen (siehe 2.5.2), dessen diacylierte Flavonol 3-glukoside aufgrund der Ergebnisse der Strukturaufklärung am Institut für Biochemische Pflanzenpathologie bekannt waren (Jungblut 1996, Jungblut *et al.* 1995).

Abb. 3.5 zeigt die HPLC-Diagramme von Enzymtests mit den Substraten Kämpferol 3-glukosid und Tilirosid und dem Extrakt von Methanol-löslichen Inhaltsstoffen von Primärnadeln, sowie deren Koinjektionen. Die Peaks 6 und 10 entsprechen den jeweiligen Peaks von Abb. 3.2. Die Buchstaben im Chromatogramm des Keimlings-Extrakts bezeichnen die bekannten diacylierten Flavonol 3-glukoside: A: 3'',6''-Di-(*p*-cumaroyl)-kämpferol 3-glukosid; B: 3''-(*p*-Cumaroyl)-6''-(feruloyl)-kämpferol 3-glukosid; C: 3'',6''-Di-(*p*-cumaroyl)-isorhamnetin 3-glukosid; D: 3''-(*p*-Cumaroyl)-6''-(feruloyl)-isorhamnetin 3-glukosid).

Es ist zu erkennen, dass der Peak 10 der Enzymprodukte mit dem Peak A des Keimlings-Extrakts übereinstimmt (Abb. 3.5 D und E, Punktmarkierungen), ebenso ist der Peak 10 des Enzymtests mit K3G mit dem des Enzymtests mit Tilirosid identisch (Abb. 3.5 F, rechte Punktmarkierung). Somit ist das diacylierte Hauptprodukt, das im Enzymtest entsteht, 3'',6''-Di-(*p*-cumaroyl)-kämpferol 3-glukosid. Die Identifizierung von Peak 6 als 6''-(*p*-Cumaroyl)-kämpferol 3-glukosid wurde durch die Koinjektion des K3G-Extraktes mit dem Tilirosid-Extrakt möglich (Abb. 3.5 f, linker Punkt). Somit konnte die Acyltransferase, die Peak 6 herstellt, als Hydroxycinnamoyl-CoA:kämpferol 3-glukosid 6''-*O*-Hydroxycinnamoyl-Transferase (6''-HCT) identifiziert werden. Daneben erschien es wahrscheinlich, dass Peak 9 an 3''-Position acyliert war, da das diacylierte Produkt Peak 10 (Substrat: Tilirosid!) mit dem an 3''- und 6''-Position acylierten Metaboliten übereinstimmte und von der gleichen HCT synthetisiert wurde wie Peak 9 (Abb. 3.4). Dieses Produkt, ebenso wie Peak 8 wurden mit ¹H-NMR-Spektroskopie näher untersucht.

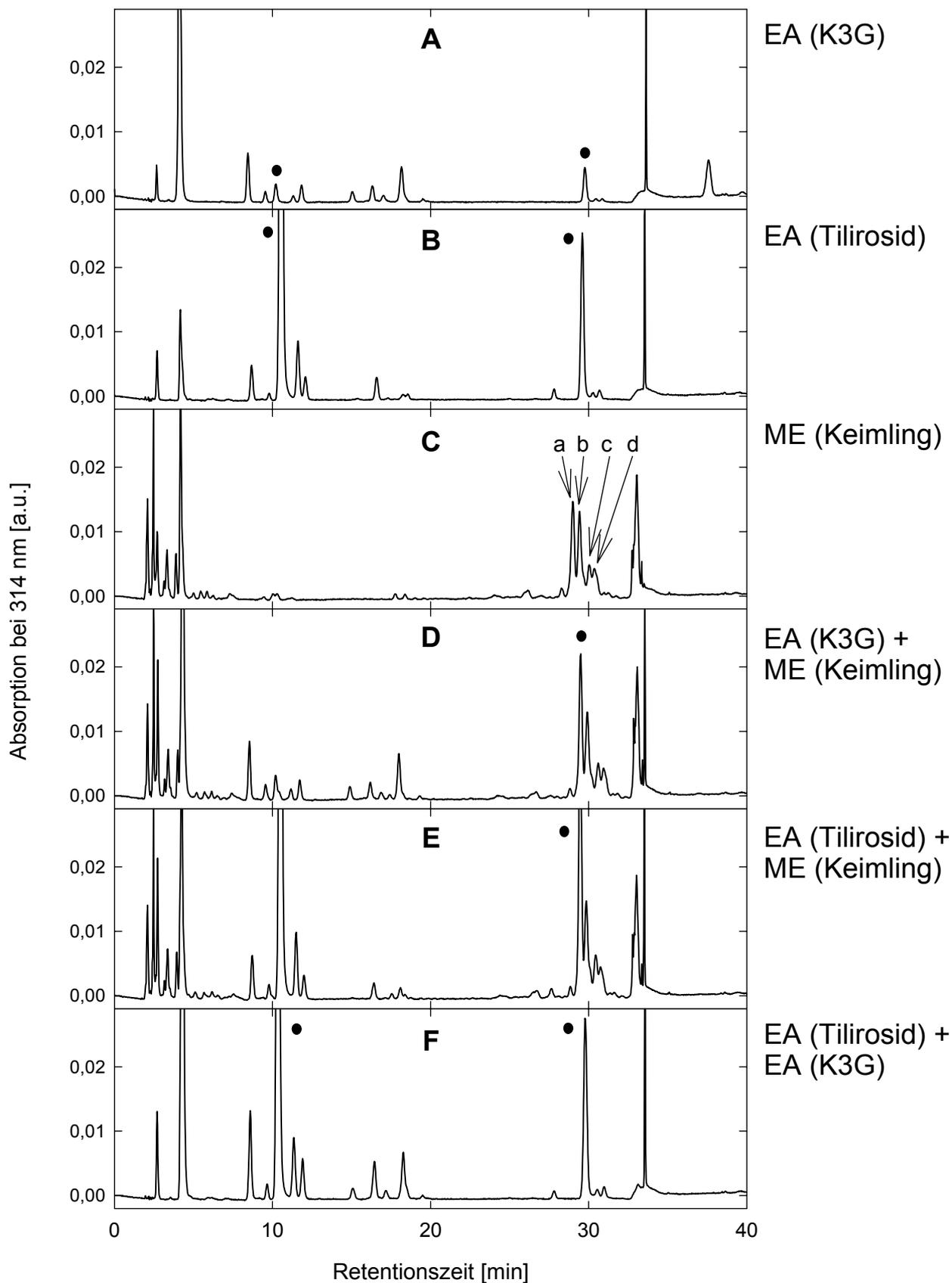


Abb. 3.5: HPLC-Diagramme zur Identifizierung von Peak 6 und 10 (siehe Abb. 3.2).

Die Diagramme A und B zeigen Enzymsätze (EA) mit den angegebenen Substraten, C einen MeOH-Extrakt (ME) von Primärnadeln von Kiefernceimlingen. D bis F stellen Koinjektionen dar, bei denen die angegebenen Extrakte im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. a, b, c, und d sind von

Fortsetzung nächste Seite

Jungblut (1996) identifizierte diacylierte Flavonol 3-glukoside (a: 3'',6''-Di-(p-cumaroyl)-K3G; b: 3''-(p-Cumaroyl)-6''-(feruloyl)-K3G; c: 3'',6''-Di-(p-cumaroyl)-I3G; d: 3''-(p-Cumaroyl)-6''-(feruloyl)-I3G). Die Punkte weisen auf Peaks hin, die bei den verschiedenen Extrakten übereinstimmen, da die Größe der Peaks relativ zur Größe anderer Peaks zunimmt.

3.3.2 Enzymatische Synthese von monoacylierten Kämpferol 3-glukosiden

Die Strukturaufklärung der monoacylierten Verbindungen Peak 8 und 9 erfolgte mit Hilfe von ¹H-NMR-Messungen, da diese nicht als Referenzen zur Verfügung standen. Für die Gewinnung dieser Verbindungen wurde die enzymatische Synthese mit Proteinextrakten gewählt, die nur die Aktivität jeweils einer HCT enthielten. Geeignete Fraktionen wurden durch Chromatographie mit Q-Sepharose gewonnen (siehe Abb. 3.4 und Abschnitt 3.8.3). Vorteil dieser Proteinextrakte war zudem die höhere spezifische Enzymaktivität, da weniger Ansätze für eine entsprechende Menge des gewünschten Produkts erforderlich waren.

3.3.3 Reinigung mittels präparativer HPLC

Die synthetisierten Produkte wurden direkt nach Ausschütteln aus dem Enzymextrakt und Konzentrierung mittels präparativer HPLC von Substraten und Verunreinigungen getrennt. Abb. 3.6 zeigt Chromatogramme aus der Reinigung von Peak 9 (A) und Peak 8 (B). Insgesamt wurden von Peak 9 ca. 900 µg (die Ermittlung der Gesamtmenge ergab photometrisch 1100 µg, mittels analytischer HPLC 810 µg) mit einer Reinheit von 85 % (analyt. HPLC) und von Peak 8 ca. 250 µg (HPLC) mit einer Reinheit von 76 % erhalten. Vom Substrat Kämpferol 3-glukosid konnten durchschnittlich 60 % der im Enzymtest eingesetzten Menge nach der präparativen HPLC zurückgewonnen und erneut zur Synthese verwendet werden.

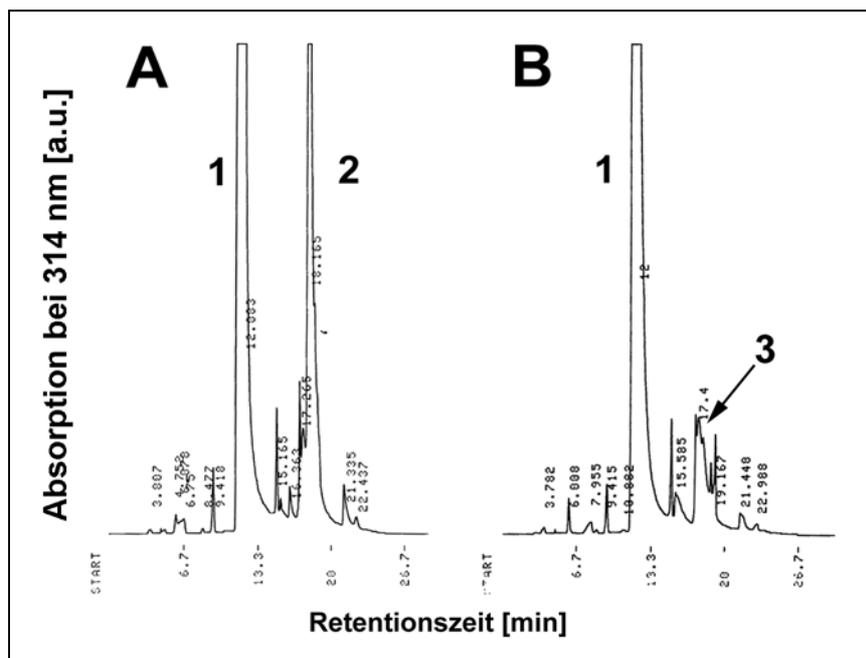


Abb. 3.6: HPLC-Diagramme zur Reinigung von Peak 9 (A) und 8 (B).

Peak 1 ist das Substrat des Enzymtest, Kämpferol 3-glukosid, Peak 2 bzw. 3 sind die Produkte (entsprechend Peak 9 bzw. 8 in Abb. 3.2).

3.3.4 NMR-Spektroskopie

Zur Aufklärung der Acylierungsstellen wurden neben den Enzym-Produkten auch Kämpferol 3-glukosid und Tilirosid als Referenzen für die ^1H -NMR-Spektroskopie eingesetzt. Dies erleichterte die Zuordnung der Signale zu den einzelnen Protonen. Außerdem konnte auch auf Daten zurückgegriffen werden, die im Rahmen der Strukturaufklärung der diacylierten Metabolite aus Kiefern ermittelt worden waren (Jungblut 1996). Die Zuordnung wurde zudem dadurch vereinfacht, dass die im Enzymtest eingesetzten Substrate bekannt waren. Tabelle 3.1 fasst die Ergebnisse der NMR-Spektroskopie der unbekannt Peaks im Vergleich zu Kämpferol 3-glukosid zusammen.

Tab. 3.1: ^1H -NMR-Daten von K3G und den monoacylierten Enzymtest-Produkten Peak 9 und Peak 8. Alle Messungen wurden in CD_3CN bei 30°C (K3G und Peak 9) oder 0°C (Peak 8) durchgeführt. Von Peak 9 wurden ca. $350\ \mu\text{g}$, von Peak 8 ca. $150\ \mu\text{g}$ eingesetzt.

Proton	Kämpferol 3-glukosid		Peak 9		Peak 8	
	δ [ppm]	^nJ [Hz]	δ [ppm]	^nJ [Hz]	δ [ppm]	^nJ [Hz]
Flavonoid						
H-2'/6'	8,07	<u>AA'</u> <u>XX'</u> 9,0	8,08	<u>AA'</u> <u>XX'</u> 9,0	8,09	<u>AA'</u> <u>XX'</u> 9,0
H-7'''	-	-	7,70	d 16,0	7,64	d 16,0
H-2'''/6'''	-	-	7,53	<u>AA'</u> <u>XX'</u> 8,6	7,50	<u>AA'</u> <u>XX'</u> 8,7
H-3'/5'	6,93	<u>AA'</u> <u>XX'</u> 8,9	6,95	<u>AA'</u> <u>XX'</u> 8,9	6,94	<u>AA'</u> <u>XX'</u> 8,9
H-3'''/5'''	-	-	6,86	<u>AA'</u> <u>XX'</u> 8,6	6,82	<u>AA'</u> <u>XX'</u> 8,6
H-8	6,47	d 2,1	6,51	d 2,1	6,47	d 2,1
H-8'''	-	-	6,39	d 15,9	6,32	d 15,9
H-6	6,26	d 2,1	6,29	d 2,1	6,25	d 2,0
Zucker						
H-1''	5,05	d* 7,6	5,17	d 7,9	5,21	d 8,0
H-6''A	3,51	dd 11,8; 5,6	3,48	m	3,30	m
H-6''B	3,40	dd 11,8; 2,8	3,43	dd 11,1; 5,9	3,30	m
H-2''	3,35	m	3,60	t 8,6; 8,4	3,48	dd 9,1; 8,0
H-3''	3,34	m	5,02	t 9,3; 9,4	3,64	t 9,1
H-4''	3,23	t* 9,0	3,54	m	4,79	t 9,8
H-5''	3,14	ddd 9,0; 5,6; 2,9	3,28	ddd 8,4; 5,2; 2,8	3,37	dddd 10,0; 7,6; 5,1; 2,4
* zusätzlich mit virtuellen Kopplungen						

Im Anhang befinden sich das ^1H -NMR-Spektrum und das $2\text{D-}^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-Spektrum von Peak 9, sowie die ^1H -NMR-Daten aller untersuchten Substanzen (K3G, Tilirosid, Peak 9, Peak 8, 2''-6'''-Di-(*p*-cumaroyl)-kämpferol 3-glukosid). Als Literatur zu Methodik und Auswertung von ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie sei z. B. (Kessler *et al.* 1988, Friebolin 1988) empfohlen.

In Abb. 3.7 ist die Struktur von Kämpferol 3-glukosid mit der Nummerierung der verschiedenen Positionen gezeigt.

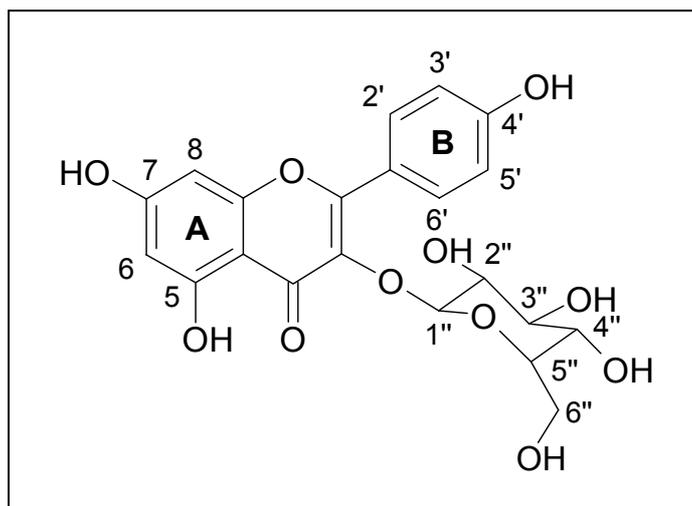


Abb. 3.7: Struktur von Kämpferol 3-glukosid mit Nummerierung der Positionen der Protonen.

Die Protonen des B-Ring waren an einem für *para*-substituierte Aromaten typischen AA'XX'-Kopplungssystem zu erkennen. Die zugehörigen Signale entsprachen zwei Protonen, wobei das AA'-Signal eine Verschiebung von 8,07 ppm mit einer Kopplung von 9,0 Hz hatte, während das XX'-System bei 6,93 ppm mit einer Kopplung von 8,9 Hz auftrat. Die beiden aromatischen Protonen des A-Rings erschienen als Dubletts bei 6,47 bzw. 6,26 ppm und hatten eine Kopplung von 2,1 Hz, die für eine *meta*-Konfiguration typisch ist.

Die Protonen des Zuckerrests waren im höheren Feld bei 3,1 bis 5,2 ppm zu finden. H-1'' hatte die stärkste Verschiebung von 5,05 ppm durch die Bindung des Flavonoidanteils an die Hydroxygruppe an dieser Position, während die beiden Protonen in 6''-Position Doppel-dubletts bildeten, die aber mit Verschiebungen von 3,51 bzw. 3,40 ppm voneinander getrennt waren. Die Signale von H-2'' und H-3'' waren als überlagerte Multipletts zu erkennen ($\delta = 3,34$ ppm). H-4'' und H-5'' hatten Verschiebungen von 3,23 (t) und 3,14 (ddd). Die eindeutige Zuordnung der Protonen des Zucker-Rests wurde anhand des 2D- ^1H , ^1H -COSY-Spektrums durchgeführt (siehe Anhang).

Die NMR-Spektren der monoacylierten Enzym-Produkte unterschieden sich von Kämpferol 3-glukosid zum Einen durch das Auftreten von Signalen weiterer aromatischer Protonen, die von dem Cumarsäure-Rest verursacht wurden, zum Anderen durch die Verschiebung der Protonen des Zucker-Rests.

Die aromatischen Protonen der Acylgruppe zeigten ähnlich denen des B-Rings des Flavonoids ein AA'XX'-Kopplungssystem, die der Doppelbindung zwei Dubletts bei 7,70 und 6,86 ppm (Peak 9) mit einer großen Kopplungskonstanten von 16,0 bzw. 15,9 Hz. Diese Kopplung erlaubte eine Zuordnung zu einer *trans*-Konfiguration.

Die Acylierungsstellen am Zucker waren durch eine Verschiebung der zugehörigen Protonen zu tieferem Feld gekennzeichnet, die durch elektronenziehende und damit entschirmende Effekte der Acylgruppe zustande kam. So war bei Peak 9 das Proton in 3''-Position um 1,68 ppm, bei Peak 8 das Proton in 4''-Position um 1,56 ppm verschoben. Die den Acylierungsstellen benachbarten Protonen zeigten ebenfalls noch eine leichte Verschiebung um 0,3 ppm zu tieferem Feld hin.

Diese Ergebnisse erlauben die Zuordnung der im Enzymtest entstehenden monoacylierten Verbindungen zu der Position 6'' (Peak 6), zu der Position 3'' (Peak 9) und zu der Position 4'' (Peak 8). Aus dem Nachweis von drei monoacylierten Enzymprodukten und der Trennung von drei verschiedenen Enzymaktivitäten mittels Anionenaustauscher-Chromatographie folgt somit, dass in der Kiefernnadel drei verschiedene Enzyme vorhanden sind, die sich durch die Acylierungsposition am Zucker-Rest unterscheiden:

- Hydroxycinnamoyl-CoA:kämpferol 3-glukosid 3''-*O*-Hydroxycinnamoyl-Transferase (3''-HCT)
- Hydroxycinnamoyl-CoA:kämpferol 3-glukosid 4''-*O*-Hydroxycinnamoyl-Transferase (4''-HCT)
- Hydroxycinnamoyl-CoA:kämpferol 3-glukosid 6''-*O*-Hydroxycinnamoyl-Transferase (6''-HCT).

3.4 Inhaltsstoff-Analyse

3.4.1 Lösliche phenolische Verbindungen

Die Analyse der Methanol-löslichen phenolischen Inhaltsstoffe erfolgte bei den Ernten der Freilandmessungen und bei den Keimlingsexperimenten in der Sonnensimulatoren des GSF-Forschungszentrum parallel zu den Aktivitätsmessungen der HCT's. Da die Ergebnisse bei adulten Bäumen und Keimlingen Unterschiede zeigten, werden im Folgenden beispielhaft Extrakte von je einem Freilandbaum und einem Keimling im Detail beschrieben und die Daten miteinander verglichen. Jeder Extrakt wurde sowohl mit Hilfe eines Methanol-Gradienten für die Flavonol-Derivate, Stilbene und Proanthocyanidine (Flavane) als auch eines Acetonitril-Gradienten für die acylierten Flavonolglykoside analysiert. Da nicht alle in Kiefernnadeln vorkommenden phenolischen Verbindungen bekannt waren, wurden nur identifizierte Substanzen in die Analyse einbezogen.

Die Zuordnung erfolgte anhand von Ergebnissen, die am Institut erarbeitet wurden (Jungblut *et al.* 1995, Schnitzler *et al.* 1996, Turunen *et al.* 1999). Die Quantifizierung wurde mittels authentischen Standards durchgeführt.

3.4.1.1 Methanol-Gradient

Der Vergleich der Chromatogramme von Keimlingen und adulten Freilandbäumen (Abb. 3.8) zeigt einige Unterschiede bezüglich der Anzahl und der relativen Intensität der Peaks. Bei Keimlingen (Abb. 3.8 A) waren deutlich weniger Peaks zu beobachten. Das Chromatogramm des Extrakts von Freilandbäumen (Abb. 3.8 B) war dagegen wesentlich komplexer.

Die identifizierten Peaks ließen sich anhand ihrer Retentionszeit und Diodenarray-Spektren (Tab. 3.2) in drei Gruppen einteilen: die erste Gruppe um 21 min Retentionszeit, nach ihren DA-Spektren Flavane und Hydroxyzimtsäure-Derivate, zu der Peak 1, Catechin (Peak 2) und Peak 3 gehörten. Dann eine zweite Gruppe um 32 min Retentionszeit, die von den Peaks 4 bis 7 charakterisiert wurde und aus nichtacylierten Flavonolglykosid-Derivaten bestand. Hier war nur einer der Peaks bei beiden Chromatogrammen identisch (Peak 5). Peak 4 stimmte mit Peak 4a nicht überein, wie die Retentionszeiten zeigten. Die DA-Spektren waren aber praktisch identisch und entsprachen denen von Quercetin-Derivaten. Peaks 6 und 7 konnten in den Chromatogrammen von adulten Bäumen nicht eindeutig identifiziert werden.

Die dritte Gruppe bildeten die UV-B-Schutzpigmente, acylierte Flavonolglukoside (Peak 8, 9 und 10), die aus Quercetin- (Peak 8) und Kämpferol- und Isorhamnetin-Derivaten (Peak 9 und 10) bestand. Die acylierten Flavonolglukoside wurden mit Hilfe des Methanol-Gradienten nur in ihrer Summe quantifiziert (Peak 9 und 10 zusammen). Mittels des Acetonitril-Gradienten wurden dann die Komponenten aufgetrennt und einzelnen quantifiziert.

Daneben wurden bei den Freilandbäumen auch noch die Stilbene Pinosylvin (Peak 11) und Pinosylvinmethylether (Peak 12) gefunden. Diese konnten im Keimlingsextrakt nicht nachgewiesen werden. Ein weiterer Unterschied zwischen Freilandbäumen und Keimlingen war das Vorkommen von monoacylierten Flavonolglukosiden bei den Freilandbäumen, die zusammen mit diacylierten Quercetinglukosiden Peak 8 bildeten und anhand des DA-Spektrums identifiziert werden konnten.

Tab. 3.2 fasst die Daten der identifizierten Peaks (Retentionszeit, Diodenarray-Spektren und Substanznamen) zusammen.

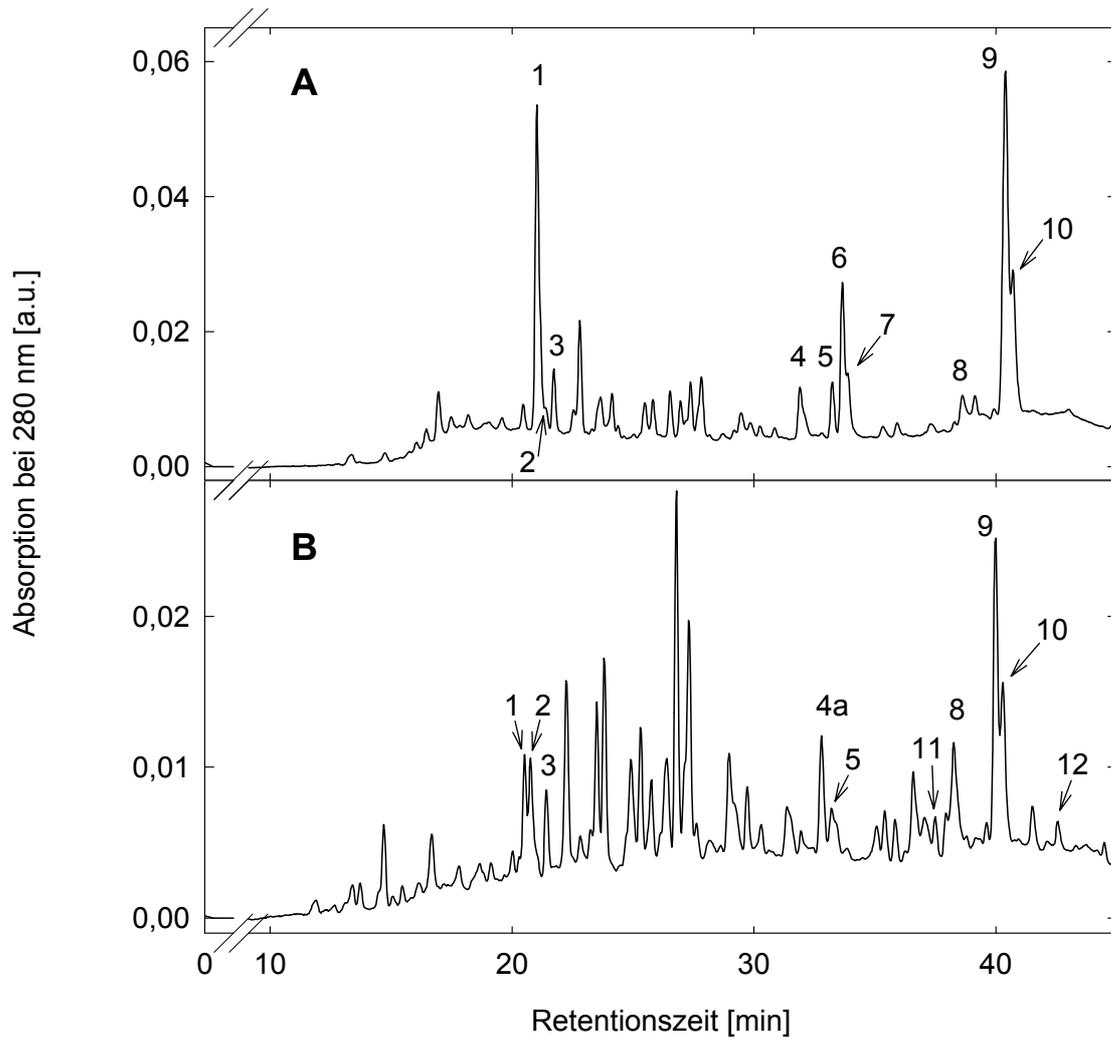
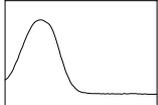
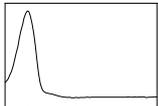
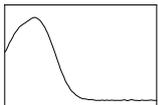
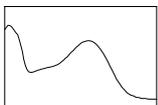
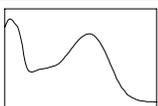
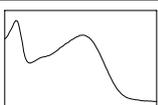
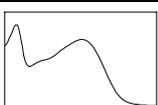
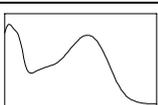
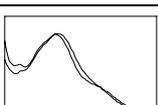
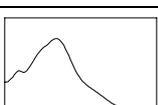
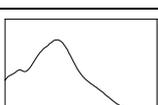


Abb. 3.8: HPLC-Diagramm des Methanol-Gradienten der MeOH-löslichen phenolischen Verbindungen eines Primärnadelextrakts von Keimlingen (A) und des Extrakts von Nadeln eines adulten Baumes (B). Die Nummern bezeichnen die ausgewerteten Peaks, die in Tab. 3.2 beschrieben werden.

Tab. 3.2: Zuordnung der Peaks von Abb 3.8 mit Retentionszeiten (R_t), Diodenarray-Spektren (DA, 250 - 440 nm) und Substanznamen.

Peak-Nr.	R_t [min]	DA-Spektrum	Abs.-Max. [nm]	Name
1	20.5		294	Hydroxyzimtsäure-Derivat
2	21.2		278	Catechin
3	21.7		287	Hydroxyzimtsäure-Derivat
4	31.9		255 / 354	Quercetin-Derivat
4a	32.8		256 / 356	Quercetin-Derivat
5	33.3		263 / 348	Kämpferol-Derivat
6	33.7		263 / 348	Kämpferol 3-glukosid
7	33.9		254 / 353	Quercetin-Derivat
8	38.7		314	diacylierte Quercetinglukoside + monoacylierte Flavonolglukoside (nur adulte Bäume)
9	40.0		268 / 314	diacylierte Flavonolglukoside
10	40.3		268 / 314	diacylierte Flavonolglukoside
11	37.5	wie PSM	298	Pinosylvin
12	42.5		298	Pinosylvinmethylether (PSM)

3.4.1.2 Acetonitril-Gradient (diacylierte Flavonol-glukoside)

Mit Hilfe des Acetonitril-Gradienten war es, wie oben erwähnt, möglich die diacylierten Verbindungen zu trennen und einzeln zu quantifizieren. In Abb. 3.9 sind Chromatogramme eines Keimnadel-Extrakts (A) und eines Extrakts eines Freilandbaumes (B) dargestellt. Tab. 3.3 zeigt die dazugehörigen DA-Spektren und Substanznamen.

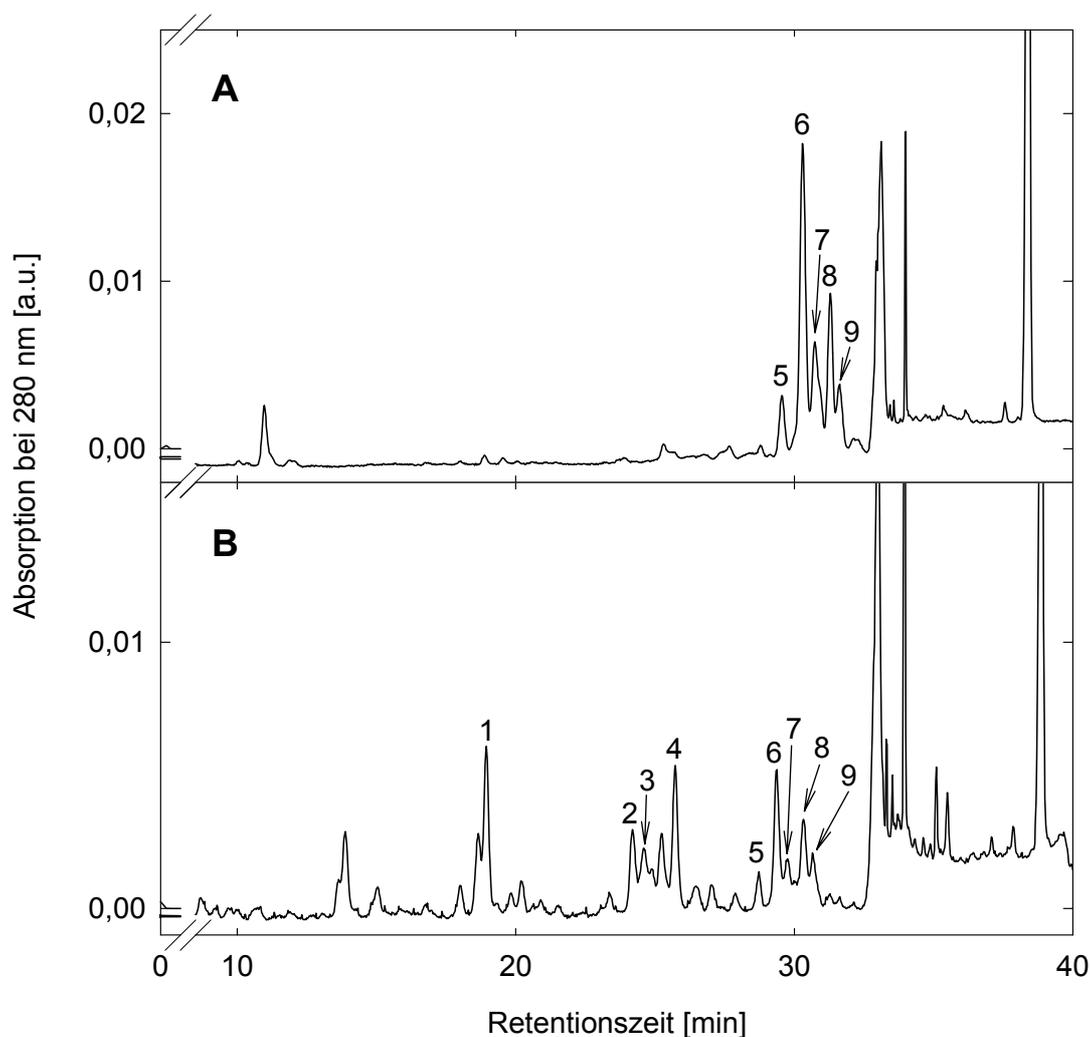


Abb. 3.9: HPLC-Diagramm des Acetonitril-Gradienten der MeOH-löslichen phenolischen Verbindungen eines Primärnadelextrakts von Keimlingen (A) und des Extrakts von Nadeln eines adulten Baumes (B).

Die Nummern beziehen sich auf die Zuordnung von Tab. 3.3.

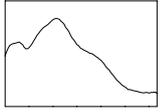
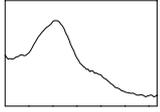
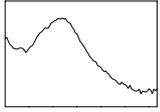
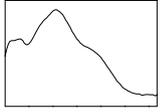
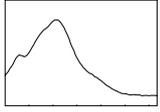
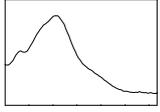
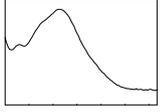
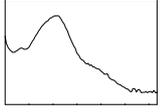
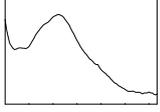
Aus dem Extrakt waren sieben diacylierte Flavonolglykoside sicher zu identifizieren (Peak 2, 3 und 5 bis 9), von denen sechs strukturell bekannt waren. Zwei weitere Peaks konnten anhand des Spektrums monoacylierten Flavonolglykosiden zugeordnet werden (Peak 1 und 4). Auch hier gab es wieder wesentliche Unterschiede zwischen Primärnadeln und Nadeln adulter Bäume. Die monoacylierten Produkte waren im Primärnadelextrakt in zu geringer Menge vorhanden, um quantifiziert werden zu können. Sie wurden aus diesem Grund nicht in

die Auswertung einbezogen. Darüberhinaus kamen im Extrakt von Freilandnadeln mehrere monoacylierte Verbindungen in größerer Menge vor, die teilweise berücksichtigt wurden (Peak 1 und 4).

Die sechs diacylierten Flavonolglukoside, deren Struktur bekannt war, waren als Produkte der HCT's von besonderem Interesse. Sie wurden sowohl bei den Freilanduntersuchungen als auch bei den Sonnensimulatorexperimenten analysiert.

Tab. 3.3: Zuordnung der Peaks von Abb 3.9 mit Retentionszeiten (R_t), Diodenarray-Spektren (DA, 250 - 440 nm) und Substanznamen.

Abkürzungen: glc, glukosid; Q, Quercetin; K, Kämpferol; I, Isorhamnetin.

Peak-Nr.	R_t [min]	DA-Spektrum	Abs.-Max. [nm]	Name
1	18.9		267 / 314	monoacyl. Flavonol 3-glykosid
2	24.1		313	3'',6''-Di-(<i>p</i> -cumaryol)-Q 3-glc
3	24.5		321	3''-(<i>p</i> -Cumaryol),6''-feruloyl-Q 3-glc
4	25.6		267 / 313	monoacyl. Flavonol 3-glykosid
5	28.6		268 / 314	diacyl. Flavonol 3-glykosid
6	29.3		268 / 313	3'',6''-Di-(<i>p</i> -cumaryol)-K 3-glc
7	29.7		268 / 317	3''-(<i>p</i> -Cumaryol),6''-feruloyl-K 3-glc
8	30.3		268 / 315	3'',6''-Di-(<i>p</i> -cumaryol)-I 3-glc
9	30.7		268 / 316	3''-(<i>p</i> -Cumaryol),6''-feruloyl-I 3-glc

3.4.2 Zellwandgebundene phenolische Verbindungen

Mit Hilfe einer alkalischen Hydrolyse ließen sich Methanol-unlösliche phenolische Verbindungen aus der Zellwand freisetzen. Abb. 3.10 zeigt die Bestandteile eines solchen Hydrolysats aus Primärnadeln von Kiefernkeimlingen (A) und den Nadeln von Freilandbäumen (B). In Tab. 3.4 sind die entsprechenden DA-Spektren und Substanznamen dargestellt. In diesem Fall waren die Chromatogramme sehr ähnlich. Es traten zwei Hauptbestandteile auf, *trans*-Cumarsäure (Peak 5) und Kämpferol 3-glukosid (Peak 9). Daneben ließen sich die Peaks nach ihren DA-Spektren bzw. Strukturen in drei Gruppen einteilen, Peak 1 bis 3 bildeten die erste Gruppe mit Substanzen, die ein Absorptionsmaximum zwischen 268 und 277 nm hatten und somit Flavane darstellen. Die Peaks 4 bis 6 waren Hydroxyzimtsäuren, zu denen neben den *cis/trans*-Isomeren von Cumarsäure auch Ferulasäure gehörte. Die dritte Gruppe bestand aus den Peaks 7 bis 10, bei denen es sich um Flavonolglykoside handelte.

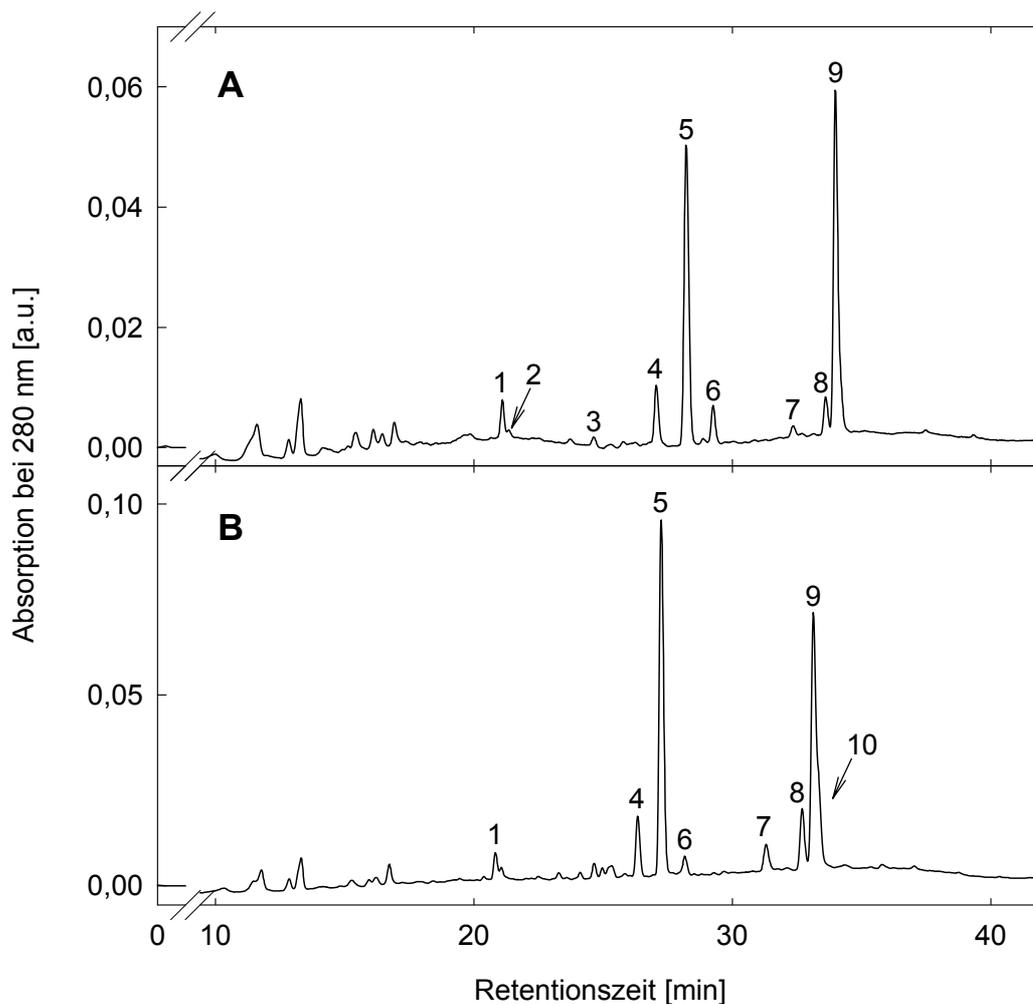
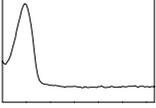
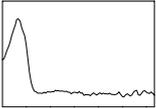
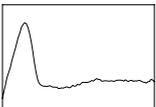
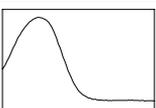
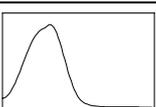
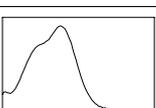
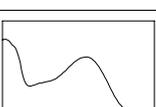
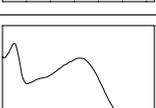
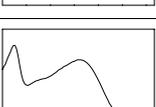
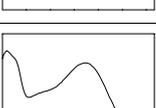


Abb. 3.10: HPLC-Diagramm der zellwandgebundenen phenolischen Verbindungen eines Keimnadelhydrolysats (A) und des Nadelhydrolysats eines adulten Baumes (B). Die Retentionszeiten von B sind gegenüber A um ca. 0,5 min zu kürzerer Zeit hin verschoben.

Tab. 3.4: Zuordnung der Peaks von Abb. 3.10 mit Retentionszeiten, Diodenarray-Spektren (DA, 250 - 440 nm) und Substanzenamen.

Die Retentionszeiten entsprechen Abb. 3.10 A mit Ausnahme von Peak 10 (Abb. 3.10 B). Peak 1 bis 3 lassen sich anhand der Absorptionsmaxima zwischen 268 und 277 nm als Flavane klassifizieren.

Peak-Nr.	R _t [min]	DA-Spektrum	Abs.-Max [nm]	Name
1	21.2		277	Flavan
2	21.4		268	Flavan
3	24.6		277	Flavan
4	26.7		295	<i>cis</i> -Cumarsäure
5	27.7		308	<i>trans</i> -Cumarsäure
6	28.7		296 / 321	Ferulasäure
7	32.0		252 / 353	Quercetinderivat
8	33.2		263 / 346	Kämpferolderivat
9	33.6		263 / 346	Kämpferol 3-glukosid
10	33.4 (B)		254 / 352	Quercetinderivat

3.4.3 Anthocyane

Bei der Untersuchung der Anthocyane wurden zwei Ziele verfolgt. Zuerst war die Frage zu beantworten, ob die Rotfärbung der Hypokotyle von Kiefernkeimlingen in den Sonnensimulatorexperimenten auf eine Akkumulation von Anthocyanen als Reaktion auf eine Starklichtbehandlung oder auf die UV-B-Strahlung zurückzuführen ist. Dazu wurde der Gesamtanthocyanengehalt photometrisch bestimmt (siehe 3.6.2.5). Zweitens sollte die Frage beantwortet werden, ob in Kiefern acylierte Anthocyane vorkommen, die unter Umständen ebenfalls eine Rolle bei dem UV-B-Schutz spielen. Dafür wurden die Anthocyane mit HPLC aufgetrennt und mit entsprechenden Standardsubstanzen verglichen. Als Quelle für Anthocyane wurden weibliche Blütenzapfen gewählt, da diese Anthocyane akkumulieren und somit leicht ausreichend Material für eine Analyse gewonnen werden konnte. Abb. 3.11 zeigt ein HPLC-Chromatogramm der extrahierten Anthocyane (A) und darunter ein Chromatogramm nachdem der Anthocyanextrakt sauer hydrolysiert wurde (B). Durch die Hydrolyse wurden die Glykoside gespalten und die Aglyka freigesetzt. Dadurch wurde die Identifizierung erleichtert, da es nur eine relativ begrenzte Anzahl von Aglyka (Anthocyanidinen) gibt, diese aber durch Zuckerreste und Acylierungen sehr variabel modifiziert werden können (siehe z. B. Tatsuzawa *et al.* 2000, hier wird ein Anthocyan vorgestellt, das mit 4 Zuckerresten und zwei Hydroxyzimtsäuren modifiziert ist).

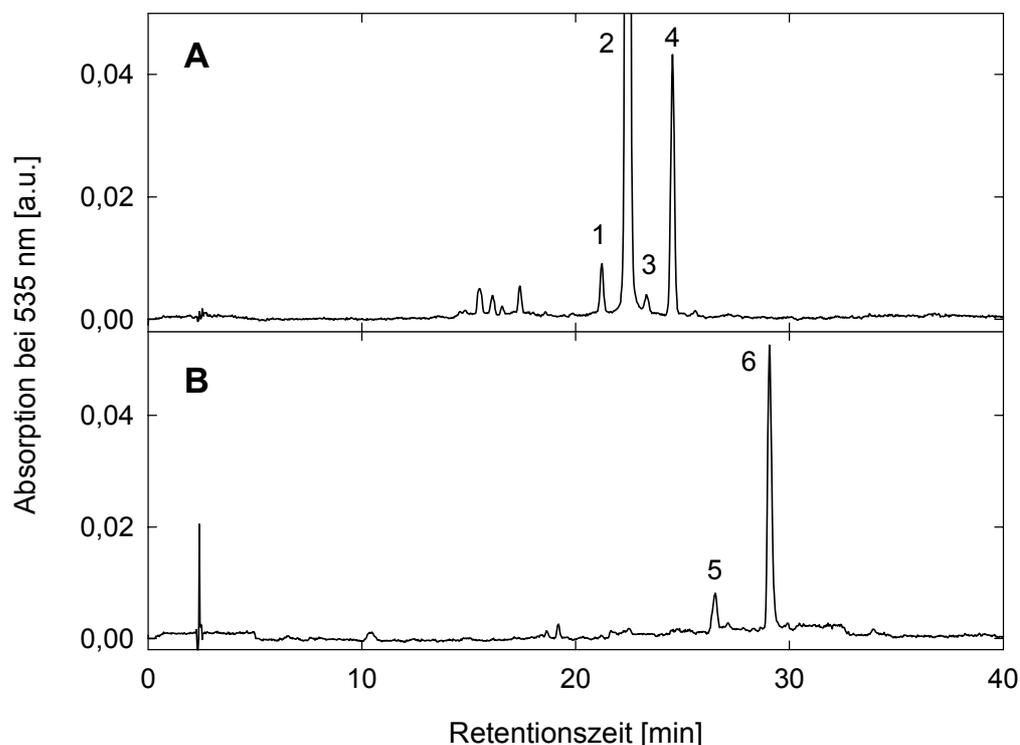


Abb. 3.11: HPLC-Diagramm eines Anthocyan-Extrakts von weibl. Kiefernblütenzapfen (A) und nach saurer Hydrolyse (B).

Für die Zuordnung der nummerierten Peaks siehe Tab. 3.5.

Auf den ersten Blick fällt auf, dass im Blütenextrakt nur wenig Anthocyanpeaks vorkamen (Abb. 3.11 A, Peak 1 bis 4), die Retentionszeiten zwischen 20 und 25 min hatten. Es konnten keine Peaks bei längeren Retentionszeiten beobachtet werden, wie es für acylierte Anthocyane zu erwarten wäre, da monoacylierte Standardverbindungen Retentionszeiten zwischen 23 und 29 min hatten. Neben einem Hauptprodukt (Peak 2, Anteil ca. 86 %) kommt ein zweites Anthocyan in geringerer Menge vor (Peak 4, ca. 8 %). Zwei weitere kleine Peaks wiesen ebenfalls Anthocyanenspektren auf, konnten aber aufgrund der geringen Menge nicht eindeutig zugeordnet werden.

Mit Hilfe von Koinjektionen wurde festgestellt, dass der Hauptpeak (2) sowohl mit Cyanidin 3-glukosid als auch mit Päonidin 3-glukosid übereinstimmte (Abb. 3.12). Für die anderen Peaks wurde keine Entsprechung mit einem der getesteten Standards (Pelargonidin 3-glc, Di- und Triglykoside von Cyanidin) gefunden. Auch die DA-Spektren von Cyanidin 3-glukosid und Päonidin 3-glukosid waren identisch, die Unterschiede zum Spektrum von Peak 2 gering. Aufgrund dieser Übereinstimmung konnte nicht entschieden werden, ob Peak 2 Cyanidin 3-glukosid oder Päonidin 3-glukosid war.

Nach saurer Hydrolyse konnte mit Hilfe der Aglyka festgestellt werden, dass der Hauptpeak (Peak 6) des Hydrolysats bei 29.1 Minuten eluierte und daher mit Cyanidin (Abb. 3.13 A), nicht aber mit Päonidin identisch war. Der zweite Peak des Hydrolysats hatte die gleiche Retentionszeit wie Delphinidin (Abb. 3.13 B).

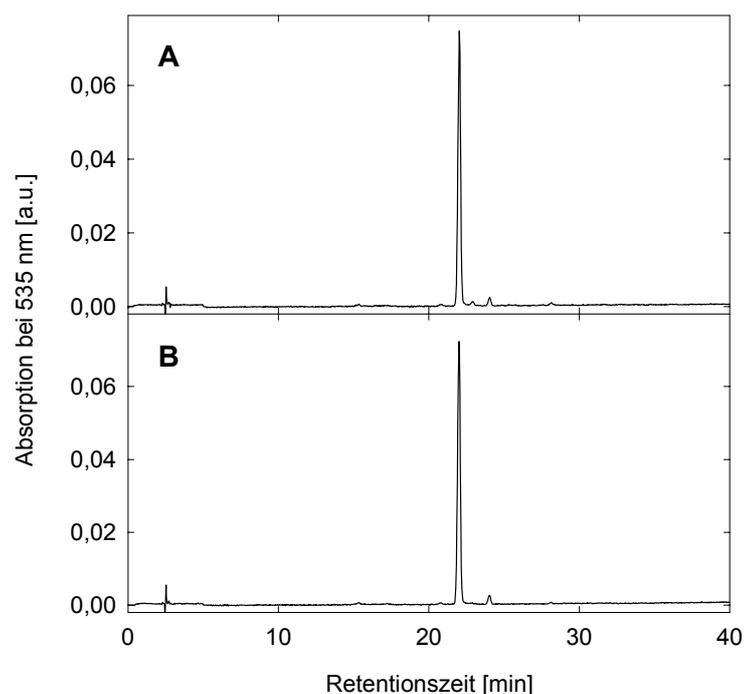


Abb. 3.12: HPLC-Chromatogramm einer Koinjektion eines Extrakts von weiblichen Kiefernblüten mit Cyanidin 3-glukosid (A) und Päonidin 3-glukosid (B).

Beide Referenzsubstanzen hatten die gleiche Retentionszeit wie der Hauptpeak 1.

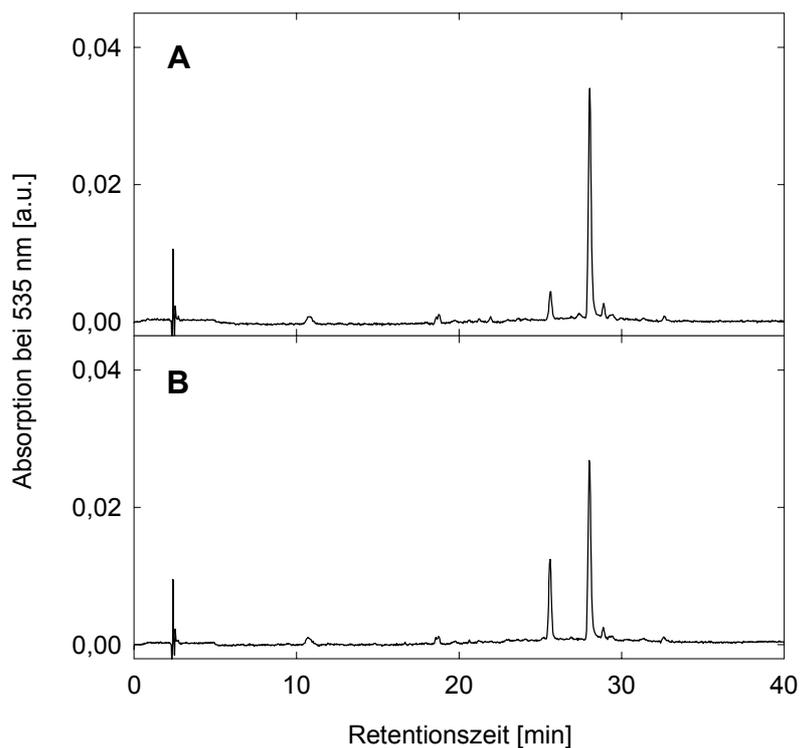
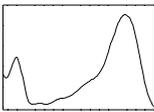
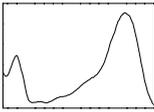
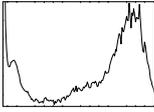
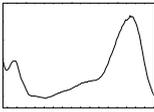


Abb. 3.13: HPLC-Diagramm einer Koinjektion eines hydrolysierten Blütenextrakts mit Cyanidin (A) und Delphinidin (B).

Cyanidin kochromatographierte mit dem rechten Peak (Peak 6), Delphinidin mit dem linken Peak (Peak 5).

Aufgrund dieser Ergebnisse ergab sich das in Tab. 3.5 dargestellte Bild.

Tab. 3.5: Ergebnis der Anthocyan-Analyse in Kiefernblütenzapfen.

Peak-Nr.	Rt [min]	DA-Spektrum 250 - 580 nm	Abs.-Max. [nm]	Koinjektion	Anteil (%)
Blütenextrakt					
1	21.2	---	---	---	1
2	22.4		280 / 516	Cyanidin 3glc/ Päonidin 3glc	86
3	23.3	---	---	---	0.5
4	24.5		280 / 516	---	8
nach saurer Hydrolyse					
5	26.5		---	Delphinidin	10
6	29.1		276 / 528	Cyanidin	71

Anhand der DA-Spektren konnte gezeigt werden, dass in weiblichen Blütenzapfen keine mit Hydroxyzimtsäuren acylierten Anthocyane vorhanden waren. Die Koinjektionen zusammen mit den Ergebnissen der sauren Hydrolyse zeigten, dass Cyanidin 3-glukosid der Hauptmetabolit (Abb. 3.11 A, Peak 2) mit einem Anteil von ca. 86 % war. Bei dem nächst größeren Anthocyanpeak (Peak 4) könnte es sich, dem Ergebnis der Hydrolyse nach, um ein Delphininderivat handeln. Allerdings sollte Delphinidin 3-glukosid polarer sein als Cyanidin 3-glukosid, Peak 4 ist aber unpolarer als Peak 2. Die Frage nach dem Substitutionsmuster des potentiellen Delphinidderivats bleibt also offen.

Die Anthocyane des Hypocotyls zeigten eine ähnliche Zusammensetzung wie die der Blüten (Abb. 3.14). Hier war ebenfalls Cyanidin 3-glukosid das Hauptprodukt und das im Blütenextrakt zweithäufigste Anthocyan (Peak 4) kam, wenn auch in geringerer Menge, vor. Ein im Blütenextrakt nur wenig vorhandener Metabolit hatte aber im Hypokotyl einen wesentlich größeren Anteil (Peak 1) und es kam noch ein zusätzliches Anthocyan in geringer Menge vor (Peak 1a). Die DA-Spektren der Peaks 1a und 1 des Hypokotylextrakts (nicht dargestellt) gaben keinen Hinweis auf eine mögliche Acylierung.

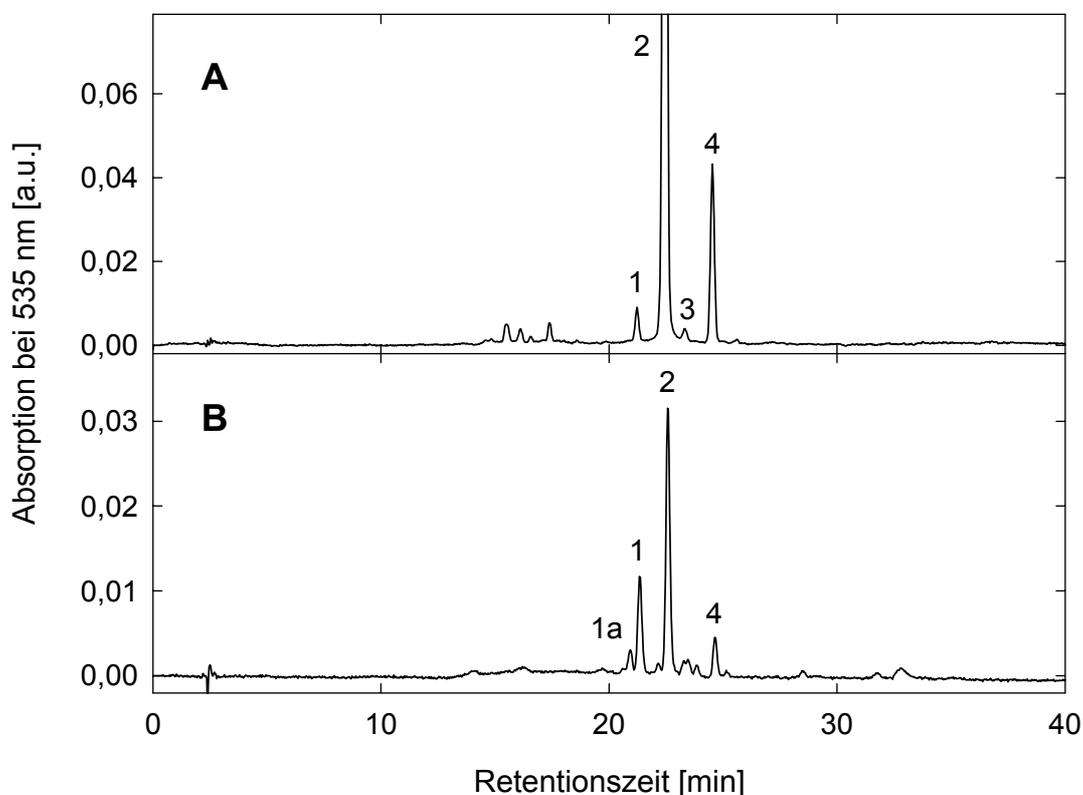


Abb. 3.14: Vergleich der HPLC-Diagramme eines Blütenzapfenextrakts (A) mit einem Extrakt aus Hypokotylen (B).

Für die Zuordnung der Peaks siehe Tab. 3.5.

3.5 Freilandbäume

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Enzymaktivitäts- und Inhaltsstoff-Messungen der adulten Bäume im Freiland gezeigt. Von zwei Bäumen auf dem GSF-Gelände wurden in regelmäßigen Abständen (während der Vegetationsperiode wöchentlich, außerhalb der Vegetationsperiode zwei- bis vierwöchentlich) Proben genommen, von denen die Enzymaktivitäten der 3''- und der 6''-HCT sowie der Gehalt der Methanol-löslichen und zellwandgebundenen phenolischen Inhaltsstoffe jeweils mit Doppelbestimmungen gemessen wurden. Diese Untersuchungen dienten der Aufklärung des UV-B-Schutzes durch diacylierte Verbindungen und andere phenolische Inhaltsstoffe im Freiland unter natürlichen Bedingungen, da über den Verlauf von Biosynthese und Akkumulation dieser Verbindungen bei adulten Bäumen während der Nadelentwicklung wenig bekannt ist (siehe 1.1.3 und 1.3.2).

Die Skalierung der Abszisse der Grafiken folgt den Monaten des Jahres, beginnend mit dem 1. Januar des Jahres des Austriebs der jeweiligen Nadeln (= 0). Dadurch liegen die drei verschiedenen untersuchten Nadeljahrgänge (1997, 1998, 1999) übereinander. Durch diese Art der Auftragung wird die Abhängigkeit der untersuchten Faktoren vom Blattalter bzw. dem Entwicklungsstadium deutlich erkennbar.

3.5.1 Verlauf der Aktivitäten der HCT's im Jahresgang

Die Aktivitätsmessungen erfolgten bei den Freilandernnten in den Jahren 1997 und 1998 mit Isorhamnetin 3-glukosid als Akzeptorsubstrat, da das Enzymtestprodukt 3''-(*p*-Cumaroyl)-kämpferol 3-glukosid bei Proben von Freilandbäumen wegen verunreinigender Peaks im HPLC-Chromatogramm nicht quantifizierbar war. Das entsprechende Isorhamnetin-Derivat war hingegen wegen der verschobenen Retentionszeit als einzelner, getrennter Peak auswertbar. Bei den Messungen im Jahr 1999 wurde Kämpferol 3-glukosid als Substrat für die 6''-HCT eingesetzt, da hier Tilirosid als Substrat für die 3''-HCT verwendet werden sollte. Um die Aktivität von 3''-HCT und 6''-HCT besser miteinander vergleichen zu können, wurden deswegen für beide Enzyme Kämpferol-Derivate gewählt.

3.5.1.1 6''-HCT

Die Aktivität der 6''-HCT konnte nur im jeweils ersten Jahr der Nadelentwicklung während des Austriebs und der frühen Entwicklung nachgewiesen werden (Abb. 3.15). In sehr jungen, gerade die Knospenhülle durchbrechenden Nadeln war die Aktivität gering, stieg dann aber während der Entwicklung schnell an. Die höchste Aktivität war im Juni mit ca. 20 $\mu\text{kat kg}^{-1}$

erreicht, fiel dann stark ab und im Juli / August konnte keine Aktivität mehr festgestellt werden. Ebenso war in den zwei- und dreijährigen Nadeln keine Aktivität messbar.

Beide untersuchten Bäume verhielten sich sehr ähnlich, ein Unterschied bestand darin, dass die Aktivität des Baumes A später ihr Maximum erreichte und länger nachweisbar war. Dies deutet auf eine bei Baum A vermutlich standortbedingt um ein bis zwei Wochen verzögerte Entwicklung hin. Baum B war mehr südlich exponiert als Baum A, der darüber hinaus durch Nachbarbäume stärker beschattet wurde.

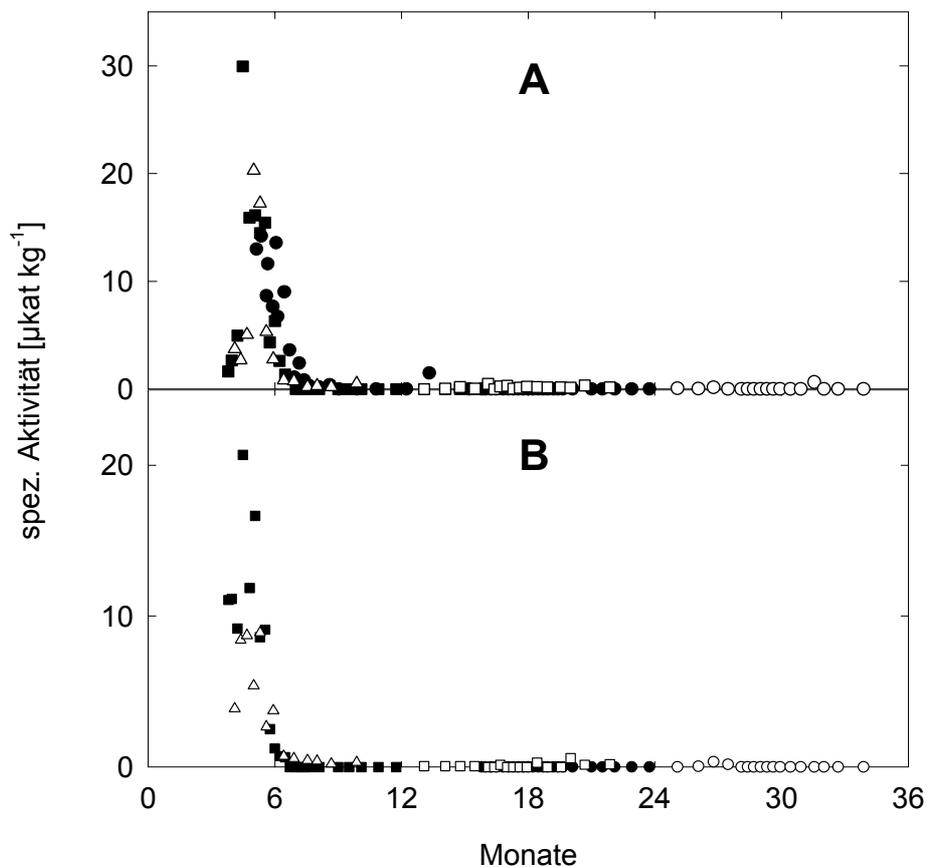


Abb. 3.15: Verlauf der Enzymaktivität der 6''-HCT in Baum A (A) und Baum B (B).

(●/○ Nadeljahrgang 1997, ■/□ NJ 98, ▲/△ NJ 99; offene Symbole: K3G als Substrat, geschlossene Symbole: I3G als Substrat.). Es wird deutlich, dass die 6''-HCT nur während des Austriebs der Nadeln aktiv ist.

3.5.1.2 3''-HCT

Der Aktivitätsverlauf der 3''-HCT unterschied sich von dem der 6''-HCT dadurch, dass die Aktivität der 3''-HCT während des gesamten Jahres messbar war (Abb. 3.16). Außerdem konnte sie im Winter und während der Vegetationsperioden im zweiten und dritten Jahr nachgewiesen werden, wobei es jeweils im Frühjahr einen Anstieg der Aktivität gab, im zweiten

Jahr stärker als im dritten. Die Enzymaktivität verringerte sich jedoch während des Beobachtungszeitraums von Jahr zu Jahr.

Das Maximum von über $20 \mu\text{kat kg}^{-1}$ im ersten Jahr wurde später als bei der 6''-HCT erreicht (Juli / August statt Juni), im zweiten und dritten Jahr war es zu Beginn der Vegetationsperiode (April / Mai), also früher als im ersten Jahr, zu beobachten. Die beiden Untersuchungsbäume verhielten sich ähnlich, allerdings war auch hier die Entwicklung von Baum A wieder etwas verzögert.

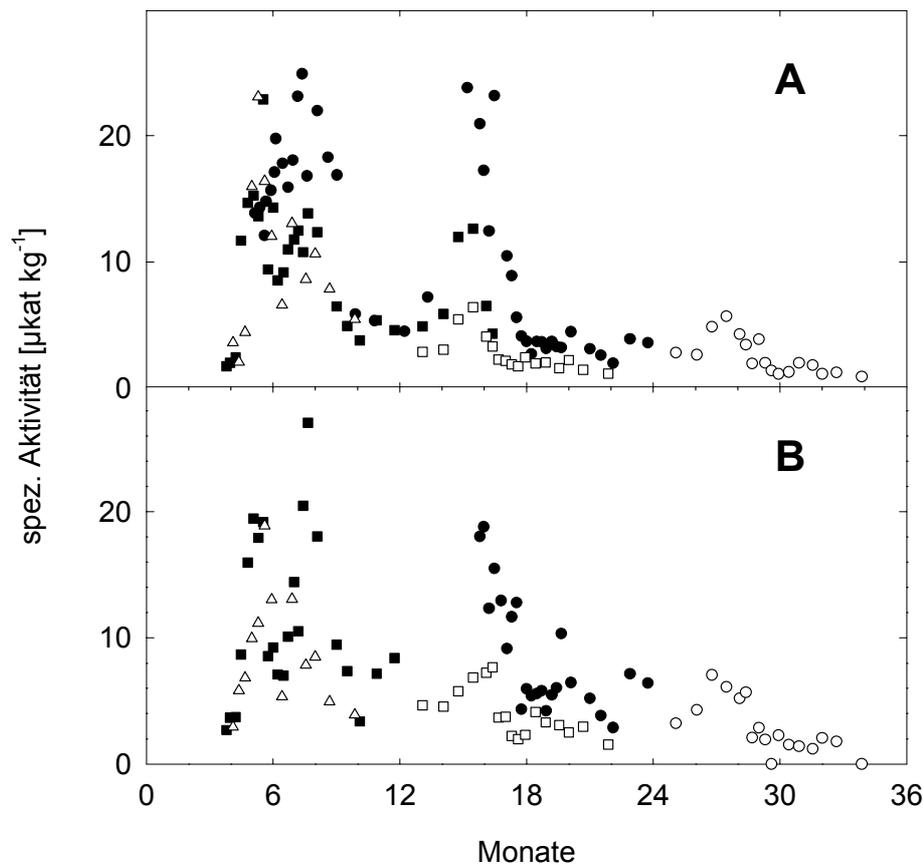


Abb. 3.16: Verlauf der Enzymaktivität der 3''-HCT in Baum A (A) und Baum B (B).

(●/○ Nadeljahrgang 1997, ■/□ NJ 98, ▲/△ NJ 99; offene Symbole: K3G als Substrat, geschlossene Symbole: I3G als Substrat).

In Tabelle 3.6 sind die Maxima der jährlichen Aktivitäten der beiden HCT's gegenüber gestellt. Es wird deutlich, dass die 6''-HCT die maximale Aktivität im Mai / Juni erreicht, während die 3''-HCT im ersten Jahr die maximale Aktivität später im Jahr, nämlich Juni bis August, im zweiten und dritten Jahr dann früher, April / Mai, erreicht.

Tab. 3.6: Aktivitätsmaxima der HCT's in den untersuchten Jahren.

Baum	NJ	6''-HCT			3''-HCT		
		97	98	99	97	98	99
A	97	6-8	-		7/8	4	4
	98	-	5		-	6/8	4
	99	-	-	5/6	-	-	6
B	97	-	-	-	-	4	4
	98	-	5	-	-	6/8	5
	99	-	-	5/6	-	-	6

Zur genaueren Betrachtung des Jahresverlaufs der 3''-HCT ist in Abb. 3.17 das Ergebnis der Aktivitätsmessung des Nadeljahrgangs 1998 im Jahr 1998 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Aktivität erst einige Wochen nach Beginn des Nadelsaustriebs ansteigt und auch außerhalb der Vegetationsperiode im Winter nachgewiesen werden kann. Daneben scheint es einen biphasischen Verlauf mit zwei Maxima im Juni und im August zu geben, der zwar nicht in allen Jahren gemessen werden konnte, aber bei Baum A im ersten Jahr der Nadeljahrgänge 1998 und 1999, bei Baum B im ersten Jahr von NJ 1998 und 1999 und im zweiten Jahr von NJ 1997 und 1998 zu erkennen war.

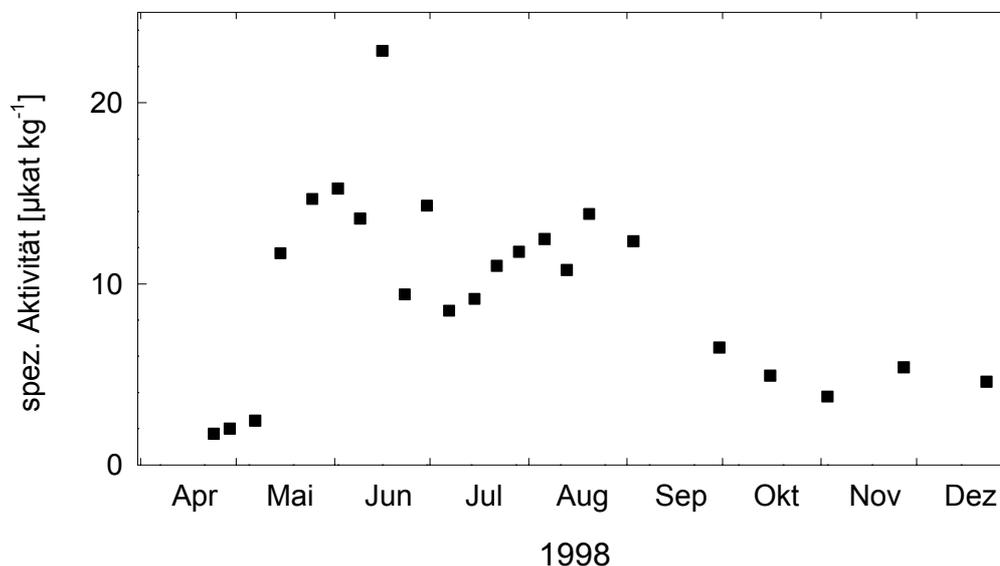


Abb. 3.17: Verlauf der Aktivität der 3''-HCT im aktuellen Nadeljahrgang von Baum A im Jahr 1998 (Substrat: I3G).

3.5.2 Verlauf des Gehalts phenolischer Inhaltsstoffe im Jahresgang

Die Nummerierung der in den folgenden Abbildungen gezeigten Grafiken entspricht der Nummerierung der Peaks der Chromatogramme in Abschnitt 3.4. Die Grafiken sind nach Substanzklassen geordnet.

3.5.2.1 Lösliche phenolische Inhaltsstoffe (Methanol-Gradient)

In den nächsten beiden Abbildungen sind die Konzentrationen der Methanol-löslichen Inhaltsstoffe im Jahresgang gezeigt. Entsprechend den vorangegangenen Darstellungen der Enzymaktivitäten beginnt die Abszisse mit dem Jahresbeginn des Nadelaustriebs.

In Abb. 3.18 sind die zwei analysierten Hydroxyzimtsäure-Derivate, das Flavan Catechin und die beiden Stilbene Pinosylvin und Pinosylvinmethylether dargestellt. Es fällt auf, dass die sich die Hydroxyzimtsäure-Derivate 1 und 3 gegensätzlich verhielten, Peak 1 zeigte eine starke Abnahme während der Nadelentwicklung von ca. 4 bzw. 8 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG auf ca. 1 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG und anschließend einen konstanten Gehalt. Peak 3 akkumulierte in den ersten Monaten der Nadelentwicklung und erreichte gegen Ende der ersten Vegetationsperiode ein Maximum von ca. 0.7 bis 1.2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG und zeigte im zweiten Jahr einen konstanten Gehalt. Catechin dagegen akkumulierte relativ spät während der ersten Vegetationsperiode, erreichte am Ende des ersten Jahres ca. 2 bis 4 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG und nahm dann im weiteren Verlauf noch leicht zu. Bei Baum B war beim Nadeljahrgang 98 auch in ganz jungen Nadeln Catechin nachweisbar, das dann abnahm und ab Juni wieder zunahm.

Die Stilbene kamen in relativ geringer Konzentration vor, sie überstiegen kaum 0.2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG. Der Pinosylvinmethylether (PSM, Nr. 12) zeigte einen Jahresverlauf, der gänzlich gegensätzlich zu den Flavanen war. Während der Austriebs und der Entwicklung im ersten Jahr war kein PSM nachweisbar, erst am Ende der Vegetationsperiode stieg der Gehalt an und erreichte ein Maximum im Winter (0.2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG, Januar / Februar). Während der zweiten Vegetationsperiode nahm der Gehalt wieder bis unter die Nachweisgrenze ab, um im zweiten Winter wiederum anzusteigen. Der Gehalt von Pinosylvin (PS, Nr. 11) war geringer als der von PSM, in Baum B war PS erst im zweiten Jahr nachweisbar.

Der Vergleich zwischen den Bäumen zeigt, dass Catechin in Baum B in einer höheren Konzentration vorkam, die Stilbene dagegen in beiden Bäumen ähnliche, sehr niedrige Gehalte erreichten.

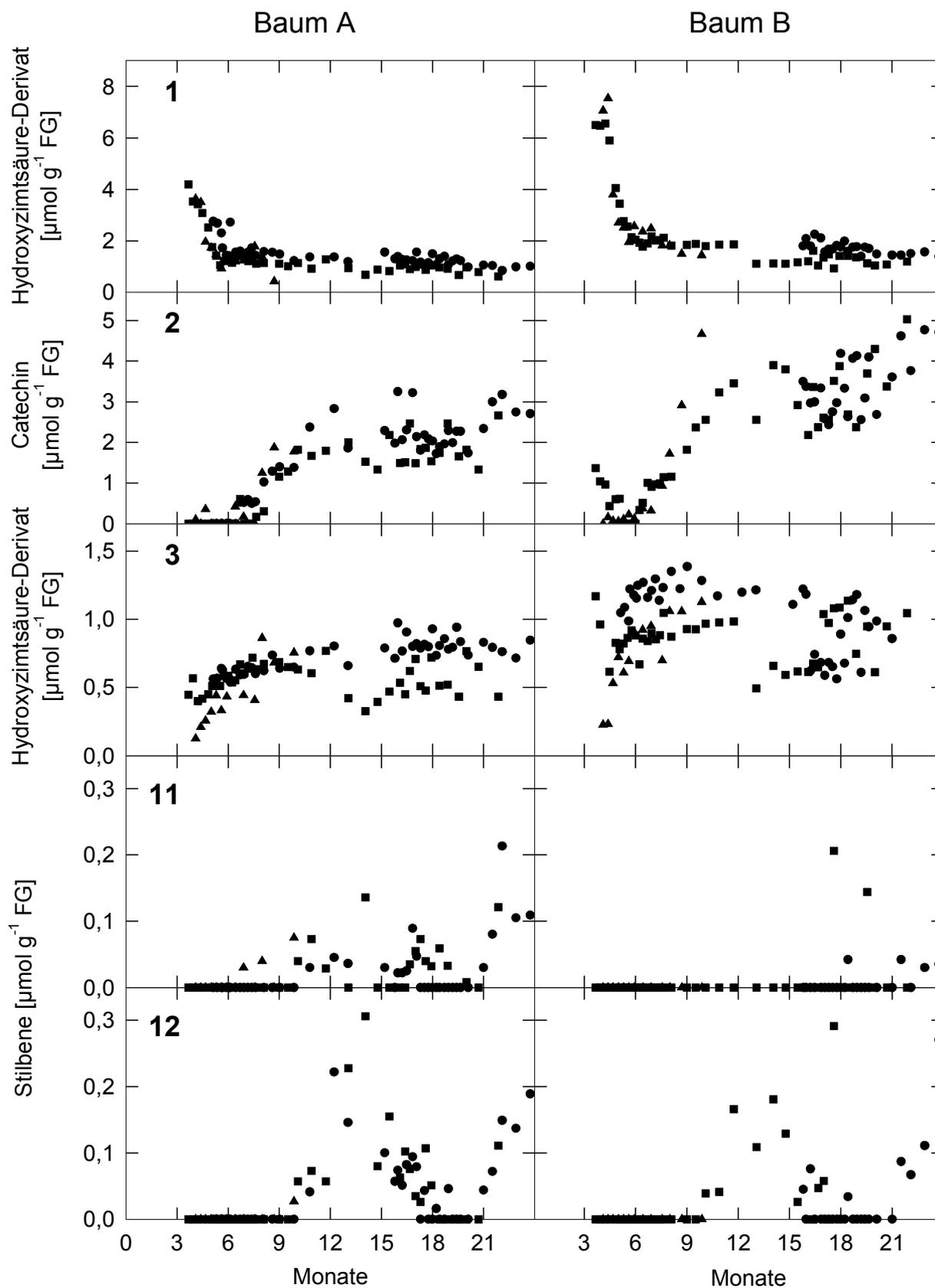


Abb. 3.18: Verlauf des Gehalts von Hydroxyzimtsäure-Derivaten (1, 3), Catechin (2) und Stilbene (11 und 12).

2: Catechin, 11: Pinosylvin, 12: Pinosylvinmethylether.

● Nadeljahrgang 1997, ■ NJ 98, ▲ NJ 99; der Gehalt der Peaks 1 und 3 ist in Catechinäquivalenten pro g FG angegeben, da keine Referenzsubstanzen zur Verfügung standen.

In Abb. 3.19 sind der Verlauf der nichtacylierten und diacylierten Flavonolglykoside im Jahresgang dargestellt. Dabei zeigte der Verlauf der nichtacylierten Flavonolglykoside ein interessantes Verhalten. Bei beiden Substanzen, dem Quercetin-Derivat 4a und dem Kämpferol-Derivat 5 war zu Beginn des Nadelaustriebs ein schneller Anstieg mit einem ebenso schnellen Abfall zu erkennen. Vor allem bei der Verbindung 5 bei Baum B war dieses Verhalten deutlich sichtbar. Diese Verbindung erreichte ein Maximum von ca. $1 \mu\text{mol g}^{-1}$ FG und fiel dann um 75 % ab. Nach einem Minimum im ersten Sommer akkumulierten die Flavonolglykoside über den Untersuchungszeitraum, wobei der Gehalt von Verbindung 4a am Ende des zweiten Jahres ungefähr viermal höher war als der von Verbindung 5.

Die acylierten Flavonolglukoside 9 und 10 zeigten ebenfalls einen schnellen Anstieg während der frühen Nadelentwicklung. Das Maximum wurde im Juni mit 3.5 bis $4 \mu\text{mol g}^{-1}$ FG erreicht. Der Anstieg korrelierte mit der höchsten Aktivität der HCT's. Nach Erreichen des Maximums nahm der Gehalt in der ersten Vegetationsperiode erst schnell, dann langsamer auf 1 bis $1.5 \mu\text{mol g}^{-1}$ FG ab. Auch im zweiten Jahr wurde der Gehalt geringer, sodass am Ende des zweiten Jahres nur ein Viertel des Maximalwertes gemessen wurde (unter $1 \mu\text{mol g}^{-1}$ FG).

Peak 8, der aus den diacylierten Quercetinglukosiden und monoacylierten Produkten bestand, erreichte erst am Ende des Sommers des ersten Jahres ein Maximum, das aber wesentlich geringer ausfiel als das von 9 und 10. Die Maximalwerte von 8 erreichten ca. 10 % des Maximalwertes von 9/10 bei Baum A und ca. 20 % bei Baum B. Während des Nadelaustriebs waren diese Verbindungen nicht nachweisbar.

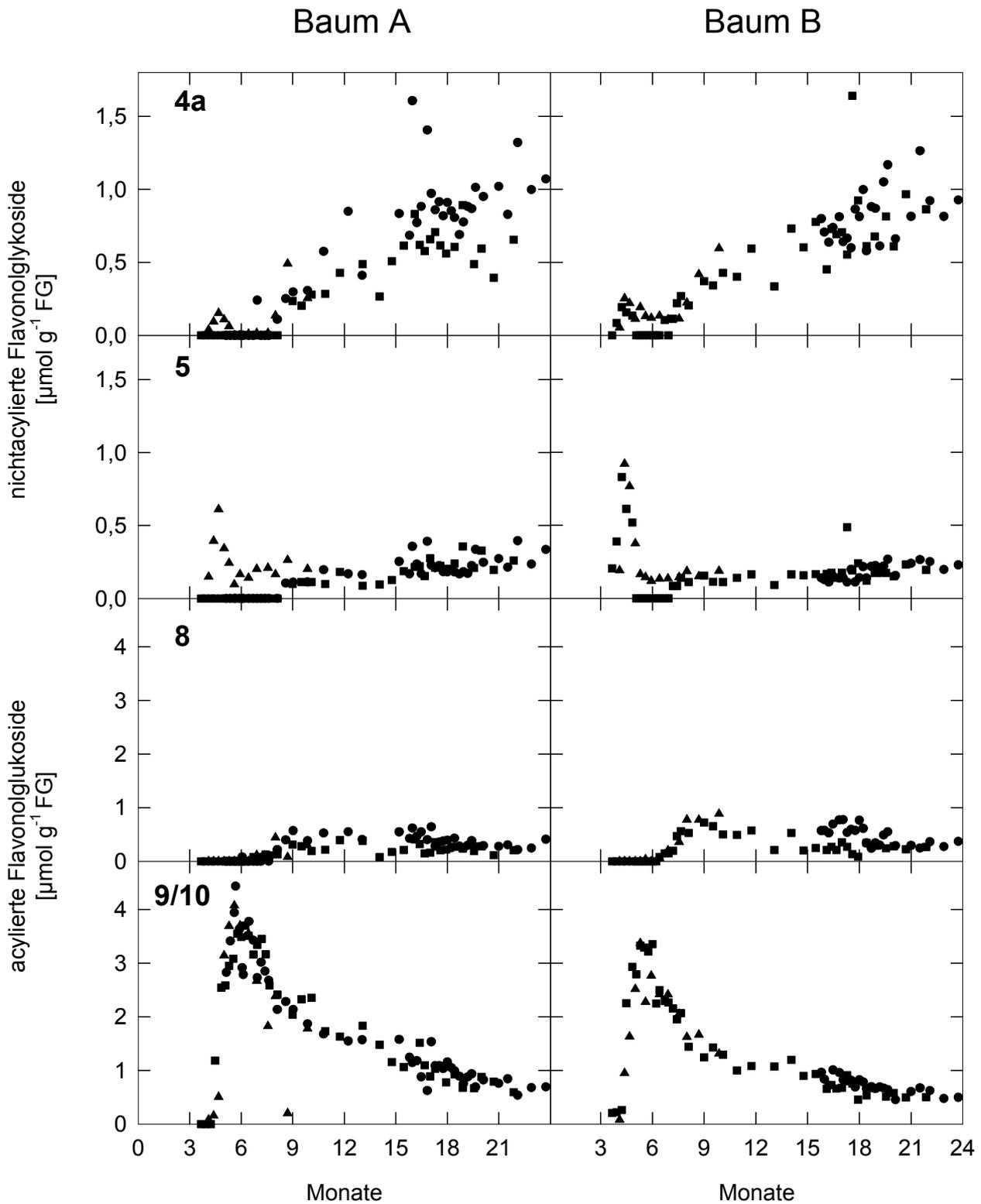


Abb. 3.19: Verlauf des Gehalts der nichtacylierten (4 und 5) und acylierten Flavonolglykoside (8 und 9/10).

4a: Quercetin-Derivat, **5:** Kämpferol-Derivat, **8:** diacylierte Quercetinglukoside und monoacylierte Flavonolglykoside, **9/10:** diacylierte Flavonolglykoside.

● Nadeljahrgang 1997, ■ NJ 98, ▲ NJ 99, die Diagramme der nichtacylierten und der acylierten Flavonolglykoside sind jeweils gleich skaliert.

3.5.2.2 *Acylierte Flavonolglukoside (Acetonitril-Gradient)*

Mit Hilfe eines Acetonitril-Gradienten wurden die acylierten Flavonolglukoside mittels HPLC einzeln quantifiziert (Abb. 3.20 und 3.21). Neben zwei monoacylierten Metaboliten wurden die bekannten diacylierten Derivate von Quercetin-, Kämpferol- und Isorhamnetin 3-glukosid analysiert. Daneben wurde auch noch ein unbekanntes diacyliertes Produkt erfasst.

Die Verläufe der monoacylierten Produkte (1 und 4) und der diacylierten Quercetin-Derivate (2 und 3) zeigten das Bild, das sich auch schon in der summarischen Betrachtung mit Hilfe des Methanol-Gradienten angedeutet hatte. In der frühen Phase der Nadelentwicklung waren diese Metabolite nicht nachweisbar, erst im Juli/August des ersten Jahres stieg der Gehalt auf 0.1 bis 0.2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG an. Im Winter und während des zweiten Jahres nahmen die Konzentrationen jedoch wieder geringfügig ab. Insgesamt waren die gemessenen Konzentrationen dieser vier Verbindungen gering im Vergleich zu den anderen diacylierten Metaboliten (siehe unten). Außer bei Verbindung 3 waren die Gehalte dieser Metabolite bei Baum B größer. Der Vergleich der beiden Quercetin-Derivate 2 (mit Cumarsäure diacyliert) und 3 (mit Ferula- und Cumarsäure acyliert) zeigte keinen Unterschied. Beide Substanzen kamen etwa in gleicher Menge vor.

Die anderen diacylierten Verbindungen (5, Abb. 3.20 und 6 bis 9, Abb. 3.21) zeigten im Einzelnen den Verlauf der Gesamtsumme der Verbindungen (9/10, Abb. 3.19). Bei den Kämpferol-Verbindungen erreichte das homoacylierte Produkt 6 bei Baum A fast den zehnfachen Wert des heteroacylierten Produkts 7, bei Baum B war dieser Unterschied etwas geringer. Bei den Isorhamnetin-Derivaten war das Verhältnis umgekehrt, hier war das heteroacylierte Produkt 9 stärker vertreten, es erreichte aber bei Baum A nur ungefähr die doppelte Menge des homoacylierten Produkts 8. Bei Baum B kamen diese beiden Metabolite etwa in gleicher Menge vor.

Bei Baum B zeigten sich aber beim Vergleich der einzelnen Nadeljahrgänge untereinander wesentliche Unterschiede. Die Peaks 7 und 8 erreichten beim Nadeljahrgang 1999 ungefähr doppelt so hohe Werte wie bei den beiden anderen Jahrgängen, Peak 9 hatte dagegen beim Nadeljahrgang 1999 einen geringeren Gehalt. Der Vergleich des homoacylierten Produkts 8 mit dem heteroacylierten Produkt 9 zeigt, dass es bei einem Baum jährliche Unterschiede gibt, ob an 6''-Position der Anteil von Ferula- oder Cumarsäure überwiegt. Hier spielt offenbar für die Verteilung der Substanzen die Aktivität von Methyltransferasen eine Rolle.

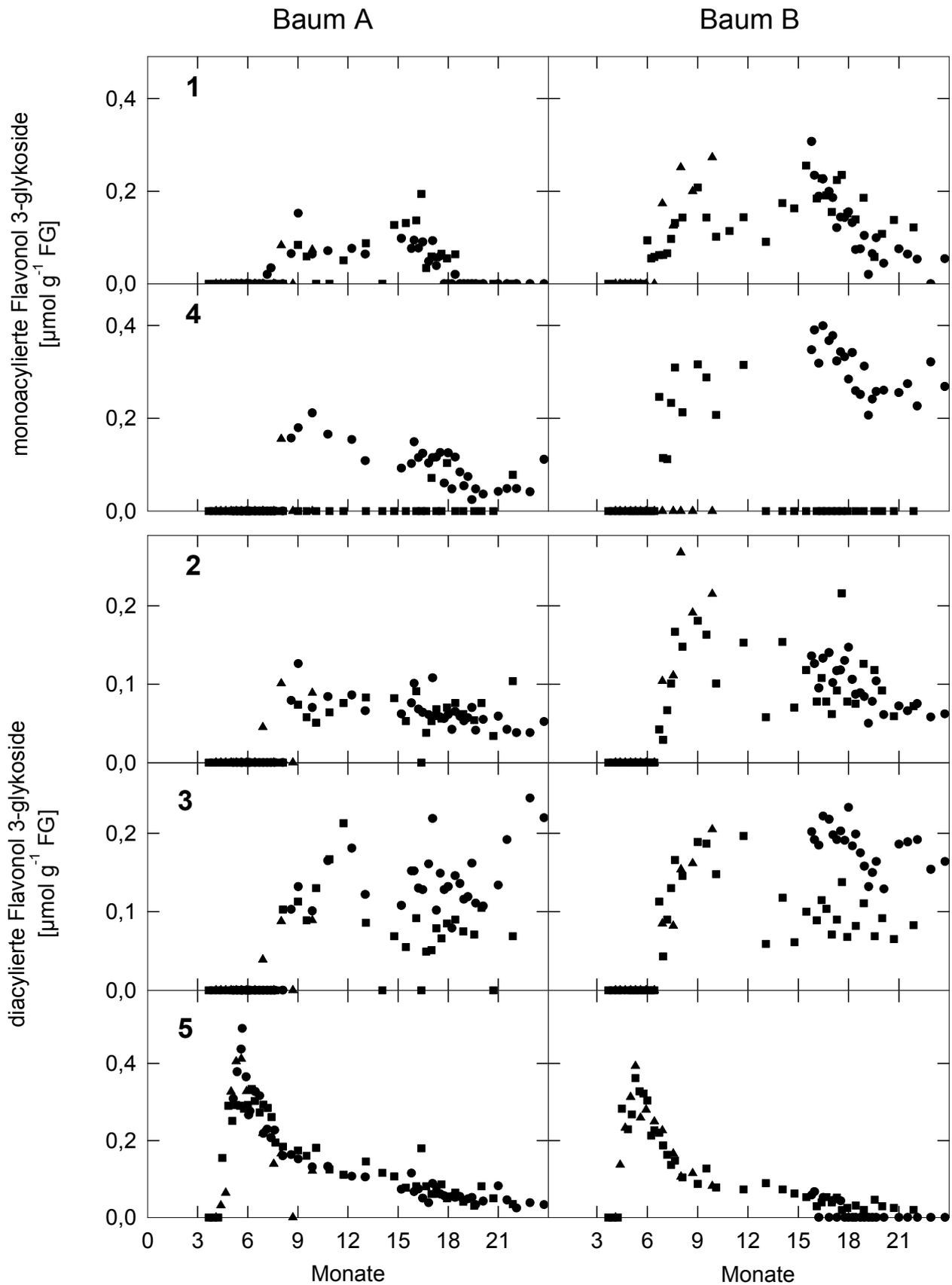


Abb. 3.20: Verlauf des Gehalts mono- (1 und 4) und diacylierter Flavonolglykoside (2, 3 und 5).
 2: 3''-6''-Di-(p-cumaroyl)-quercetin 3-glc, 3: 3''-(p-Cumaroyl),6''-feruloyl-quercetin 3-glc,
 5: nicht identifiziertes diacyliertes Flavonolglykosid.
 ● Nadeljahrgang 1997, ■ NJ 98, ▲ NJ 99.

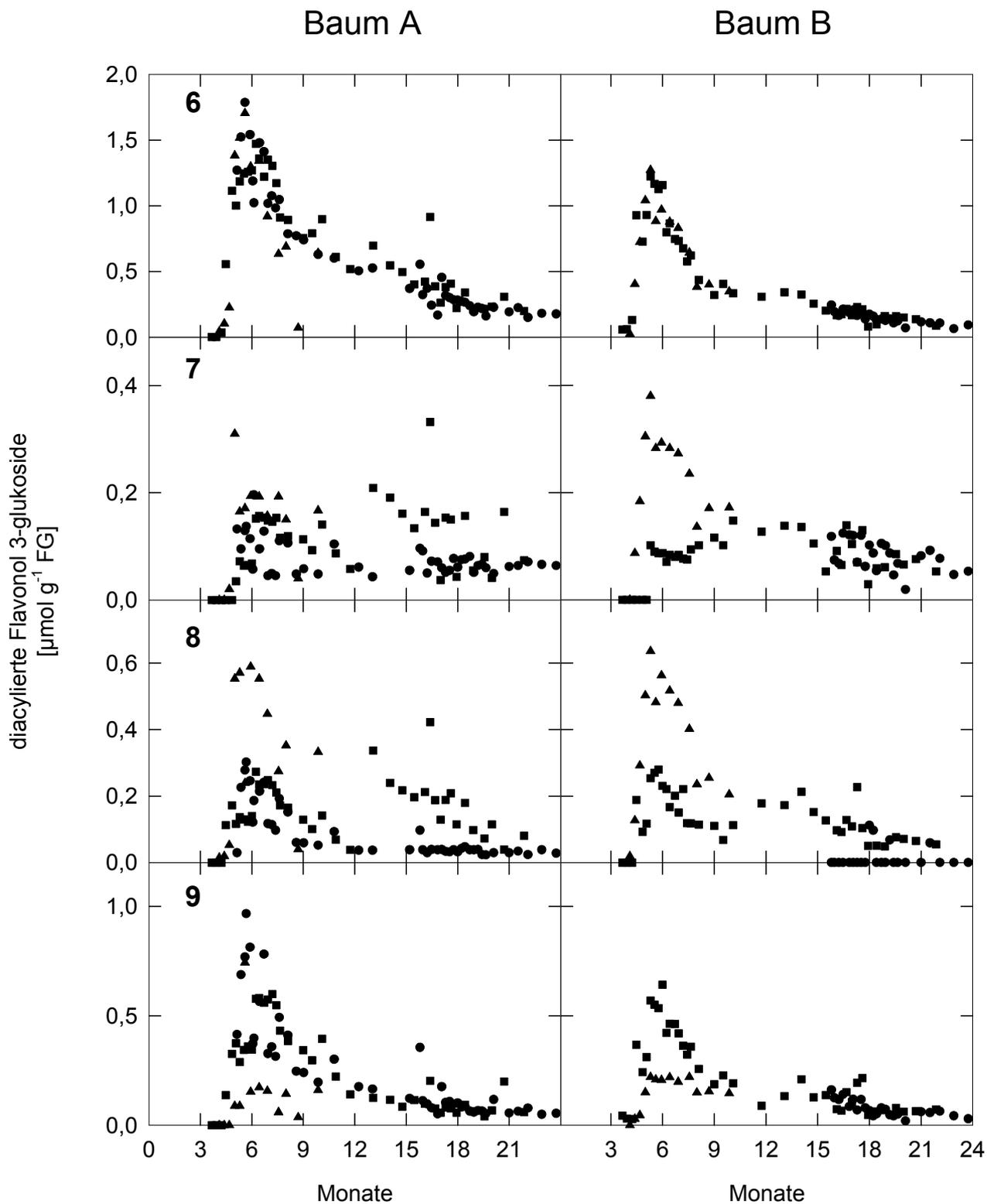


Abb. 3.21: Verlauf des Gehalts diacylierter Flavonolglukoside.

6: 3''-6''-Di-(p-cumaroyl)-kämpferol 3-glc, 7: 3''-(p-Cumaroyl),6''-feruloyl-kämpferol 3-glc,

8: 3''-6''-Di-(p-cumaroyl)-isorhamnetin 3-glc, 9: 3''-(p-Cumaroyl),6''-feruloyl-isorhamnetin 3-glc.

● Nadeljahrgang 1997, ■ NJ 98, ▲ NJ 99.

3.5.2.3 Zellwandgebundene phenolische Inhaltsstoffe

Von den mittels alkalischer Hydrolyse freigesetzten zellwandgebundenen Inhaltsstoffen wurden in den Freilanduntersuchungen ein Flavan (1, Abb. 3.22), drei Hydroxyzimtsäuren (Abb. 3.22, 4: *cis*-Cumarsäure, 5: *trans*-Cumarsäure und 6: Ferulasäure) und vier Flavonolglykoside (Abb. 3.23) analysiert.

Das zellwandgebundene Flavan zeigte ein ähnliches Verhalten wie die Verbindung 1 der Methanol-löslichen Inhaltsstoffe (Abb. 3.18). In sehr jungen Nadeln war die Konzentration mit bis zu $1 \mu\text{mol g}^{-1}$ FG relativ hoch, nahm dann aber während der Nadelentwicklung um ca. 80 % ab. Ab Mitte der ersten Vegetationsperiode bis zum Ende des zweiten Jahres war ein Anstieg auf den ursprünglichen Wert zu verzeichnen.

Ganz anders verhielten sich die Hydroxyzimtsäuren. In sehr jungen Nadeln waren sie nicht nachweisbar, akkumulierten dann aber mit zunehmenden Nadelalter. Der Anteil der *trans*-Cumarsäure war mit ca. 80 % des Gesamtgehalts der Hydroxyzimtsäuren am höchsten. Sie erreichte ihr Konzentrationsmaximum mit ca. 1.5 bis $2 \mu\text{mol g}^{-1}$ FG im Juli / August, d. h. eher als die *cis*-Cumarsäure (Anteil ca. 15 %) und Ferulasäure (Anteil ca. 5 %). Verglichen mit den löslichen diacylierten Flavonolglukosiden akkumulierten die zellwandgebundenen Hydroxyzimtsäuren in der ersten Vegetationsperiode später.

Der Verlauf der Flavonolglykoside (Abb. 3.23) ist analog jenem der Hydroxyzimtsäuren (Abb. 3.22). Es war eine Akkumulation während der ersten Vegetationsperiode zu beobachten. Die Konzentration erreichte ein Maximum im September, also später als bei den Hydroxyzimtsäuren. Die untersuchten Kämpferol-Derivate hatten einen Anteil von ca. 85 % an der Flavonolglykosiden und kamen damit in wesentlich größerer Menge vor als die Quercetin-Derivate mit einem Anteil von ca. 15 %. Von den beiden Kämpferol-Derivaten hatte das Kämpferol 3-glukosid wiederum den größten Anteil an den Flavonolglykosiden mit ca. 70 % (bis 4 bzw. $3 \mu\text{mol g}^{-1}$ FG).

In Hinblick auf den UV-B-Schutz durch die untersuchten Substanzen ergab sich zusammenfassend folgendes Bild: In den jungen, hellgrünen Nadeln akkumulierten die diacylierten Flavonol 3-glukoside sehr schnell, nachweisbar sowohl als hohe Aktivität der 3''- und der 6''-HCT als auch als steiler Anstieg des Gehalts der diacylierten Verbindungen. Die nähere Analyse zeigte, dass monoacylierte Verbindungen und Quercetin-Derivate nur eine geringe Rolle spielten im Gegensatz zu Kämpferol- und Isorhamnetin-Derivaten. Von diesen hatten das mit zwei Cumarsäure-Resten homoacylierte Kämpferol 3-glukosid und das mit einer

Cumarsäure und einer Ferulasäure heteroacylierte Isorhamnetin 3-glukosid die höchsten Konzentrationen. Mit der Abnahme des Gehalts diacylierter Verbindungen ging ein Anstieg von zellwandgebundenen Hydroxyzimtsäuren, vor allem *trans*-Cumarsäure, und Flavonolglykosiden, hier vor allem Kämpferol 3-glukosid, einher. Dieser Anstieg begann ebenfalls früh in der Entwicklung der Nadeln, war aber langsamer als bei den diacylierten Verbindungen. Die zellwandgebundenen Metabolite nahmen mit zunehmenden Blattalter im Gegensatz zu den diacylierten nicht ab.

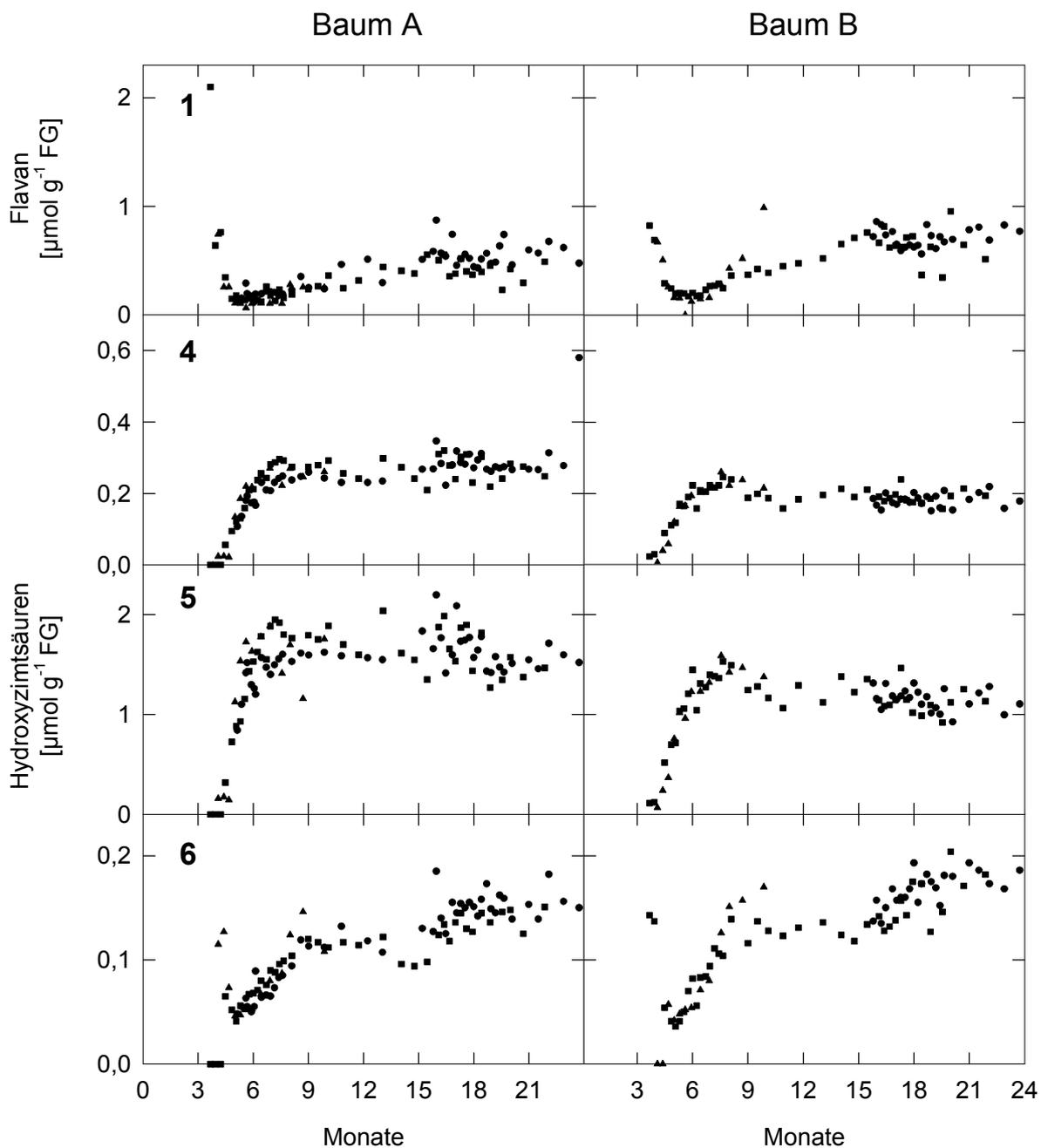


Abb. 3.22: Verlauf des Gehalts der zellwandgebundenen Flavane (1) und Hydroxyzimtsäuren (4-6). 4: *cis*-Cumarsäure, 5: *trans*-Cumarsäure, 6: Ferulasäure; der Flavangehalt ist in Catechinäquivalenten angegeben.

● Nadeljahrgang 1997, ■ NJ 98, ▲ NJ 99.

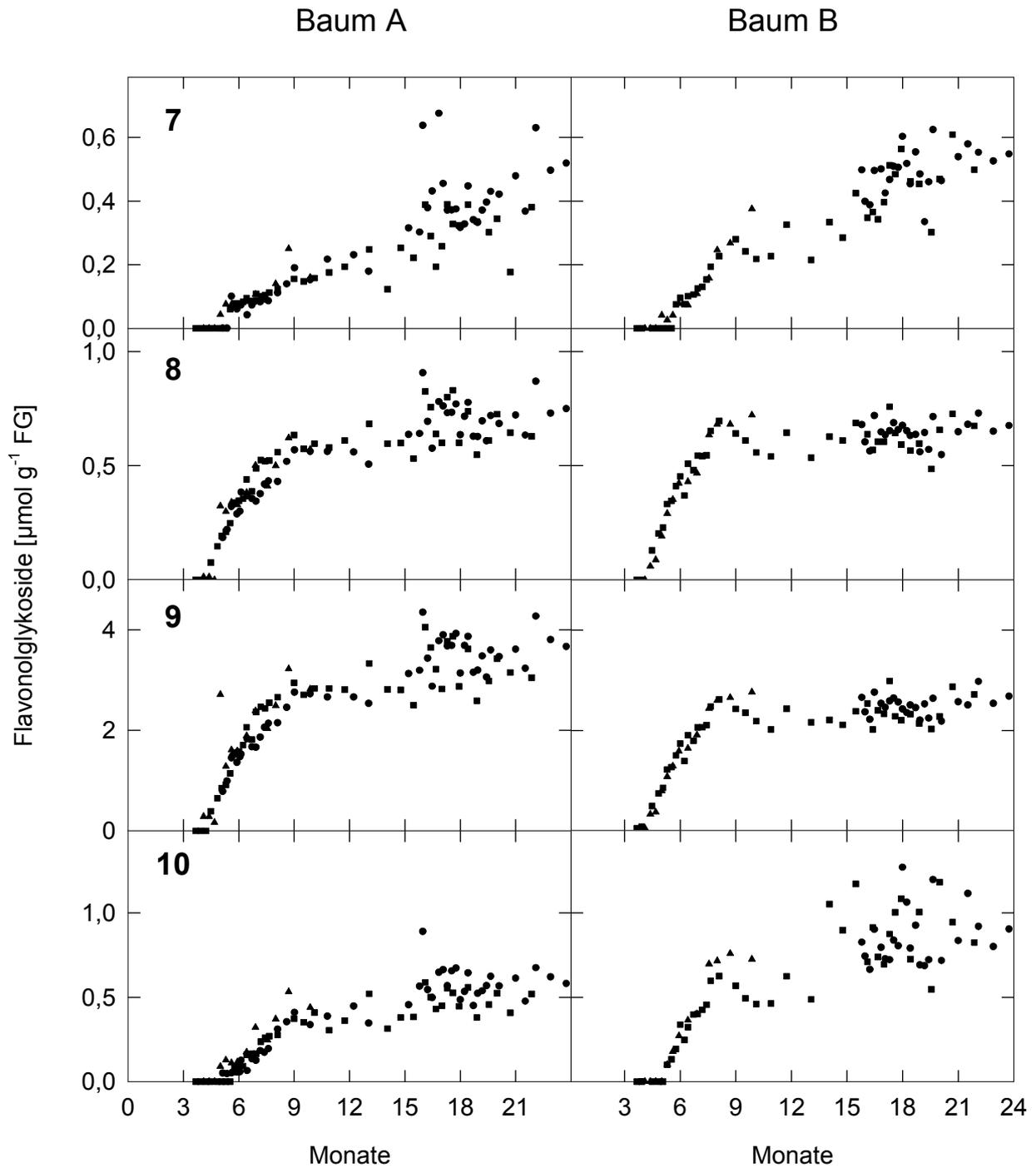


Abb. 3.23: Verlauf des Gehalts zellwandgebundener Flavonolglykoside.

7 und 10: Quercetinderivate, 8: Kämpferolderivat, 9: Kämpferol 3-glukosid

● Nadeljahrgang 1997, ■ NJ 98, ▲ NJ 99.

3.5.3 Das Verhältnis von Nadeloberfläche zu Nadelgewicht im Jahresgang

Aus praktischen Gründen wurde in den vorangegangenen Abschnitten der Gehalt der Inhaltsstoffe auf das Frischgewicht der Nadeln bezogen. Da die diacylierten Metabolite aber in der Epidermis der Nadeln lokalisiert sind (Schnitzler *et al.* 1996), wurde untersucht, ob sich das Verhältnis von Nadeloberfläche zu Nadelgewicht während der Nadelentwicklung verändert. Dafür wurden in einer Saison zu verschiedenen Zeiten Oberfläche und Frischgewicht der Nadeln bestimmt und in Relation zueinander gesetzt (Abb. 3.24).

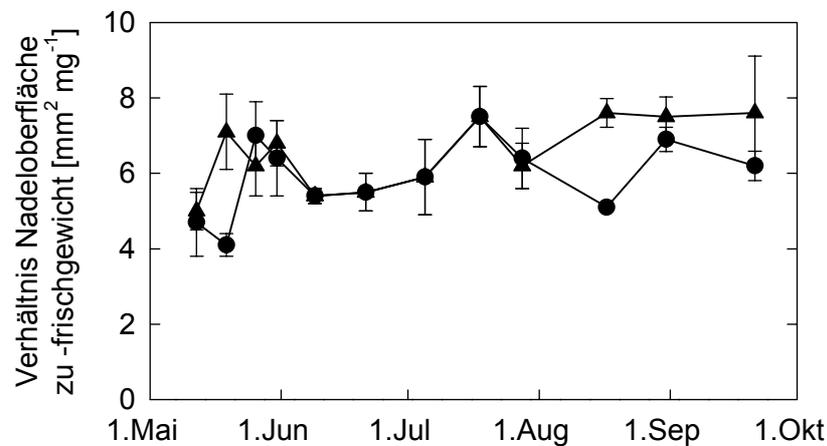


Abb. 3.24: Verlauf des Verhältnisses von Nadeloberfläche zu -frischgewicht im Jahresgang.

● Baum A, ▲ Baum B.

Es zeigte sich, dass das Verhältnis der Nadeloberfläche zum Frischgewicht im Jahresgang etwa konstant war. Auch in jungen austreibenden Nadeln war es nicht wesentlich verschieden zu älteren Nadeln. Somit sollte ein Bezug der Inhaltsstoffe auf das Frischgewicht keinen relevanten Unterschied zu einem Bezug auf die Nadeloberfläche haben.

3.6 Sonnensimulator-Experimente

In den folgenden beiden Abschnitten sind die Ergebnisse von zwei Sonnensimulatorexperimenten (V 623b und V 658) dargestellt, bei denen das Verhalten der HCT's und der phenolischen Inhaltsstoffe unter verschiedenen UV-B-Bestrahlungsvarianten unter kontrollierten Bedingungen untersucht wurde. V623b wurde mit vier verschiedenen UV-B-Varianten durchgeführt, wobei die Varianten folgende UV-B-Tagesdosen hatten (in $\text{kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$): UV-B 0: 0.0, UV-B 1: 7.9, UV-B 2: 16.6 und UV-B 3: 43.9. Die Exposition erfolgte über einen Zeitraum von 10 Tagen. Die Ernten erfolgten täglich bis zum fünften Tag, dann am achten und zehnten Tag, jeweils morgens. Pro Behandlungsvariante und Erntetermin wurde eine Probe genommen, von der Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

In V 658 wurden die Keimlinge mit zwei UV-B-Varianten behandelt, die UV-B-Tagesdosen von 0 (-UV-B) bzw. $28 \text{ kJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$ (+UV-B) hatten. Die +UV-B-Variante lag zwischen den Varianten UV-B 2 und UV-B 3 von V 623b und entsprach einer UV-B-Belastung, wie sie an einem natürlichen Standort an einem Sommertag gemessen werden kann. Die Ernte erfolgte in den ersten beiden Tagen zwölfstündig, bis zum fünften Tag täglich und dann am siebten, elften und 14. Tag. Pro Variante wurden drei unabhängige Proben geerntet, von denen jeweils Einzelmessungen durchgeführt wurden. Zusätzlich zu den löslichen phenolischen Metaboliten wurden in V 658 auch die Gehalte der zellwandgebundenen Inhaltsstoffe und Anthocyane gemessen.

Alle Messungen wurden an Primärnadeln vorgenommen.

3.6.1 V 623b

3.6.1.1 *Enzymaktivitäten*

Die Enzymaktivitäten von V 623b wurden mit Isorhamnetin 3-glukosid ermittelt. Es stellte sich heraus, dass 6''-(*p*-Cumaroyl)-isorhamnetin 3-glukosid nicht quantifiziert werden konnte, da der Peak durch Nebenprodukte verunreinigt war. Die Berechnung der 6''-HCT-Aktivität erfolgte aus diesem Grund nur durch die Quantifizierung des diacylierten Produkts 3''-6''-Di-(*p*-cumaroyl)-isorhamnetin 3-glukosid (siehe auch Text zu Abb. 3.25).

In Abb. 3.25 sind die Aktivitäten der 3''-HCT (A) und der 6''-HCT (B) gezeigt. Die 3''-HCT war sowohl in der Schwachlichtkontrolle (SLK) als auch in allen UV-B-Varianten nachweisbar. Sie war bei Starklicht/UV-A deutlich höher, wie ein Vergleich zwischen SLK und den UV-B-Varianten zeigte und sie wurde durch UV-B maximal 1.5-fach induziert. Es zeigte sich keine Abhängigkeit der Aktivität von der UV-B-Dosis. Der Vergleich zwischen

3''-HCT und 6''-HCT zeigte jedoch wesentliche Unterschiede. Die 6''-HCT war bei der SLK nicht, bei der UV-B 0-Variante nur bei einigen Messungen nachweisbar. Im Gegensatz dazu gab es bei den Varianten mit UV-B einen Anstieg der Aktivität innerhalb der ersten zwei Tage der UV-B-Behandlung um das 3- bis 4-fache. Eine Dosisabhängigkeit konnte auch hier nicht beobachtet werden. Die 6''-HCT zeigte also eine deutliche UV-B-Induktion im Gegensatz zur 3''-HCT, die auf relativ hohem Niveau, d. h. ca. dreimal so hoch wie die induzierte 6''-HCT, konstitutiv aktiv war.

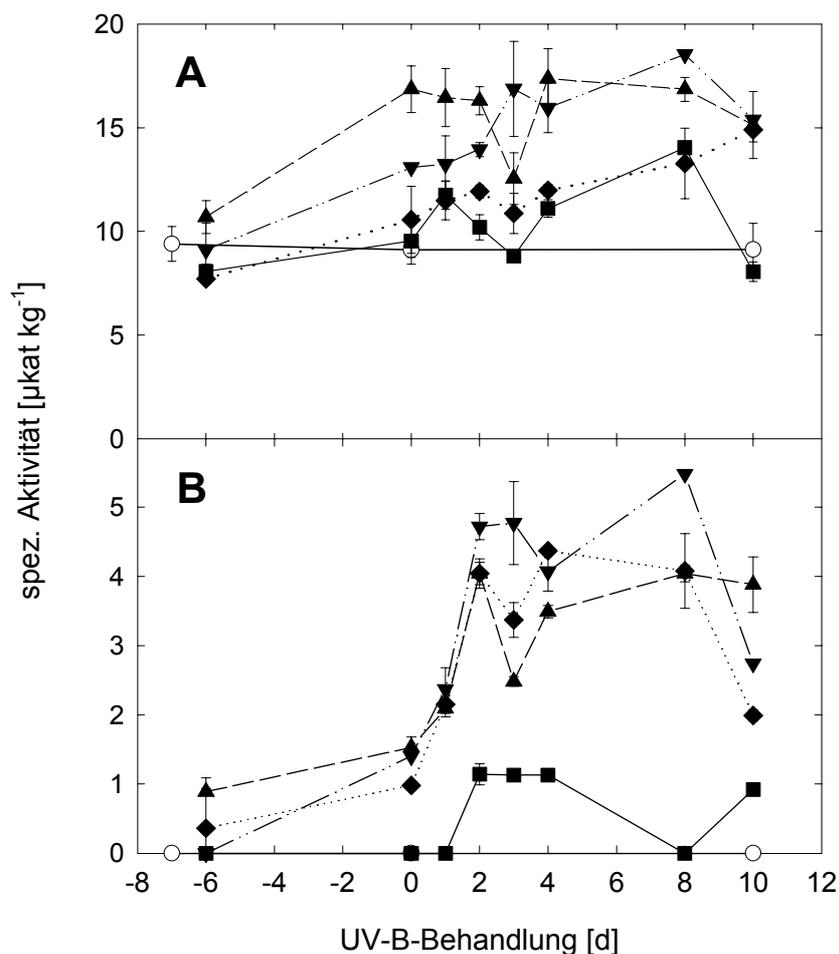


Abb. 3.25: Verlauf der Enzymaktivitäten der 3''-HCT (A) und 6''-HCT (B) in V 623b.

Neben den vier UV-B-Varianten (UV-B 0: ■, UV-B 1: ▲, UV-B 2: ▼, UV-B 3: ◆) ist die Schwachlichtkontrolle (SLK: ○, Anzuchtammer) gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte von Doppelbestimmungen mit Spannweite. Die 6''-HCT-Aktivität wurde mit Hilfe des im Enzymtest entstehenden 3''-6''-Di-(p-cumaroyl)-isorhamnetin 3-glukosid bestimmt, da der Peak des 6''-(p-Cumaroyl)-isorhamnetin 3-glukosid nicht quantifiziert werden konnte. Die Aktivität erscheint dadurch u. U. geringer als sie tatsächlich war. Aufgrund der hohen Aktivität der 3''-HCT ist aber anzunehmen, dass der Großteil des 6''-HCT-Produkts in diacylierter Form vorlag.

3.6.1.2 Lösliche phenolische Inhaltsstoffe (Methanol-Gradient)

Von den löslichen Inhaltsstoffen zeigten die diacylierten Verbindungen ein ausgeprägtes Induktionsverhalten (Abb. 3.26 8 und 9/10). Entsprechend der höchsten Enzymaktivität der 6''-HCT wurde die Akkumulation der Metabolite nach zwei Tagen UV-B-Behandlung sichtbar, besonders stark bei Peak 8, den diacylierten Quercetin-Derivaten, die in der Schwachlichtkontrolle nicht nachweisbar waren. Hier wurde eine dreifache Zunahme bei der UV-B 3 - Variante gegenüber der UV-B 0-Variante beobachtet. Bei allen diacylierten Metaboliten war eine Abhängigkeit von der UV-B-Dosis zu erkennen, wobei die Unterschiede zwischen den UV-B-Varianten 1 und 2 nur gering ausfielen. Ebenso war sowohl bei Peak 8 als auch bei Peak 9/10 eine Induktion der Akkumulation durch UV-A/Starklicht zu beobachten, wie der Vergleich zwischen Schwachlichtkontrolle und UV-B 0-Variante zeigte.

Trotz der relativ hohen Aktivität der 3''-HCT in allen Lichtvarianten konnten keine monoacylierten Verbindungen nachgewiesen werden.

Von den anderen untersuchten löslichen Inhaltsstoffen zeigten die Hydroxyzimtsäuren und Catechin ein uneinheitliches Bild. Während bei Peak 1 kein besonderer Effekt zu erkennen war, verdoppelte sich der Gehalt von Catechin (2) während der Starklichtakklimatisierung, nahm dann während der UV-B-Behandlung, aber auch in der Schwachlichtkontrolle und der UV-B 0-Variante, ab und stieg wiederum nach 4 Tagen vor allem aber bei der UV-B Variante 3 an. Peak 3 war in der Schwachlichtkontrolle nicht nachweisbar, wurde aber durch Starklicht und UV-A/UV-B deutlich induziert. Neben der allgemeinen starklichtabhängigen Akkumulation war auch noch eine UV-B-spezifische, dosisabhängige Akkumulation zu erkennen. Nach 10 Tagen UV-B-Behandlung war der Gehalt dieser Hydroxyzimtsäure bei der UV-B 3-Variante mehr als doppelt so hoch wie bei der UV-B-freien Variante.

Die Flavonolglykoside waren in allen Behandlungsvarianten messbar und zeigten auch eine mehr oder weniger starke Zunahme durch die Behandlung mit UV-B. Die Quercetin-Derivate 4 und 7 zeigten den stärksten Effekt mit einer Verdopplung des Gehalts der UV-B 3-Variante gegenüber der UV-B 0-Variante. Dieser Induktionseffekt überlagerte gerade bei den Kämpferol-Derivaten 5 und 6 eine offenbar entwicklungspezifische Abnahme des Gehalts während des Versuchszeitraums, der dadurch nur bei der Schwachlichtkontrolle sichtbar wurde. Verbindung 6 (Kämpferol 3-glukosid) hatte mit ca. 65 % (ca. 2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG) den größten Anteil an den untersuchten Flavonolglykosiden.

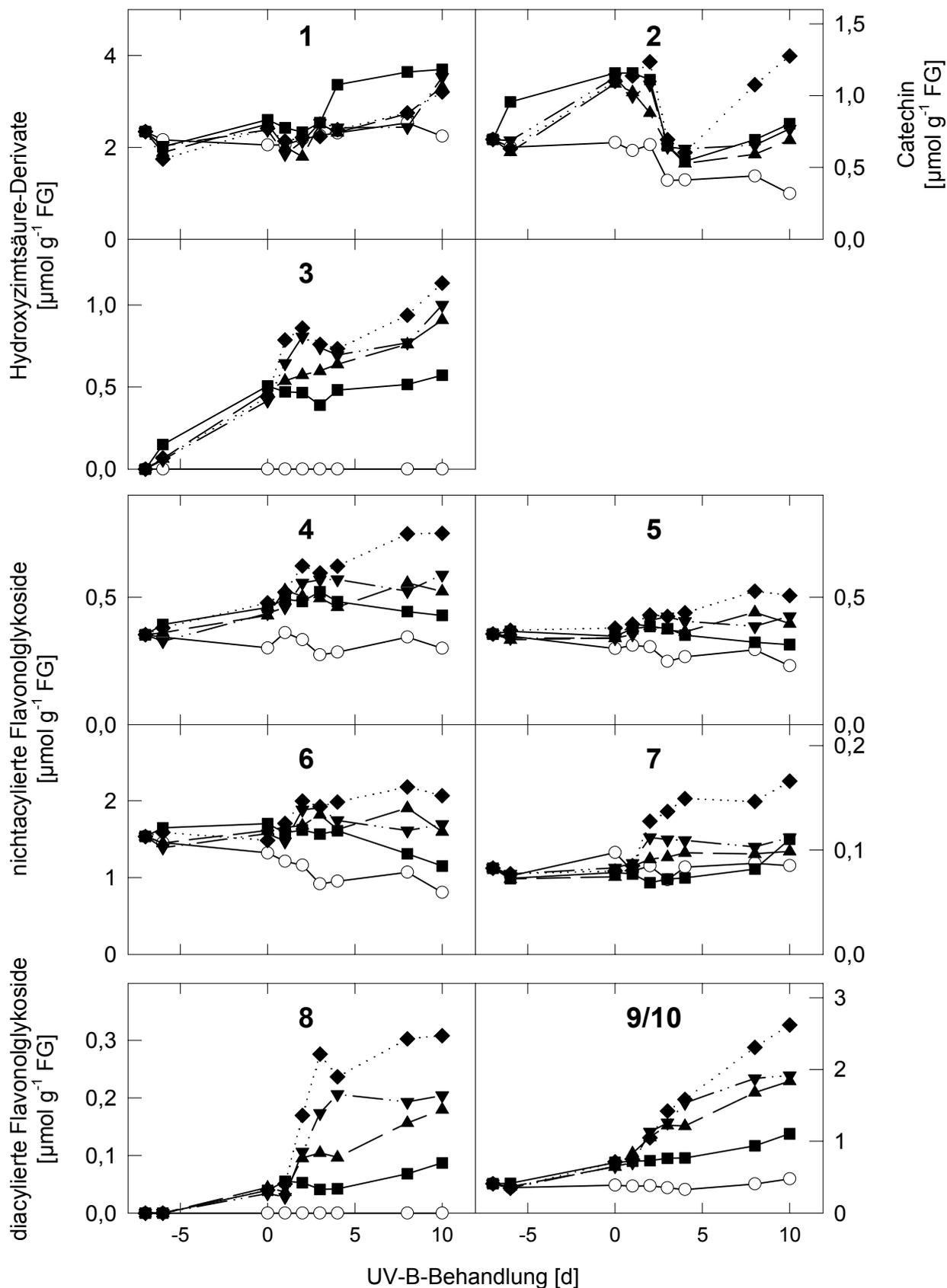


Abb. 3.26: Verlauf des Gehalts der Hydroxyzimtsäure-Derivate (1, 3), Catechin (2), sowie der nicht-acylierten (4-7) und acylierten Flavonolglykoside (8-10) während UV-B-Behandlung in V 623b. SLK: ○, UV-B 0; ■, UV-B 1; ▲, UV-B 2; ▼, UV-B 3; ◆, UV-B 3; 2: Catechin, 4: Quercetin-Derivat, 5: Kämpferol-Derivat, 6: Kämpferol 3-glucosid, 7: Quercetin-Derivat, 8: diacylierte Quercetinglukoside, 9/10: diacylierte Kämpferol- und Isorhamnetinglukoside.

3.6.1.3 Acylierte Flavonolglukoside (Acetonitril-Gradient)

Die spezifische Analyse der diacylierten Verbindungen mit Hilfe des Acetonitril-Gradienten (Abb. 3.27) zeigte, dass das homoacylierte Kämpferol- und Isorhamnetin-Derivat (6 und 8) jeweils wesentlich stärker zunahm als die entsprechenden heteroacylierten Verbindungen (7 und 9). Die Konzentrationen von 6 und 8 waren bei der UV-B 3-Variante ungefähr fünfmal höher als bei der UV-B 0-Variante. Demgegenüber hatte sich die Konzentration von 7 und 9 nicht einmal verdoppelt. Andererseits war der Gehalt von 7 und 9 bei der UV-B 0-Variante jeweils genauso hoch wie der von 6 und 8.

Insgesamt zeigten also alle untersuchten diacylierten Verbindungen eine UV-B-abhängige Akkumulation, die bei den Verbindungen 5, 6 und 8 am stärksten ausgeprägt war.

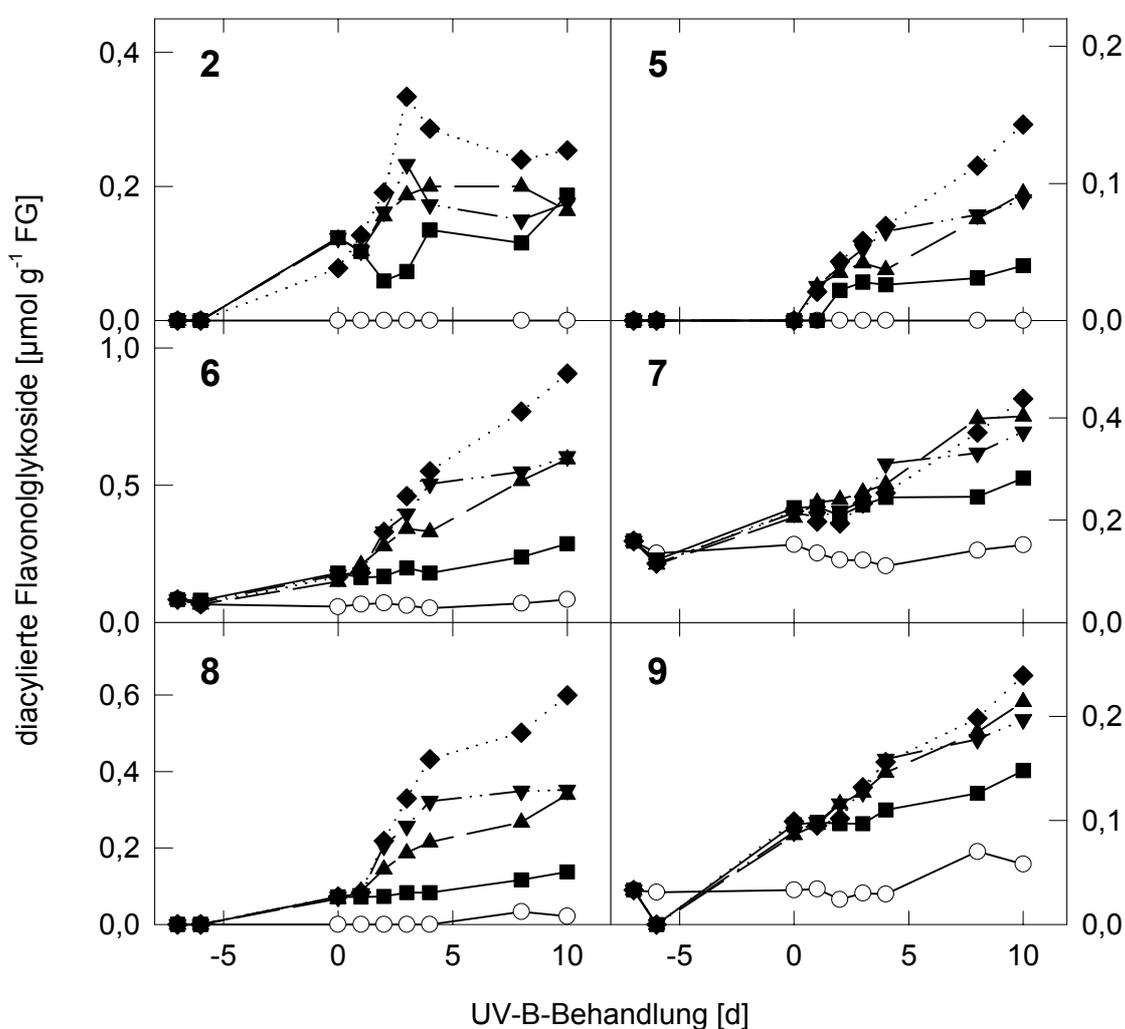


Abb. 3.27: Verlauf des Gehalts der diacylierten Flavonolglukoside während UV-B-Behandlung in V623b.

SLK: O, UV-B 0: ■, UV-B 1: ▲, UV-B 2: ▼, UV-B 3: ◆;

2: 3''-6''-Di-(p-cumaroyl)-quercetin 3-glc, 5: nicht identifiziertes diacyliertes Flavonolglykosid, 6: 3''-6''-Di-(p-cumaroyl)-kämpferol 3-glc, 7: 3''-(p-Cumaroyl),6''-feruloyl-kämpferol 3-glc, 8: 3''-6''-Di-(p-cumaroyl)-isorhamnetin 3-glc, 9: 3''-(p-Cumaroyl),6''-feruloyl-isorhamnetin 3-glc.

3.6.2 V 658

Das Sonnensimulatorexperiment V 658 wurde gegenüber V 623b in zwei wesentlichen Punkten optimiert. Die Anzucht der Kiefernkeimlinge erfolgte vor Beginn der UV-B-Behandlung unter kontrollierten UV-B-Ausschluss-Bedingungen durch Verwendung eines Plexiglasschirms. Die Reduktion auf zwei UV-B-Behandlungsvarianten (ohne UV-B und mit UV-B) ermöglichte außerdem die Ernte von drei Parallelen pro Behandlungsvariante. Bei der +UV-B-Variante von V 658 entsprach die spektrale Verteilung die der UV-B 2-Variante von V 623b (Filtergläser jeweils Sanalux), die Tagesdosis lag zwischen der UV-B 2 und der UV-B 3-Variante von V 623b, da die Lichtintensität höher war.

3.6.2.1 Enzymaktivitäten

Die Aktivitäten der HCT's wurden in diesem Experiment mit den Substraten Tilirosid (3''-HCT, Abb. 3.28 A) und Kämpferol 3-glukosid (6''-HCT, Abb. 3.28 B) gemessen. Die 3''-HCT zeigte das gleiche Verhalten wie in V 623b. Es konnte keine Induktion durch UV-B, aber eine Erhöhung der Aktivität in beiden Starklichtvarianten mit und ohne UV-B gemessen werden. Bei der 6''-HCT war eine deutliche Induktion durch UV-B nach 12 h Behandlung zu erkennen. Das Maximum der Enzymaktivität wurde, wie in V 623b, 48 h nach Beginn der UV-B-Behandlung erreicht. Die Aktivität der UV-B-freien Starklichtvariante war ungefähr doppelt so hoch wie bei der Schwachlichtkontrolle.

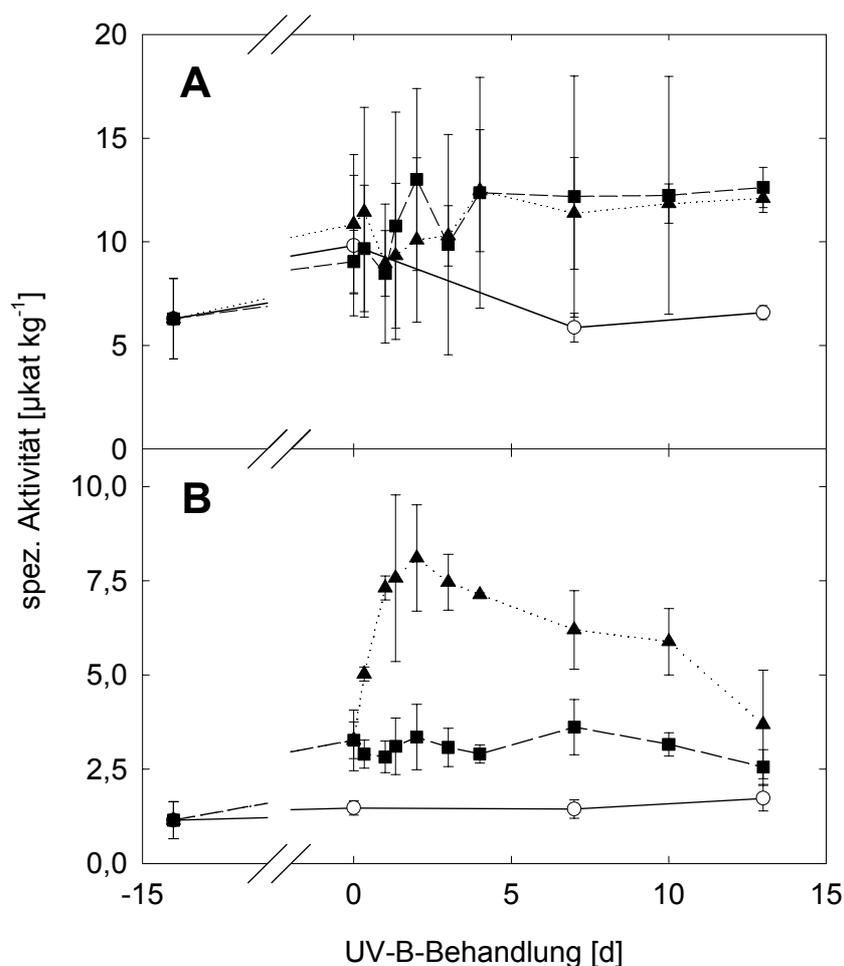


Abb. 3.28: Verlauf der Enzymaktivitäten der 3''-HCT (A) und der 6''-HCT (B) in V658.

SLK: ○, -UV-B: ■, +UV-B: ▲;

Zur Ermittlung der Enzymaktivität wurde für die 3''-HCT Tiliosid, für die 6''-HCT Kämpferol 3-glucosid eingesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung (n = 3).

3.6.2.2 Lösliche phenolische Inhaltsstoffe (Methanol-Gradient)

Die Analysenergebnisse der Methanol-löslichen Inhaltsstoffe von V 658 (Abb. 3.29) bestätigten weitgehend die Ergebnisse von V 623b. Die diacylierten Verbindungen 8 und 9/10 zeigten einen Anstieg des Gehalts bei der +UV-B-Variante, der nach 24 bis 36 h begann und bei den Quercetin-Derivaten nach zwei Tagen, bei den Verbindungen 9 und 10 nach vier Tagen ein Maximum erreichte. Nach sieben Tagen UV-B-Behandlung konnte dann noch ein weiterer Anstieg, bei den Quercetin-Derivaten um den Faktor zwei, beobachtet werden. Bei allen diacylierten Verbindungen zeigte sich ein höherer Gehalt bei der -UV-B-Variante gegenüber der Schwachlichtkontrolle. Bei den Verbindungen 9 und 10 konnte zudem noch ein Anstieg des Gehalts bei der Schwachlichtkontrolle über den gesamten untersuchten Zeitraum von vier Wochen beobachtet werden. Der Vergleich der Enzymaktivitäten der HCT's mit der Akkumulation der diacylierten Verbindungen zeigte auch bei V 658 eine sehr gute Überein-

stimmung, da der Gehalt der Produkte während der höchsten Enzymaktivität am stärksten zunahm.

Bei den Hydroxycimtsäure-Derivaten und Catechin war das uneinheitliche Bild von V 623b ebenfalls reproduzierbar. Peak 1 zeigte in V 658 mit einer Verdoppelung deutlichere Induktion durch Starklicht/UV-A und UV-B als in V 623b, wobei der Gehalt bei der -UV-B-Variante höher war als bei der +UV-B-Variante. Bei Catechin dagegen war keine Wirkung der Lichtbehandlung auf den Gehalt feststellbar. Gegenüber V623b war auch kein Anstieg während der Akklimatisierung festzustellen. Diese erfolgte allerdings in V 658 auch durch eine stufenweise Erhöhung der Lichtintensität innerhalb von einer Woche, demgegenüber wurden in V 623b die Pflanzen direkt der maximalen Lichtintensität ausgesetzt. Peak 3 wiederum zeigte eine Induktion sowohl durch Starklicht/UV-A (um ca. 10 %), als auch durch UV-B (um ca. 100 %). Im Gegensatz zu V 623b war diese Verbindung auch in der Schwachlichtkontrolle nachweisbar.

Die nichtacylierten Flavonolglykoside 4, 5 und 6 zeigten eine deutliche Abnahme des Gehalts im Laufe des Versuchs. Verbindung 6 (Kämpferol 3-glukosid) hatte zu Beginn der Akklimatisierung eine Konzentration von $6 \mu\text{mol g}^{-1}$ FG, ein Wert, der von keinem der Flavonolglykoside, auch im Freiland nicht, erreicht wurde. Gegen Ende des Versuchs betrug die Konzentration dieser Verbindung nur noch $2 \mu\text{mol g}^{-1}$ FG. Diese Abnahme in V 658 war mit der in V 623b vergleichbar. Die Werte waren insgesamt bei V 623b geringer entsprechend dem etwas höheren Alter der Keimlinge in diesem Versuch (9 Wochen zu Beginn der UV-B-Behandlung gegenüber 6 Wochen in V 658).

Während allerdings in V 623b der Gehalt der Verbindungen 4 bis 6 in den UV-B-Behandlungsvarianten höher war als in der Schwachlichtkontrolle, war dies in V 658 nicht der Fall. Dort lagen die Werte der UV-B-Behandlungsvarianten teilweise unter denen der Schwachlichtkontrolle. Nur das Quercetin-Derivat 7 zeigte mit einer Zunahme des Gehalts durch Starklicht/UV-A und UV-B in V 658 das gleiche Verhalten wie in V 623b.

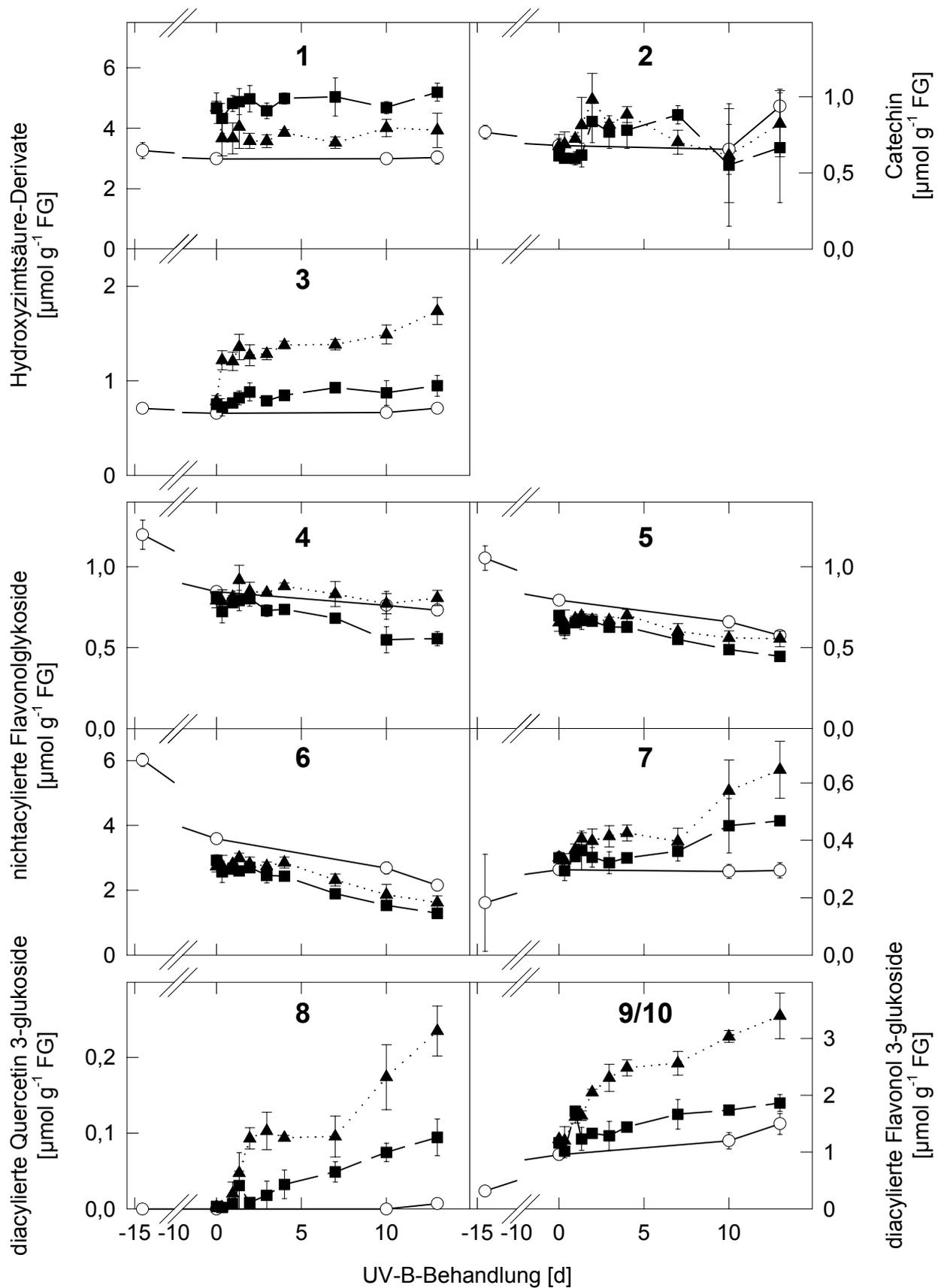


Abb. 3.29: Verlauf des Gehalts der Hydroxyzimtsäure-Derivate (1 und 3), Catechin (2), sowie der nichtacylierten (4-7) und acylierten Flavonolglykoside (8-10) während UV-B-Behandlung in V 658.

SLK: ○, -UV-B: ■, +UV-B: ▲; Substanznamen wie Abb. 3.26.

3.6.2.3 *Acylierte Flavonolglukoside (Acetonitril-Gradient)*

Die spezifische Analyse der diacylierten Verbindungen mit Hilfe des Acetonitril-Gradienten (Abb. 3.30) zeigte entsprechend V 623b, dass die homoacylierten Kämpferol- und Isorhamnetin-Derivate (6 und 8) jeweils wesentlich stärker zunahmen als die entsprechenden heteroacylierten Verbindungen (7 und 9). Die Konzentrationen von 6 und 8 waren bei der +UV-B-Variante allerdings nur etwa doppelt so hoch wie bei der -UV-B-Variante im Gegensatz zu der fünffachen Steigerung bei V 623b. Demgegenüber waren die Konzentrationen von 7 und 9 bei der +UV-B-Variante nur geringfügig gegenüber der -UV-B-Variante erhöht. Der Gehalt dieser Verbindungen zeigte jeweils keinen Unterschied zwischen der -UV-B-Variante und der Schwachlichtkontrolle.

Insgesamt zeigten also alle untersuchten diacylierten Verbindungen eine UV-B-abhängige Akkumulation, die bei den Verbindungen 6 und 8 am stärksten ausgeprägt war.

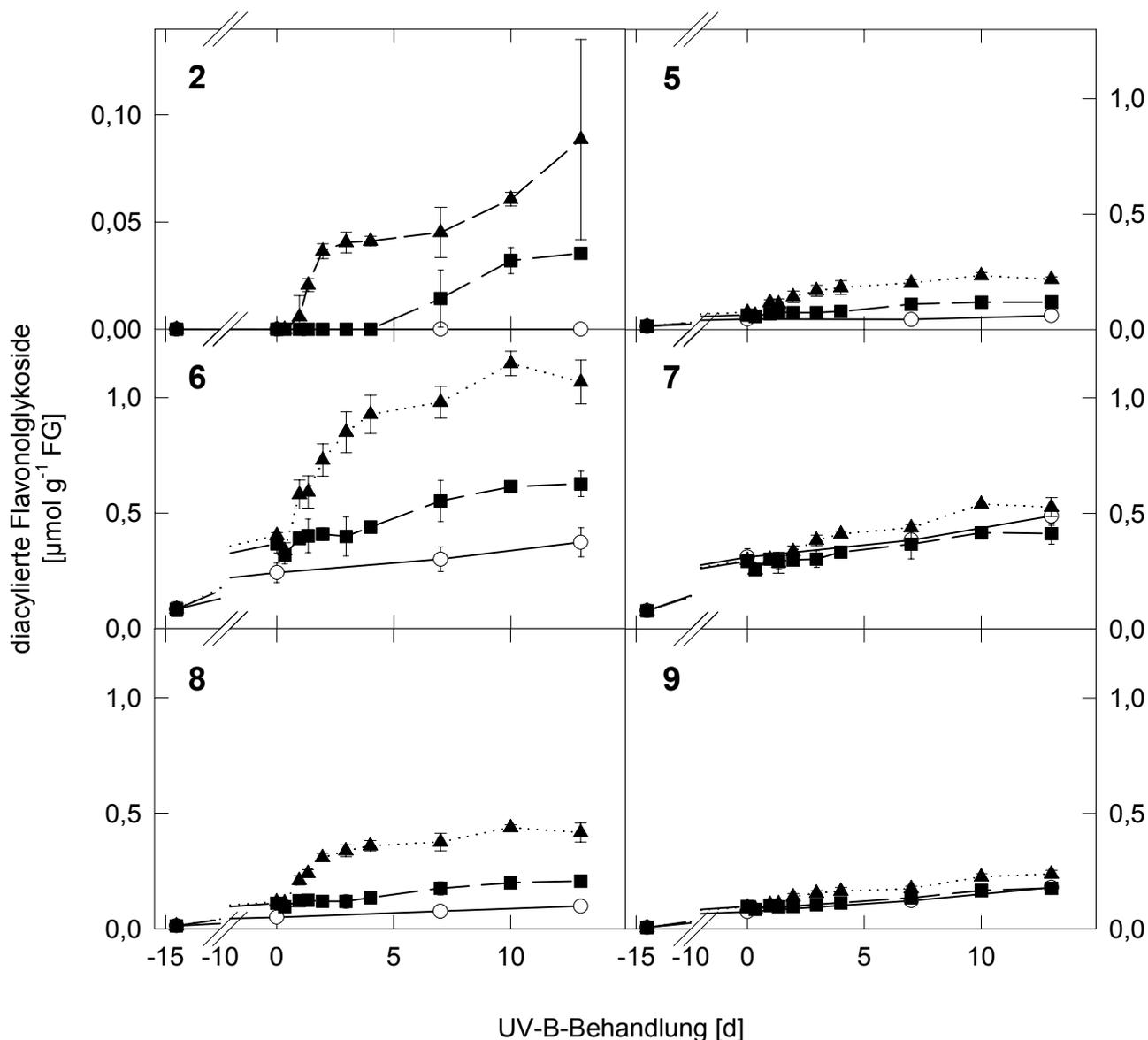


Abb. 3.30: Verlauf des Gehalts der diacylierten Flavonolglykoside während UV-B-Behandlung bei V 658.

Bei den Diagrammen 5 bis 9 sind die Ordinaten gleich skaliert; Substanznamen wie Abb. 3.27.

SLK: ○, -UV-B: ■, +UV-B: ▲.

3.6.2.4 Zellwandgebundene phenolische Inhaltsstoffe

In V 658 wurden zur Ergänzung der Messung der HCT-Aktivitäten und der Gehalte der Methanol-löslichen Inhaltsstoffe auch der Gehalt an zellwandgebundenen Inhaltsstoffen bestimmt (Abb. 3.31). Die drei untersuchten Flavane 1 bis 3 zeigten ein sehr ähnliches Verhalten. Der Gehalt in beiden Starklichtvarianten nahm gegenüber der Schwachlichtkontrolle zu, wobei aber kein UV-B-Effekt sichtbar war. Diese Zunahme betrug bei Flavan 1 ungefähr 1,5, bei Flavan 2 war sie mit einer dreifachen Steigerung wesentlich stärker, bei Flavan 3 wurde eine Verdoppelung gemessen.

Bei den Hydroxyzimtsäuren wurde sowohl bei der *cis*-Cumarsäure (4) als auch bei der *trans*-Cumarsäure (5) ein erhöhter Gehalt durch die UV-B-Behandlung nachgewiesen. Diese UV-B-abhängige Zunahme hielt bis zum zehnten Tag der UV-B-Behandlung an, zwischen dem zehnten und dem vierzehnten Tag war wieder eine Abnahme zu beobachten. Auch hier war, ähnlich wie bei den Flavanen, der Gehalt bei der -UV-B-Variante doppelt so hoch wie bei der Schwachlichtkontrolle. Die Ferulasäure 6 zeigte keine Starklicht/UV-A bzw. UV-B-abhängige Zunahme, insgesamt betrug der Gehalt der Ferulasäure nur ca. 10 % von der *trans*-Cumarsäure.

Die Flavonolglykoside 8 und 9 (Kämpferol 3-glukosid) zeigten das gleiche Verhalten wie die Cumarsäure-Isomere: (i) eine entwicklungsabhängige Zunahme während der Versuchsdauer (SLK), (ii) einen erhöhten Gehalt durch Starklicht/UV-A (-UV-B-Variante) und (iii) eine zusätzliche Erhöhung durch UV-B (+UV-B-Variante).

Die Reaktionen der zellwandgebundenen Inhaltsstoffe auf die UV-B-Behandlung wurden zwei bis drei Tage nach Behandlungsbeginn sichtbar. Sie waren langsamer als die der löslichen diacylierten Verbindungen, die schon nach 24 h einen Effekt zeigten.

Es ließen sich also sowohl bei den adulten Freilandbäumen während der Nadelentwicklung wie auch bei Kiefernkeimlingen in UV-B-Induktionsexperimenten ein ähnliches Verhalten beobachten: Zuerst trat eine schnelle Reaktion ein, die auf Enzym- und Inhaltsstoffebene messbar war und zu einer Akkumulation der löslichen diacylierten Verbindungen führte. Daran anschließend erfolgte eine langsame Reaktion, die zu einer Zunahme der zellwandgebundenen Inhaltsstoffe führte. Bei Freilandbäumen erfolgte die Abnahme der diacylierten Verbindungen parallel zu der Zunahme der zellwandgebundenen Inhaltsstoffe. Diese Beobachtung konnte in den UV-B-Expositionsexperimenten mit Keimlingen nicht gemacht werden. Möglicherweise war hier der Beobachtungszeitraum zu kurz.

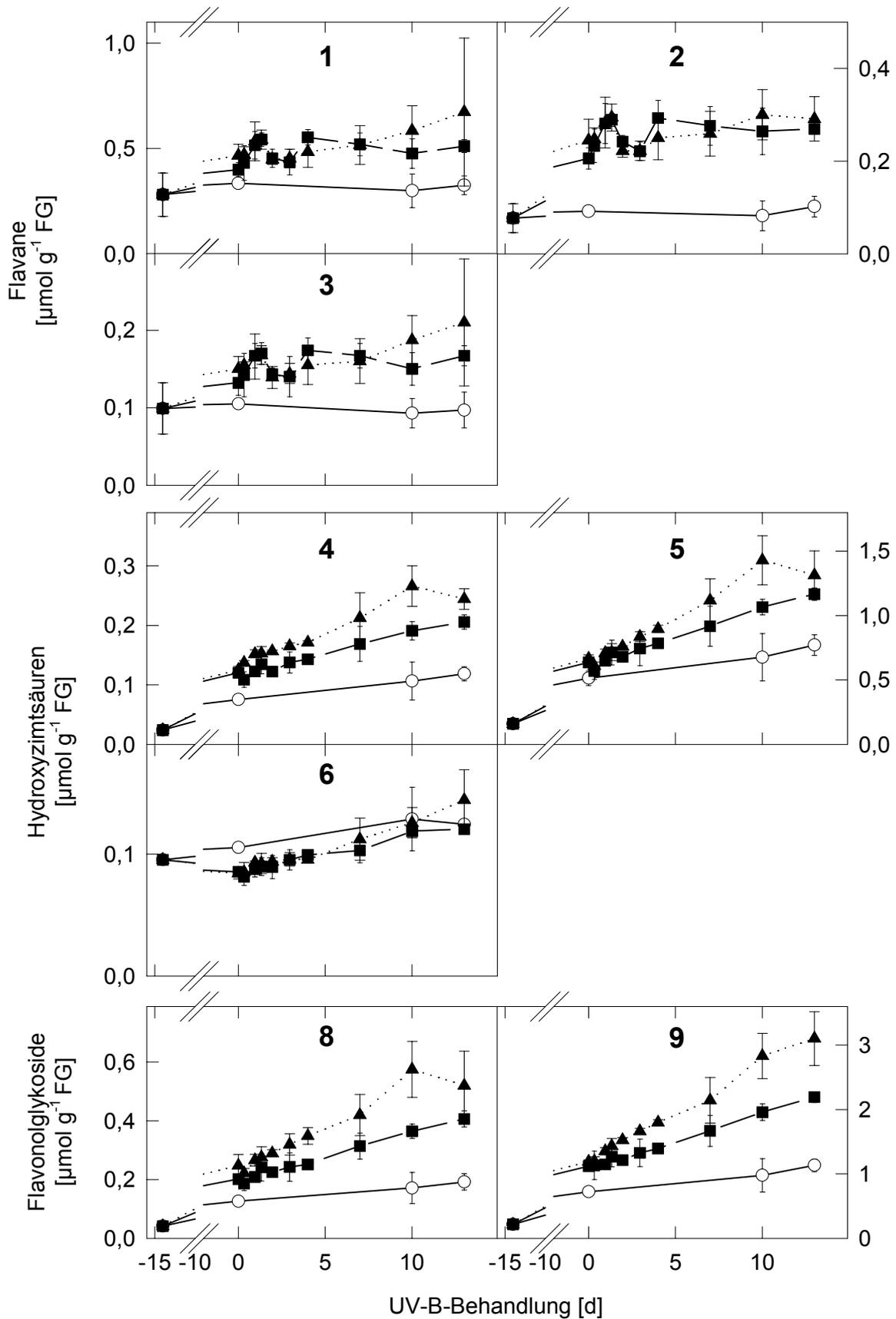


Abb. 3.31: Verlauf des Gehalts der zellwandgebundenen Flavane (1-3), Hydroxyzimtsäuren (4-6) sowie Flavonolglykoside (8, 9) während UV-B-Behandlung bei V 658.

SLK: ○, -UV-B; ■, -UV-B; ▲, +UV-B; 4: *cis*-Cumarsäure, 5: *trans*-Cumarsäure, 6: Ferulasäure, 8: Kämpferolderivat, 9: Kämpferol 3-glukosid; die Flavangehalte sind als Catechinäquivalente angegeben.

3.6.2.5 Anthocyane

Im Verlauf der UV-B-Induktionsexperimente mit Kiefernkeimlingen wurde mehrfach festgestellt, dass sich Hypokotyl und Nadelkranz während der UV-B-Exposition rot verfärbten. Dabei unterschieden sich die Verfärbungen an den beiden Organen dadurch, dass die Rotfärbung des Hypokotyls bei der Mehrzahl der Pflanzen vorkam, während die Rotfärbung des Keimnadelkranzes nur bei einigen Individuen auftrat und mit fortlaufender Versuchsdauer die Anzahl dieser Individuen zunahm. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden Anthocyangehalt des Hypokotyls und der Keimnadeln summarisch mit einem Photometertest gemessen (Abb. 3.32). Dabei zeigte das Hypokotyl eine geringe Anthocyan-Zunahme während der Akklimatisierungsphase in beiden Starklichtvarianten (Abb. 3.32 A). Diese Zunahme war transient, da der Gehalt während der Versuchsdauer wieder abnahm. Es konnte kein Unterschied zwischen den beiden UV-B-Behandlungsvarianten festgestellt werden, sodass anzunehmen ist, dass es sich um einen Starklicht- oder UV-A-Effekt handelt.

In Keimnadeln konnten nur Spuren von Anthocyanen nachgewiesen werden (Abb. 3.32 B), da die Werte nur geringfügig oberhalb der Nachweisgrenze von ca. 70 nmol g⁻¹ FG lagen. Es gab keine Veränderung des Gehalts während des Untersuchungszeitraums in den verschiedenen Behandlungsvarianten.

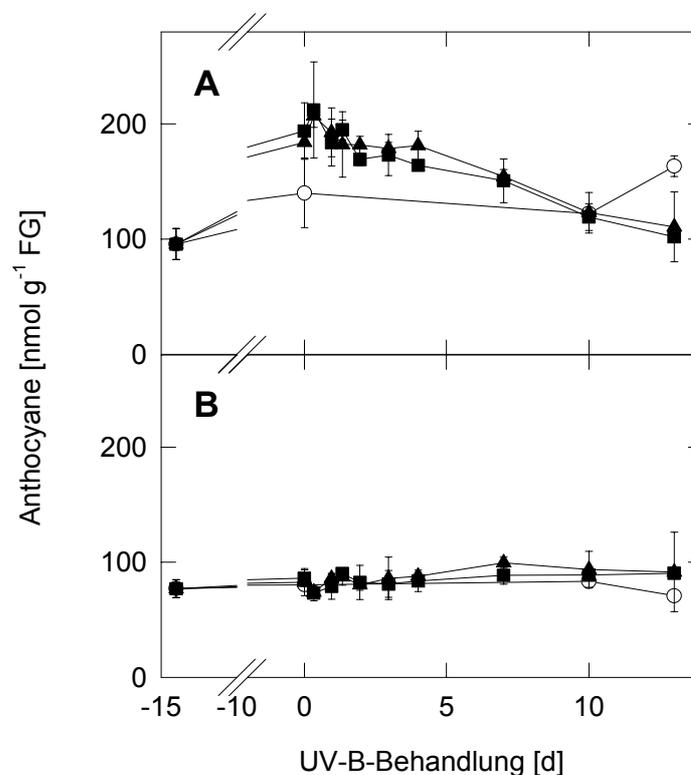


Abb. 3.32: Verlauf des Anthocyangehalts im Hypokotyl (A) und in Keimnadeln (B) während UV-B-Behandlung bei V 658.

SLK: ○, -UV-B: ■, +UV-B: ▲; Die Nachweisgrenze der Methode lag bei ca. 70 nmol g⁻¹ FG.

Parallel zu den Messungen des Anthocyangehalts wurden stichprobenhaft Messungen des Chlorophyllgehalts durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass in der Starklichtvariante nur ungefähr 40 % des Chlorophyllgehalts der Schwachlichtkontrolle nachgewiesen werden konnte und der Chlorophyllgehalt im Lauf des Experiments abnahm. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass die beobachtete Rotfärbung der Nadeln durch den geringeren Chlorophyllgehalt und nicht durch die Neusynthese von Anthocyanen verursacht wurde.

3.7 Biochemische Charakterisierung der Enzyme

Die Charakterisierung der HCT's erfolgte je nach Erfordernis in verschiedenen Extrakten. Die Abhängigkeit vom Proteingehalt und der Inkubationszeit der 3''- und der 6''-HCT wurde im entsalzten Rohextrakt gemessen, da dies für die Aktivitätsmessungen der Sonnensimulator-experimente und der Freilanduntersuchungen wichtig war. Die Aktivität der 4''-HCT im Rohextrakt war zu gering, um die jeweiligen Parameter zu bestimmen. Die weiteren biochemischen Parameter wurden für alle drei HCT's in angereinigten Extrakten gemessen, bei denen die Aktivitäten der HCT's weitgehend voneinander getrennt waren.

3.7.1 Proteinabhängigkeit

Die Abhängigkeit der Aktivität von dem Gesamtproteingehalt wurde für die Messungen der Enzymaktivität in einem entsalzten Rohextrakt, wie sie für die Sonnensimulator-Experimente und die Freilandmessungen durchgeführt wurden, ermittelt (Abb. 3.33). Dabei stellte sich heraus, dass die Aktivität bis ca. 0.1 mg ml^{-1} Gesamtprotein linear von dem Proteingehalt abhängig war. Bei höheren Proteingehalten knickte die Kurve deutlich ab. Die Aktivitätsmessungen erfolgten aus diesem Grund bei Proteinkonzentrationen, die in einem Bereich bis zu 0.1 mg ml^{-1} lagen.

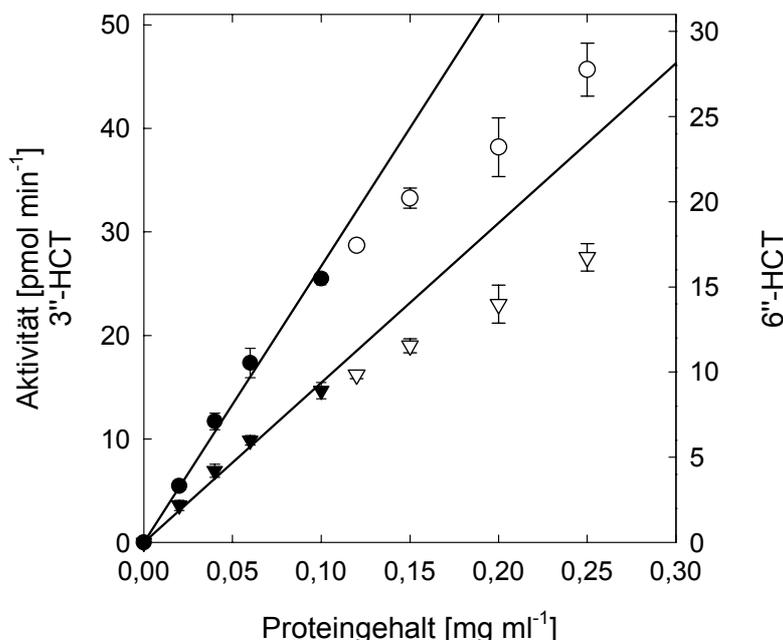


Abb. 3.33: Abhängigkeit der Enzymaktivitäten vom Proteingehalt.

● 3''-HCT, ▼ 6''-HCT; die Werte der geschlossenen Symbole sind zur Berechnung der Regressionsgeraden verwendet worden. Dargestellt sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen mit Spannweite.

3.7.2 Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Die Abhängigkeit der Produktbildung von der Inkubationszeit verlief bis 60 min linear und knickte dann stark ab (Abb. 3.34). Um eine möglichst große Produktmenge pro Enzymtest und damit eine maximale Empfindlichkeit des Tests zu erreichen, wurden alle Enzymtests mit einer Inkubationszeit von 60 min durchgeführt.

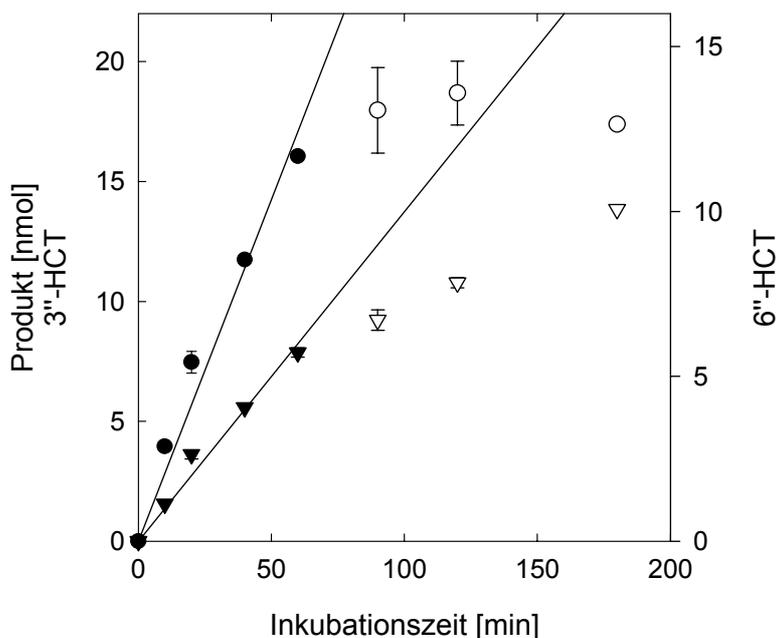


Abb. 3.34: Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von der Inkubationszeit.

● 3''-HCT, ▼ 6''-HCT; die Werte der geschlossenen Symbole sind zur Berechnung der Regressionsgeraden benutzt worden. Dargestellt sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen mit Spannweite.

3.7.3 Temperaturabhängigkeit

Die Temperaturabhängigkeit der HCT's wurde in einem Vorexperiment mit einem weiten Temperaturbereich von 0°C bis 60°C in 10°C-Schritten bestimmt. Dabei ergab sich ein Optimum für alle HCT's von ca. 37°C. In einer genaueren Analyse wurde dann das Aktivitätsmaximum für die 3''-HCT mit 40 °C, für die 4''- und die 6''-HCT mit 44°C bestimmt (Abb. 3.35).

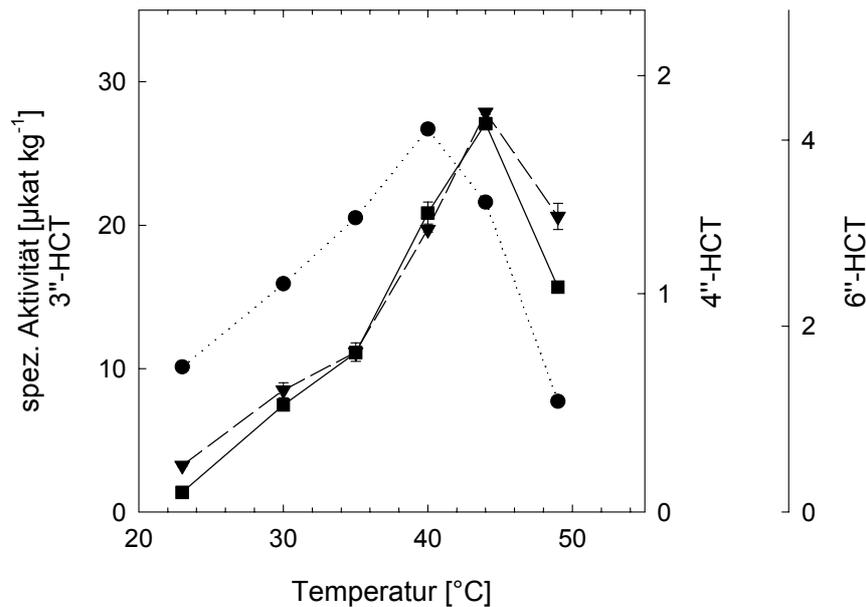


Abb. 3.35: Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von der Temperatur.

3''-HCT: ●, 4''-HCT: ■, 6''-HCT: ▼; Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 3).

3.7.4 pH-Abhängigkeit

Die Abhängigkeit der HCT-Aktivitäten vom pH-Wert des Puffers ergab wie schon bei der Temperaturabhängigkeit, dass sich 4''- und 6''-HCT ähnlich verhielten, aber Unterschiede zur 3''-HCT hatten. Die maximale Aktivität erreichte die 3''-HCT bei einem pH-Wert von 7, während sowohl 4''- als auch 6''-HCT ein pH-Optimum von 8 hatten (Abb. 3.36). Die 6''-HCT hatte bei einem pH-Wert von 6.8, bei dem die Tests der Freiland- und Sonnensimulator-experimenten durchgeführt wurden, ca. 70 % der maximalen Aktivität.

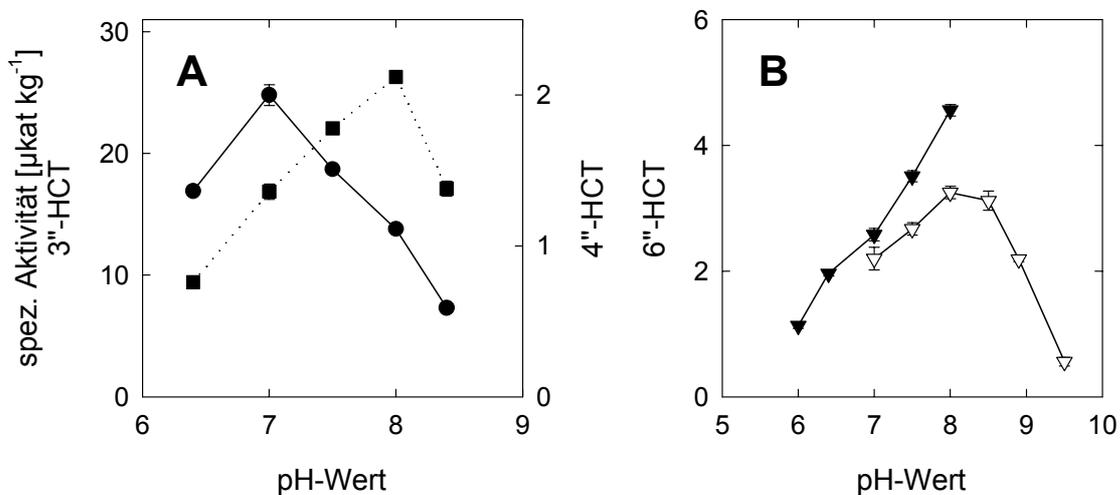


Abb. 3.36: Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von dem pH-Wert.

A: 3''-HCT: ●, 4''-HCT: ■; B: 6''-HCT: 100 mM NaPi: ▼, 50 mM Tris/HCl: ▽. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 3).

3.7.5 Apparentes Molekulargewicht der nativen Enzyme

3''- und 4''-HCT

Das native Molekulargewicht (MG) der Enzyme wurde für die 3''- und die 4''-HCT in einem FPLC-Lauf mit einer Superose 6-Säule bestimmt. Dafür wurde eine Enzympräparation nach Chromatographie an Q-Sepharose (P2) verwendet. Die Säule wurde vor dem Auftrag der Enzympräparation mit fünf Proteinen bekannten Molekulargewichts durch die Bestimmung des Elutionsvolumens V_e von jedem Protein geeicht. Das Ausschlussvolumen V_0 der Säule wurde mit Dextranblau bestimmt. Anschließend an die Eichung wurde die Chromatographie mit den HCT's durchgeführt und die Enzymaktivität der Fraktionen bestimmt. In Tab. 3.7 und Abb. 3.38 sind die Ergebnisse gezeigt. Mit dem Elutionsvolumen der Fraktion mit höchster Aktivität konnte anhand der Regressionsgeraden das Molekulargewicht bestimmt werden (Abb. 3.37). Für die 3''-HCT ergab sich so ein M_r von 46.6 +/- 2 kDa und für die 4''-HCT von 34.8 +/- 3 kDa.

Tab. 3.7: Ergebnis der Eichung zur Ermittlung von V_e/V_0 für die Regressionsanalyse.

Für die 3''- und die 4''-HCT sind die gemessenen Elutionsvolumina der Fraktionen mit der höchsten Aktivität, die daraus resultierenden V_e/V_0 -Werte und die aus der Regression (siehe Abb. 3.37) berechneten Molekulargewichte angegeben.

	MG [kDa]	V_0 [ml]	V_e [ml]	V_e/V_0
Dextranblau		8.675		
Cytochrome C	12.4		18.01	2.076
Carbo-Anhydrase	29		17.37	2.002
Albumin	66		16.03	1.848
Alcohol-Dehydrogenase	150		15.43	1.779
β -Amylase	200		14.75	1.700
3''-HCT	48.7-44.6		16.55 +/- 0.1	1.907-1.919
4''-HCT	37.7-31.9		16.95 +/- 0.1	1.942-1.965

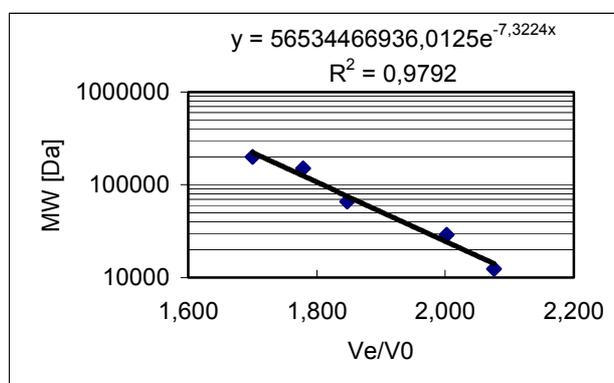


Abb. 3.37: Ermittlung der Regressionsgeraden mit Hilfe der Eichproteine zur Berechnung von M_r der 3''- und der 4''-HCT.

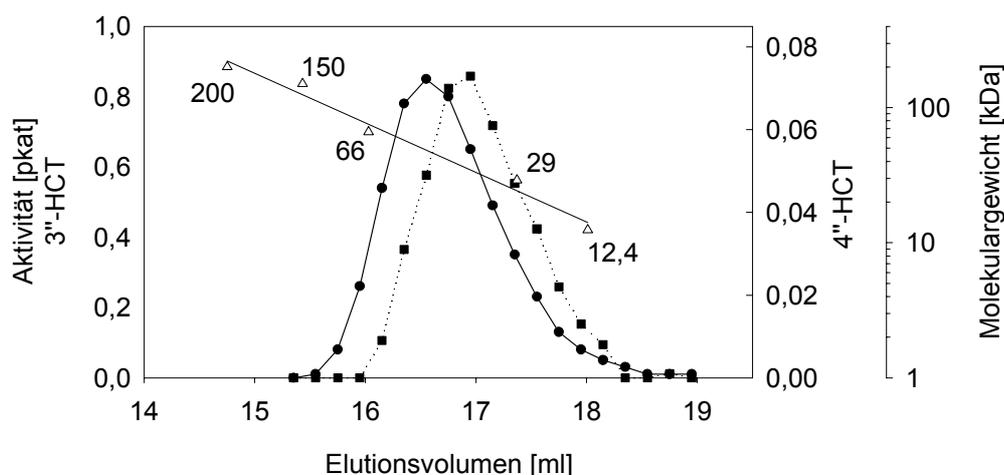


Abb. 3.38: Aktivitätsverlauf und Eichgerade zur Molekulargewichtsbestimmung der 3''-HCT (●) und der 4''-HCT (■) mit einer Superose 6-Säule.

Die Aktivitätsmaxima der beiden HCT sind deutlich versetzt. Für die 3''-HCT konnte ein Molekulargewicht von 46.6 ± 2 kDa und für die 4''-HCT von 34.8 ± 3 kDa ermittelt werden.

6''-HCT

Für die Ermittlung von MG der 6''-HCT wurde ebenso vorgegangen wie für die beiden anderen HCT. Als Extrakt diente ebenfalls eine Proteinpräparation nach Q-Sepharose (DL), die vor Auftragen auf die Säule konzentriert wurde. Tab. 3.8 und die Abbildung 3.39 zeigen die Ergebnisse der Eichung und der Regressionsanalyse. Wie in Abb. 3.40 zu erkennen ist, wurde das Maximum der 6''-HCT-Aktivität sehr spät bei einem Elutionsvolumen von 18.68 ml detektiert, was einem sehr geringen Molekulargewicht von 9.1 kDa entsprach.

Tab. 3.8: Ergebnis der Eichung zur Ermittlung von V_e/V_0 für die Regressionsanalyse.

Für die 6''-HCT ist das Elutionsvolumen der Fraktion mit der höchsten Aktivität, die daraus resultierenden V_e/V_0 -Werte und das aus der Regression (siehe Abb. 3.39) berechnete Molekulargewicht angegeben.

	MG [kDa]	V_0 [ml]	V_e [ml]	V_e/V_0
Dextranblau		8,21		
Cytochrome C	12.4		18,10	2.205
Carbo-Anhydrase	29		17,52	2.134
Albumin	66		16,22	1.976
Alcohol-Dehydrogenase	150		15,53	1.892
β -Amylase	200		14,84	1.808
6''-HCT	9.8-8.3		18.68 \pm 0.1	2.263-2.287

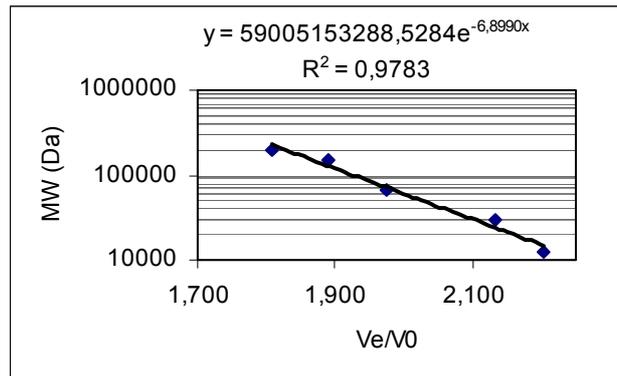


Abb. 3.39: Ermittlung der Regressionsgeraden mit Hilfe der Eichproteine zur Berechnung von MG der 6''-HCT

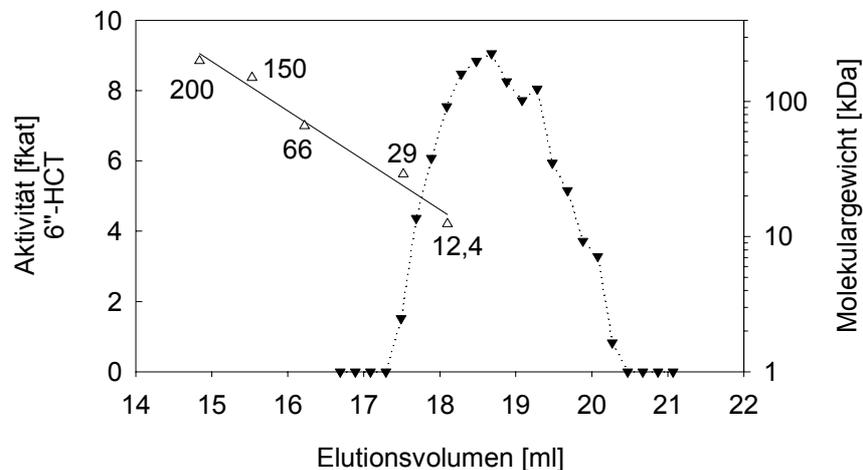


Abb. 3.40: Aktivitätsverlauf und Eichgerade zur Molekulargewichtsbestimmung der 6''-HCT (▼) mit einer Superose 6-Säule.
Für die 6''-HCT konnte ein Molekulargewicht von 9.1 +/- 1 kDa ermittelt werden.

3.7.6 Isoelektrischer Punkt

Der isoelektrische Punkt, pI oder IEP, wurde durch Chromatographie mit einer MonoP-Säule ermittelt (Chromatofokussierung).

3''-HCT und 4''-HCT

Für die Ermittlung des pI-Werts der 3''-HCT wurden zwei Läufe mit verschiedenen pH-Gradienten durchgeführt. Für den ersten Lauf wurde ein breiter pH-Gradient zwischen pH 4 und 7.4 gewählt (Abb. 3.41), anschließend wurde ein schmaler pH-Gradient zwischen 4 und 5.2 verwendet, der auch für die Proteinreinigung benutzt wurde. Der zweite Lauf ist aus diesem Grund unter 3.8.6 dargestellt.

Bei beiden Läufen eluierte die maximale Aktivität in einem Peak bei einem pH-Wert von 4.7. Außerdem waren jeweils eine Schulter, in Abb. 3.41 weniger ausgeprägt als in Abb. 3.53, bei einem pH-Wert von 4.5 zu erkennen. Diese Schulter deutete auf das Vorhandensein eines Isoenzym mit einem geringfügig niedrigeren pI-Wert hin. Der pI-Wert der 3''-HCT betrug demnach 4.7.

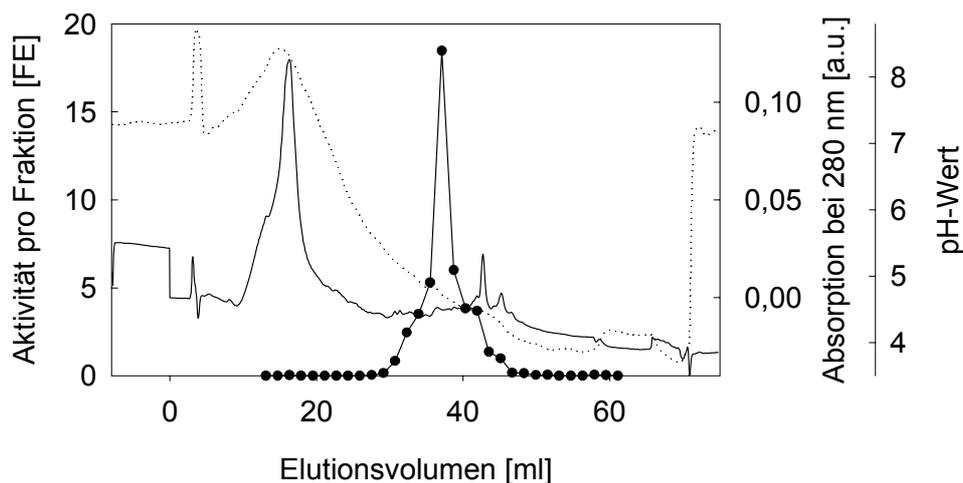


Abb. 3.41: Chromatofokussierung der 3''-HCT mit Mono P, breiter pH-Gradient von 7.4 bis 4.0. Auf die Säule wurde ein Proteinextrakt nach nativer Elektrophorese aufgetragen, die Aktivität ist in Flächeneinheiten (FE) angegeben (●). Außerdem ist die Absorption bei 280 nm (durchgezogen) und der pH-Verlauf (gepunktet) gezeigt.

Der pI-Wert der 4''-HCT wurde anhand des in Abb. 3.53 dargestellten Laufs ermittelt. Dort verlief das Aktivitätsprofil parallel zur 3''-HCT, sodass der 4''-HCT der gleiche pI-Wert von 4.7 zugeordnet wurde.

6''-HCT

Zur Bestimmung des pI-Werts der 6''-HCT wurde eine Proteinpräparation eingesetzt, die mittels Q-Sepharose und Reactive Brown 10 angereinigt war. Da in einem Vorversuch festgestellt wurde, dass die 6''-HCT unter den gleichen Bedingungen wie die 3''-HCT (pH 7.4) nicht an die Säulenmatrix der MonoP-Säule bindet, wurde ein Gradient in einem höheren pH-Bereich (9.5 bis 6.0) gewählt. Unter diesen Bedingungen war es möglich, die 6''-HCT zu binden und mit einem pH-Gradienten zu eluieren. Der Aktivitätstest der Fraktionen ergab zwei Peaks bei pH-Werten von 7.92 und 7.68 (Abb. 3.42). Dieses Ergebnis deutet ebenfalls auf Isoenzyme mit pI-Werten von 7.9 und 7.7 hin.

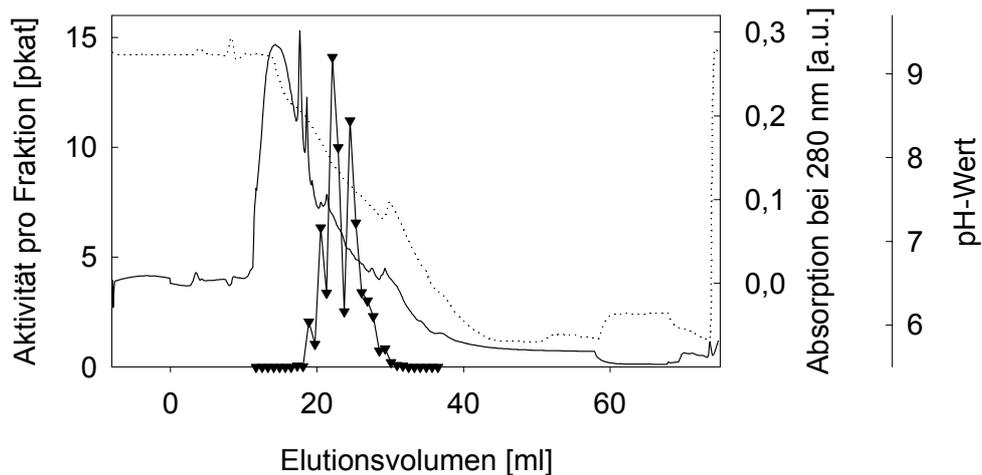


Abb. 3.42: Chromatofokussierung der 6''-HCT mit Mono P, pH-Gradient von 9.5 bis 6.0.

Aufgetragen wurde ein angereinigter Proteinextrakt nach Q-Sepharose und Reactive Brown 10. Dargestellt sind die Aktivität der Fraktionen (▼), die Absorption bei 280 nm (durchgezogen) und der pH-Verlaufs (gepunktet).

3.7.7 Einfluß von divalenten Kationen und Inhibitoren auf die Enzymaktivität

Zur Charakterisierung der Enzymaktivitäten der HCT's wurde der Einfluss von divalenten Kationen, Schwermetallen und einigen Enzyminhibitoren untersucht. Kenntnis über die Wirkung von NaCl, EDTA und PMSF auf die Aktivität war auch für die Proteinreinigung wichtig, da diese Verbindungen in bestimmten Schritten eingesetzt werden mussten.

Tab. 3.9 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Es ist zu erkennen, dass die 3''- und die 4''-HCT sich ähnlich verhielten. Sie wurden durch die zweiwertigen Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} in geringem Umfang gehemmt (13 bis 32 % Hemmung). Damit stimmt auch überein, dass EDTA keinen hemmenden Einfluss hatte. Bei der Wirkung von Schwermetallen unterschieden sich jedoch die beiden Transferasen. Die 3''-HCT wurde durch Hg^{2+} und Cu^{2+} praktisch vollständig gehemmt, demgegenüber hatte die 4''-HCT bei 1 mM Cu^{2+} noch 42 % der ursprünglichen Aktivität. Ein Unterschied war auch bei der Wirkung des Proteinase-Inhibitors PMSF festzustellen. Die Wirkung auf die 3''-HCT war vernachlässigbar, während die 4''-HCT stark gehemmt wurde (70 % Hemmung). Reduzierende Agentien wie β -Mercaptoethanol und DTE hatten einen leicht hemmenden Einfluss auf die Enzymaktivität (9 bis 23 % Hemmung), dagegen hatten Sulfhydryl-reaktive Verbindungen wie N-Methylmaleimid und Iodacetamid keinen Effekt.

Die Inhibition durch CoA wurde getestet, um die Möglichkeit einer Reinigung mit Affinitätschromatographie zu untersuchen. Eine starke Inhibition deutet auf eine Bindung des Enzyms an den Inhibitor, wobei dieser Effekt für eine Bindung an immobilisiertes CoA, das kommerziell erhältlich ist, genutzt werden kann. Alle drei HCT's wurden durch CoA

gehemmt, die 3''- und die 4''-HCT weniger stark (58 bzw. 56 % Hemmung), die 6''-HCT wesentlich stärker (81 % Hemmung). Weitergehende Experimente mit immobilisierten CoA führten allerdings nicht zum gewünschten Erfolg (siehe 3.8.4).

Die 6''-HCT verhielt sich teilweise anders als die beiden anderen HCT's. So hatten Ca^{2+} und Mg^{2+} , aber auch Na^+ einen fördernden Effekt auf die Enzymaktivität, im Gegensatz dazu zeigte EDTA aber keine Hemmung. Die Wirkung von Schwermetallen auf die 6''-HCT war vergleichbar mit der auf die 3''-HCT, da die Aktivität vollständig gehemmt wurde. PMSF hatte dagegen in der eingesetzten Konzentration keine Wirkung auf die 6''-HCT, reduzierende Agentien hemmten leicht (DTE: 12 % Hemmung) und Sulfhydryl-alkylierende Reagentien hatten ebenfalls nur eine sehr geringe Wirkung (N-Methylmaleimid: 13 % Hemmung).

Tab. 3.9: Wirkung von divalenten Kationen und Enzyminhibitoren auf die Aktivität der HCT's, angegeben als relative Aktivität [%] (Mittelwerte aus drei Messungen).
Die Aktivität der 3''-HCT mit DTE konnte nicht gemessen werden, da der Produktpeak in der HPLC wegen Verunreinigungen nicht quantifiziert werden konnte.

	Konzentration [mM]	3''-HCT	4''-HCT	6''-HCT
		% der Kontrollaktivität		
Kontrolle	-	100	100	100
NaCl	10	96	94	111
CaCl_2	10	87	77	123
MgCl_2	10	77	68	120
HgCl_2	1	0	0	0
CuCl_2	1	3	42	0
EDTA	5	97	97	104
PMSF	1	82	30	104
β -Mercaptoethanol	5	86	91	56
DTE	5	-	77	88
N-Methylmaleimid	1	100	97	87
Jodacetamid	1	100	96	105
CoA	1	42	44	19

3.7.8 Substratabhängigkeit

Die Untersuchungen zur Substratabhängigkeit wurden mit den potentiell natürlichen Substraten der 3''- und 6''-HCT durchgeführt. Dafür wurden die Donorsubstrate Cumaroyl-CoA und Feruloyl-CoA und die Akzeptorsubstrate Kämpferol 3-glukosid, Tilirosid und 3''-(*p*-Cumaroyl)-kämpferol 3-glukosid verwendet, deren diacylierte Metabolite aus der Strukturklärung der UV-B-Schutzpigmente bekannt waren (Jungblut *et al.* 1995). Von diesen Substraten wurden die kinetischen Parameter K_m und V_{max} ermittelt (siehe z. B. in Bisswanger 1994).

Diese K_m -Bestimmung wurde in angereinigten Extrakten (Q-Sepharose DL und P2) durchgeführt, da im Rohextrakt sowohl die monoacylierten als auch das diacylierte Produkt gebildet wurden. Durch die Bildung der monoacylierten Produkte während der Inkubationszeit des Enzymtests standen der jeweils anderen HCT neben dem nichtacylierten Substrat diese als potentiell zweites Substrat zu Verfügung. Aufgrund dieser Konkurrenzsituation war die K_m -Bestimmung im Rohextrakt nicht möglich.

3.7.8.1 Donorsubstrate

3''-HCT

Die 3''-HCT setzte Cumaroyl-CoA sowohl mit K3G als auch mit Tilirosid um (Abb. 3.43). Dabei wurde für K3G mit 39 μM ein höherer K_m -Wert ermittelt als für Tilirosid (24 μM). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug mit K3G 24 $\mu\text{kat kg}^{-1}$, mit Tilirosid 28 $\mu\text{kat kg}^{-1}$.

Ebenso wie Cumaroyl-CoA wurde auch Feruloyl-CoA mit beiden getesteten Akzeptorsubstraten K3G und Tilirosid umgesetzt (Abb. 3.44). Hier waren die K_m -Werte mit 55 μM bzw. 115 μM wesentlich höher und die Reaktionsgeschwindigkeiten mit 9 $\mu\text{kat kg}^{-1}$ bzw. 18 $\mu\text{kat kg}^{-1}$ geringer, was auf eine geringere Affinität als der 3''-HCT gegenüber Feruloyl-CoA als auf Cumaroyl-CoA deutet.

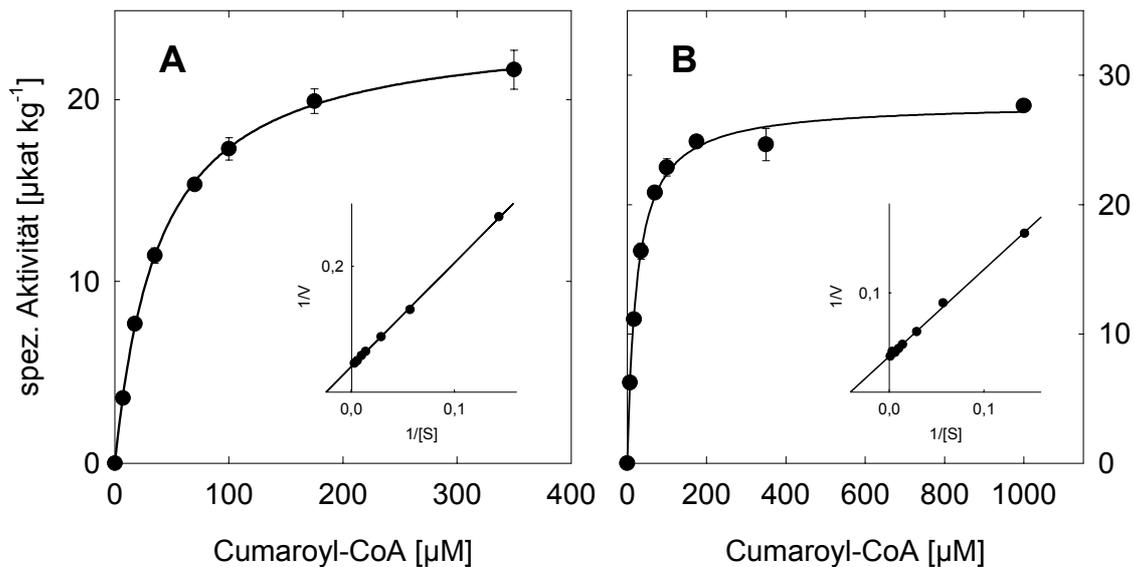


Abb. 3.43: Abhängigkeit der 3''-HCT-Aktivität von Cumaroyl-CoA.

A: Akzeptorsubstrat Kämpferol 3-glucosid, B: Akzeptorsubstrat Tilirosid. In das Michaelis-Menten-Diagramm ist die doppelt-reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk eingefügt. Der K_m -Wert für Cumaroyl-CoA mit dem zweiten Substrat K3G betrug 39 μM bei einer V_{max} von 24 $\mu\text{kat kg}^{-1}$, mit dem zweiten Substrat Tilirosid wurde ein K_m -Wert von 24 μM bei einer V_{max} von 28 $\mu\text{kat kg}^{-1}$ ermittelt.

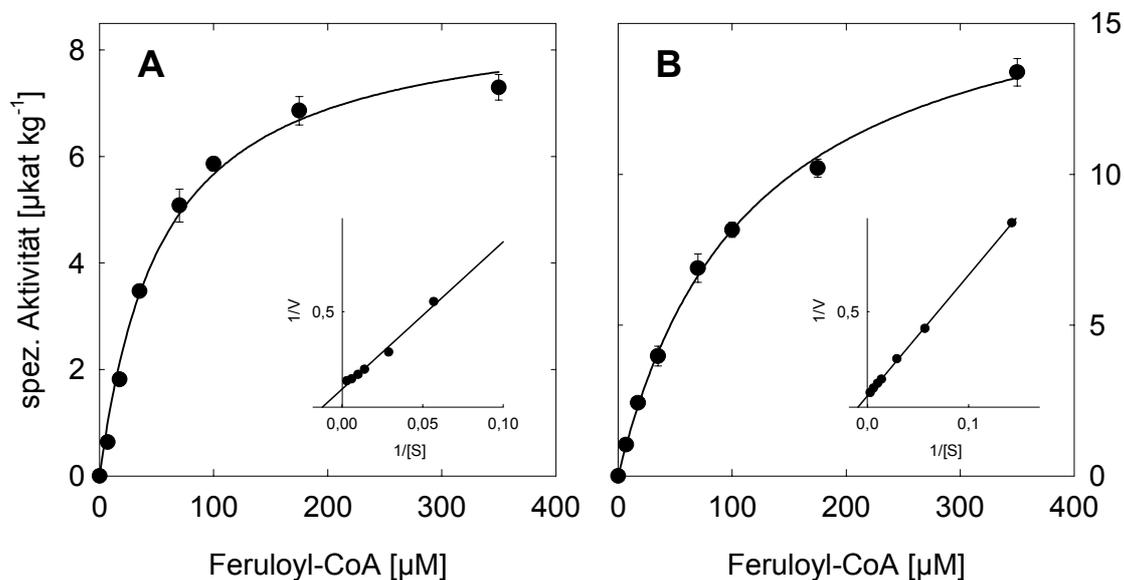


Abb. 3.44: Abhängigkeit der 3''-HCT-Aktivität von Feruloyl-CoA.

A: Akzeptorsubstrat Kämpferol 3-glucosid, B: Akzeptorsubstrat Tilirosid. In das Michaelis-Menten-Diagramm ist die doppelt-reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk eingefügt. Der K_m -Wert für Feruloyl-CoA mit dem zweiten Substrat K3G betrug 55 μM bei einer V_{max} von 9 $\mu\text{kat kg}^{-1}$, mit dem zweiten Substrat Tilirosid wurde ein K_m -Wert von 115 μM bei einer V_{max} von 18 $\mu\text{kat kg}^{-1}$ ermittelt.

6''-HCT

Die Bestimmung von K_m und V_{max} für die 6''-HCT wurde mit K3G durchgeführt. Bei Enzymtests, bei denen enzymatisch synthetisiertes 3''-(*p*-Cumaroyl)-kämpferol 3-glukosid als Substrat eingesetzt wurde, konnte kein diacyliertes Produkt nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigte, dass die 6''-HCT in dem Q-Sepharose DL-Extrakt nur das nichtacylierte, nicht aber das an 3''-Position monoacylierte Kämpferol 3-glukosid umsetzen konnte. Ein wichtiger Hinweis auf die Reihenfolge der Schritte bei der Acylierung der Flavonolglukoside in der Pflanze.

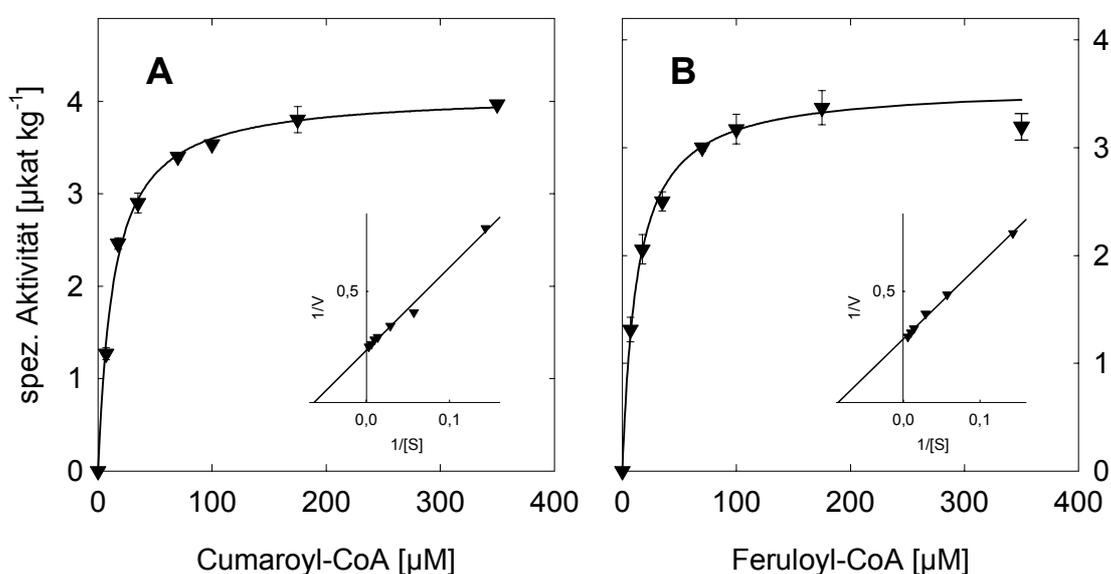


Abb. 3.45: Abhängigkeit der 6''-HCT-Aktivität von Cumaroyl- (A) und Feruloyl-CoA (B).

Akzeptorsubstrat Kämpferol 3-glukosid. In das Michaelis-Menten-Diagramm ist die doppelt-reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk eingefügt. Der K_m -Wert für Cumaroyl-CoA betrug $14 \mu\text{M}$ bei einer V_{max} von $4 \mu\text{kat kg}^{-1}$, für Feruloyl-CoA wurden $13 \mu\text{M}$ bei $4 \mu\text{kat kg}^{-1}$ ermittelt.

Für die 6''-HCT konnte für beide Donorsubstrate, Cumaroyl-CoA und Feruloyl-CoA, ein K_m -Wert von 14 bzw. $13 \mu\text{M}$ ermittelt werden, der damit in der gleichen Größenordnung lag. Die gemessenen V_{max} -Werte waren mit jeweils $4 \mu\text{kat kg}^{-1}$ identisch (Abb. 3.45). In Tab. 3.10 sind die kinetischen Daten für die beiden HCT's zusammengefasst. Aus den Daten geht hervor, dass die 3''-HCT eine wesentlich geringere Affinität zu Feruloyl-CoA als zu Cumaroyl-CoA hat. Dies stimmt mit dem Befund überein, dass in der Kiefernnadel keine an 3''-Position mit Ferulasäure acylierten Metabolite gefunden wurden. Diesen Unterschied gibt es bei der 6''-HCT nicht, hier sind die kinetischen Parameter für beide Donorsubstrate praktisch identisch. Dementsprechend werden auch beide Säuren als Acylgruppen an 6''-Position bei den diacylierten Metaboliten in der Nadel gefunden.

Tab. 3.10: Kinetische Parameter der 3''- und der 6''-HCT für Cumaroyl- und Feruloyl-CoA.

Da das 3''-(*p*-Cumaroyl)-kämpferol 3-glukosid (3''-Mono) von der 6''-HCT nicht umgesetzt wurde, konnten damit keine kinetischen Parameter ermittelt werden.

Enzym	variiertes Substrat	fixes Substrat (100 μM)	K_m -Wert	V_{\max}	V_{\max}/K_m
			[μM]	[$\mu\text{kat kg}^{-1}$]	[%]
3''-HCT	Cumaroyl-CoA	K3G	39	24	53
		Tilirosid	24	28	100
	Feruloyl-CoA	K3G	55	9	14
		Tilirosid	115	18	14
6''-HCT	Cumaroyl-CoA	K3G	14	4	94
		3''-Mono	-	-	-
	Feruloyl-CoA	K3G	13	4	100
		3''-Mono	-	-	-

3.7.8.2 Akzeptorsubstrate

Die Abhängigkeit der HCT's von den Akzeptorsubstraten wurde für die 3''-HCT mit Kämpferol 3-glukosid und Tilirosid, für die 6''-HCT mit K3G ermittelt (kein Umsatz des 3''-(*p*-Cumaroyl)-kämpferol 3-glukosid, siehe oben). Als Donorsubstrat wurde jeweils Cumaroyl-CoA eingesetzt.

3''-HCT

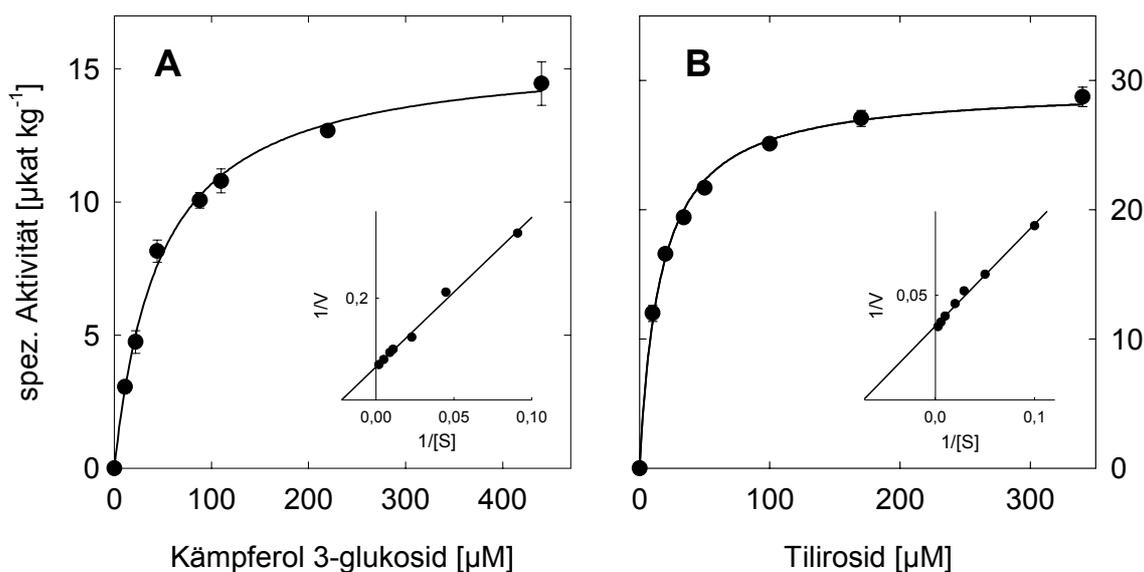


Abb. 3.46: Abhängigkeit der 3''-HCT-Aktivität von Kämpferol 3-glukosid (A) und Tilirosid (B).

Als Donorsubstrat wurde Cumaroyl-CoA eingesetzt. In das Michaelis-Menten-Diagramm ist die doppelt-reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk eingefügt. Der K_m -Wert für K3G betrug 47 μM bei einer V_{\max} von 16 $\mu\text{kat kg}^{-1}$, für Tilirosid wurde ein K_m -Wert von 16 μM bei einer V_{\max} von 29 $\mu\text{kat kg}^{-1}$ ermittelt.

Der K_m -Wert der 3''-HCT für K3G war mit $47 \mu\text{M}$ dreimal so hoch wie für Tilirosid mit $16 \mu\text{M}$ (Abb. 3.46). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die 3''-HCT das monoacylierte Substrat gegenüber dem nichtacylierten bevorzugt und eine bestimmte Reihenfolge der Acylierung *in planta*, erst an 6''-Position, dann an 3''-Position, anzunehmen ist.

6''-HCT

Bei der Ermittlung von K_m -Wert und V_{\max} der 6''-HCT für K3G zeigte sich eine Hemmung bei Konzentrationen über $150 \mu\text{M}$, da hier die spezifische Aktivität stark abnahm (Abb. 3.47). Als Grund für die Hemmung der Enzymaktivität kommt eine Substrathemmung in Frage. Die Werte für $220 \mu\text{M}$ und $440 \mu\text{M}$ wurden daher nicht in die Berechnung der kinetischen Parameter einbezogen. Der so ermittelte K_m -Wert war mit $22 \mu\text{M}$ in der gleichen Größenordnung wie der K_m -Wert der 3''-HCT für Tilirosid. V_{\max} zeigt mit $2.2 \mu\text{kat kg}^{-1}$ allerdings einen niedrigeren Wert als V_{\max} für Cumaroyl-CoA mit $4 \mu\text{kat kg}^{-1}$. Dieser Unterschied deutet auf eine Unterschätzung des Wertes für K3G hin, die durch die fehlenden Werte bei höheren Konzentrationen zustande kommt.

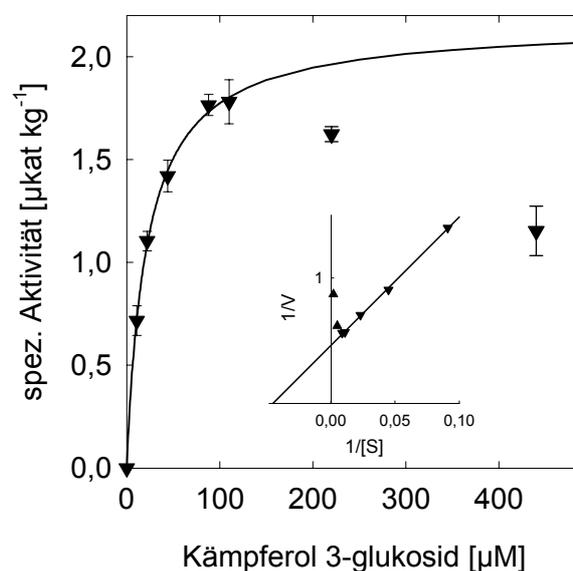


Abb. 3.47: Abhängigkeit der 6''-HCT-Aktivität von Kämpferol 3-glukosid.

Als Donorsubstrat wurde Cumaroyl-CoA eingesetzt. In das Michaelis-Menten-Diagramm ist die doppelt-reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk eingefügt. Der K_m -Wert betrug $22 \mu\text{M}$ bei einer V_{\max} von $2.2 \mu\text{kat kg}^{-1}$, wobei die Berechnung der Regression unter Ausschluss der Werte bei 220 und $440 \mu\text{M}$ erfolgte.

Die kinetischen Parameter für die Akzeptorsubstrate sind auch hier noch einmal in Tab. 3.11 zusammengefasst. Neben den schon erwähnten ähnlichen K_m -Werten der 3''-HCT für Tilirosid und der 6''-HCT für K3G fällt die ca. zehnfach geringere V_{max} der 6''-HCT gegenüber der 3''-HCT auf. Diese wird zwar offenbar durch die Hemmung bei höheren Konzentrationen bei der Berechnung unterschätzt, wie auch der Blick auf eine V_{max} von $4 \mu\text{kat kg}^{-1}$ von Cumaroyl-CoA mit dem fixen Akzeptorsubstrat K3G zeigt, liegt aber trotzdem deutlich unter den Werten der 3''-HCT für beide Akzeptorsubstrate.

Tab. 3.11: Kinetische Parameter der 3''- und 6''-HCT für die Akzeptorsubstrate Kämpferol 3-glukosid und Tilirosid.

Da das 3''-(p-Cumaroyl)-kämpferol 3-glukosid (3''-Mono) von der 6''-HCT nicht umgesetzt wurde, konnten damit keine kinetischen Parameter ermittelt werden.

Enzym	variiertes Substrat	fixes Substrat (100 μM)	K_m -Wert [μM]	V_{max} [$\mu\text{kat kg}^{-1}$]	V_{max}/K_m [%]
3''-HCT	K3G	Cumaroyl-CoA	47	16	19
	Tilirosid	Cumaroyl-CoA	16	29	100
6''-HCT	K3G	Cumaroyl-CoA	22	2.2	
	3''-Mono	Cumaroyl-CoA	-	-	

Die ermittelten K_m -Werte für die 3''-HCT für Tilirosid und für die 6''-HCT für K3G zeigen darüberhinaus, dass der Standardenzymtest mit einer Substratkonzentration von $100 \mu\text{M}$ in Sättigung durchgeführt wurde (Tab. 3.12).

Tab. 3.12: Vergleich des K_m -Werts mit der im Standardenzymtest eingesetzten Konzentration.

Enzym	Substrat	K_m -Wert [μM]	-fach Konz. Enzymtest (100 μM)
3''-HCT	Cumaroyl-CoA	24	4.2
	Tilirosid	16	6.3
6''-HCT	Cumaroyl-CoA	14	7.1
	K3G	22	4.5

3.7.9 Substratspezifität

3.7.9.1 Donorsubstrate

Die nähere Untersuchung der Spezifität von Donorsubstraten erfolgte mit aliphatischen und aromatischen CoA-Estern. Das Ergebnis ist in Tab. 3.13 dargestellt. Neben den Retentionszeiten der Produkte sind deren Diodenarray-Spektren angegeben, um die Veränderung der Spektren des Akzeptorsubstrats durch die Acylierung zu zeigen. Aufgrund der unterschiedlichen Absorptionseigenschaften der verschiedenen Reaktionsprodukte war es nicht möglich diese zu quantifizieren, zumal keine Referenzsubstanzen zur Verfügung standen.

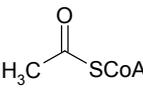
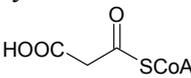
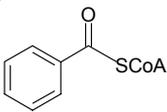
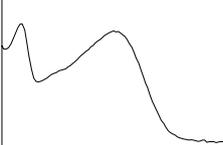
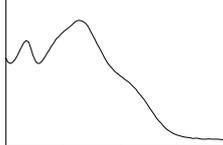
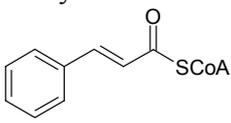
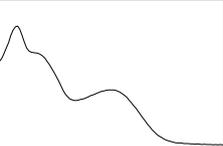
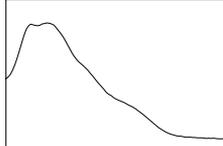
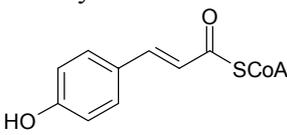
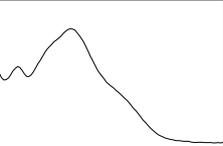
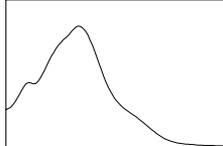
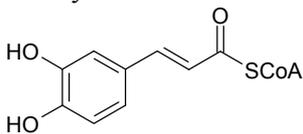
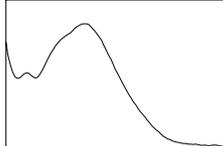
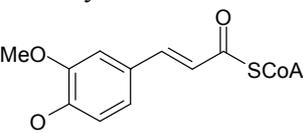
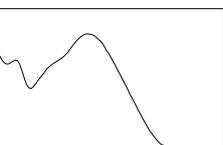
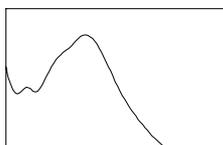
Mit den aliphatischen CoA-Estern Acetyl- und Malonyl-CoA waren keine Produkte im Enzymtest nachweisbar. Die aromatischen CoA-Ester wurden als Donorsubstrate akzeptiert, es konnten mit K3G als Akzeptorsubstrat jeweils zwei Produkte nachgewiesen werden, mit Tilirosid eines. Die Produkte lassen sich nach zunehmender Lipophilie (= zunehmende Retentionszeit) reihen: Caffeoyle- (16.5/19.2/22.6), Cumaroyl- (18.1/21.1/23.2), Feruloyl- (18.3/21.3/23.4), Benzoyl- (19.6/22.2/24.0), Cinnamoyl-Rest (21.7/23.2/24.6). Die beobachtete Polarität der Produkte stimmte mit der zu erwartenden Polarität aufgrund des Acylsubstituenten überein.

Die Diodenarray-Spektren zeigen die Veränderung durch die Acylierung. Bei der Benzoylierung ist kein Unterschied des Spektrums der Produkte gegenüber dem Akzeptorsubstrat zu erkennen, da das Absorptionsmaximum der Benzoylgruppe unterhalb von 250 nm liegt. Bei der Acylierung mit Zimtsäure zeigt das Produkt eine Schulter bei 282 nm, um 4 nm gegenüber dem Maximum der freien Zimtsäure (278 nm) verschoben. Bei den Hydroxyzimtsäuren dagegen dominiert der Acylrest im Absorptionsspektrum, sodass das Maximum des Produktspektrums jeweils dem der Hydroxyzimtsäure, jedoch um 4 -5 nm zu höherer Wellenlänge verschoben, entspricht.

Das Vorhandensein von zwei monoacylierten Produkten bei dem Akzeptorsubstrat K3G ist ein Hinweis darauf, dass sowohl die 3''- als auch die 6''-HCT die aromatischen CoA-Ester als Substrate akzeptieren. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Produkte mit der geringeren Retentionszeit in einem 6''-HCT-Extrakt synthetisiert werden und in einem 3''-HCT-Extrakt mit dem Substrat Tilirosid diacylierte Produkte entstehen.

Tab. 3.13: Produkte des Enzymtests mit verschiedenen Donorsubstraten.

Neben den Retentionszeiten (Rt) sind die Diodenarray-Spektren (250-450 nm) gezeigt. Zum Vergleich sind die DA-Spektren der Akzeptorsubstrate gegenüber gestellt.

Donorsubstrat	Akzeptorsubstrat			
	Kämpferol 3-glukosid	Tilirosid		
Acetyl-CoA 	---	---	---	---
Malonyl-CoA 	---	---	---	---
Benzoyl-CoA 	19.6 22.2		24.0	
Cinnamoyl-CoA 	21.7 23.2		24.6	
Cumaroyl-CoA 	18.1 20.1 21.1		23.2	
Caffeoyl-CoA 	16.5 19.3		22.6	
Feruloyl-CoA 	18.3 21.3		23.4	

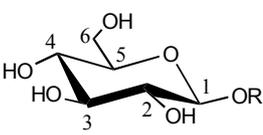
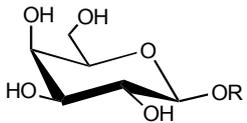
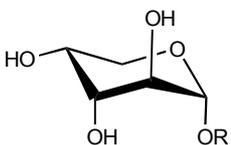
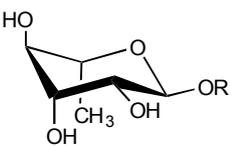
3.7.9.2 Akzeptorsubstrate

Die Spezifität der HCT's in Bezug auf das Akzeptorsubstrat wurde mit verschiedenen Flavonolglukosiden (Kämpferol-, Isorhamnetin- und Quercetin 3-glukosid) und mit verschiedenen Zuckerresten (Quercetin 3-glukosid, -galaktosid, -arabinosid und -rhamnosid) getestet. In Tab. 3.14 sind die Ergebnisse gezeigt. Die Enzymaktivitäten sind relativ zur höchsten Aktivität angegeben. Die 3''-HCT hat die höchste Aktivität mit Kämpferol und mit Isorhamnetin als Flavonolanteil, die Aktivität mit Quercetin ist wesentlich geringer (67 %). Im Gegensatz dazu hat die 6''-HCT die höchste Aktivität mit Quercetin als Flavonolanteil. Die Polarität des B-Rings ist offenbar ein entscheidendes Merkmal zur Bindung des Enzyms an das Substrat. Die 3''-HCT benötigt danach eine geringere Polarität, die 6''-HCT eine größere Polarität an dieser Position für maximale Aktivität.

Wird der Glukosidsubstituent des Akzeptorsubstrats gegen nicht in der Kiefer gefundene Zuckerreste ersetzt, kommt es zu einer drastischen Reduktion der Aktivität. Schon die veränderte Position der Hydroxylgruppe an 4''-Position des Zuckers (Glukosid → Galaktosid) führt bei der 3''-HCT zu einer Verringerung der Aktivität um 82 %, bei der 6''-HCT noch um 48 %. Erstaunlich ist die relativ hohe Aktivität der 3''-HCT mit dem Arabinosid (15 %) im Vergleich zum Galaktosid, ist doch die Position der 3''-Hydroxylgruppe axial statt äquatorial. Dass die 6''-HCT weder Arabinosid noch Rhamnosid acylieren kann, liegt jedoch an der fehlenden Hydroxylgruppe an 6''-Position. Die 3''-HCT kann ebenfalls Rhamnosid nicht umsetzen. Hier könnte der Grund in einer sterischen Hinderung durch die axial liegende Methylgruppe liegen, die zudem auch noch unpolarer als die Hydroxylgruppe an 6''-Position des Glukosids ist.

Neben den Flavonol 3-glykosiden wurden auch noch ein Isoflavon (Genistein 7-glukosid = Genistin), ein Flavon (Apigenin 7-glukosid = Cosmosiin), ein Flavanon (Naringenin 7-glukosid) und drei Anthocyane (Cyanidin 3-glukosid = Kuromanin, Cyanidin 3,5-di-glukosid = Cyanin und Cyanidin 3,2''-di-glukosid) als natürlich vorkommende phenolische Akzeptorsubstrate und einige xenobiotische phenolische Glukoside (Phenyl-, 4-Nitrophenyl-, Methylumbelliferyl-, Umbelliferyl- und 6-Bromo-2-naphthylglukosid) getestet. Bei keiner dieser Verbindungen konnten acylierte Produkte nachgewiesen werden.

Tab. 3.14: Relative Aktivität der 3''-HCT und der 6''-HCT mit verschiedenen Akzeptorsubstraten. Angegeben sind die Aktivitäten in % relativ zur höchsten Aktivität (K3G für die 3''-HCT, Q3G für die 6''-HCT bei verschiedenen Flavonolresten, bei Variation des Zuckerrests bei beiden Enzymen Q3G). Die Konzentration der Substrate im Enzymtest war 100 μ M.

Flavonol	Substituent in 3'-Position	3''-HCT	6''-HCT
		relative Aktivität [%]	
Kämpferolglukosid	-H	100	59
Isorhamnetinglukosid	-OMe	101	52
Quercetinglukosid	-OH	67	100
Zuckerrest	Konformation		
Q- β -D-glukopyranosid (Isoquercitrin)		100	100
Q- β -D-galaktopyranosid (Hyperosid)		18	52
Q- α -D-arabinopyranosid		15	0
Q- α -L-rhamnopyranosid (Quercitrin)		0	0

3.8 Reinigung der 3''-HCT

3.8.1 Aufschluss der Kiefernadeln

Der Aufschluss von insgesamt ca. 1700 g (FG) lyophilisierter Nadeln aus dem Freiland, die in den Monaten Mai und Juni geerntet wurden, führte zu einem Rohextrakt mit dem Gesamtvolumen von ca. 11.7 Liter. Bei einer durchschnittliche Proteinkonzentration von 0.45 mg ml^{-1} betrug die extrahierte Gesamtproteinmenge 5.3 g. Es wurden also ca. 3 mg Gesamtprotein pro g (FG) Nadelmaterial gewonnen. Bei einer spezifischen Aktivität von $17.5 \text{ } \mu\text{kat kg}^{-1}$ wurde danach eine Gesamtaktivität von 93 nkat aus den Nadeln extrahiert.

3.8.2 Ammoniumsulfat-Fällung

Die Ammoniumsulfat-Fällung wurde in einem Bereich zwischen 25 % und 60 % Sättigung durchgeführt. Ein Vorversuch, bei dem eine Fällung in 20 %-Schritten durchgeführt wurde, hatte ergeben, dass die gesamte Enzymaktivität der 3''-HCT in den Fraktionen von 20 % bis 60 % zu finden war. Ein zweites Fällungsexperiment zeigte, dass der Fällungsbereich auf 25 % bis 60 % eingegrenzt werden konnte.

Aufnehmen in Puffer und Entsalzung über Sephadex G-25 ergaben 3.9 g Gesamtprotein in einem Volumen von ca. 3.4 l und einer Proteinkonzentration von 1.16 mg ml^{-1} . Die spezifische Aktivität betrug $19.1 \text{ } \mu\text{kat kg}^{-1}$, die Gesamtaktivität 75.2 nkat. Dies entsprach einer Ausbeute von 81 % bei einer 1.1-fachen Anreicherung.

3.8.3 Anionenaustauscher-Chromatographie an Q-Sepharose ff

Als nächster Schritt nach der Ammoniumsulfat-Fällung wurde eine Chromatographie mit dem Anionenaustauscher Q-Sepharose ff vorgenommen.

In der Literatur ist häufig als zweiter Schritt eine hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC) zu finden, die direkt nach der Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt wird. Dieser Weg erwies sich für die 3''-HCT als nicht gangbar, da das im Aufschlusspuffer vorhandene Polyethylenglykol (PEG 1450) eine Bindung von Protein an die HIC-Matrix verhinderte. Die Anwesenheit von PEG im Aufschlusspuffer war jedoch wichtig, da ohne PEG nur ca. 28 % des Gesamtproteins aus Nadeln im Vergleich zu Puffer mit PEG gewonnen werden konnte. Ein zweiter Nachteil der HIC zeigte sich nach Entfernung des PEG, indem zwar Protein und auch 3''-HCT-Aktivität an die HIC-Matrix gebunden werden konnte, die Enzymaktivität sich jedoch nur mit großen Verlusten eluieren ließ. Daher wurde keine Anreicherung

und bei nur geringer Ausbeute erzielt. Da eine HIC also mit Nachteilen behaftet, wurde auf diesen Schritt verzichtet und nach Ammoniumsulfat-Präzipitation und Entsalzung direkt die Ionenaustauscher-Chromatographie (IEX) durchgeführt.

In Abb. 3.48 ist ein repräsentatives Chromatogramm eines Q-Sepharose-Laufs gezeigt. Man erkennt, dass die 3''-HCT-Aktivität unter den gewählten Bedingungen an das Säulenmaterial bindet und mit einem Salzgradienten in einem Peak in einem Leitfähigkeitsbereich zwischen 12 und 18.5 mS cm⁻¹ eluiert. Der mit P2 markierte Bereich wurde gesammelt und für den nächsten Reinigungsschritt verwendet.

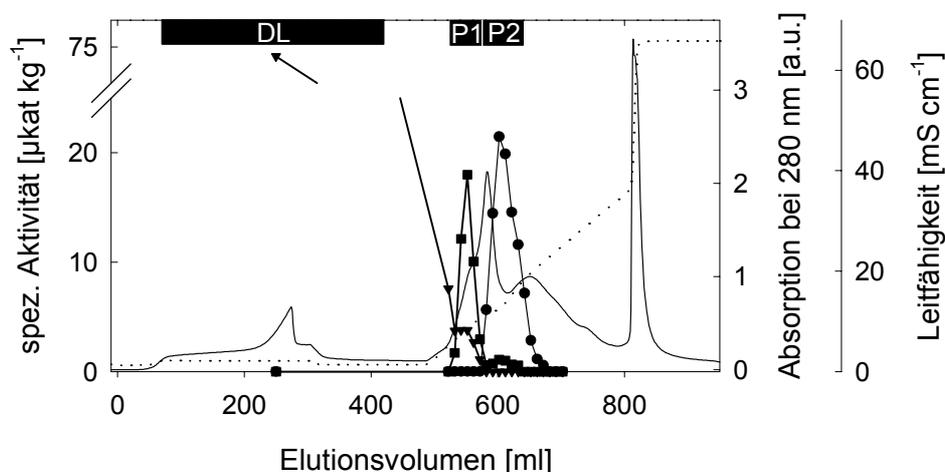


Abb. 3.48: Chromatogramm eines Q-Sepharose-Laufs.

Angegeben sind die spezifische Aktivität der 6''-HCT (▼), der 3''-HCT (●) und der 4''-HCT (■), gemessen mit dem Substrat K3G, die Absorption bei 280 nm (durchgezogene Linie) als Maß für die Proteinkonzentration und die Leitfähigkeit (gepunktete Linie). Die Änderung der Leitfähigkeit wurde durch einen NaCl-Konzentrationsgradienten hervorgerufen. Mit schwarzen Balken sind die Bereiche markiert, die jeweils gesammelt wurden (DL = Durchlauf, P1 = Peak 1, P2 = Peak 2, siehe auch 2.10.4.2). P2 wurde für den nächsten Reinigungsschritt verwendet.

In Abb. 3.49 ist ein SDS-Gel dargestellt, auf das Extrakte der ersten drei Reinigungsschritte aufgetragen wurden. Es waren kaum größere Proteine mit einer Molmasse über 80 kDa im Aufschluss zu finden. Eine prominente Bande bei ca. 52 kDa stellt wahrscheinlich die große Untereinheit der RUBISCO (Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxidase) dar, dem häufigsten Protein in der Pflanzenzelle (Strasburger 1991). Diese Bande wie auch eine weitere wurde bei ca. 36 kDa durch den ersten Chromatographie-Schritt angereichert. Gut zu erkennen ist auch der große Unterschied des Bandenmusters zwischen den drei verschiedenen Q-Sepharose-Fractionen. Dies weist darauf hin, dass die Trennung durch den ersten Chromatographie-Schritt erfolgreich gewesen ist.

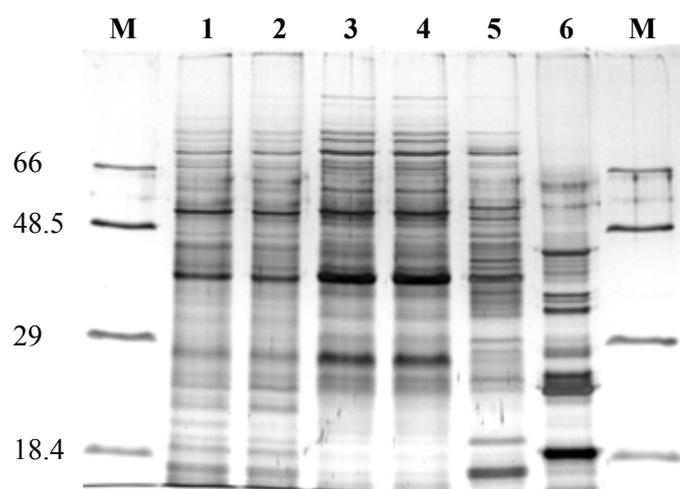


Abb. 3.49: SDS-Gel der ersten drei Reinigungsschritte (Silberfärbung).

M: Marker, links sind die Molmassen der Markerproteine in kDa angegeben. Spur 1: Aufschluss, Spur 2: Ammoniumsulfat-Fällung, Spur 3+4: Q-Sepharose Peak 2 (3''-HCT), Spur 5: Q-Sepharose Peak 1 (4''-HCT), Spur 6: Q-Sepharose DL (6''-HCT). Pro Spur wurden 2.2 bis 2.7 μg Gesamtprotein aufgetragen. In den Spuren 1 bis 4 ist eine Hauptbande bei ca. 52 kDa zu erkennen, bei der es sich wahrscheinlich um die große Untereinheit der RUBISCO handelt.

In Tabelle 3.15 ist die Anreicherung und die Ausbeute der ersten drei Reinigungsschritte gezeigt. Es konnten nach Ammoniumsulfat-Fällung, Entsalzung und Chromatographie an Q-Sepharose noch ca. 43 % der Gesamtaktivität des Rohextrakts bei einer dreifachen Anreicherung wiedergefunden werden.

Tab. 3.15: Anreicherung und Ausbeute der ersten drei Schritte der Reinigung der 3''-HCT.

Reinigungsschritt	Gesamtprotein [mg]	spez. Aktivität [$\mu\text{kat kg}^{-1}$]	Anreicherung	Gesamtaktivität [nkat]	Ausbeute
Aufschluss	5322	17.5		93.0	
Ammoniumsulfat-Fällung	3944	19.1	1.1x	75.2	81%
Q-Sepharose	770	52.2	3.0x	40.2	43%

3.8.4 Chromatographie mit Reactive Brown 10

Für den nächsten Reinigungsschritt wurde ein Farbligandengel gewählt, da Farbligandengele häufig für eine effiziente Proteinreinigung verwendet werden (Clonis *et al.* 1987, Dean & Watson 1979). Die Wirkung von so genannten Pseudo-Affinitätsgelen beruht auf der Nachahmung eines biospezifischen Liganden durch einen immobilisierten Triazin-Farbstoff, wodurch der Farbstoff an die reaktive Stelle des Enzyms binden kann. Triazin-Farbstoffe können insbesondere an Enzyme binden, die mit Nucleotiden oder anderen Heterocyclen interagieren (Atkinson *et al.* 1981). Deswegen eignen sich diese Farbliganden besonders für Enzyme, die Adenyl-Cofaktoren wie NAD⁺ oder NADP⁺ benötigen oder CoA-abhängig sind (Hermanson *et al.* 1992). In letzter Zeit sind einige Hydroxymethylsäure-CoA-abhängige Acyltransferasen mit Farbligandengelen gereinigt worden (Fujiwara *et al.* 1998a, Fujiwara *et al.* 1997, Hohlfeld *et al.* 1996a, Yang *et al.* 1997).

In Vorversuchen sind einige der erhältlichen Farbligandengele auf ihre mögliche Verwendung zur Reinigung der 3''-HCT getestet worden. In Tab. 3.16 sind die Ergebnisse gezeigt; neben den Farbligandengelen ist auch CoA-Agarose als echtes Affinitätsmaterial aufgeführt. Hinweise auf die Eignung der CoA-Agarose zu HCT-Reinigung waren neben dem CoA-Ester als Donorsubstrat auch eine Hemmung der Enzymaktivität durch CoA (siehe 3.8.6).

Tab. 3.16: Bindungsverhalten der 3''-HCT-Aktivität an verschiedene Farbligandengele und CoA-Agarose.

Angegeben ist die Verteilung von Gesamtproteinmenge und Enzymaktivität zwischen Durchlauf und Eluat relativ zum eingesetzten Extrakt sowie die Anreicherung. Die Elution erfolgte jeweils mit 1M NaCl.

	CoA- Agarose	Blue Sephacrose	Matrex Green A	Matrex Orange A	Reactive Brown 10	Reactive Yellow 3	Reactive Yellow 86
Proteinmenge							
Durchlauf	71 %	30 %	40 %	91 %	52 %	78 %	70 %
Eluat	2 %	11 %	14 %	4 %	29 %	6 %	4 %
Aktivität							
Durchlauf	65 %	0 %	0 %	26 %	33 %	105 %	78 %
Eluat	0 %	14 %	18 %	3 %	36 %	0 %	0 %
Anreicherung							
Durchlauf	1.1x	-	-	0.8x	0.6x	1.3x	1.1x
Eluat	-	1.2x	1.3x	0.6x	1.4x	-	-

Es zeigte sich, dass bei CoA-Agarose und den Farbligandengelen Reactive Yellow 3 und 86 die 3''-HCT nicht gebunden hat und auch im Durchlauf nur eine geringe Anreicherung stattgefunden hat. Bei Blue Sepharose und Matrex Green A war die Enzymaktivität jeweils vollständig an die Matrix gebunden, konnte aber nur zu einem geringen Anteil wieder eluiert

werden. Weitere Versuche mit Blue Sepharose zur Steigerung der Ausbeute durch Elution mit 10 mM CoA oder 1 mM Donorsubstrat, führten zu keiner Verbesserung. Auch durch eine Erhöhung des pH-Wertes des Puffers von 7.0 auf 7.5 und 8.0 konnte keine höhere Ausbeute erzielt werden. Bei Matrex Orange A und Reactive Brown 10 waren sowohl im Durchlauf als auch im Eluat Aktivität der 3''-HCT nachweisbar, die Ausbeute bei Matrex Orange A war allerdings äußerst gering, sodass dieses Gel ebenfalls nicht für die Reinigung in Frage kam. Bei Reactive Brown 10 wurde die höchste Anreicherung erzielt, wobei die Ausbeute relativ niedrig war (36 %). Mit diesem Gel wurden weitere Optimierungsversuche unternommen, sodass schließlich eine Anreicherung gegenüber dem Q-Sepharose-Schritt von 5.3-fach bei einer Ausbeute von 74 % erreicht werden konnte.

Abb. 3.50 zeigt das Chromatogramm eines Laufes mit Reactive Brown 10. Auffällig ist, dass die 3''-HCT-Aktivität im Durchlauf zu messen war und nicht durch den NaCl-Gradienten eluiert wurde. Die Aktivität erschien aber nicht im Hauptproteinpeak des Durchlaufs, sondern war zu diesem verschoben. Da dieses Verhalten auf eine zu hohe Durchflussrate hinwies, wurde auch eine niedrigere Flussrate (0.3 statt 2 ml min⁻¹) getestet. Allerdings wurde dadurch das gleiche Ergebnis erzielt.

Die Gesamtaktivität nach Reinigung mit Reactive Brown 10 betrug 30 nkat, entsprechend einer Ausbeute gegenüber dem Rohextrakt von 32 %, mit einer spezifischen Aktivität von 285 µkat kg⁻¹ und einem Anreicherungsfaktor von 16-fach.

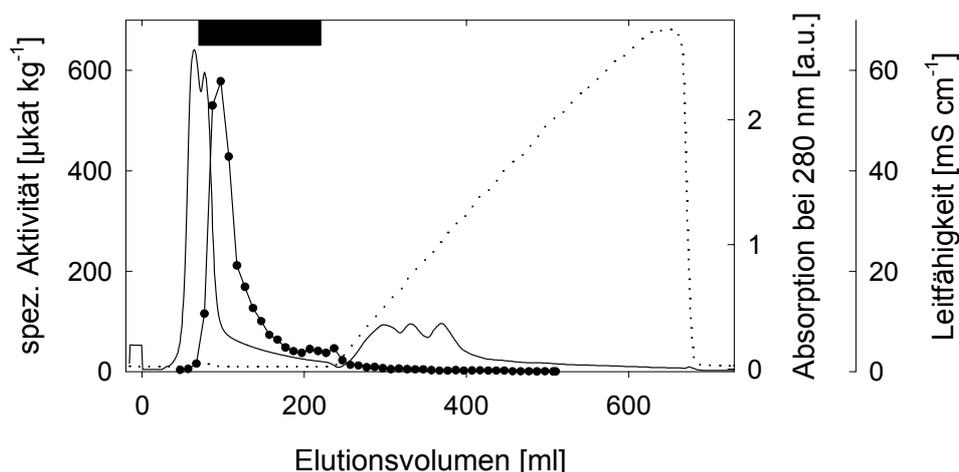


Abb.3.50: Chromatogramm eines Reactive Brown 10-Laufs.

Angegeben ist die Enzymaktivität der 3''-HCT der einzelnen Fraktionen, gemessen mit dem Substrat Tilirosid, sonst wie Abb. 3.48. Der schwarze Balken markiert die vereinten Fraktionen, mit denen der nächste Reinigungsschritt durchgeführt wurde.

3.8.5 Chromatographie mit Hydroxyapatit (HAP)

Neben der Verwendung von Farbligandengelen ist bei Reinigungsverfahren von Enzymen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels in der Literatur auch die Verwendung von Hydroxyapatit beschrieben (siehe z. B. Fleurence & Negrel 1989, Vogt *et al.* 1993). Hydroxyapatit ($(\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH})_2$) ist eine Form von Calciumphosphat, die in kristalliner oder keramischer Form für die Proteinreinigung verwendet wird. Die 3''-HCT-Aktivität konnte ebenfalls an diese Matrix gebunden werden und eluierte in einem Peak (Abb. 3.51).

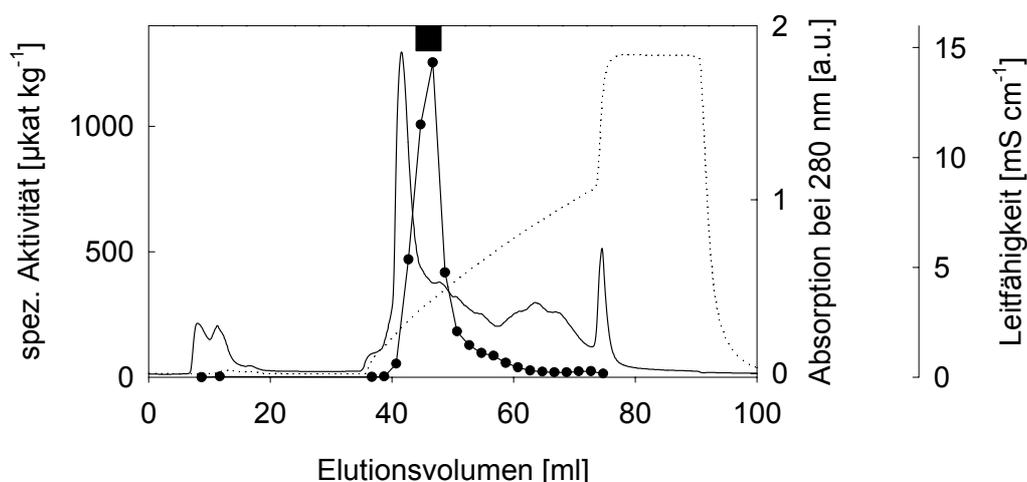


Abb. 3.51: Chromatogramm eines Hydroxyapatit-Laufs.

Darstellung wie Abb.3.48. Der Leitfähigkeitsgradient wurde durch einen NaPi-Konzentrationsgradienten erzeugt (von 2 bis 400 mM).

Die Fraktionen mit 3''-HCT-Aktivität wurden mit Hilfe der SDS-Gel analysiert (Abb. 3.52). In diesem Stadium der Reinigung konnte keine Bande mit der Enzymaktivität korreliert werden. Die Gesamtaktivität nach diesem Chromatographie-Schritt betrug 5.9 nkat, was einer Ausbeute von 6 % entsprach bei einer 26-fachen Anreicherung (spezifische Aktivität: 459 $\mu\text{kat / kg}$).

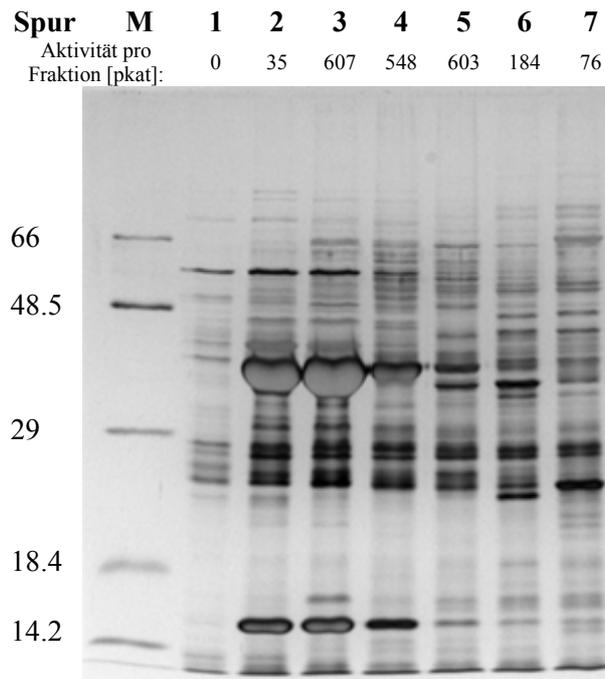


Abb. 3.52: SDS-Gel eines HAP-Laufs (Silberfärbung).

Pro Spur wurden jeweils 10 μ l einer Fraktion aufgetragen. Das Gel zeigt einen anderen als den in Abb. 3.51 dargestellten Lauf, der aber ein vergleichbares Elutionsprofil zeigte.

Zur Identifizierung und Sequenzierung der 3''-HCT wurde nach der HAP-Chromatographie eine Zwei-Wege-Strategie beschritten. Der erste Weg bestand aus einer analytischen Reinigung mit Chromatofocussierung an Mono P und Anionenaustauscher-Chromatographie an Mono Q, beides hochauflösende Matrices mit nur geringer Kapazität. Für diese Schritte wurde ein Teil der Enzympräparation nach HAP verwendet. Nach der Chromatographie mit Mono Q konnten drei Banden identifiziert werden, die der Aktivität der 3''-HCT folgten.

Wegen der geringen Kapazität der analytischen Säulen wurde dann als zweiter präparativer Weg eine native Elektrophorese durchgeführt, mit der eine größere Menge Protein ausreichend getrennt werden konnte. Bei den Optimierungs-Experimenten zur nativen Elektrophorese konnten die Ergebnisse der Chromatographieschritte bestätigt werden. Nach einer SDS-PAGE konnten die chromatographisch identifizierten Banden auf diese Weise für eine Aminosäuresequenzierung in ausreichender Menge erhalten werden. Wegen der Trennung der Enzympräparation in zwei Teile konnte keine Gesamtausbeute der einzelnen Schritte bestimmt werden.

3.8.6 Chromatofocussierung mit Mono P

Für die Chromatographie mit Mono P wurden 1.3 mg Gesamtprotein des angereinigten Extraktes des HAP-Schritts verwendet. Es wurde ein enger pH-Gradient zwischen 5.2 und 4.0 gewählt, da die Bestimmung des isoelektrischen Punkts der 3''-HCT mit Mono P mit einem Gradienten zwischen 7.4 und 4.0 einen pI von 4.7 ergeben hatte (siehe 3.7.6). Die 3''-HCT eluierte in einem breiten Peak mit einem Maximum bei einem pH-Wert von 4.71 (Abb. 3.53). Der Peak zeigte eine Schulter bei einem pH-Wert von 4.67, was auf die Existenz eines Isoenzym hindeuten kann. Der erste Aktivitätspeak im Durchlauf könnte auf eine Überladung der Säule oder eine höhere Ionenstärke des Puffers hindeuten. Ein Indiz für die zweite Möglichkeit ist der verringerte pH-Wert in diesem Bereich.

Die vereinten Fraktionen mit höchster Aktivität hatten eine spezifische Aktivität von 2207 $\mu\text{kat} / \text{kg}$, das entsprach einer 115-fachen Anreicherung gegenüber dem Rohextrakt.

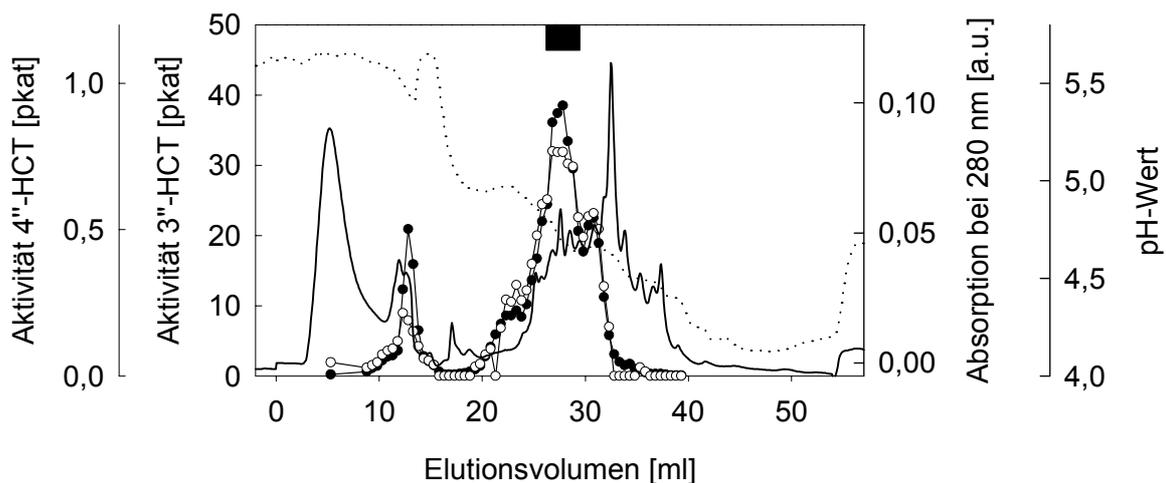


Abb. 3.53: Chromatogramm eines Laufs mit Mono P (Chromatofocussierung).

Dargestellt sind neben der Absorption bei 280 nm (durchgezogene Linie) und der 3''-HCT-Aktivität (●) auch die 4''-HCT-Aktivität (○) und der pH-Wert (gestrichelte Linie). Der schwarze Balken gibt die Fraktionen an, die vereint und für die Chromatographie an Mono Q verwendet wurden.

Spur	M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Aktivität pro Fraktion [pkat]		21	0.6	1.4	4.1	7.4	8.6	8.4	14	22	36	39	30	18	23	11	3.1	1.5	1.0	0.5	0.3

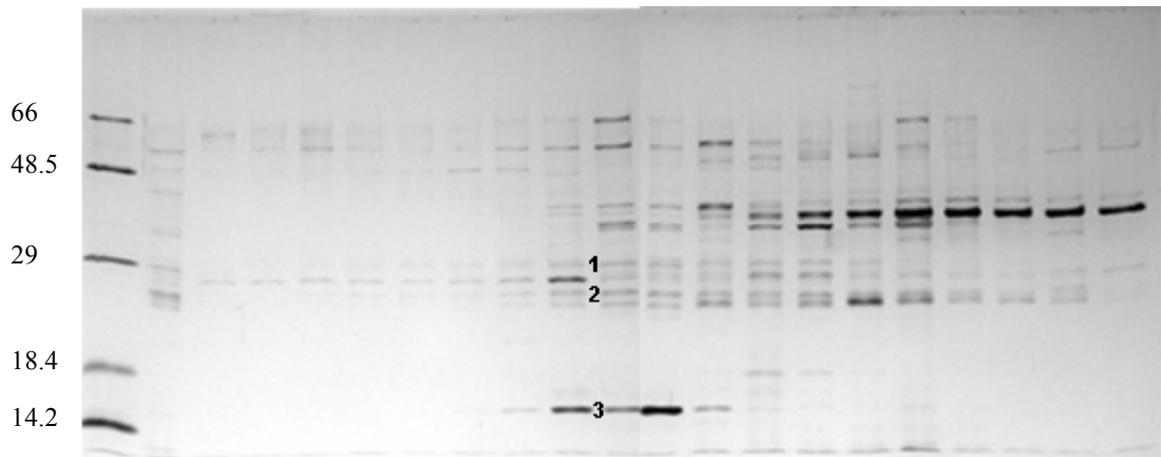


Abb. 3.54: SDS-Gel der Fraktionen des Mono P-Laufs (Silberfärbung)

Die Banden, deren Intensität der Enzymaktivität folgt, sind nummeriert, die Molmassen betragen: 1: 28 kDa; 2: 24 kDa und 3: 15 kDa.

Die Fraktionen mit 3''-HCT-Aktivität wurden mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 3.54). Ein Vergleich der Bandenintensität mit dem Aktivitätsverlauf (Abb. 3.55) der Fraktionen zeigte für die 28 kDa- und die 24 kDa-Banden einen ähnlichen Verlauf, während eine 15 kDa-Bande keinen eindeutigen Zusammenhang erkennen ließ. Diese dritte Bande wurde ebenfalls analysiert, da sie nach dem nächsten chromatographischen Schritt mit Mono Q als 3''-HCT in Frage kam.

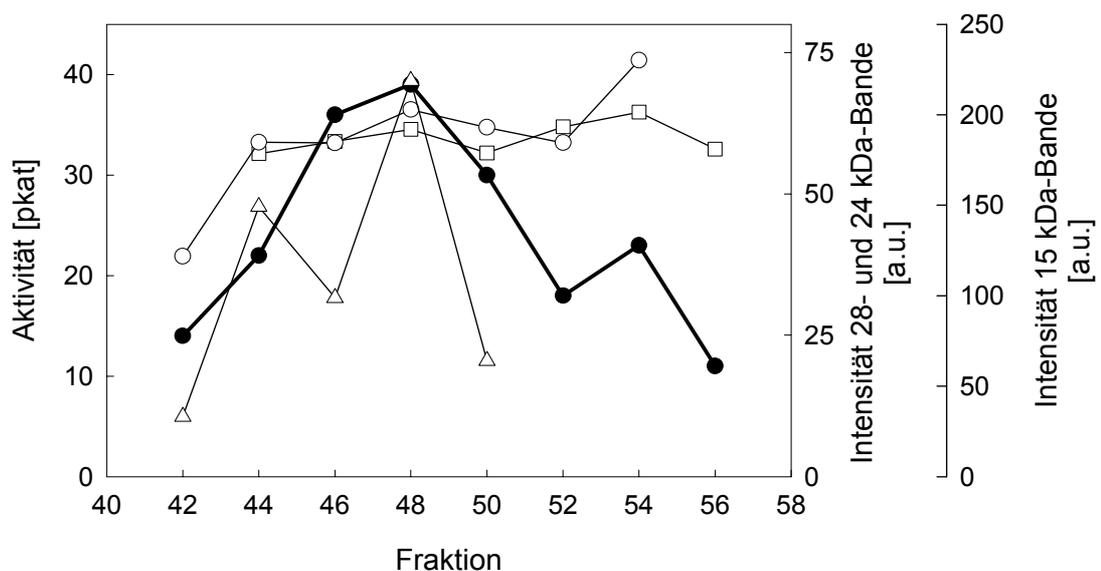


Abb. 3.55: Densitometrische Auswertung des Gels von Abb. 3.54.

Bandenintensitäten (28 kDa: □, 24 kDa: ○, 15 kDa: △) und Enzymaktivität (●) der einzelnen Fraktionen von Abb. 3.53 und 3.54.

3.8.7 Chromatographie mit Mono Q

Für die Chromatographie mit Mono Q wurden die Fraktionen des Mono P-Laufs verwendet. Insgesamt wurden 30 µg Gesamtprotein auf die Säule aufgetragen. Wie in Abb. 3.56 gezeigt ist, eluierte die 3''-HCT in einem Peak.

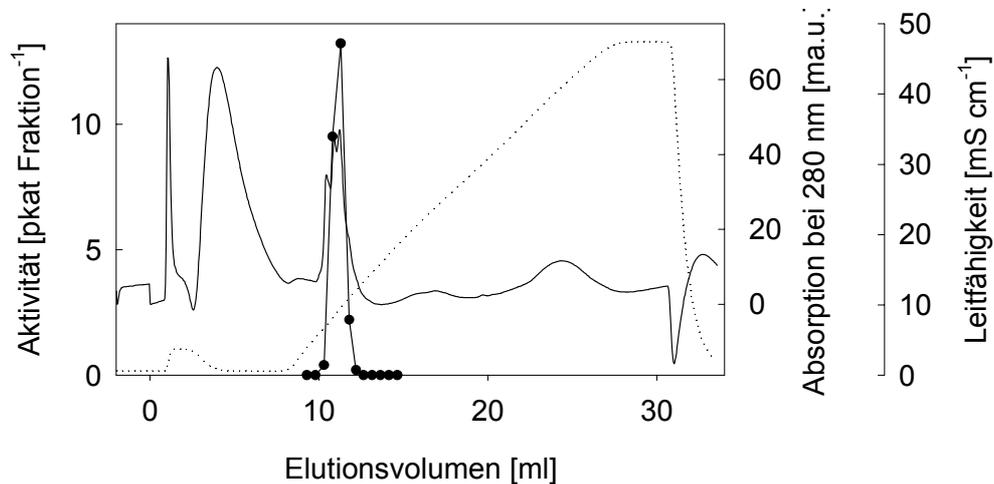


Abb. 3.56: Chromatogramm eines Laufs mit Mono Q.
Darstellung wie Abb. 3.48.

In Abb. 3.57 ist ein SDS-Gel der Fraktionen mit 3''-HCT-Aktivität gezeigt. Es waren drei Banden erkennbar, die der Aktivität der 3''-HCT folgten. Sie hatten Molmassen von 15, 24 und 28 kDa, wobei das Bandenmuster des Mono P-Laufs der Bande mit der niedrigsten Molmasse mit dem Aktivitätsverlauf am wenigsten übereinstimmte.

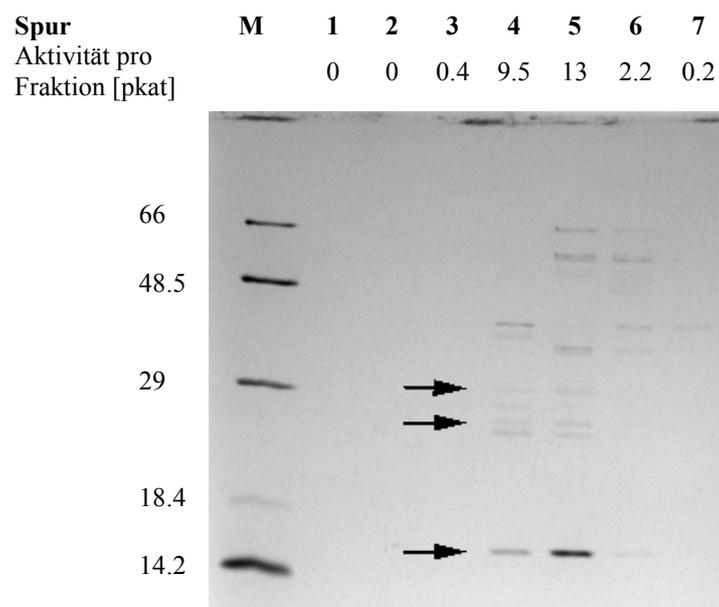


Abb.3.57: SDS-Gel des Mono Q-Laufs (Silberfärbung).

Die Pfeile markieren die Banden, die der Aktivität der 3''-HCT folgen. Die Molmassen betragen von oben nach unten 28, 24 und 15 kDa. Für eine densitometrische Auswertung waren die Banden zu schwach.

3.8.8 Native Gelelektrophorese

Die Bedingungen der nativen Elektrophorese mussten den Eigenschaften der 3''-HCT angepasst werden. Diese Optimierung wurde wegen der einfachen Handhabung mit einem Minigel durchgeführt. Ausgehend von einem apparenten pI-Wert von 4.7 erwies sich ein Imidazol-HEPES-Puffersystem mit einem pH von 7.4 als optimal (McLellan 1982). Der pH-Wert des Puffersystems sollte einerseits möglichst im neutralen pH-Bereich liegen, um die Erhaltung der Enzymaktivität zu gewährleisten, andererseits musste der pH-Wert auch wesentlich über dem pI-Wert des Proteins liegen, um eine hohe Wanderungsgeschwindigkeit während der Elektrophorese zu ermöglichen. Auf drei Spuren des Gels wurden eine angereinigte Enzympräparation (nach Reinigung mit Reactive Brown 10) aufgetragen, um nach der Elektrophorese eine Spur des Gels zu färben und zwei Spuren in Streifen zu schneiden, die Proteine zu eluieren und auf Enzymaktivität zu testen (Abb. 3.58).

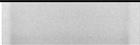
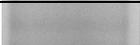
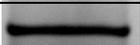
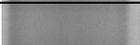
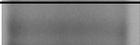
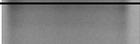
Nr.		Aktivität [pkat]
1		0.0
2		0.0
3		0.0
4		0.0
5		0.0
6		0.0
7		0.1
8		0.3
9		1.9
10		0.7
11		0.3

Abb. 3.58: Natives Minigel, Coomassie-Färbung.

Drei Spuren des Gels wurden mit einer Proteinpräparation nach dem Reinigungsschritt mit Reactive Brown 10 beladen. Die gefärbte Spur wurde mit 45 µg, die beiden Spuren, die auf Enzymaktivität getestet wurden, wurden mit je 90 µg Gesamtprotein beladen. Diese beiden Spuren wurden entsprechend den Markierungen zerteilt, das Protein wurde mittels Diffusion eluiert und das Eluat auf Enzymaktivität getestet.

Die Eluate der einzelnen Streifen des nativen Gels wurden dann mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 3.59). Hier zeigte sich, dass eine Bande bei 25 kDa der Enzymaktivität folgte. Es konnten nur etwa 7 % der eingesetzten Aktivität wieder gefunden werden. Dabei zeigte sich, dass einerseits die Protein-Ausbeute der Elution aus den Gelstreifen gering war, andererseits war auch eine Inaktivierung des Enzyms während der nativen Elektrophorese, vermutlich durch Wärmeentwicklung, im Minigel zu beobachten.

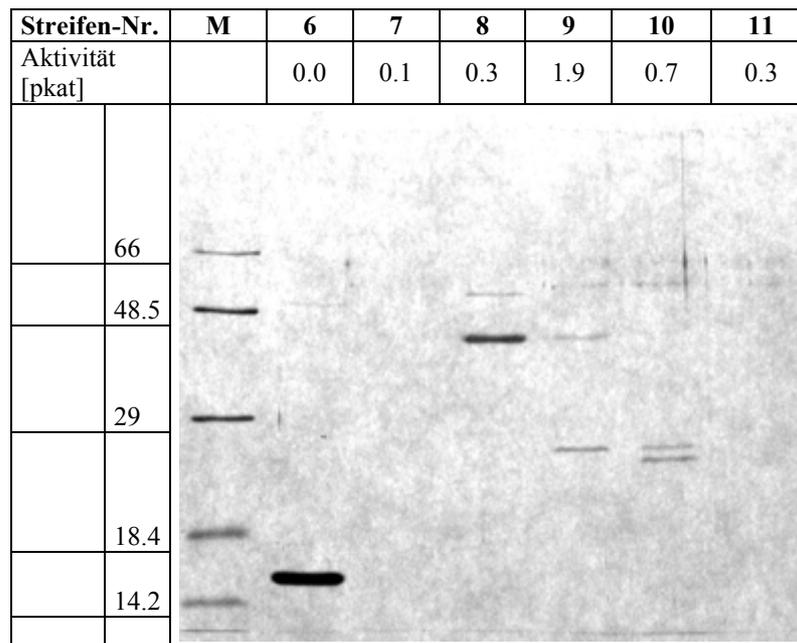


Abb. 3.59: SDS-Gel der Fraktionen 6 bis 11 des nativen Minigels von Abb. 3.58 (Silberfärbung).

Aufgrund der geringen Ausbeute, die mit der Elution aus den Gelstreifen erzielt wurde, und der geringen Kapazität des Gels wurde das System auf eine Mini Prep Cell übertragen. Diese Apparatur ermöglichte eine Elektrophorese mit kontinuierlicher Elution. Zur präparativen Reinigung wurde das Gel der Mini Prep Cell pro Lauf mit 1.5 bis 2.5 mg Gesamtprotein aus dem HAP-Reinigungsschritt beladen. Es wurden insgesamt 5 Läufe durchgeführt. In Abb. 3.60 ist ein repräsentativer Lauf dargestellt. Die Aktivität eluierte in einem Peak.

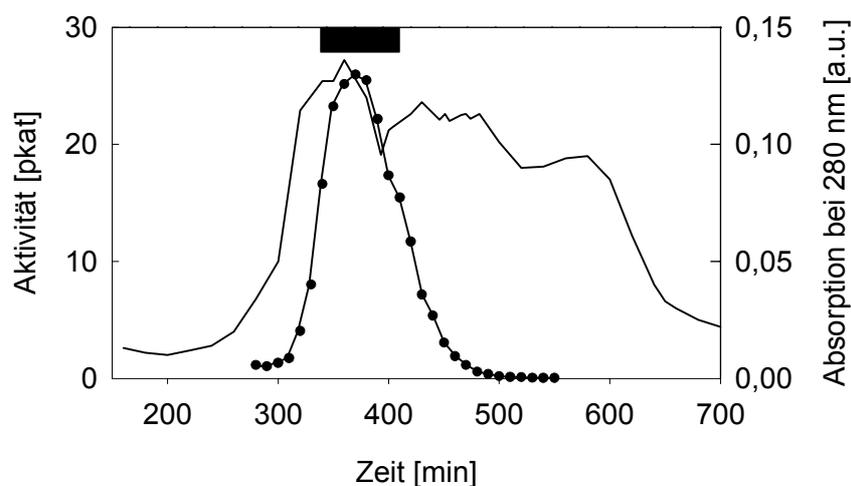


Abb. 3.60: Elutionsprofil einer Mini Prep Cell-Elektrophorese.

Angegeben sind die Absorption bei 280 nm (durchgezogene Linie) und die Aktivität der 3''-HCT, gemessen mit Tilirosid (●), aufgetragen gegen die Elektrophorese-Dauer. Der schwarze Balken kennzeichnet den Bereich der Fraktionen, die gesammelt und auf ein SDS-Gel aufgetragen wurden. Aus diesem SDS-Gel wurden dann Banden ausgeschnitten und sequenziert.

Mit diesen Fraktionen wurde ebenfalls eine SDS-PAGE durchgeführt, deren Ergebnis in Abb. 4.61 gezeigt ist. In dem Gel waren vier Banden sichtbar, deren Intensität der Aktivität der Fraktionen folgte. Eine fünfte Bande bei 16 kDa ist markiert, die nach Chromatographie mit Mono Q ebenfalls der 3''-HCT-Aktivität folgte. Nach der nativen Elektrophorese konnte keine Korrelation der Bandenintensität mit der Enzymaktivität gefunden werden (Abb. 3.62). Der Vergleich des Gels nach dem Mono Q-Lauf mit dem der nativen Elektrophorese zeigte weiterhin, dass zwei Banden mit einer Molmasse von 24 bzw. 28 kDa übrig blieben, die als Träger der 3''-HCT-Aktivität in Frage kamen. Mit diesen beiden Banden wurde eine Aminosäuresequenzierung durchgeführt.

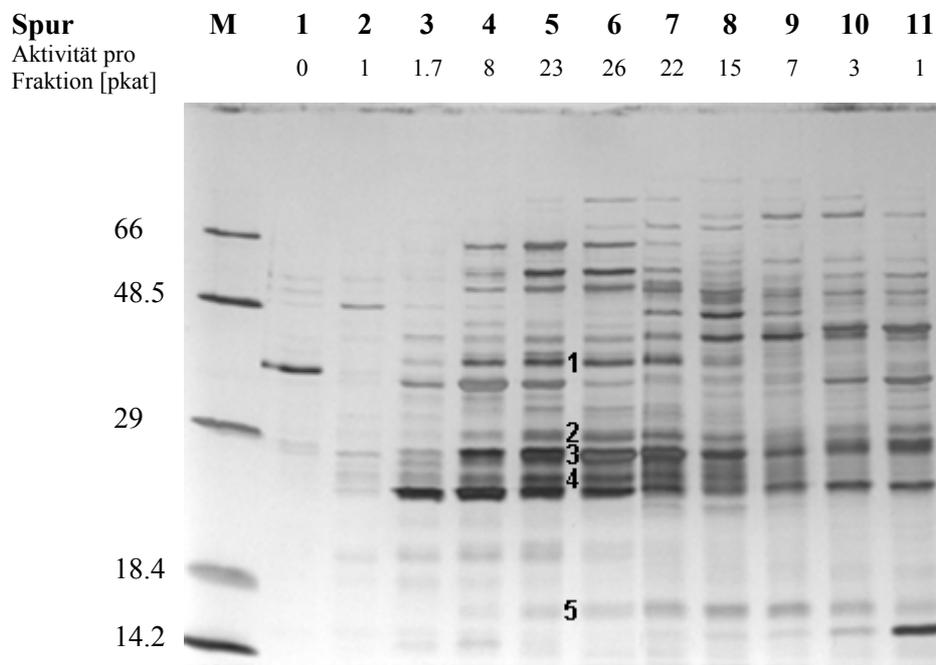


Abb. 3.61: SDS-Gel der Mini Prep Cell-Fraktionen (Silberfärbung).

Die Nummern markieren Banden, deren Intensitätsverlauf der Enzymaktivität folgt (siehe nächste Abbildung).

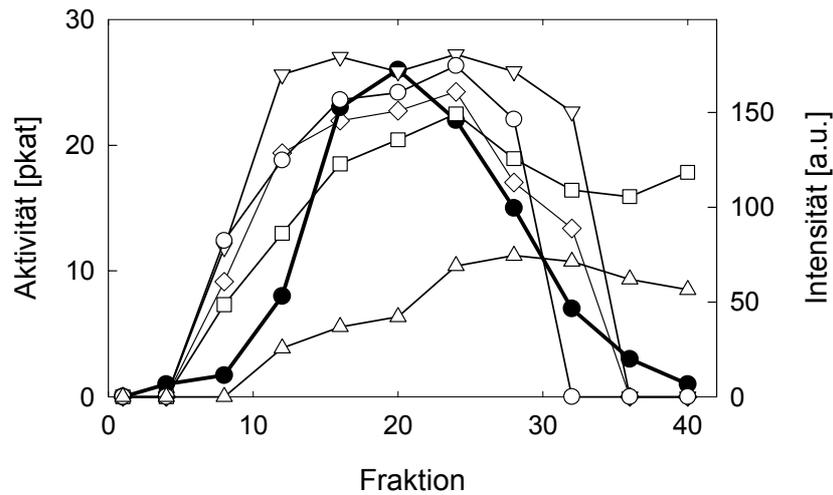


Abb. 3.62: Densitometrische Auswertung der markierten Banden des Gels von Abb. 3.61.
 Aktivität der 3'-HCT (●), 1: 37.5 (◇); 2: 28 (□); 3: 26 (▽); 4: 24 (○) und 5: 16 (△) kDa.

Nach der nativen Elektrophorese mit der Mini Prep Cell wurden die vereinigten und konzentrierten Enzympräparationen auf ein SDS-Gel übertragen und unter denaturierenden Bedingungen nochmals elektrophoretisiert. Aus diesem Gel wurden die drei Banden bei 28, 24 und 15 kDa ausgeschnitten und sequenziert (Abb. 3.63).

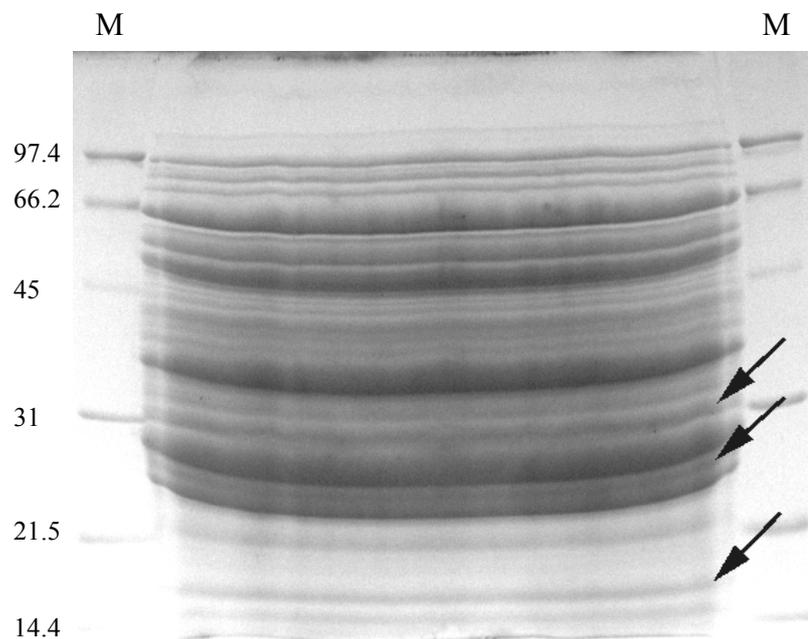


Abb. 3.63: SDS-Gel der Fraktionen nach nativer Elektrophorese (Colloidale Coomassie-Färbung).
 Die Pfeile markieren die ausgeschnittenen und sequenzierten Banden.

In Tab. 3.17 sind alle Schritte der Reinigung der 3''-HCT zusammengefasst. Mit der Reinigung konnte die 3''-HCT 105x (Mini Prep Cell) bzw. 115x (Mono P) angereichert werden. Da nach der chromatographischen Reinigung mit HAP zwei verschiedene Wege eingeschlagen wurden, ist sowohl für die Chromatofocussierung mit Mono P als auch für die native Elektrophorese mit der Mini Prep Cell die Ausbeute gegenüber dem bei dem jeweiligen Schritt eingesetzten Hydroxyapatit-Extrakt und nicht gegenüber dem Aufschluss angegeben.

Tab. 3.17: Zusammenfassung der Reinigung der 3''-HCT.

Nach der Reinigung mit Hydroxyapatit wurde der Extrakt in zwei Fraktionen getrennt, von denen die eine für die weitere chromatographische Reinigung mit Mono P und Mono Q zur Identifizierung, die andere für die native Elektrophorese mit der Mini Prep Cell und die Sequenzierung verwendet wurde. Die Aktivitäten wurden mit Tilirosid als Substrat bestimmt.

* Die für Mono P und die native Elektrophorese angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf den eingesetzten HAP-Extrakt, ansonsten bezieht sich die Ausbeute auf den Aufschluss.

Reinigungsschritt	Gesamtprotein [mg]	spez. Aktivität [µkat/kg]	Anreicherung [-fach]	Gesamtaktivität [pkat]	Ausbeute [%]
Aufschluss	5322	17.5		93000	
AS-Fällung	3944	19.1	1.1	75200	81
Q-Sepharose	770	52	3.0	40200	43
Reactive Brown 10	105	285	16	29925	32
Hydroxyapatit	12.8	459	26	5900	6
Hydroxyapatit	1.3			600	
Mono P	0.07	2007	115	140	23*
Hydroxyapatit	7.3			3000	
Native Elektrophorese	ca. 0.8	1841	105	1470	49*

3.9 Sequenzierung von Peptiden

Die Aminosäure-Sequenzierung von Peptiden der drei Protein-Banden wurde von der Firma TOPLAB durchgeführt. Die Spaltung der Proteine erfolgte im Gel mit der Protease LysC, nach Elution wurden einige Peptide sequenziert. Von der 28 kDa-Bande konnten drei Peptide, von der 24 kDa-Bande ein Peptid und von der 15 kDa-Bande zwei Peptide sequenziert werden (Tab.3.18). Neben den Sequenzen sind in der Tabelle auch die Homologien nach Datenbankanalyse mit dem Programm MS-Edman Search, die im Rahmen der Sequenzierung von TOPLAB durchgeführt wurden, angegeben. Außer der Datenbankanalyse mit MS-Edman Search wurde ein weiterer Homologie-Vergleich mit dem BLAST-Programm (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) durchgeführt, um nach Homologien zu bekannten Sequenzen zu suchen. In diese Untersuchung wurden auch die Sequenzen einbezogen, die mit MS-Edman Search Ähnlichkeiten gezeigt hatten. Die detaillierten Ergebnisse des BLAST-Programms sind im Anhang dargestellt.

Die für die 28 kDa-Bande gezeigten Homologien zu bekannten Sequenzen sind nicht signifikant, die nicht übereinstimmenden Aminosäuren sind jeweils fett gedruckt. Die jeweils anderen Peptide konnten weder bei der angegebenen PAL, noch bei der Squalen Hopon Cyclase gefunden werden. Dies ist neben der fehlenden Signifikanz der Homologien ein weiterer Hinweis darauf, dass die 28 kDa-Bande tatsächlich mit sehr großer Wahrscheinlichkeit weder eine PAL noch eine Squalen Hopon Cyclase ist und es sich bei ihr um ein unbekanntes Protein handelt.

Für die 24 kDa-Bande konnte eine homologe Sequenz in einer speziellen Datenbank der University of Minnesota mit der Bezeichnung NXNV_065_F12_F (Abb. 3.64) entdeckt werden. In dieser Datenbank sind EST-Sequenzen gesammelt, die im Rahmen eines Sequenzierungsprojekts von *Pinus taeda*-Genen gewonnen wurden Allona *et al.* 1998 und über das Internet zugänglich sind (URL: <http://www.cbc.umn.edu/ResearchProjects/Pine>). Die Gesamtsequenz des EST-Clones NXNV, die ca. 100 Aminosäuren lang ist, zeigt in Teilen Homologien zu verschiedenen Proteinen der Aldo/Ketoreduktase-Familie wie z.B. einer Oxidoreduktase aus Mais, wie eine BLAST-Suche ergab. Diese Oxidoreduktase mit der Bezeichnung IN2-2 ist nicht weiter charakterisiert, sodass über deren Substrate keine Aussage gemacht werden kann. Es gibt allerdings eine Cinnamoyl-CoA Reduktase, die Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester als Substrate verwendet (EC-Nr.: 1.2.1.44). Über ein gemeinsames Bindungsmotiv für CoA-Ester wäre es denkbar, dass die 3''-HCT eine Sequenzähnlichkeit mit diesen Enzymen haben könnte.

Tab. 3.18: Ergebnis der Sequenzierung der drei Protein-Banden.

Fett gedruckte Aminosäuren stimmen mit den angegebenen Homologie nicht überein.

Bande	Sequenz	Homologie
28 kDa	(K) FIRE EDLHTK	PAL (3 Austausch) von <i>Daucus carota</i> Accession-Nr.: 3334285
	(K) --PDL DFTAV	Squalene Hopene Cyclase (1 Austausch) von <i>Bradyrhizobium japonicum</i> Accession-Nr.: 1711504
	(K) EAQIFK	---
24 kDa	(K) GITFFDTADV GATK	NXNV_065_F12_F Pine Normal Xylem EST des Pine Gene Discovery Project (URL: http://web.ahc.umn.edu/biodata/nsfpine/20000221a/)
15 kDa	(K) YH Y LVANAK	unbekanntes Protein von <i>A. thaliana</i> (1 Austausch)
	(K) F M LDEEEH F K	unbekanntes Protein von <i>A. thaliana</i> (1 Austausch)

Die für CoA-abhängige Ac(et)yltransferasen beschriebenen konservierten Sequenzmotive HXXXDG und DFGWGKP (St-Pierre *et al.* 1998, Walker & Croteau 2000) konnten aber weder in den sequenzierten Peptiden, noch der Sequenz des *Pinus taeda*-EST-Clons entdeckt werden.

Die beiden Peptide der 15 kDa-Bande konnten in einem Protein von *Arabidopsis thaliana* wiedergefunden werden, in dem sie direkt hintereinander liegen. Für dieses Protein (GenBank Accession-Nr.: AB019228.1, Abb 3.64) ist keine Funktion beschrieben. Eine BLAST-Suche mit diesem Protein ergab fünf Treffer (siehe Anhang). Von diesen fünf Proteinen, die von Rotalgen und Cyanobakterien stammen, ist wiederum keine Funktion bekannt. Sie sind als hypothetische Proteine beschrieben. Bei einem Vergleich der Aminosäuresequenz des unbekanntes Proteins mit zwei verschiedenen Vertretern von bekannten Hydroxycinnamoyl-Transferasen (5AT, Fujiwara *et al.* 1998b und THT, Schmidt *et al.* 1999) mit dem Programm BLAST 2 SEQUENCES konnte keine Homologie festgestellt werden. Allerdings hat das erste Peptid eine Homologie zu einer β -Ketoacyl-CoA Synthase.

Abb. 3.64: Aminosäuresequenzen der homologen Datenbankeinträge der 24 und 15 kDa-Bande.

EST-Klons NXNV_065_F12_F aus <i>Pinus taeda</i> (unterstrichen: Peptid der 24 kDa-Bande)					
ANPVI P RVKL	GNQGLEVSKV	GYGCMGLTGI	YNNPASEEDG	ISIIKYAF E K	<u>GITFFDTADV</u>
<u>YGATK</u> N EVLV	GKALKQLPR-	NVQLAKK F GI	VMVDGKMDAK	GTP-Y-RKCC	--SLK-LD
unbekanntes Protein aus <i>A. thaliana</i> (unterstrichen: Peptide der 15 kDa-Bande)					
MWSVTGALT V	AVPPTAAACR	TKPFLISS S F	PKQTKKLHLS	SPSLSLPSSH	FSSSFKTAAT
SIEQQSSV N K	G E STKYHFL V	<u>ANAKF</u> M LDE E	<u>E</u> H F Q E QL F ER	LRYFGERELV	QDFWL V IEPK
FLDN F PKITQ	RLRR P AV A LV	<u>STNGT</u> W IT F M	KLRLDRVLYD	SFEATSLDEA	LASN P TTLE F
DKPKN W VAPY	PKYEPGW W DT	FLPK V TQ E SA	V		

4 Diskussion

4.1 Nachweis der Hydroxycinnamoyl-Transferase-Aktivität

Die bisherigen Arbeiten zu Hydroxycinnamoyl-Transferasen wurden in erster Linie mit Enzymen durchgeführt, die Anthocyane oder Amine acylieren. In nur einer einzigen älteren Arbeit wurde meines Wissens nach die Aktivität einer Hydroxycinnamoyl-Transferase untersucht, die ein Flavonolglycosid als Akzeptorsubstrat verwendet (Saylor & Mansell 1977). Für den Nachweis der Hydroxycinnamoyl-Transferasen, die an der Biosynthese der UV-B-Schutzpigmente in der Kiefer beteiligt sind, musste also erst ein Enzymtest entwickelt werden. Dabei erfolgte die Analyse der Produkte aus dem Enzymtest nicht wie bei Saylor & Mansell 1977 mit Dünnschichtchromatographie (DC), sondern mittels HPLC. Diese Methode erwies sich zwar als zeitaufwändiger, hatte dafür aber eine Reihe von Vorteilen. So lag die Nachweisgrenze durch die hohe Sensitivität der Methode für die Aktivität der HCT's für den Enzymtest unter Standardbedingungen bei ungefähr 100 nkat kg^{-1} , d. h. es konnten noch 2 pmol des acylierten Produkts nachgewiesen werden. Weiterhin ist die Auflösung der HPLC wesentlich größer als die der DC und die Quantifizierung sehr einfach möglich.

Ein Nachweis der HCT-Aktivität mit markiertem $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{-Cumaroyl-CoA}$ mittels einem Ausschütteltest wurde ebenfalls getestet, scheiterte aber an der Bildung von radioaktiven Nebenprodukten, durch die keine Quantifizierung der acylierten Enzymprodukte und damit der Enzymaktivität möglich war. Diese Verbindungen wurden wie die acylierten Enzymprodukte mit Ethylacetat aus dem Proteinextrakt ausgeschüttelt, da sie, wie eine Untersuchung mit Radio-HPLC ergab, ähnlich lipophil waren.

Bei der Extraktion von Proteinen aus Kiefernnadeln zeigte sich, dass der Zusatz von wasserlöslichen Polymeren wie Polyethylenglykol (PEG) die Löslichkeit für Proteine allgemein stark erhöhte (Dellus *et al.* 1997). Im Aufschlusspuffer wurde zu diesem Zweck PEG 1450 verwendet, durch das viermal mehr Protein pro Gramm Nadelmaterial isoliert werden konnte als ohne diesen Zusatz. Durch die Verwendung von PEG wurde die spezifische Aktivität der HCT's nicht verändert. Die positive Wirkung solcher löslichen Polymere bei der Extraktion von Enzymen und Zellorganellen aus pflanzlichen Materialien ist allgemein bekannt; sie werden daher oft verwendet. Der Mechanismus dieser Agentien ist allerdings unklar (Loomis 1974).

Zur Entfernung von phenolischen Verbindungen, die in Kiefernnadeln in großer Menge enthalten sind und durch Oxidation, die Bildung von Wasserstoffbrücken und hydrophobe Interaktion Enzyme inaktivieren können, war es wichtig, das Nadelmaterial mit unlöslichem

PVPP zu homogenisieren, da PVPP diese Verbindungen bindet und somit unschädlich macht (Cooper 1981, Loomis 1974). Durch Verwendung von PEG 1450 und PVPP konnte die Extraktion von Proteinen aus Kiefernadeln bezüglich Proteinausbeute und Stabilität der Enzymaktivität optimiert werden.

Die hohe Auflösung der HPLC-Methode erlaubte es, alle entstehenden acylierten Produkte mit Hilfe des Diodenarray-Spektrums als solche zu identifizieren und zu quantifizieren. Dadurch konnten drei monoacylierte und ein bzw. zwei diacylierte Produkte im Enzymtest eines Nadelrohextrakts nachgewiesen werden. Dies war ein Hinweis darauf, dass die HCT's positionsspezifisch sind, wie es auch für Anthocyanin-Hydroxycinnamoyl-Transferasen gefunden wurde (Callebaut *et al.* 1996, Fujiwara *et al.* 1997, Kamsteeg *et al.* 1980, Yonekura-Sakakibara *et al.* 2000) und im Nadelrohextrakt drei HCT's vorhanden sind. Die Untersuchung aller im Enzymtest entstehenden Produkte zeigte, dass auch Cumarsäure in geringer Menge nachweisbar war. Diese stammte aus dem Cumaroyl-CoA, wo sie als Verunreinigung vorhanden war. Aus diesem Grund konnte die Existenz einer Hydrolase, die Cumarsäure freisetzt, im Enzymextrakt ausgeschlossen werden. Ein weiterer Hinweis auf das Fehlen einer Hydrolaseaktivität war, dass keine zeitabhängige Zunahme des Cumarsäurepeaks in Enzymtests beobachtet werden konnte.

Der Nachweis von mehreren HCT's erforderte die genaue Kenntnis der Strukturen ihrer jeweiligen Produkte, um die Enzymaktivitäten eindeutig bestimmten Verbindungen zuzuordnen und dadurch mit den diacylierten UV-B-Schutzpigmenten in Zusammenhang bringen zu können. Bei diesen Verbindungen waren die Acylgruppen nur an 3''- und 6''-Position festgestellt worden, deswegen überraschte die Existenz eines dritten Enzyms, dessen Produkte bisher nicht in *Pinus sylvestris* nachgewiesen wurden. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass in der Kiefer noch einige diacylierte Produkte, deren Acylierungspositionen bisher nicht untersucht wurden, in geringerer Menge vorhanden sind. Unter denen könnten sich auch Verbindungen befinden, die an 4''-Position acyliert sind.

Für die eindeutige Strukturaufklärung der acylierten Enzymprodukte war es deswegen nötig, diese mit bekannten Referenzsubstanzen wie Tilirosid zu vergleichen. Wo keine Referenzsubstanzen zu Verfügung standen wurden die Verbindungen in ausreichender Menge enzymatisch hergestellt und mit präparativer HPLC soweit gereinigt, dass sie mit $^1\text{H-NMR}$ untersucht werden konnten. Die Untersuchung mit $^1\text{H-NMR}$ erwies sich als ausreichend, da der Aufbau der Verbindungen weitgehend bekannt war und nur die Acylierungsposition ermittelt werden musste.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigte, dass bei den drei monoacylierten Produkten die Hydroxyzimtsäuren an den Positionen 3'', 4'' und 6'' des Zuckerrests zu finden waren. Durch die Trennung von drei verschiedenen Enzymaktivitäten durch den ersten chromatographischen Reinigungsschritt mit dem Anionenaustauscher Q-Sepharose konnten damit drei verschiedene HCT's nachgewiesen werden: 3''-, 4''- und 6''-HCT. Alle drei HCT's können nichtacylierte Flavonol 3-glukoside, die 4''- und die 3''-HCT können zudem auch das an 6''-Position monoacylierte Tilirosid als Substrat verwenden.

4.2 Messung der HCT-Aktivität im Freiland und in UV-B-Expositionsexperimenten

Die Messung der Enzymaktivität der 3''- und der 6''-HCT wurden bei adulten Bäumen im Freiland und bei Keimlingen in zwei Sonnensimulatorexperimenten durchgeführt. Bei der Messung im Freiland zeigten die beiden Enzyme im Jahresverlauf ein unterschiedliches Verhalten. Die Aktivität der 6''-HCT stieg in der frühen Nadelentwicklung stark an, fiel dann aber bis Ende Juni wieder ab und war ab Mitte des Sommers nicht mehr nachweisbar. Einen ähnlichen jahreszeitlichen Verlauf mit einem frühen Maximum während der Nadelentwicklung zeigt auch die Cinnamylalkohol-Dehydrogenase (CAD) in Fichte. Die Aktivität dieses Enzyms, das an der Ligninbiosynthese beteiligt ist, hat etwas später als die 6''-HCT im Juni ein ausgeprägtes Maximum (Galliano *et al.* 1993).

Die 3''-HCT verhielt sich zu Beginn der Nadelentwicklung ähnlich wie die 6''-HCT, doch war auch während der zweiten Hälfte der Vegetationsperiode sowie während der Vegetationsruhe im Winter Aktivität messbar. Im zweiten Jahr konnte dann eine transiente Erhöhung im zeitigen Frühjahr beobachtet werden, selbst im dritten Jahr war noch Aktivität vorhanden. Dieses Verhalten der 3''-HCT ist schwierig zu interpretieren, da wegen des Fehlens der 6''-HCT-Aktivität keine diacylierten Verbindungen synthetisiert werden können und auch keine Akkumulation von monoacylierten Verbindungen nachgewiesen werden konnte. Es stellt sich somit die Frage, ob die Enzymaktivität „sinnlos“ vorhanden ist, da keine Substrate zu Verfügung stehen, oder ob die entstehenden monoacylierten Produkte einer weiteren Modifikation und Translokation unterliegen. Daher muss die Frage nach der Funktion der konstitutiv vorhandenen Aktivität der 3''-HCT unbeantwortet bleiben.

In den Expositionsexperimenten in den Sonnensimulatoren konnte das unterschiedliche Verhalten von 6''- und 3''-HCT-Aktivität in den Primärnadeln von Keimlingen ebenfalls beobachtet werden. Die 6''-HCT-Aktivität wurde durch UV-B induziert und stieg innerhalb

von 48 h nach Beginn der UV-B-Behandlung auf das Dreifache an. Die 3''-HCT war wie im Freiland konstitutiv vorhanden und zeigte keine Induzierbarkeit durch UV-B.

Der Verlauf der 6''-HCT-Aktivität zeigt also ein licht- und entwicklungsabhängiges Verhalten, wie es ganz ähnlich auch für die Synthese anderer sekundärer Inhaltsstoffe wie Anthocyanine in *Malus*-Blüten (Dong *et al.* 1998) oder Alkaloide in *Catharanthus*-Blättern (De Luca *et al.* 1998) nachgewiesen wurde. An der Synthese des Alkaloids Vindolin in *Catharanthus* ist eine Ac(et)yltransferase beteiligt, deren Aktivität durch Licht induziert wird und nur in jungem Blattgewebe hoch ist (St-Pierre *et al.* 1998). Ein entwicklungsabhängiger Verlauf der Aktivität von Hydroxycinnamoyl-Transferasen konnte beispielsweise auch in der Koleoptile von Weizen (Louis & Negrel 1991) und bei *Equisetum*-Sporophyten (Hohlfeld *et al.* 1996b) nachgewiesen werden. Die Abhängigkeit der Biosynthese epidermaler Flavonoide, die als UV-B-Schutzpigmente fungieren, von der Entwicklung konnte auch in Roggen gezeigt werden (Burchard *et al.* 2000). Hier ist das Primärblatt, das sich beim Verlassen der Koleoptile schnell an veränderte Lichtverhältnisse anpassen muss, im Alter von 4 Tagen am empfindlichsten gegenüber der Induktion der Flavonoid-Biosynthese durch UV-B (Reuber *et al.* 1996).

Während demnach die Synthese der diacylierten Flavonolglukoside von Organogenese und Umweltfaktoren abhängig ist und von der Aktivität der 6''-HCT kontrolliert wird, unterliegt die 3''-HCT-Aktivität im Freiland anderen regulativen Faktoren. Der biphasische Verlauf der 3''-HCT während der Vegetationsperiode ähnelt dem Zeitverlauf des Längenwachstums des Sprosses, wie er bei Koniferen und einigen Fagaceen zu beobachten ist. Dieser Verlauf ist durch ein intermittierendes Wachstum gekennzeichnet, bei dem der Sprosszuwachs nach dem Frühjahrsaustrieb unterbrochen und später mit einem zweiten Schub fortgesetzt wird (Larcher 1994). Offenbar wird die Aktivität der 3''-HCT nicht durch Licht reguliert, wie die Expositionsexperimente zeigen, und ist auch nicht entwicklungsabhängig, sondern scheint eher mit allgemeiner metabolischer Aktivität der Nadeln zu korrelieren.

Eine genauere Untersuchung zur Abhängigkeit der 6''-HCT-Aktivität von Organogenese und UV-B-Strahlung würde ein Experiment erfordern, bei dem Bäume, die einige Jahre alt sein und sich unter natürlichen Bedingungen entwickelt haben sollten, für ein bis zwei Vegetationsperioden unter UV-B-Ausschluss heranwachsen. Alternativ oder besser parallel wäre ein entsprechender Versuch im Sonnensimulator, bei dem die Bedingungen besser kontrollierbar sind, durchzuführen.

4.3 Inhaltsstoffanalyse

Die Inhaltsstoffanalyse der Kiefernnadeln erfolgte parallel zu den Aktivitätsmessungen der Enzyme, um die Akkumulation der Enzymprodukte mit dem zeitlichen Verlauf der Enzymaktivitäten vergleichen zu können. Der Schwerpunkt lag dabei auf den UV-B-Schutzpigmenten, den acylierten und nichtacylierten Flavonolglykosiden (Jungblut *et al.* 1995, Wilson *et al.* 1998, einen Überblick gibt Harborne & Williams 2000) und den zellwandgebundenen Hydroxyzimtsäuren (Fischbach *et al.* 1999). Es wurden aber auch andere Inhaltsstoffe gemessen, von denen bekannt war, dass sie als Stressantwort akkumulieren, wie Catechin, dessen Gehalt z. B. bei SO₂-Belastung ansteigt (Härtling & Schulz 1998), oder Stilbene, deren Synthese durch Ozon induziert wird (Rosemann *et al.* 1991). Die Gehalte dieser Verbindungen wurden hier erstmals im Jahresverlauf im Freiland bei ungeschädigten adulten Kiefern untersucht.

Die Analyse der Einzelsubstanzen mit HPLC eröffnete zudem die Möglichkeit, den Verlauf des Gehalts dieser Verbindungen sowohl im Freiland als auch in UV-B-Expositionsexperimenten in Sonnensimulatoren zu verfolgen und damit u. a. Unterschiede innerhalb der Substanzklassen aufzudecken. In der Literatur wird oft nur der Summengehalt von Flavonoiden oder anderen phenolischen Inhaltsstoffen beschrieben, der durch die Messung der Extinktion von methanolischen Extrakten ermittelt wird. Dabei bleibt allerdings oft unklar, um welche Substanzen es sich handelt (siehe z. B. Cuadra *et al.* 1997, Jordan *et al.* 1994, Strid & Porra 1992).

Von den Methanol-löslichen Inhaltsstoffen wurden 13 Verbindungen untersucht. Diese 13 Verbindungen lassen sich nach ihrem chromatographischen Verhalten in vier Gruppen einteilen: (i) Flavane (Proanthocyanidine) und Hydroxyzimtsäure-Derivate, (ii) Flavonolglykoside, (iii) acylierte Flavonolglykoside und (iv) Stilbene. In dieser Reihenfolge werden die Ergebnisse dieser Verbindungen diskutiert.

Catechin war von besonderem Interesse für die Messungen an Freilandbäumen, da es hier nur wenig Daten über den zeitlichen Verlauf des Gehalts während des Jahres gibt, dieser Inhaltsstoff aber als Indikator für Umweltstress bei Bäumen diskutiert wird. So konnte eine Akkumulation von Catechin in Kiefernnadeln in Abhängigkeit der Exposition mit SO₂ und eine positive Korrelation mit Nekrosenbildung beobachtet werden (Härtling & Schulz 1998). Daneben zeigt Catechin auch eine positive Wirkung auf das Wachstum von Buchengewebe und wirkt antioxidativ (Feucht *et al.* 1997), was allgemein für Flavonoide angenommen wird

(Bors *et al.* 1998, Grace & Logan 2000). In den Freilandbäumen war in jungen Nadeln kein Catechin, anders als bei Fichte (Strack *et al.* 1989), nachweisbar. Ab dem Ende der Vegetationsperiode, mit zunehmendem Alter der Nadeln, stieg der Gehalt an, was wiederum mit den Ergebnissen von Strack *et al.* übereinstimmt. In zweijährigen Nadeln wurden 3 bis 4 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG erreicht.

In den Sonnensimulatorexperimenten V 623b und V 658 konnte keine UV-B-abhängige Induktion der Catechinsynthese festgestellt werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen in Fichte von Fischbach *et al.* 1999 überein, wo ebenfalls kein Einfluss von UV-B auf den Catechingehalt gefunden wurde. Das Ergebnis von V 623b zeigt allerdings Abweichungen von V 658, da der Catechingehalt während der Akklimatisierung zunahm und in der UV-B-Variante mit dem höchsten UV-B-Anteil am Versuchsende nach 13 Tagen am höchsten war. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Pflanzen in V 623b durch die Akklimatisierung, die mit einer schlagartigen Erhöhung der Lichtintensität durch das Umstellen der Keimlinge von der Anzuchtammer mit ca. $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in den Sonnensimulator mit ca. $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ begann, gestresst wurden. In V 658 wurde die Lichtintensität während der Akklimatisierungsphase im Sonnensimulator innerhalb einer Woche auf die maximale Leistung gesteigert, was nicht zu einer Anreicherung von Catechin führte. Dieser Vergleich der beiden UV-B-Expositionsexperimente unterstreicht die Wichtigkeit der kontrollierten Akklimatisierung an die neuen Verhältnisse in den Sonnensimulatoren gegenüber der Anzuchtammer, bevor das eigentliche Experiment begonnen wird.

Der erhöhte Catechingehalt in der höchsten UV-B-Stufe kann dahingehend interpretiert werden, dass Schäden durch den extrem hohen Anteil kurzwelliger UV-B-Strahlung in der Nadel auftraten, was zu einer Stressreaktion führte. Die Tagesdosis dieser UV-B-Stufe war mit 34 MED wesentlich höher als die natürlicherweise an einem offenen Standort in Mitteleuropa vorkommende Tagesdosis von maximal 20 MED. Für *Pinus taeda* konnte gezeigt werden, dass schon eine zusätzliche UV-B-Bestrahlungsstärke von 15 % zu einem verringerten Wachstum führte (Sullivan & Teramura 1992). Da aber keine dosisabhängige Wirkung von UV-B auf den Catechingehalt festgestellt werden konnte, scheidet Catechin als UV-B-Schutzpigment aus, was als Erklärung der höhenabhängigen Zunahme des Catechingehalts bei der Fichte postuliert wurde (Richter *et al.* 1996). Es ist in der Kiefer eher als ein Stressmetabolit zu betrachten, dessen protektive Wirkung auf den antioxidativen Eigenschaften beruht.

Das Hydroxyzimtsäure-Derivat 1 hat ein Absorptionsmaximum von 294 nm, das im kurzwelligen UV-B-Bereich liegt. Die hohe Konzentration, in der diese Verbindung in sehr jungen Nadeln in den ersten Wochen während der Entwicklung vorhanden ist, deutet auf eine

Funktion beim UV-B-Schutz hin. Verbindung 3 zeigte dagegen bei den Freilandmessungen einen Anstieg des Gehalts während der Nadelentwicklung zu einem Maximum im Juni des ersten Jahres. Obwohl der Gehalt insgesamt eher niedrig war (der Gehalt von Verbindung 3 betrug ca. 20 bis 30 % des Catechingehalts), scheint auch dieser Metabolit einen Beitrag zum UV-B-Schutz leisten zu können, da in den Sonnensimulatorexperimenten diese Verbindung dosisabhängig durch UV-B induziert wurde. Das Absorptionsmaximum liegt mit 287 nm ebenfalls im kurzwelligen UV-B-Bereich, damit ist auch die physikalische Voraussetzung für ein UV-B-Schutzpigment erfüllt. Eine Strukturanalyse dieser beiden Verbindungen, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt wurde, könnte zeigen, inwieweit diese beiden Verbindungen auch als Zwischenprodukte für die Synthese anderer phenolischer Inhaltsstoffe fungieren.

Der Gehalt von löslichen, nichtacylierten Flavonolglykosiden in der Kiefer wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals sowohl bei adulten Freilandbäumen als auch in UV-B-Expositionsexperimenten gemessen. Im Freiland wurden diese Verbindungen, besonders Kämpferol 3-glukosid, bisher nur in der Fichte untersucht (Fischbach *et al.* 1999, Slimestad 1998, Strack *et al.* 1989). Dort wurde eine starke Abnahme von K3G und anderen Flavonolglykosiden während der frühen Nadelentwicklung festgestellt, unabhängig vom Anteil der UV-B-Strahlung. Im Gegensatz dazu konnte bei den vorliegenden Freilandmessungen bei Kiefer K3G nicht in nennenswerter Menge gefunden werden. Dafür zeigte das Kämpferolglykosid 5 ein ähnliches Verhalten wie K3G in der Fichte. Hier konnte die höchste Konzentration mit 0.5 bis 1.0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG im Mai gemessen werden, anschließend fiel der Gehalt im Juni auf ca. 0.2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG ab. Dieser Peak fällt mit dem Zeitraum der Akkumulation der diacylierten Flavonolglykoside zusammen, wodurch sich die Frage stellt, ob es sich hierbei um eine Translokation von nichtacylierten zu diacylierten Verbindungen handelt. Dagegen spricht, dass die Menge der nichtacylierten Verbindungen mit maximal 1.0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG im Vergleich zu den diacylierten Verbindungen mit bis zu 4.0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG gering ist. Es scheint eher der Fall zu sein, dass die Synthese der Flavonolglykoside schneller verläuft als die Acylierung, weswegen sich dann vorübergehend die nichtacylierten Verbindungen anreichern. Auf jeden Fall unterliegen die Flavonolglykoside in den jungen, sich entwickelnden Nadeln in *Pinus* einem lebhaften Metabolismus, wie es auch schon für *Picea* gezeigt wurde (Niemann 1979).

Vier Flavonolglykoside wurden bei Kiefernkeimlingen in den UV-B-Experimenten, unter ihnen auch K3G, untersucht. Dabei zeigte sich bei den beiden Experimenten ein unterschiedliches Verhalten. Während bei V 623b bei allen Flavonolglykosiden eine UV-B-abhängige

Akkumulation zu beobachten war, war dies bei V 658 nur bei dem Quercetinderivat 7 der Fall. Die anderen drei Verbindungen zeigten eine Abnahme während der Versuchsdauer bei allen Behandlungsvarianten. Diese entwicklungsbedingte Abnahme war auch bei der Schwachlichtvariante bei V 623b zu beobachten. Turunen *et al.* 1999 haben bei UV-B-Ausschlussexperimenten ein ähnliches Verhalten feststellen können, wie es V 623b zeigt, und zwar einen UV-A / UV-B-abhängigen Anstieg des Gehalts der untersuchten Flavonolglykoside, vor allem von K3G. Es bleibt unklar, warum sich K3G bei V 658 anders verhält. K3G war bei allen Experimenten mit Kiefernkeimlingen das häufigste Flavonolglykosid, bei V 658 hatte es zu Beginn der UV-B-Behandlung eine Konzentration von 2.6 bis 2.8 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG, während die drei anderen Flavonolglykoside Konzentrationen zwischen 0.3 bis 0.7 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG aufwiesen.

Diacylierte UV-B-Schutzpigmente sind bisher nicht während der Nadelentwicklung in adulten Kiefern untersucht worden. Hier zeigte sich ein unerwarteter Verlauf der Kämpferol- und Isorhamnetinderivate, deren Gehalt nach einer schnellen Akkumulation während der Nadelentwicklung im Juni auf bis zu 3.5 bis 4.0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG noch im gleichen Sommer auf die Hälfte abnahm. Dieser Verlauf stimmt sehr gut mit der Aktivität der 6''-HCT überein, wie Abb 4.1 zeigt. Während des steilsten Anstieg des Gehalts der diacylierten Verbindungen war die Aktivität der 6''-HCT am größten. Keine Enzymaktivität war mehr nachweisbar, als der Gehalt der Metabolite zurückging. Eine Modellrechnung zeigte, dass die Enzymaktivität für die Menge der nachgewiesenen diacylierten Verbindungen ausreichte. Bei einer spezifischen Aktivität von 20 $\mu\text{kat kg}^{-1}$ (*in vitro*) sind bei einem Proteingehalt von 4-5 mg Gesamtprotein pro g FG ca. 13 h nötig, um 4 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG zu synthetisieren. Der angegebene Proteingehalt bezieht sich auf die aus jungen Nadeln extrahierte Proteinmenge. Bei älteren Nadeln können höhere Werte erreicht werden.

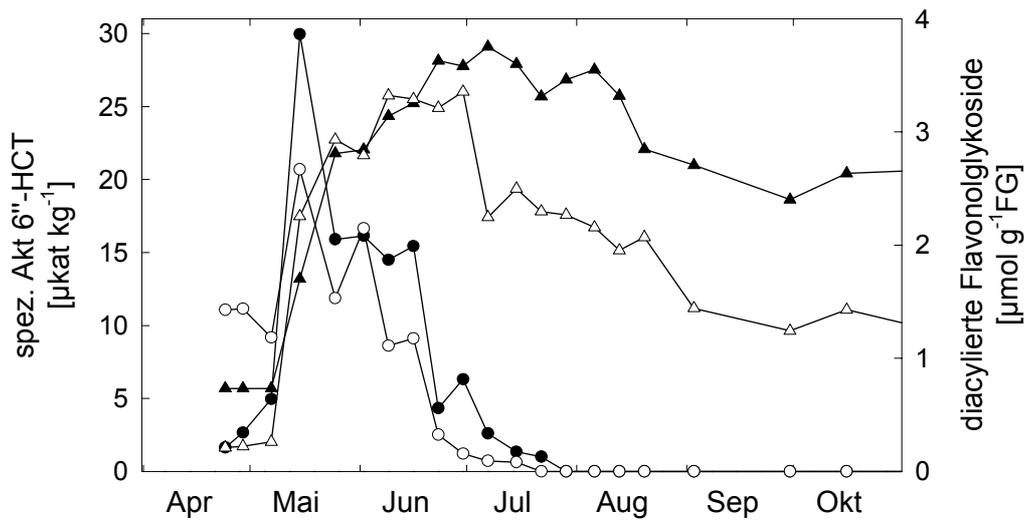


Abb. 4.1: Vergleich der Aktivität der 6''-HCT mit dem Gehalt der diacylierten Verbindungen. Geschlossenen Symbole: Baum A, offene Symbole: Baum B; ●/○: Aktivität der 6''-HCT, ▲/△: Gehalt der diacylierten Verbindungen.

Auch im zweiten Jahr verringerte sich der Gehalt weiter, sodass am Ende des Messzeitraums nur noch 0.5 bis 0.6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG gemessen wurden. Dieses Verhalten ist auch für Fichte nord-europäischer Herkunft nachgewiesen worden (Slimestad 1998) und deutet darauf hin, dass der UV-B-Schutz durch die diacylierten Verbindungen von vorübergehender Bedeutung ist und andere Inhaltsstoffe diese Rolle in späteren Phasen der Nadelentwicklung übernehmen. Wie noch gezeigt wird, kommen dafür zellwandgebundene Metabolite in Frage. Die diacylierten Verbindungen wären dann für den UV-B-Schutz während der frühen Nadelentwicklung verantwortlich. Neben dem UV-B-Schutz gibt es noch einen zweiten Aspekt, der mit der Akkumulation dieser Verbindungen in Zusammenhang steht. So wurde gezeigt, dass die phenolischen Inhaltsstoffe von Koniferen sowohl als Fraßschutz als auch gegen die Eiablage von phytophagen Insekten wirken können (Abou-Zaid *et al.* 2000). Gerade die jungen Nadeln sind aufgrund des hohen Stickstoffgehalts, den sie entwicklungsbedingt besitzen, attraktiv für Herbivoren, weswegen sie geschützt werden müssen (Feeny 1992). So schützen sich auch austreibende Blätter von *Coffea* durch die transiente Akkumulation von Alkaloiden vor Fraßfeinden (Frischknecht *et al.* 1986). Für diese Funktion als Deterrent kommt neben den acylierten Flavonolglykosiden auch das Flavan 1 in Frage, das ebenfalls in der frühen Nadelentwicklung in hoher Konzentration vorkommt und dessen Gehalt dann während der weiteren Nadelentwicklung abnimmt. Da die Biosynthese der Sekundärmetabolite für die Pflanze hohe Kosten verursacht (Harper 1989), zeigt der hohe Gehalt von phenolischen Inhaltsstoffen in den jungen Nadeln, dass sie unter diesen ökologischen Gesichtspunkten für den Baum sehr wertvoll sein müssen.

Die Betrachtung der beiden diacylierten Isorhamnetinderivate zeigt Unterschiede bei der Verteilung zwischen den einzelnen Jahrgängen. Während in den Jahren '97 und '98 die Konzentrationen der heteroacylierten Verbindung zwischen 0.6 und 0.8 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG und im Gegensatz dazu die der homoacylierten Verbindung zwischen 0.2 und 0.3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG lag, war die Verteilung im Jahr '99 mit 0.2 bzw. 0.6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG umgekehrt. Diese Beobachtung konnte bei beiden Bäumen gemacht werden und zeigt, dass Unterschiede in der Verteilung der phenolischen Inhaltsstoffe bei den gleichen Individuen zwischen verschiedenen Jahren bestehen, also offenbar nicht von der genetischen Ausstattung, sondern von anderen Faktoren, z. B. der Umwelt, abhängen.

Die diacylierten Quercetinderivate zeigten einen anderen Verlauf als die Kämpferol- und Isorhamnetinderivate, da sie erst ab Mitte Juli nachgewiesen werden konnten und ihre Konzentration nicht mehr als 1.0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG erreichte. Dies könnte als Ergebnis der Aktivität einer Methyltransferase interpretiert werden, die in der frühen Phase der Nadelentwicklung die Quercetinderivat vollständig zu Isorhamnetinderivaten umsetzt. Die Quercetinverbindungen sind zumindest im Vergleich zu anderen diacylierten Verbindungen für den UV-B-Schutz von untergeordneter Bedeutung.

Bei Kiefernkeimlingen in den Sonnensimulatorexperimenten zeigten die diacylierten Verbindungen eine deutliche UV-B-Induzierbarkeit, wie es auch schon bei anderen Untersuchungen beobachtet wurde (Schnitzler *et al.* 1997). Verknüpft man nun die Freilanddaten mit den Ergebnissen der Sonnensimulatorexperimente, so zeigt sich, dass die Biosynthese der Verbindungen im Freiland ebenfalls während der Nadelentwicklung, offenbar durch UV-B induziert, stattfindet. Offenbar besteht aber die Induzierbarkeit nur in einer zeitlich begrenzten, frühen Phase der Nadelentwicklung, während in älteren Nadeln die Fähigkeit zur Biosynthese, trotz hoher UV-B-Werte, die im Hochsommer und im zweiten Jahr vorhanden sind, nicht mehr besteht.

Von den zellwandgebundenen Inhaltsstoffen in den Freilandbäumen war *trans*-Cumarinsäure mit bis zu 2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG die häufigste Hydroxyzimtsäure und K3G mit bis zu 3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG das häufigste Flavonolglykosid. Alle zellwandgebundenen Inhaltsstoffe erreichten ihre maximale Konzentration später als die diacylierten Flavonolglykoside, wobei *trans*-Cumarinsäure schneller akkumulierte (Maximum im Juli / August) als Ferulasäure und K3G (Maximum jeweils im September). Dieses Verhalten ist ein Indiz dafür, dass die zellwandgebundenen Metabolite für den langfristigen UV-B-Schutz verantwortlich sind, da ihr Gehalt zunimmt, während der Gehalt der löslichen diacylierten Verbindungen abnimmt. Die Funktion der zellwandgebundenen Inhaltsstoffe als UV-B-Schutz wird durch die verstärkte

Akkumulation durch UV-B in den Expositionsexperimenten deutlich: Nach zehn Tagen UV-B-Behandlung war der Gehalt von Hydroxyzimtsäuren und Flavonolglykosiden in der +UV-B-Variante ungefähr 50 % höher als in der -UV-B-Variante.

Die starke Abnahme der diacylierten Verbindungen in der zweiten Hälfte der ersten Vegetationsperiode zusammen mit der Zunahme der zellwandgebundenen Metabolite in diesem Zeitraum wirft die Frage nach der Translokation der Verbindungen von dem einen Pool zum anderen auf. Zur genaueren Betrachtung ist für den Baum B das Verhalten des löslichen Kämpferol 3-glykosids, des homo-diacylierten K3G und der beiden zellwandgebundenen Verbindungen *trans*-Cumarsäure und K3G für das Jahr 1998 gegenübergestellt (Abb. 4.2).

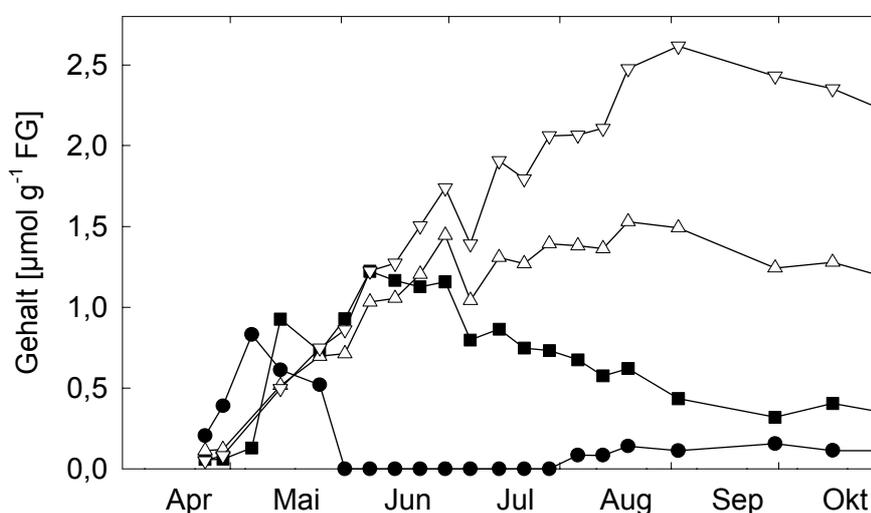


Abb. 4.2: Verlauf ausgewählter Inhaltsstoffe des Nadeljahrgangs 1998 von Baum B im Jahr 1998.

- : lösliches Kämpferolglykosid (Peak 5), ■: 3''-6''-Di-(*p*-cumaroyl)-K3G,
- ▽: zellwandgebundenes K3G, △: zellwandgebundene Cumarsäure.

Dabei zeigt sich, dass in der ersten Hälfte der Vegetationsperiode eine starke biosynthetische Aktivität den Gehalt sowohl der diacylierten Verbindung als auch der zellwandgebundenen Metabolite ansteigen lässt. In dieser Phase ist auch das nichtacylierte, lösliche Kämpferolglykosid nachweisbar. In der zweiten Hälfte der Vegetationsperiode nimmt der Gehalt der diacylierten Verbindung ab, während die zellwandgebundenen Verbindungen weiter zunehmen. Hier wird offenbar die Syntheseaktivität für Flavonolglykoside und Hydroxyzimtsäuren geringer und es kommt zu einer Verschiebung der löslichen diacylierten Verbindungen in die Zellwand. Der höhere Gehalt von K3G gegenüber Cumarsäure zeigt aber, dass es sich nicht ausschließlich um eine derartige Translokation handeln kann, da in diesem Fall der Gehalt von Cumarsäure doppelt so hoch sein müsste wie der von K3G. Da auch der Pool der lösli-

chen nichtacylierten Verbindungen klein ist und zu diesem Zeitpunkt nicht abnimmt, muss weiterhin die Neusynthese von Flavonolglykosiden stattfinden, die dann aber ausschließlich in die Zellwand eingebaut werden. Sobald die Akkumulation der zellwandgebundenen Verbindungen nachläßt, erscheinen wieder lösliche nichtacylierte Flavonolglykoside. Die Neusynthese und der Einbau in die Zellwand ist auch in der zweiten Vegetationsperiode, wenn auch in geringerem Umfang als in der ersten Vegetationsperiode, zu beobachten. Eine zweite Möglichkeit, das Missverhältnis von K3G zu Cumarsäure bei den zellwandgebundenen Inhaltsstoffen gegenüber den diacylierten Verbindungen zu erklären, ist die Verwendung von Cumarsäure für die Synthese von Lignin (Strack & Mock 1993). Die zu Cumarylalkohol reduzierte Cumarsäure wird nicht durch die alkalische Hydrolyse freigesetzt und ist deswegen nicht mit dieser Methode nachweisbar.

Eine Bestätigung der Hypothese der gleichzeitigen Synthese von diacylierten und zellwandgebundenen Verbindungen ergibt sich aus den Ergebnissen der UV-B-Expositionsexperimente, da dort beide Prozesse UV-B induziert sind und gleichzeitig ablaufen. Die Akkumulation der zellwandgebundenen Metabolite verläuft allerdings in den ersten drei Tagen langsamer als die der diacylierten Verbindungen. Die Dauer des Experiments war zu kurz, um eine eventuell vorkommende Translokation vom löslichen Pool in die Zellwand beobachten zu können.

Die Stilbene Pinosylvin und Pinosylvinmethylether konnten in den Nadeln von Kiefernceimlingen in den Expositionsexperimenten nicht nachgewiesen werden, d. h. es erfolgte keine Induktion der Synthese durch UV-B. Dagegen wurde nach einer 24-stündigen Ozonbehandlung mit einer Konzentration von 100 bis 200 nl l^{-1} die Induktion der Biosynthese in Keimlingen beobachtet (Rosemann *et al.* 1991, Zinser *et al.* 2000). In Fichte wurden bei Freilandmessungen an adulten, ungestressten Nadel insgesamt vier verschiedene Stilbene identifiziert (Strack *et al.* 1989). Deren Gehalt nahm ab Juli / August im ersten Jahr der Nadeln zu und war im Winter am höchsten. Die eigenen Messungen zeigen, dass in Kiefer die Stilbene erst später, ab Oktober, nachgewiesen werden können. Aber auch hier war der Gehalt im Winter am höchsten und nahm im Verlauf des zweiten Sommers wieder ab. Insgesamt war der Gehalt mit maximal 0.1 bis 0.2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ FG gering (zum Vergleich: das Kernholz der Kiefer enthält bis zu 3 % Pinosylvin bezogen auf das Trockengewicht (Bergström *et al.* 1999)). Die Bildung der Stilbene scheint also eine Folge der (Kälte-)Anpassung der Bäume an den Winter sein. Zumindest führt die „natürliche“ hochsommerliche Ozonexposition im Freiland nicht zu einer Reaktion der Bäume (auf dem Gelände der GSF werden bis zu 100 nl l^{-1} Ozon in den Sommermonaten gemessen).

Die Messungen der verschiedenen Parameter an den Freilandbäumen zeigten einige individuelle Unterschiede zwischen den Bäumen, vor allem in Bezug auf die absoluten Werte, weniger aber in Bezug auf den zeitlichen Verlauf. Aus diesem Grund wurden auch die Ergebnisse der beiden Bäume in der vorliegende Arbeit nicht zusammengefasst, sondern immer einander gegenübergestellt. Ein zweiter Grund dieser Vorgehensweise war ein Unterschied in der zeitlichen Entwicklung der beiden Bäume. Baum B war Baum A entwicklungsmäßig, z. B. bei Blühbeginn oder Austrieb, jeweils um ca. eine Woche voraus, was durch die stärker südliche Exposition von Baum B erklärt werden kann.

Die vergleichenden Messungen von adulten Freilandbäumen und Keimlingen in den Sonnensimulatoren haben gezeigt, dass Keimlinge ein gutes Modell für Untersuchungen an Koniferen sind, da die Primärnadeln der Keimlinge vergleichbar mit jungen austreibenden Nadeln von adulten Bäumen sind. Die Keimlinge haben gegenüber älteren Versuchspflanzen nicht nur den Vorteil, durch kurze Anzuchtzeiten schneller zu Verfügung zu stehen, sondern sind auch kleiner, sodass mehr Individuen, gerade in Sonnensimulatoren, untersucht werden können und die individuelle Variation dadurch besser zu kontrollieren ist. Für adulte Bäume wären solche Experimente wesentlich aufwändiger. Aber man muss auch mit Keimlingen den Versuchszeitraum genügend lang wählen, da die Nadelentwicklung im Freiland mehrere Monate benötigt.

4.4 Rolle der untersuchten Inhaltsstoffe für den UV-B-Schutz der Kiefer

Fasst man die Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessungen und der Inhaltsstoffanalysen von den Freilandbäumen und den Keimlingen aus den UV-B-Expositionsexperimenten zusammen, lassen sich einige Aussagen zum UV-B-Schutz der Kiefer machen:

(i) Die Gehalte der diacylierten Verbindungen reichen aus, um das Nadelmesophyll vor UV-B-Strahlung zu schützen. Die Berechnungen zur Ermittlung der Transmission der Epidermis bei Schnitzler *et al.* 1996 zeigen, dass ein Gehalt der diacylierten Verbindungen von ca. $4 \mu\text{mol g}^{-1}$ FG bei Keimnadeln zu einer Transmission von $2 \times 10^{-5} \%$ bei 300 nm führt (unter der Voraussetzung, dass die diacylierten Verbindungen gleichmäßig in der Epidermis verteilt sind und bei einem angenommenen Epidermis-Volumen von $104 \mu\text{l g}^{-1}$ FG). Bei den Freilandbäumen wurden Gehalte von 3.5 bis 4, bei den Keimlingen in den Primärnadeln bis $3.5 \mu\text{mol g}^{-1}$ FG erreicht. Diese Werte und damit auch die Transmission liegen bei den hier untersuchten Nadeln also in der gleichen Größenordnung. Die Kiefernnadeln sind durch die

UV-B-Schirmpigmente sehr effektiv vor UV-B-Strahlung geschützt sind, was auch mit faser-optischen Messungen gezeigt worden war (Day 1993, DeLucia *et al.* 1992).

(ii) Die gemessene Aktivität der HCT's reicht aus, um die ermittelte Konzentration von diacylierten Verbindungen zu synthetisieren. Die Biosynthese wird von der Aktivität der 6''-HCT reguliert, die entwicklungsabhängig durch UV-B induzierbar ist.

(iii) Die diacylierten Verbindungen bilden einen UV-B-Schutz während der Entwicklung von Nadeln, der von der Pflanze schnell aufgebaut werden kann, aber nicht langfristig angelegt ist. Bei älteren Nadeln, bei denen keine Aktivität der 6''-HCT beobachtet werden konnte, findet ein Abbau der diacylierten Verbindungen statt und der UV-B-Schutz wird von zellwandgebundenen Inhaltsstoffen übernommen, die langsamer als die löslichen Verbindungen akkumulieren.

(iv) Der Gehalt der diacylierten Verbindungen ist in Kiefernkeimlingen abhängig von der UV-B-Dosis. Die Pflanze ist also in der Lage, sich verschiedenen UV-B-Belastungen anzupassen. In den UV-B-Expositionsexperimenten wurde die Grenze der Belastbarkeit nicht erreicht, wobei die Tagesdosis bei V 623b deutlich oberhalb der natürlich vorkommenden Tagesdosis lag. Offenbar gibt es einen Puffer, mit dem die Kiefer auch höhere UV-B-Belastungen, wie sie bei einer Ausdünnung der stratosphärischen Ozonschicht zu erwarten sind, ertragen kann. Es bleibt die Frage nach der oberen Grenze der UV-B-Belastung und ob es einen Schwellenwert gibt, bei dem der Schutz durch die Schirmpigmente nicht mehr ausreicht. Dies müsste in Sonnensimulatorexperimenten überprüft werden. Die Dosisabhängigkeit der Biosynthese der diacylierten und einiger zellwandgebundener Verbindungen zeigt auch, dass es eine Translokation von Kohlenstoff vom Primär- in den Sekundärstoffwechsel durch UV-B gibt. Dies ist ein Hinweis auf die Ursache des verringerten Wachstums, das bei Keimlingsexperimenten festgestellt wurde (Laakso & Huttunen 1998).

4.5 Anthocyane in Kiefer

In weiblichen Blütenzapfen und Hypokotyl wurden insgesamt fünf verschiedene Anthocyane gefunden, von denen keine mit Hydroxyzimtsäuren acyliert war. Dabei war Cyanidin 3-glucosid die Hauptverbindung mit einem Anteil von ca. 85 %. Anhand der Diodenarray-Spektren konnten keine acylierten Anthocyane identifiziert werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten überein, die bisher zu Kiefer (Andersen 1992) und Fichte (Slimestad 1997) publiziert wurden, und werden als primitive Merkmale von Gymnospermen gegenüber den höher entwickelten Angiospermen interpretiert (Harborne 1993).

Das in den Blüten zweithäufigste Anthocyan war entgegen den Ergebnissen von Andersen 1992 nicht Päonidin 3-glukosid, da das Aglykon Päonidin nicht nach der sauren Hydrolyse nachgewiesen werden konnte, sondern ein Delphinidin-Derivat. Delphinidin 3-glukosid wurde auch in Kiefernadel gefunden (Toivonen *et al.* 1991). Allerdings ist nicht bekannt, ob sich verschiedene Kultivare von *Pinus* im Hydroxylierungs- und Methylierungsmuster der Anthocyanidine und damit im Vorkommen von Delphinidin und Päonidin unterscheiden.

Die Rotfärbung von Keimlingsnadeln, die bei UV-B-Expositionsexperimenten in den Sonnensimulatoren beobachtet wurde, geht nicht auf eine Akkumulation von Anthocyanen zurück, sondern wird durch die Abnahme des Chlorophyllgehalts verursacht. Diese Veränderung des Chlorophyllgehalts ist als eine modulative Strahlungsanpassung an die veränderten Lichtverhältnisse durch die Umstellung der Keimlinge von der Anzuchtammer in den Sonnensimulator anzusehen (Larcher 1994).

Andererseits erfolgte aber eine Zunahme des Anthocyangehalts im Hypokotyl der Keimlinge, der starklicht- oder UV-A-abhängig sein muss, da er in beiden Behandlungsvarianten von V 658 zu beobachten war. Dies scheint jedoch eher eine Starklichtanpassung zu sein als ein gezielter Schutz vor UV-B, da die Anthocyane kaum einen Beitrag zum UV-B-Schutz liefern können: (i) sind sie nicht acyliert, was eine geringe Absorption im UV-B-Bereich zu Folge hat, (ii) werden sie nicht durch UV-B induziert. Demgegenüber wurde nachgewiesen, dass Anthocyane Blätter vor Photoinhibition schützen können, da sie im gleichen Wellenlängenbereich absorbieren wie Chlorophyll *b* (Gould *et al.* 1995).

Letztlich ist die Funktion der Anthocyane in Koniferen unklar, doch ist eine Rolle als UV-B-Schutz aufgrund der Ergebnisse unwahrscheinlich. Es wurde auch eine Akkumulation von Anthocyanen in Kiefern als Folge von Frosthärtung und Winteranpassung (Toivonen *et al.* 1991) beobachtet, ohne dass die ökophysiologische Rolle dieses Verhaltens hätte erklärt werden können. Ebenso ist die Frage, warum Anthocyane in weiblichen Blütenzapfen in großer Menge vorkommen, offen (Cooper-Driver & Bhattacharya 1998). Dies ist eine allgemeine Eigenschaft von Koniferen, was sich besonders gut bei Lärchen beobachten lässt. Diese blühen im zeitigen Frühjahr zu einem Zeitpunkt, zu dem die Nadeln noch nicht entwickelt sind und die Blüten deswegen deutlich hervortreten. Da aber Koniferen windbestäubt sind (Anemophilie), brauchen sie nicht mit Hilfe von Blütenfarbstoffen Insekten oder andere Bestäuber anzulocken. Zudem eignen sich Anthocyane als UV-B-Schutz aufgrund ihrer Absorptionseigenschaften nur schlecht. Gerade bei den Reproduktionsorganen ist aber ein effektiver Schutz vor UV-B-Strahlung sehr wichtig.

4.6 Biochemische Charakterisierung der Enzyme

Es sind bisher noch keine biochemischen Parameter von Hydroxycinnamoyl-Transferasen, die Flavonol 3-glukoside acylieren, bekannt. Nach den bisher zur Verfügung stehenden Daten sind sich *O*- und *N*-HCT's in ihren biochemischen Eigenschaften sehr ähnlich, weswegen die HCT's aus der Kiefer mit Vertretern aus beiden Klassen verglichen werden. Dieser Vergleich wiederum zeigt, dass die 3''- und die 4''-HCT diesen anderen Enzymen ähnlich sind, die 6''-HCT aber in einigen Eigenschaften wie Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt von allen anderen Hydroxycinnamoyl-Transferasen abweicht.

Die Größe der pflanzlichen Hydroxycinnamoyl-Transferasen beträgt zwischen 40 (Matsukawa *et al.* 2000) und 75 kDa (Ulbrich & Zenk 1979) mit einem Schwerpunkt bei ca. 50 kDa (Fujiwara *et al.* 1998a, Hohlfeld *et al.* 1996b). Bei den Enzymen handelt es sich um lösliche, monomere Proteine mit Ausnahme der Tyramin-Hydroxycinnamoyl-Transferasen. Diese sind dimere Enzyme, deren Untereinheiten ein Molekulargewicht von 24 bis 28 kDa haben (Hohlfeld *et al.* 1995, Yu & Facchini 1999). Die 3''- und 4''-HCT mit nativen, apparenten Molekulargewichten von 45 bzw. 35 kDa liegen also im gleichen Bereich wie andere Hydroxycinnamoyl-Transferasen. Für die 6''-HCT wurde mit 9 kDa, das entspricht ungefähr 80 Aminosäuren, eine extrem geringe apparente Molmasse ermittelt. Andere Acyltransferasen dieser Größe sind nicht bekannt.

Ein ähnlich großer Unterschied besteht auch im isoelektrischen Punkt. Hier wurden bei Anthocyanin-Hydroxycinnamoyl-Transferasen Werte von 4.6 bis 5.3 (Fujiwara *et al.* 1998a, Fujiwara *et al.* 1997), bei einer ω -Hydroxypalmitat-Hydroxycinnamoyl-Transferase von 4.6 festgestellt (Lotfy *et al.* 1996). Auch hier liegen die 3''-HCT und die 4''-HCT mit einem pI von 4.7 im gleichen Bereich wie andere Acyltransferasen, während die 6''-HCT mit einem pI von 7.7 bis 7.9 eine Ausnahme bildet.

Es ist nicht klar, ob diese abweichenden Eigenschaften der 6''-HCT auch *in vivo* vorhanden sind oder ob es sich um Artefakte handelt, die durch Extraktion und Reinigung erst *in vitro* zustande kommen. Eine mögliche Erklärung dieses Befundes ist das Auftreten einer proteolytischen Spaltung des Enzyms während der ersten Reinigungsschritte, die ein enzymatisch aktives Peptid zur Folge hat. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei der Reinigung der Anthranilat-Acyltransferase aus *Dianthus* gemacht. Dort wurden neben dem 53 kDa Holo-protein auch zwei Peptide mit 22 und 31 kDa gereinigt, die mittels Immunodetektion als enzymatisch aktive proteolytische Abbauprodukte identifiziert werden konnten (Yang *et al.* 1997). Eine Spaltung des Proteins würde gleichzeitig mit dem Molekulargewicht auch den pI beeinflussen, da dieser von der Aminosäurestruktur des Peptids abhängt. Die Abspaltung des

Peptids müsste allerdings sehr früh, vermutlich schon während des Aufschlusses des Zellen, stattfinden. Ein Hinweis darauf ist der Befund, dass bereits beim ersten chromatographischen Reinigungsschritt mit dem Anionenaustauscher Q-Sepharose der pI hoch sein muss, da die Enzymaktivität bei einem pH-Wert des Puffers von 7.5 nicht an den Anionenaustauscher bindet, also in kationischer oder neutraler Form vorliegt. Das bedeutet, dass das Enzym schon bei diesem Reinigungsschritt einen pI hat, der oberhalb des pH-Wertes des Puffers liegt. Eine andere Möglichkeit wäre ein chromatographischer Artefakt bei der Gelfiltration. Durch unspezifische Interaktionen des Enzymproteins mit der Matrix würde die Elution verzögert, was zu einer fehlerhaften Berechnung der apparenten Molmasse führen würde.

Im Gegensatz zu Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt, bei denen sich 3''- und 4''-HCT ähnlich sind und sich von der 6''-HCT stark unterscheiden, ist dies bei pH- und Temperatur-Optimum nicht der Fall. Hier konnten für die 4''- und die 6''-HCT mit einem pH-Optimum von 8 und eine optimale Temperatur von 44°C die gleichen Werte ermittelt werden, während die Werte für die 3''-HCT mit einem pH-Optimum von 7 und einem Temperatur-Optimum von 40°C jeweils etwas darunter liegen. Diese Werte befinden sich in einem Bereich, der auch für andere Hydroxycinnamoyltransferasen ermittelt wurde. So liegen die pH-Optima zwischen 6.3 für eine Quinat-Hydroxycinnamoyl-Transferase (Rhodes *et al.* 1979) und 8.5 für eine Anthocyanin-Hydroxycinnamoyl-Transferase (Fujiwara *et al.* 1997). Die Enzymtests bei den Freiland- und Sonnensimulatorexperimenten wurden bei einem pH-Wert von 6.8 durchgeführt. Die 6''-HCT erreicht bei diesem pH-Wert ca. 70 % der maximalen Aktivität.

Das Temperatur-Optimum wurde erst für wenige Hydroxycinnamoyl-Transferasen bestimmt. Es betrug für vier Transferasen aus *Equisetum arvense*, die die Substrate Tartrat, Caffeoyl-Tartrat, Shikimat und Quinat acylieren, jeweils bei 40°C (Hohlfeld *et al.* 1996b).

Die drei HCT's zeigten auch in Bezug auf Kationen und Enzyminhibitoren unterschiedliche Eigenschaften. Während einerseits die 3''- und die 4''-HCT durch zweiwertige Kationen in geringem Umfang gehemmt werden (32 bis 13 % Hemmung), ist dies bei der 6''-HCT nicht der Fall. Die Aktivität der 6''-HCT wird durch je 10 mM Ca^{2+} und Mg^{2+} um ca. 20 % und auch durch Na^+ noch um 11 % gefördert, es ist aber andererseits keine Hemmung durch EDTA festzustellen, was eigentlich zu erwarten wäre. Es scheint sich bei dieser Förderung der Enzymaktivität eher um einen Effekt zu handeln, der durch die erhöhte Ionenstärke im Puffer verursacht wird als durch die Anwesenheit von Ca^{2+} oder Mg^{2+} , zumal eine Erhöhung der

6''-HCT-Aktivität um bis zu 80 % durch 200 mM NaCl beobachtet werden konnte. Eine selektive Förderung durch Mn^{2+} , Ca^{2+} oder Mg^{2+} wurde bisher nur von Hydroxycinnamoyl-Transferasen aus *Solanum* (Hohlfeld *et al.* 1995) und *Gentiana* (Fujiwara *et al.* 1997) beschrieben, andere Transferasen zeigen keine entsprechende Abhängigkeit.

Durch Schwermetalle wie Hg^{2+} und Cu^{2+} werden alle drei HCT's stark bis komplett gehemmt, nur die 4''-HCT hat bei 1 mM Cu^{2+} noch eine Restaktivität von 42 %. Diese Sensitivität wurde ebenso bei allen Hydroxycinnamoyl-Transferasen gefunden, die Anthocyane acylieren (Callebaut *et al.* 1996, Fujiwara *et al.* 1998a, Kamsteeg *et al.* 1980, Teusch *et al.* 1987, Yonekura-Sakakibara *et al.* 2000). Diese Transferasen werden aber im Gegensatz zu den HCT's auch durch Sulfhydryl-Reagentien wie NMM oder NEM gehemmt, die bei den HCT's wie auch Iodacetamid praktisch keine Hemmwirkung entwickeln. Eine Inhibition durch NEM, NMM und Iodacetamid weist auf die Wichtigkeit von Cystein für die katalytische Funktion hin, da diese Substanzen SH-Gruppen von Cystein alkylieren (Riordan & Vallee 1972). Andererseits bedeutet eine fehlende Wirkung nicht, dass für die katalytische Funktion des Enzyms Cystein-Reste unwichtig sind, da diese durch die Konformation und Mikroumgebung des Proteins geschützt sein können.

Reduzierende Agentien wie Mercaptoethanol und DTE haben eine relativ starke inhibitorische Wirkung, vor allem auf die 6''-HCT (β -Mercaptoethanol: 44 % Hemmung) und auf die 4''-HCT (DTE: 23 % Hemmung). Diese Beobachtung wiederum führt zu der Annahme, dass Disulfidbrücken, die von DTE reduziert werden (Konigsberg 1972), für die Aktivität des Enzyms eine Rolle spielen. Dies wird auch für eine Hydroxycinnamoyl-Transferase, die Tyramin acyliert und ebenfalls durch DTE inhibiert wird, vermutet (Farmer *et al.* 1999, Fleurence & Negrel 1989).

Unterschiede zwischen den HCT's zeigten sich desweiteren hinsichtlich der Hemmung durch PMSF. Die 6''-HCT wurde nicht inhibiert, während die 3''-HCT-Aktivität um 18 % und die 4''-HCT sogar um 70 % verringert wurde. Eine relativ starke Hemmung wurde auch durch CoA beobachtet. Hier lag die Restaktivität bei 19 % (6''-HCT) bis 44 % (4''-HCT). Diese Hemmung deutet auf eine starke Bindung des Produkts der enzymatischen Reaktion, CoA, an das Enzym hin. Aus diesem Grund wurde versucht, mit Hilfe von immobilisiertem CoA eine Affinitätschromatographie zur Reinigung der HCT's zu entwickeln, wie im nächsten Kapitel dargestellt wird.

Die kinetischen Parameter für die Akzeptorsubstrate der 3''- und der 6''-HCT zeigen, dass die Synthese der diacylierten Flavonol 3-glukoside in einer festgelegten Reihenfolge erfolgen muss. Der K_m -Wert der 3''-HCT für Tilirosid ist mit 16 μM deutlich niedriger als für

K3G mit $47 \mu\text{M}$. Dies zeigt, dass die Affinität der 3''-HCT für das monoacylierte Substrat höher ist als für das nichtacylierte. Der Quotient $V_{\text{max}}/K_{\text{m}}$ bestätigt dies: Er beträgt für K3G nur 19 % des Wertes von Tiliosid. Noch deutlicher wird die Reihenfolge der Acylierung durch das Verhalten der 6''-HCT. Die 6''-HCT kann das an der 3''-Position monoacylierte Substrat nicht umsetzen, hat aber für K3G mit $22 \mu\text{M}$ einen K_{m} -Wert, der in der Größenordnung des K_{m} -Werts der 3''-HCT für Tiliosid liegt. Daraus folgt, dass Flavonol 3-glukoside zuerst an 6''-Position und dann an 3''-Position acyliert werden. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich ein Modell der Biosynthese der diacylierten Flavonol 3-glukoside erstellen (Abb. 4.3).

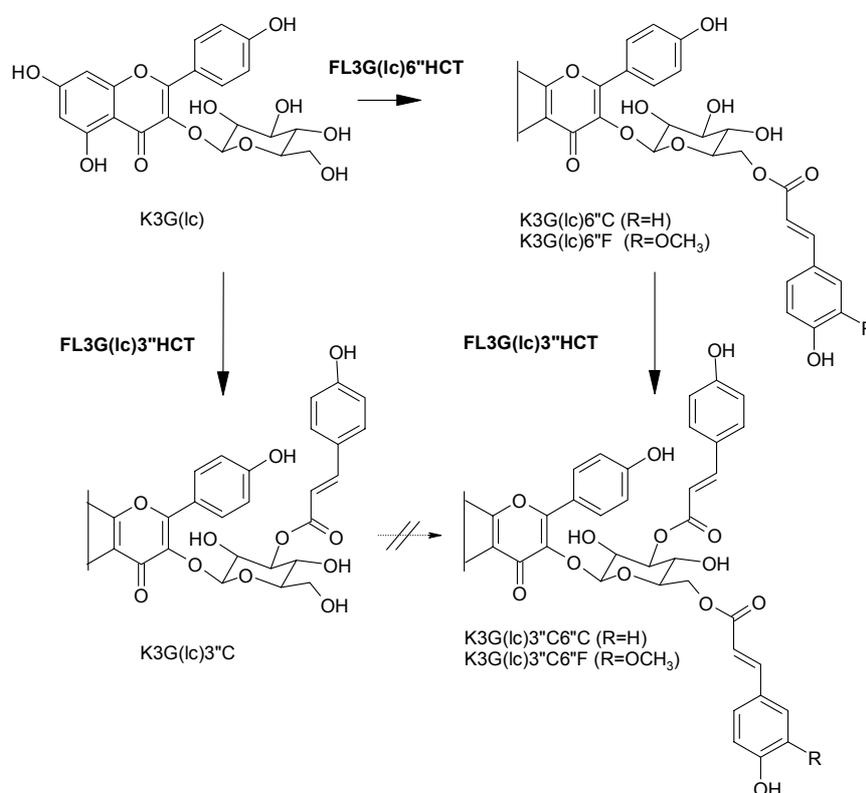


Abb. 4.3: Modell der Acylierung von Flavonol 3-glukosiden.

Die 3''-HCT kann sowohl Flavonol 3-glukoside als auch an 6''-Position monoacylierte Verbindungen umsetzen. Die 6''-HCT kann hingegen nur nichtacylierte Flavonol 3-glukoside als Substrate verwenden. An 3''-Position ist nur Cumarsäure, an 6''-Position zudem auch Ferulasäure gefunden worden. Dementsprechend ist die Affinität der 3''-HCT zu Cumaroyl-CoA wesentlich größer als zu Feruloyl-CoA, während die 6''-HCT zu beiden Substraten die gleiche Affinität hat.

Die kinetischen Parameter für die Donorsubstrate spiegeln das Bild der in der Pflanze gefundenen acylierten Produkte wider. Die 3''-HCT hat für Feruloyl-CoA mit $115 \mu\text{M}$ einen wesentlich höheren K_{m} -Wert als für Cumaroyl-CoA mit $24 \mu\text{M}$, beides jeweils mit Tiliosid als Akzeptorsubstrat gemessen. Dies bedeutet, dass die 3''-HCT zwischen diesen beiden Sub-

straten unterscheiden kann. Auch hier zeigt der Quotient V_{\max}/K_m , dass die Affinität für Cumaroyl-CoA wesentlich größer ist als für Feruloyl-CoA, da mit Feruloyl-CoA nur 14 % des Wertes von Cumaroyl-CoA erreicht werden. Entsprechend diesen Ergebnissen werden auch nur diacylierte Verbindungen gefunden, die an 3''-Position mit Cumarsäure verestert sind. Die 6''-HCT hat dagegen für beide Substrate mit 13 bzw. 14 μM ungefähr den gleichen K_m -Wert. Auch dieses Ergebnis stimmt mit der gefundenen Struktur der diacylierten Verbindungen in Kiefernnadeln überein, da an 6''-Position sowohl Cumarsäure als auch Ferulasäure gefunden werden.

Die Regulation des Verteilungsmusters von Cumar- und Ferulasäure in den diacylierten Verbindungen in der Pflanze wird also nicht nur durch das Angebot der entsprechenden Donorsubstrate, sondern auch durch die Spezifität der Acyltransferasen bestimmt.

Es stellt sich allerdings noch die Frage, wie entschieden wird, mit welcher Säure an 6''-Position acyliert wird. Der Verlauf des Gehalts der verschiedenen diacylierten Verbindungen im Jahresgang zeigte, dass es von Jahr zu Jahr Unterschiede zwischen homo- und heteroacylierten Verbindungen gab, die am gleichen Baum zu finden waren, also nicht durch eine unterschiedliche genetische Ausstattung zustande kommen konnten. Hier spielen offenbar verschiedene, umweltbedingte Regulationen von Hydroxylasen und Methyltransferasen eine Rolle, die an der Modifizierung der Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester beteiligt sind (Heller & Forkmann 1993). Eher unwahrscheinlich ist die Möglichkeit, dass nach der Acylierung noch eine Modifikation der Cumarsäure zu Ferulasäure stattfindet.

Die 3''- und die 6''-HCT zeigen eine weite Substratspezifität bei den Donorsubstraten, da alle getesteten aromatischen CoA-Ester (Benzoyl-, Cinnamoyl-, Cumaroyl, Caffeyol- und Feruloyl-CoA) umgesetzt werden können. Aliphatische CoA-Ester wie Malonyl- und Acetyl-CoA werden nicht akzeptiert. Eine ähnliche Substratspezifität konnte bisher nur für die Benzoyl-/Hydroxycinnamoyl-Transferasen gefunden werden, die an der Synthese von Phytoalexinen in *Dianthus* (Yang *et al.* 1997) und *Avena* (Matsukawa *et al.* 2000) beteiligt sind. Andere Hydroxycinnamoyl-Transferasen zeigen ein ähnlich breites Spektrum für Hydroxycinnamoyl-CoA-Estern, können aber nicht Vanilloyl-CoA, das in *meta*-Position methoxylierte Benzoesäure-Derivat, umsetzen. Dies hat zu der Vermutung geführt, dass die Doppelbindung zwischen Aromaten und Säuregruppe eine wichtige Determinante für die Spezifität sein muss (Hohlfeld *et al.* 1995, Hohlfeld *et al.* 1996b). Dieses Kriterium trifft für die HCT's in Kiefer nicht zu, hier spielt der aromatische Charakter des Donorsubstrats die entscheidende Rolle. Acyltransferasen, die sowohl aromatische als auch aliphatische Donorsubstrate umsetzen

können, sind bisher noch nicht entdeckt worden (Fujiwara *et al.* 1997, Teusch *et al.* 1987, Yonekura-Sakakibara *et al.* 2000).

Untersuchungen zur Spezifität gegenüber dem Akzeptorsubstrat wurden zum einen mit verschiedenen Flavonolanteilen (Kämpferol, Isorhamnetin und Quercetin), zum anderen mit unterschiedlichen Zuckerresten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Polarität am B-Ring des Flavonols in 3'-Position entscheidenden Einfluss auf die Aktivität der HCT's nimmt. Interessanterweise reagieren die 3''- und die 6''-HCT unterschiedlich auf die Modifikation an dieser Stelle. Die 3''-HCT weist die höchste Aktivität mit Kämpferol und Isorhamnetin auf, also den Flavonolaglyka mit den weniger polaren Gruppen an 3'-Position (-H und -OMe), die 6''-HCT zeigt dagegen die höchste Aktivität mit Quercetin, das an 3'-Position eine Hydroxylgruppe trägt. Eine ähnlich hohe Spezifität gegenüber dem Hydroxylierungsmuster des B-Rings zeigen auch Anthocyanin-Hydroxycinnamoyl-Transferasen (Callebaut *et al.* 1996, Kamsteeg *et al.* 1980, Yonekura-Sakakibara *et al.* 2000). Allerdings ist der Flavonolcharakter des Akzeptorsubstrats essentielle Voraussetzung für eine Umsetzung durch die HCT's, da keine Aktivität mit anderen Flavonoiden, auch nicht mit Anthocyanglukosiden, gemessen werden konnte. Wegen dieser Spezifität können die HCT's aus der Kiefer keine Rolle bei der Entgiftung von Xenobiotika spielen, da sie diese nicht umsetzen können. Die Modifikation von Xenobiotika(glykosiden) durch Acylierung mit Hydroxyzimtsäuren wurde in Analogie zu Glykosyl- und Malonylkonjugation für die Entgiftung postuliert (Sandermann *et al.* 1997). Da die HCT's aber eine hohe Spezifität gegenüber dem Akzeptorsubstrat zeigen wie es auch für Glykosyltransferasen beobachtet wurde (Sandermann *et al.* 1991), müssten in Pflanzen zur Entgiftung von Xenobiotika entsprechende Acyltransferasen entwickelt worden sein, die solche Substrate selektiv umsetzen können. In der Kiefer konnten solche Enzym-Aktivitäten jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die HCT's haben nicht nur eine hohe Selektivität gegenüber der Position der Hydroxylgruppe des Zuckerrests, die acyliert wird, sondern auch gegenüber Konformation und Konfiguration des Glykosids. Eine Veränderung der Lage von benachbarten Hydroxylgruppen hat einen starken Einfluss auf die Aktivität, wie ein Vergleich von Quercetinglukosid (Isoquercitrin) mit dem entsprechenden Galaktosid (Hyperosid) zeigt. Die Aktivität der 3''-HCT ist mit dem Galaktosid um 82 %, die der 6''-HCT noch um 48 % geringer als mit dem Glukosid, obwohl sich das Galaktosid vom Glukosid nur in der Lage der 4''-Hydroxylgruppe unterscheidet. Andererseits überrascht die relativ hohe Aktivität der 3''-HCT mit Quercetinarabinosid (15 % im Vergleich zum Glukosid), das nicht nur eine Pentose ist, sondern auch eine α -D-Konfiguration besitzt, was zu einer axialen Hydroxylgruppe an 3''-Position führt im

Gegensatz zur äquatorialen Hydroxylgruppe im Glukosid. Quercetinrhamnosid (Quercitrin) kann von der 3''-HCT nicht umgesetzt werden, vermutlich führt die axial liegende Methylgruppe an Position 5'' zu einer sterischen Hinderung, zumal ja auch hier die 3''-Hydroxylgruppe wegen der α -L-Konfiguration axial orientiert ist. Letztendlich entscheidet also die dreidimensionale Konfiguration des Zuckers über die Spezifität der HCT's. Die 6''-HCT kann, wenig überraschend, weder das Arabinosid noch das Rhamnosid acylieren, da den beiden Zuckern entweder eine Hydroxylgruppe in 6''-Position oder das entsprechende C-Atom fehlt. Andere Bäume zeigen eine andere Zusammensetzung bei den diacylierten Verbindungen, z. B. wurde bei Buche ein Arabinosid gefunden (J. Rothenburger, unveröffentlicht). Dieser Befund eröffnete die Möglichkeit, die Spezifität der HCT's aus der Buche bezüglich des Zuckerrests und damit die Abhängigkeit von Konformation und Konfiguration zu untersuchen, um den Mechanismus besser verstehen zu können.

Ein Vergleich mit Hydroxycinnamoyl-Transferasen, die Anthocyanglykoside acylieren, zeigt, dass diese bevorzugt Di- und Triglykoside als Akzeptorsubstrate umsetzen und der acylierte Zuckerrest meistens ein Glukosid ist. Dementsprechend wurden auch nur Glukoside als Substrate getestet (Callebaut *et al.* 1996, Fujiwara *et al.* 1998a, Fujiwara *et al.* 1997). Wurde allerdings das Glukosid, an welchem die Acylierung stattfindet, durch weitere Zuckerreste modifiziert, veränderte das die Aktivität der Acyltransferase erheblich. So zeigte eine 6''-HCT mit einem Anthocyanidin 3-sophorosid 5-glukosid die höchste Aktivität, mit einem Anthocyanidin 3-glukosid 5-glukosid eine mittlere Aktivität und mit einem Anthocyanidin 3-laminaribiosid 5-glukosid keine Aktivität. Die Modifikation des 3-Glukosids mit einem weiteren Glukose-Rest (Sophorosid: Glukose in 2''-Position, Laminaribiosid: Glukose in 3''-Position) kann also die Aktivität erhöhen oder verringern (Callebaut *et al.* 1996). Neben dieser hohen Spezifität gegenüber dem Zuckerrest wurde aber auch die Beobachtung gemacht, dass eine HCT, die ein Rhamnosid an 4'''-Position acyliert (das Rhamnosid hängt wiederum an einem 3-Glukosid = Rutinosid), auch in der Lage ist, das 3-Glukosid direkt an 6''-Position zu acylieren (Fujiwara *et al.* 1998a, Kamsteeg *et al.* 1980). Die verfügbaren Daten zur Akzeptorsubstrat-Spezifität der Anthocanidinglykosid-Acyltransferasen sind also widersprüchlich und bedürfen weiterer Untersuchungen, doch die Daten zu den in dieser Arbeit vorgestellten Flavonol 3-glukosid-Acyltransferasen deuten eher auf eine enge als auf eine breite Substratspezifität in Bezug auf den Zuckerrest hin.

4.7 Reinigung der 3''-HCT

Ziel der Proteinreinigung war es, Sequenzinformationen über die 3''-HCT als Grundlage für weitere Untersuchungen zu bekommen. Mit Hilfe der auf diese Weise erlangten Sequenzinformation ist es möglich, mit molekularbiologischen Methoden über degenerierte Primer mittels PCR das dem Enzym entsprechende Transkript zu finden. Hat man so die Nukleinsäure-Sequenz ermittelt, ist es wiederum möglich, zusätzliche Informationen über die HCT's zu gewinnen. Zum einen kann mit der Gesamtsequenz des Gens die Verwandtschaftsbeziehung zwischen funktionell verwandten Enzymen untersucht werden. Zum anderen benötigt man die Sequenzinformation, um spezifische Primer herzustellen, mit denen man Untersuchungen auf Transkriptionsebene durchführen kann, z. B. bei UV-B-Induktionsexperimenten. Derartige Untersuchungen sind auch für die HCT's aus der Kiefer interessant, da sich herausgestellt hat, dass die meisten Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels transkriptionell reguliert sind (Batz *et al.* 1998, Schmelzer *et al.* 1988). Ein dritter Aspekt ist die Möglichkeit, das Protein in einem Wirtsorganismus zu exprimieren und es so in größerer Menge herzustellen, um es eingehend biochemisch charakterisieren zu können.

Dieser Weg, über die Proteinreinigung an die notwendige Sequenzinformation zu gelangen, ist bisher bei allen Hydroxycinnamoyl-Transferasen beschritten worden, deren Nukleinsäuresequenz aufgeklärt werden konnten (Farmer *et al.* 1999, Fujiwara *et al.* 1998b, Schmidt *et al.* 1999, Yang *et al.* 1997, Yonekura-Sakakibara *et al.* 2000).

Insgesamt erwies sich die Reinigung der 3''-HCT als außerordentlich schwierig, da das einzige zur Verfügung stehende Material mit ausreichender 3''-HCT-Aktivität zwei bis drei Monate alte Nadeln von Freilandbäumen waren. Da sich die Nadeln aber zu diesem Zeitpunkt in voller Entwicklung befanden, waren entsprechend viele verschiedene Proteine (Photosynthese-Apparat, RUBISCO etc.) vorhanden. Die Reinigung von Hydroxycinnamoyl-Transferasen aus anderen pflanzlichen Materialien erfolgten meist aus spezialisierten Geweben (z. B. Blütenblätter, Fujiwara *et al.* 1997, Kamsteeg *et al.* 1980) oder Zellkulturen (Hohlfeld *et al.* 1996a, Reinhard & Matern 1989, Ulbrich & Zenk 1979). Gerade Zellkulturen konnten aber für die HCT-Reinigung nicht genutzt werden, da in *Pinus*-Suspensionskulturen keine HCT-Aktivität vorhanden war und weder durch Licht- noch durch Elicitorbehandlung induziert werden konnte. Die Beobachtung, dass undifferenzierte Zellen nicht in der Lage sind, acylierte Flavonol 3-glukoside zu synthetisieren, deutet darauf hin, dass die Biosynthese dieser Metabolite und damit auch die Enzymaktivität der HCT's offenbar von einem starken

Spezialisierungsgrad der Zellen abhängt. Dies stimmt wiederum mit dem Befund überein, dass in der Nadel die diacylierten Metabolite ausschließlich in der Epidermis lokalisiert sind (Schnitzler *et al.* 1996).

Neben der großen Menge verschiedener Proteine erwies sich der hohe Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen des Nadelmaterials als kritisch, da diese wegen ihrer inhibitorischen Wirkung auf Enzyme durch Oxidation während des Aufschlusses möglichst schnell entfernt werden mussten. Bei den flüchtigen Bestandteilen, überwiegend Terpenen, wurde dies durch das Gefriertrocknen der Nadeln erreicht. Die Gefriertrocknung wurde außerdem durchgeführt, um das wasserfreie Material in einer Analysenmühle bei Raumtemperatur zu einem feinen Pulver zerkleinern zu können, da der Mahlvorgang unter flüssigem Stickstoff nicht möglich war. Die nichtflüchtigen phenolischen Verbindungen wurden dann während des Aufschlusses durch die Verwendung von unlöslichem PVPP entfernt (siehe oben). Mit dieser Methodik und durch die Verwendung von DTE als Antioxidans im Aufschlusspuffer konnten Inhibitoren und Oxidationsmittel effektiv entfernt und die Enzymaktivität geschützt werden. Von Vorteil für die Handhabung der 3''-HCT während der Reinigung war die relativ große Stabilität der Enzymaktivität. So hatte nach 18 h Lagerung bei Raumtemperatur die Aktivität der 3''-HCT um ca. 29 % abgenommen, die der 6''-HCT dagegen um ca. 70 %. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen verringerte die Aktivität nicht.

Die Verwendung von PEG im Aufschlusspuffer erwies sich auch für die Ammoniumsulfat-Fällung von Vorteil. Während der Ammoniumsulfat-Fällung bildete das gefällte Protein zusammen mit dem PEG eine hydrophobe Phase auf dem wässrigen Puffer, die durch Zentrifugation und Filtrierung mit Miracloth leicht von dem Puffer abgetrennt werden konnte. Eine ähnliche Technik wurde für die Reinigung einer ACC-Oxidase aus Bananen-Früchten angewendet (Moya-Leon & John 1995). Das Protein wurde dann durch Extraktion mit Puffer aus der gallertigen PEG/Protein-Phase gewonnen, und sowohl PEG als auch Ammoniumsulfat konnten mit einer Entsalzung über Sephadex G-25 entfernt werden.

Eine Schwierigkeit bei der Proteinreinigung ergab sich daraus, dass für das Enzym kein spezifischer Schritt gefunden werden konnte, mit dem eine hohe Anreicherung zu erzielen war. Aus diesem Grund war es nötig, relativ viele Schritte bei der Reinigung durchzuführen, was dann wiederum in hohen Verlusten resultierte. Als effektivste Schritte erwiesen sich die Chromatographie mit Reactive Brown 10, die Chromatofocussierung mit Mono P und die native Elektrophorese mit 5.3- bzw. 4-fachen Anreicherungen.

Versuche mit hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) wurden mit verschiedenen Reinigungsstadien und unterschiedlichen HIC-Materialien (Phenyl- und Butylsepharose,

Source Phe) durchgeführt. Mit diese Methode, die oft zur Reinigung von Acyltransferasen verwendet wurde (Hohlfeld *et al.* 1996a, Hohlfeld *et al.* 1996b, Lotfy *et al.* 1996, Negrel & Javelle 1997), konnte keine Anreicherung erzielt werden. Die Aktivität der 3''-HCT eluierte immer mit dem Hauptproteinpeak. Zudem war die Ausbeute gering, ein Hinweis auf eine relativ große Hydrophobizität des Enzyms. Die Ursache dieser geringen Ausbeute war entweder eine irreversible Bindung an die HIC-Matrix oder eine Inaktivierung des Enzyms.

Da mit den Standard-Chromatographietechniken (HIC, IEX, GF) nicht die erforderliche Reinheit erzielt werden konnte, wurden andere Methoden wie Affinitäts- und Pseudoaffinitätschromatographie angewendet. Bei einer echten Affinitätschromatographie werden die individuellen Bindungseigenschaften des Enzyms ausgenutzt. Dies geschieht z. B. durch die Immobilisierung eines Substrats des Enzyms an eine unlösliche Matrix, sodass dieses Enzym selektiv an das Substrat binden und nach Entfernung von verunreinigenden Proteinen wieder von der Matrix eluiert werden kann (für einen Überblick über Affinitätschromatographie siehe z. B. Jakoby & Wilchek 1974). Für die Reinigung der 3''-HCT wurde als kommerziell erhältliches Material immobilisiertes Coenzym A getestet (Chibata *et al.* 1974), das an eine Agarose-Matrix gebunden ist. Trotz der Hemmung der 3''-HCT-Aktivität durch freies CoA, was auf eine Bindung an das Enzym hindeutet, war es nicht möglich, die 3''-HCT mit Hilfe von immobilisiertem CoA zu reinigen. Offenbar konnte die 3''-HCT aufgrund der Art der Bindung des Liganden an die Agarose mit nur einem Spacer-Atom nicht mit dem CoA interagieren.

Neben echten Affinitätsmaterialien werden in der Proteinreinigung auch so genannte Pseudoaffinitätsmaterialien verwendet. Dabei wird die Eigenschaft z. B. von Triazin-Farbstoffen ausgenutzt, Substrate von Enzyme strukturell zu imitieren, was zu einer mehr oder weniger selektiven Bindung an den Farbstoff führt (Clonis 1987). Vor allem Enzyme, die Adenyl-Cofaktoren wie NAD^+ , NADP^+ oder ATP benötigen oder CoA-abhängig sind, binden an Farbliganden (Dean & Watson 1979, Hermanson *et al.* 1992). Da die 3''-HCT ebenfalls CoA-Ester als Donorsubstrate verwendet, wurden Farbstoffgele für die Reinigung getestet, zumal verschiedene CoA-abhängige Hydroxycinnamoyl-Transferasen mit Farbligandengelen wie Blue Sepharose oder Reactive Yellow-3-Agarose gereinigt werden konnten (Fujiwara *et al.* 1998a, Fujiwara *et al.* 1997, Hohlfeld *et al.* 1996a, Yang *et al.* 1997). Die Bindungseigenschaften der 3''-HCT an Farbliganden wurde mit verschiedenen Farbstoffgelen getestet. Dabei hatte Reactive Brown-10-Agarose die günstigsten Eigenschaften und wurde für die Reinigung der 3''-HCT ausgewählt.

Als Reinigungsschritt nach der Farbliganden-Chromatographie wurde die Chromatographie mit Hydroxyapatit gewählt. Diese Methode ist oft ein wesentlicher Bestandteil der Reinigung von Enzymen des Sekundärstoffwechsels von Pflanzen (siehe z. B. Heller & Forkmann 1993, Vogt *et al.* 1993) und wurde auch für die Reinigung von Hydroxycinnamoyltransferasen verwendet (Fleurence & Negrel 1989, Fujiwara *et al.* 1998a, Negrel & Javelle 1997). Für die 3''-HCT eignete sich die Chromatographie mit Hydroxyapatit ebenfalls, da die Aktivität vollständig an die Säule gebunden und in einem Peak eluiert werden konnte, doch war die Ausbeute relativ gering (ca. 20 %). Der Grund dieses hohen Verlustes der Aktivität lag offenbar in einer Inaktivierung des Enzyms durch die Chromatographie und in einer verringerten Lagerfähigkeit bei -80°C im angereinigten Zustand nach diesem Reinigungsschritt. Da auch nach diesem Reinigungsschritt keine Bande im SDS-Gel der Enzymaktivität zugeordnet werden konnte, wurde für die weitere Reinigung eine Zwei-Wege-Strategie eingeschlagen, um (i) die 3''-HCT mit analytischen chromatographischen Methoden zu identifizieren und (ii) eine präparative Reinigung mit nativer Elektrophorese durchzuführen. Die Abfolge der einzelnen Schritte der Reinigung der 3''-HCT ist in Abbildung 4.4 zusammengefasst.

Bei der Chromatofocussierung, dem ersten Schritt der analytischen Reinigung, zeigte sich, dass die 3''-HCT in einem Hauptpeak mit einer kleinen Schulter eluierte. Dies ist ein Hinweis auf die Existenz von Isoenzymen oder Isoformen, die sich in geringem Umfang in ihrem isoelektrischen Punkt voneinander unterscheiden (4.71 bzw. 4.67). Ähnliches konnte bei der 6''-HCT bei der Ermittlung des pI beobachtet werden, hier lag der pI der beiden Isoformen mit 7.9 und 7.7 allerdings deutlich weiter auseinander. Nach dem zweiten Schritt der analytischen Reinigung, einer Anionenaustauscher-Chromatographie mit Mono Q, konnten drei Banden mit einem Molekulargewicht von 28, 24 und 15 kDa im SDS-Gel identifiziert werden, deren Intensität dem Aktivitätsverlauf der 3''-HCT folgte. Dabei zeigte sich, dass mit diesen beiden Schritten nicht eine für die Aminosäure-Sequenzierung ausreichende Menge der Proteine erzielt werden konnte, da für die Mikrosequenzierung eines unbekanntes Proteins eine Menge im unteren Mikrogramm-Bereich erforderlich ist, was wiederum einer deutlich sichtbaren Bande in einem Coomassie-gefärbten Polyacrylamid-Gel entspricht.

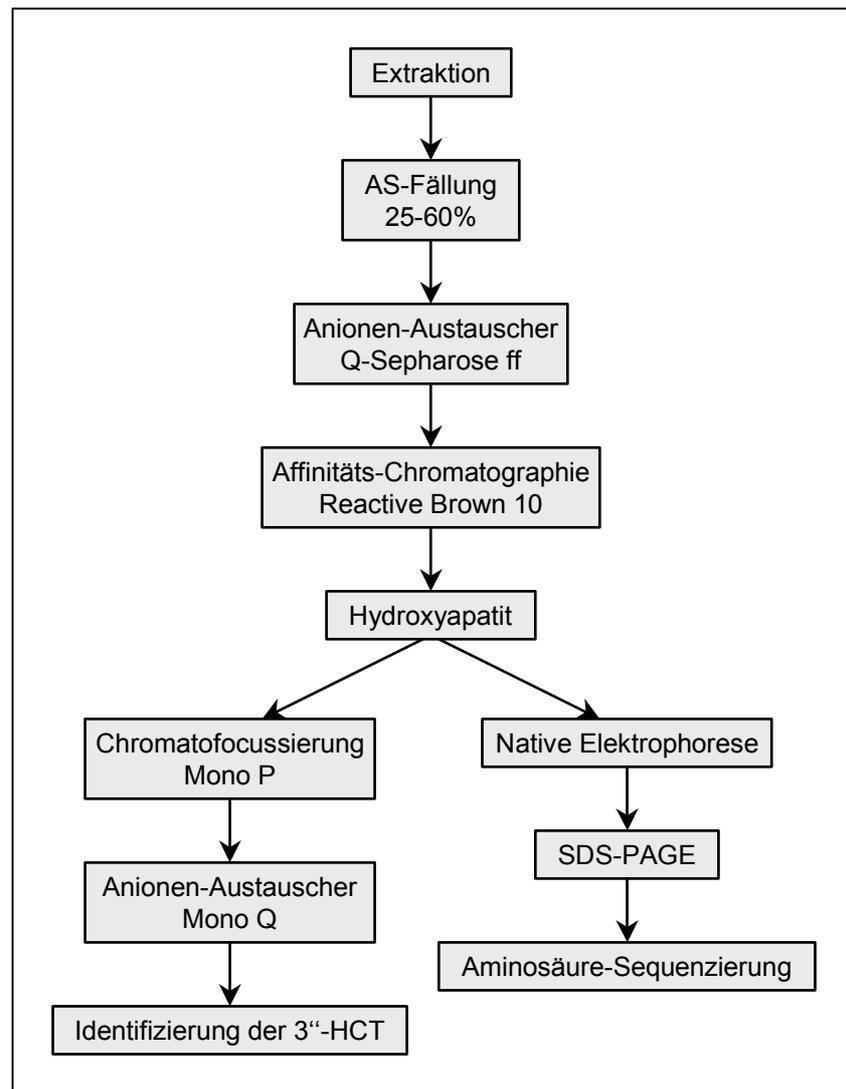


Abb. 4.4: Flussdiagramm zur Reinigung der 3''-HCT.

Aus diesem Grund wurde die native Elektrophorese eingesetzt, die mit einem Minigel optimiert und mit der Mini Prep Cell in einem präparativem Maßstab durchgeführt wurde. Dabei wurde bei der nativen Elektrophorese mit der Mini Prep Cell im Vergleich zum Minigel eine relativ hohe Ausbeute erzielt. Von der eingesetzten Gesamtaktivität konnten 49 % wiedergefunden werden. Dies wurde durch die kontinuierliche Elution ermöglicht, mit der dieses System arbeitet, denn gerade die Elution aus dem Gel erwies sich bei den vorangegangenen Versuchen mit dem Minigel als schwierig. Die native Elektrophorese mit der Mini Prep Cell hat mit der hohen Kapazität und Wiederfindungsrate einige Vorteile gegenüber chromatographischen Methoden.

Die Resultate der analytischen Reinigung mit Mono P und Mono Q wie auch die der nativen Elektrophorese zeigten das gleiche Bild, da auch bei der nativen Elektrophorese die 24 und 28 kDa-Bande der 3''-HCT-Aktivität zugeordnet werden konnten. Der Intensitätsver-

lauf der 15 kDa-Bande stimmte allerdings bei der nativen Elektrophorese nicht mit dem Aktivitätsverlauf der 3''-HCT überein. Dadurch konnte ein Zusammenhang zwischen dieser Bande und der 3''-HCT nahezu ausgeschlossen werden. Aufgrund der übereinstimmenden Ergebnisse der verschiedenen Methoden wurden von der 24 und 28 kDa-Bande, wegen des Ergebnisses der Chromatographie mit Mono Q auch von der 15 kDa-Bande, zur näheren Untersuchung nach einer Spaltung im Gel mit der Protease LysC Peptide sequenziert. Für die Sequenzierung wurden die Fraktionen der nativen Elektrophorese mit höchster Aktivität vereint und die Proteine mittels nachfolgender SDS-Gelelektrophorese getrennt.

Das Molekulargewicht zeigt eine Diskrepanz zwischen dem nativen Enzym mit 45 kDa und den sequenzierten Banden mit 24 bzw. 28 kDa. Für diesen Sachverhalt gibt es drei mögliche Erklärungen. Die erste Möglichkeit ist, dass es sich um ein Monomer handelt, welches durch einen proteolytischen Abbau während der Reinigung gespalten wird. Dies kann zu einem enzymatisch aktiven Peptid führen, wie es bei der Reinigung einer Anthranilat-Acyltransferase beobachtet wurde (Yang *et al.* 1997). Als zweite Möglichkeit ist ein Artefakt bei der Reinigung durch verunreinigenden Proteine nicht auszuschließen. Die dritte Erklärung wäre, dass die 3''-HCT als ein Dimer vorliegt. Dabei wäre es möglich, dass es sich um ein Heterodimer aus beiden Banden oder ein Homodimer aus einer der beiden Banden handelt, wie es bei den THT gefunden wurde (Farmer *et al.* 1999, Schmidt *et al.* 1999, Yu & Facchini 1999).

Die Ergebnisse der Sequenzierung zeigen, dass die 28 kDa-Bande von einem unbekanntem Protein stammt, von dem keine Sequenzen in den Datenbanken vorhanden sind. Die Homologien von zwei Peptiden zu einer PAL bzw. einer Squalene Hopene Cyclase, einem bakteriellen membranständigen Enzym, das an der Synthese von Membranlipiden beteiligt ist, sind nicht signifikant, sodass davon ausgegangen werden muss, dass die Ähnlichkeiten zufälliger Natur sind. Zudem konnte für das dritte Peptid keine Homologie gefunden werden. Ähnlich sieht das Ergebnis des Peptids der 24 kDa-Bande aus. Hier konnten über die öffentlich zugänglichen Datenbanken keine homologen Sequenzen ermittelt werden, allerdings wurde in einer speziellen Datenbank eines *Pinus-taeda*-Sequenzierungsprojektes ein Eintrag gefunden, dessen Sequenz genau mit dem Peptid übereinstimmte. Für diese Sequenz ist ebenfalls keine Funktion bekannt, es sind aber Ähnlichkeiten zu Proteinen der Aldo/Ketoreduktase-Familie vorhanden. Diese Ähnlichkeit wirft die Frage auf, ob eine Verwandtschaft zwischen Hydroxycinnamoyl-Transferasen und Oxidoreduktasen möglich ist. Immerhin gibt es z. B. eine Cinnamoyl-CoA Reduktase, die Zimtsäure-CoA-Ester als Substrat umsetzt. Eine Verwandt-

schaft zwischen den beiden Enzymfamilien wäre dann ein Hinweis darauf, dass das 24 kDa-Peptid die gesuchte HCT ist. Die Größe des *Pinus taeda*-Klones von 112 Aminosäuren, das entspricht einem Molekulargewicht von ca. 12.6 kDa, deutet darauf hin, dass dieser Klon nicht ein vollständiges Protein enthält, zumal die Bande aus *Pinus sylvestris* mit 24 kDa ein fast doppelt so großes Molekulargewicht hat. Die Sequenzuntersuchung der 15 kDa-Bande, die aufgrund der Ergebnisse der nativen Elektrophorese als HCT auszuschließen ist, zeigte eine Homologie zu einem unbekanntem Protein, das in *Arabidopsis thaliana* gefunden wurde. Beide Peptide konnten in der Sequenz dieses Proteins, hintereinander liegend, gefunden werden.

Weder in den sequenzierten Peptiden noch in den zu den Peptiden homologen Proteinen konnten die für CoA-abhängige Acetyl-/Acyltransferasen gefundenen konservierten Sequenzdomänen gefunden werden. Im Anhang sind die Sequenzen von allen zur Zeit bekannten, d. h. in Datenbanken öffentlich zugänglichen und publizierten, Hydroxycinnamoyl-Transferasen und eine Auswahl von Acetyl-CoA verwendenden Transferasen aufgelistet. Ein Vergleich dieser Sequenzen hat ergeben, dass drei konservierte Domänen (LSX₂LX₃YX₃G, HX₃DG und DFGWGKP) sowohl in Hydroxycinnamoyl-Transferasen als auch in Acetyl-Transferasen vorhanden sind (St-Pierre *et al.* 1998, Yonekura-Sakakibara *et al.* 2000), wobei eine Region von 28 Aminosäuren um die Sequenz HX₃DG als CoA-Bindungsmotiv interpretiert wird (Dudareva *et al.* 1998). Diese Tatsache hat zu der Spekulation geführt, dass diese Sequenzdomänen CoA-Ester-verwendenden Acyltransferasen gemeinsam sind und diese eine Überfamilie multifunktionaler Acyltransferasen bilden (St-Pierre *et al.* 1998). Eine Ausnahme sind allerdings die beiden bekannten Tyramin N-Hydroxycinnamoyl-Transferasen, die keine Sequenzhomologie zu den anderen Hydroxycinnamoyl- und Acetyltransferasen haben und bei denen die konservierten Sequenz-Motive nicht zu finden sind (Farmer *et al.* 1999, Schmidt *et al.* 1999). Neben der postulierten Überfamilie von Acyltransferasen gibt es offenbar Enzyme, die ähnliche Reaktionen ausführen, aber anders aufgebaut sind.

Interessanterweise befinden sich unter den Acyltransferasen, die die oben genannten konservierten Domänen besitzen, sowohl N- als auch O-Acyltransferasen (Fujiwara *et al.* 1998b, Yang *et al.* 1997). Auch in Hinblick auf das Donorsubstrat ist die einzige Gemeinsamkeit, dass CoA-Ester verwendet werden - die übertragene Acylgruppe kann sowohl ein Acetyl-, ein Benzoyl- als auch ein Hydroxycinnamoyl-Rest sein (Fujiwara *et al.* 1998b, St-Pierre *et al.* 1998, Yang *et al.* 1997). Deswegen überrascht es nicht, dass diese Acyltransferasen nur eine Identität von ca. 11-19 % aufweisen und damit eine relativ heterogene Gruppe bilden (Yonekura-Sakakibara *et al.* 2000).

Auf der Basis der Ergebnisse der Sequenzierung sprechen folgende Argumente dafür, dass es sich bei den Peptiden um Fragmente der 3''-HCT handelt: (i) Zu beiden in Frage kommenden Proteinen gibt es keine Homologien, d. h. es handelt sich um unbekannte Proteine; (ii) die konservierten, gemeinsamen Motive der bekannten Acyltransferasen sind relativ klein, es ist nicht zu erwarten, dass mit der Sequenzierung von Peptiden der HCT genau diese Motive getroffen werden; (iii) die bekannten HCT's erweisen sich nicht nur untereinander als heterogen, da sie außer den oben genannten konservierten Domänen relativ geringe Ähnlichkeit aufweisen, es gibt auch mindestens zwei Familien von CoA-abhängigen HCT's, wie die Tyramin *N*-Hydroxycinnamoyl-Transferasen zeigen, die keine Homologie zu anderen Hydroxycinnamoyl-Transferasen haben.

Für einen eindeutigen Nachweis ist es notwendig, mit degenerierten Primern aus den gefundenen Peptiden nach entsprechenden Transkripten zu suchen, genspezifische Sonden herzustellen und die damit isolierten Klone heterolog zu exprimieren und zu charakterisieren.

5 Zusammenfassung

Die an der Synthese von acylierten Flavonolglykosiden, den UV-B-Schutzpigmenten in der Kiefer und anderen Bäumen, beteiligten Hydroxycinnamoyl-Transferasen sind weitgehend unerforscht. Dies verwundert um so mehr, als Kenntnisse über den UV-B-Schutz bei Bäumen, die von großer ökologischer und ökonomischer Bedeutung sind, unter dem Eindruck sinkender stratosphärischer Ozonwerte und der damit prognostizierten erhöhten UV-B-Belastung auch in mittleren Breiten sehr wichtig geworden sind. Andererseits haben Untersuchungen zu Hydroxycinnamoyl-Transferasen, die an der Synthese von Blütenfarbstoffen (acylierte Anthocyane) und Phytoalexinen (acylierte Amine) beteiligt sind, in den letzten Jahren einige Fortschritte erbracht. In der vorliegenden Arbeit wird versucht, mit proteinbiochemischen und ökophysiologischen Untersuchungen zu Hydroxycinnamoyl-Transferasen, die Flavonolglykoside acylieren, hier eine Lücke zu schließen.

Die Untersuchungen zu den Hydroxycinnamoyl-Transferasen lassen sich in drei Teile gliedern: (i) einen methodischen Teil, in dem mit der Entwicklung eines Enzymtests die Grundlagen für die beiden folgenden Teile erarbeitet wurden; (ii) ein physiologisch-ökologischer Teil, in dem Messungen von Enzymaktivitäten und Inhaltsstoffgehalten in Nadeln adulter Bäume im Freiland und von Keimlingen unter kontrollierten Bedingungen in Sonnensimulatoren vorgenommen wurden; (iii) ein proteinbiochemischer Teil, der eine Charakterisierung der Enzyme und die Reinigung der 3''-HCT beinhaltet.

(i) Für den Nachweis und die Quantifizierung der Aktivität der Hydroxycinnamoyltransferasen in Extrakten von Kiefernadeln wurde ein Enzymtest entwickelt. Dafür wurde die Aufschlusstechnik und die HPLC-Methode, mit der die Enzymprodukte analysiert wurden, optimiert. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass in der Kiefer drei verschiedene für die Glucose der Flavonolglykoside positionsspezifische Transferasen vorhanden sind. Von den Produkten dieser Enzyme konnten die Acylierungspositionen aufgeklärt werden, wobei sich herausstellte, dass die 3''- und der 6''-HCT an der Synthese der UV-B-Schutzpigmente beteiligt sind, während die Produkte der 4''-HCT in der Kiefer noch nicht bekannt sind.

(ii) In Sonnensimulatorexperimenten mit Kiefernkeimlingen konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der 6''-HCT durch UV-B induziert wurde, während die Aktivität der 3''-HCT konstitutiv vorlag und durch UV-B nicht beeinflusst wurde. In den Freilandbäumen zeigte sich, dass die 6''-HCT entwicklungspezifisch aktiv war, während die Aktivität der 3''-HCT auch

hier konstitutiv vorlag. Die Akkumulation der diacylierten Flavonol 3-glykoside konnte nur zu Beginn der Nadelentwicklung beobachtet werden und korrelierte mit der Aktivität der 6''-HCT, woraus geschlossen werden kann, dass die 6''-HCT die Synthese der UV-B-Schutzpigmente reguliert, während die Rolle der 3''-HCT unklar bleibt, da keine Akkumulation von monoacylierten Flavonolglykosiden beobachtet wurde.

Die schnelle Akkumulation und nachfolgende Abnahme der diacylierten Verbindungen zeigen, dass diese Verbindungen für den UV-B-Schutz in den besonders gefährdeten jungen Nadeln verantwortlich sind. In älteren Nadeln sind andere langfristige Schutzmechanismen vorhanden, wobei vor allem zellwandgebundene Flavonoide und Hydroxyzimtsäuren in Frage kommen, da diese langsamer akkumulieren als die löslichen diacylierten Verbindungen.

Der Vergleich der Keimlingsexperimente mit den Freilanduntersuchungen zeigt, dass die Primärnadeln der Keimlinge ein gutes Modell für sich entwickelnde Nadeln von adulten Freilandbäumen darstellen, da sie sich physiologisch vergleichbar verhalten. Die Keimlinge besitzen einige Vorteile gegenüber mehrjährigen Bäumen, da sie jederzeit verfügbar und in größerer Individuenzahl untersucht werden können.

(iii) Mit teilweise gereinigten Enzymen konnte gezeigt werden, dass die Acylierung der Flavonolglykoside in einer festen Reihenfolge abläuft. Die Synthese der UV-B-Schutzpigmente erfolgt durch die Acylierung zuerst an 6''-Position und dann an 3''-Position.

Für die 3''- und die 4''-HCT wurde ein apparentes Molekulargewicht von 45 bzw. 35 kDa und ein pI-Wert von 4.7 ermittelt. Diese Werte liegen in einem Bereich, der ebenso für HCT's aus verschiedenen Pflanzen, die andere Substrate acylieren, festgestellt wurde. Für die 6''-HCT wurde dagegen ein außerordentlich geringes apparentes Molekulargewicht von 9 kDa und ein relativ hoher pI-Wert von 7.7 bis 7.9 ermittelt. Weitere Untersuchungen sind nötig, um festzustellen, ob es sich dabei um eine proteolytische Spaltung des Enzyms handelt.

Alle drei Transferasen zeigten gegenüber dem Akzeptorsubstrat eine hohe Spezifität für das Flavonolaglykon, wobei die Aktivität der 6''-HCT bei größerer Polarität an 3'-Position (Quercetin) höher war, die der 3''-HCT bei geringerer Polarität an dieser Position (Kämpferol und Isorhamnetin). Ähnlich hoch ist auch die Spezifität gegenüber dem Zuckerrest des Akzeptorsubstrats. Die höchste Aktivität wurde mit dem Glukosid festgestellt, das bisher auch nur in der Kiefer nachgewiesen wurde.

Die Spezifität gegenüber dem Donorsubstrat zeigt zum einen eine Abhängigkeit von CoA-Ester, da keine Aktivität mit Glukose-Estern gemessen werden konnte. Zum anderen ist der aromatische Charakter des Donorsubstrats von entscheidender Bedeutung, da sowohl die

CoA-Ester verschiedener Hydroxyzimtsäuren als auch Benzoyl-CoA als Substrate verwendet werden. Aliphatische CoA-Ester wie Acetyl- oder Malonyl-CoA werden von den HCT's nicht als Substrate akzeptiert.

Mit einer analytischen Reinigung der 3''-HCT, die säulenchromatographische Schritte beinhaltete, wurden in sechs Schritten zwei Protein-Banden mit einer Größe von 24 und 28 kDa isoliert, die mit der Enzymaktivität korrelierten. Mit einer präparativen Reinigung mit nativer Elektrophorese konnten diese beiden Banden in ausreichender Menge erhalten werden, sodass eine Sequenzierung von Peptiden möglich war. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen mit den in Datenbanken vorhandenen Sequenzen zeigte, dass es sich um zwei unbekannte Peptide handelt.

Die Resultate der Reinigung bilden die Grundlage für molekularbiologische Arbeiten, mit denen es möglich sein sollte, enzyspezifische Klone für die 3''-HCT und, falls die Enzyme auf Sequenzebene verwandt sind, auch für die 6''-HCT herzustellen. Damit könnte zum ersten Mal die Sequenz einer Flavonol 3-glukosid-Hydroxycinnamoyl-Transferase aufgeklärt werden. Mit Hilfe von molekularen Sonden ließen sich die vermutete epidermale Lokalisierung der Enzyme überprüfen und UV-B-Induktionskinetiken auf Ebene der mRNA durchführen. Dabei wären vor allem Experimente mit UV-B-Intensitäten sinnvoll, mit denen die obere Grenze der Anpassungsfähigkeit der Kiefer definiert werden kann.

6 Literaturverzeichnis

- A.-H.-Mackerness, S., Surplus, S. L., Blake, P., John, C. F., Buchanan-Wollaston, V., Jordan, B. R., Thomas, B.** (1999) Ultraviolet-B-induced stress and changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana*: role of signalling pathways controlled by jasmonic acid, ethylene and reactive oxygen species. *Plant Cell Environ* **22**: 1413-1423.
- Abou-Zaid, M. M., Grant, G. G., Helson, B. V., Beninger, C. W., de Groot, P.** (2000) Phenolics from deciduous leaves and coniferous needles as sources of novel control agents for lepidopteran forest pests. In: *Phytochemicals and Phytopharmaceuticals*. Shahidi, F. and Ho, C.-T. (Hrsg), 398-416, AOCS Press Champaign.
- Ahmad, M., Cashmore, A. R.** (1993) HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**: 162-166.
- Ahmad, M., Cashmore, A. R.** (1996) Seeing blue: the discovery of cryptochrome. *Plant Mol Biol* **30**: 851-861.
- Ahmad, M., Jarillo, J. A., Klimczak, L. J., Landry, L. G., Peng, T., Last, R. L., Cashmore, A. R.** (1997) An enzyme similar to animal type II photolyase mediates photoreactivation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**: 199-207.
- Alenius, C. M., Vogelmann, T. C., Bornman, J. F.** (1995) A three-dimensional representation of the relationship between penetration of UV-B-radiation and UV-screening pigments in the leaves of *Brassica napus*. *New Phytol* **131**: 297-302.
- Allen, D. J., Nogués, S., Baker, N. R.** (1998) Ozone depletion and increased UV-B radiation: is there a real threat to photosynthesis? *J Exp Bot* **49**: 1775-1788.
- Allona, I., Quinn, M., Shoop, E., Swope, K., St. Cyr, S., Carlis, J., Riedl, J., Retzel, E., Campbell, M. M., Sederoff, R., Whetten, R. W.** (1998) Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9693-9698.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Andersen, O. M.** (1992) Anthocyanins from reproductive structures in pinaceae. *Biochem Sys Ecol* **20**: 145-148.
- Atkinson, T., Hammond, P. M., Hartwell, R. D., Hughes, P., Scawen, M. D., Sherwood, R. F., Small, D. P., Bruton, C. J., Harvey, M. J., Lowe, C. R.** (1981) Triazine-dye affinity chromatography. *Biochem Soc Transact* **9**: 290-293.
- Baca, M., Borgstahl, G. E. O., Boissinot, M., Burke, P. M., DeWight, W. R., Slater, K. A., Getzoff, E. D.** (1994) Complete chemical structure of photoactive yellow protein: novel thioester-linked 4-hydroxycinnamyl chromophore and photocycle chemistry. *Biochemistry* **33**: 14369-14377.
- Batschauer, A.** (1999) Light perception in higher plants. *Cell Mol Life Sci* **55**: 153-165.

- Batz, O., Logemann, E., Reinold, S., Hahlbrock, K.** (1998) Extensive reprogramming of primary and secondary metabolism by fungal elicitor or infection in parsley cells. *Biol Chem* **379**: 1127-1135.
- Baum, G., Long, J. C., Jenkins, G. I., Trewavas, A. J.** (1999) Stimulation of the blue light phototropic receptor NPH1 causes a transient increase in cytosolic Ca^{2+} . *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 13554-13559.
- Baumbusch, L., Eiblmeier, M., Schnitzler, J.-P., Heller, W., Sandermann, H., Polle, A.** (1998) Interactive effects of ozone and low UV-B radiation on antioxidants in spruce (*Picea abies*) and pine (*Pinus sylvestris*) needles. *Physiol Plant* **104**: 248-254.
- Baur, P., Stulle, K., Schönherr, J., Uhlig, B.** (1998) Absorption von Strahlung im UV-B bis Blaulichtbereich durch Blattkutikeln ausgewählter Nutzpflanzen. *Gartenbauwissenschaft* **64**: 145-152.
- Bergström, B., Gustafsson, G., Gref, R., Ericsson, A.** (1999) Seasonal changes of pinosylvin distribution in the sapwood/heartwood boundary of *Pinus sylvestris*. *Trees* **14**: 65-71.
- Bird, C. R., Smith, T. A.** (1983) Agmatine coumaroyltransferase from barley seedlings. *Phytochemistry* **22**: 2401-2403.
- Bisswanger, H.** (1994) Enzymkinetik. 2. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H. J.** (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Blumthaler, M., Ambach, W.** (1990) Indication of increasing solar ultraviolet-B radiation flux in alpine regions. *Science* **248**: 206-208.
- Bokern, M., Heuer, S., Strack, D.** (1992) Hydroxycinnamic acid transferases in the biosynthesis of acylated betacyanins: purification and characterization from cell cultures of *Chenopodium rubrum* and occurrence in some other members of the *Caryophyllales*. *Bot Acta* **105**: 146-151.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C.** (1998) The chemistry of flavonoids. In: *Flavonoids in health and disease*. Rice-Evans, C. A. and Packer, L. (Hrsg), Reihe: *Antioxidants in health and disease* **7**: 111-136, Marcel Dekker New York.
- Bradford, M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Braun, J., Tevini, M.** (1993) Regulation of UV-protective pigment synthesis in the epidermal layer of rye seedlings (*Secale cereale* L. cv. Kustro). *Photochem Photobiol* **57**: 318-323.
- Britt, A. B.** (1995) Repair of DNA damage induced by ultraviolet radiation. *Plant Physiol* **108**: 891-896.

- Britt, A. B.** (1996) DNA damage and repair in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 75-100.
- Brosché, M., Fant, C., Bergkvist, S. W., Strid, H., Svensk, A., Olsson, O., Strid, A.** (1999) Molecular markers for UV-B stress in plants: alteration of the expression of four classes of genes in *Pisum sativum* and the formation of high molecular mass RNA adducts. *Biochim Biophys Acta* **1447**: 185-198.
- Burchard, P., Bilger, W., Weissenböck, G.** (2000) Contribution of hydroxycinnamates and flavonoids to epidermal shielding of UV-A and UV-B radiation in developing rye primary leaves as assessed by ultraviolet-induced chlorophyll fluorescence measurements. *Plant Cell Environ* **23**: 1373-1380.
- Butland, S. L., Chow, M. L., Ellis, B. E.** (1998) A diverse family of phenylalanine ammonia-lyase genes expressed in pine trees and cell cultures. *Plant Mol Biol* **37**: 15-24.
- Caldwell, M. M.** (1971) Solar UV irradiation and the growth and development of higher plants. In: *Photophysiology*. Giese, A. C. (Hrsg), **6**: 131-177, Academic Press New York.
- Caldwell, M. M., Björn, L. O., Bornman, J. F., Flint, S. D., Kulandaivelu, G., Teramura, A. H., Tevini, M.** (1998) Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. *J Photochem Photobiol B: Biol* **46**: 40-52.
- Caldwell, M. M., Flint, S. D.** (1994a) Solar ultraviolet radiation and ozone layer change: implications for crop plants. In: *Physiology and Determination of Crop Yield*. Boote, K., Bennett, J. M., Sinclair, T. R. and Paulsen, G. M. (Hrsg), 487-507, ASA-CSSA-SSSA Madison.
- Caldwell, M. M., Flint, S. D.** (1994b) Stratospheric ozone reduction, solar UV-B radiation and terrestrial ecosystems. *Climatic Change* **28**: 375-394.
- Caldwell, M. M., Teramura, A. H., Tevini, M., Bornman, J. F., Björn, L. O., Kulandaivelu, G.** (1995) Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial plants. *Ambio* **24**: 166-173.
- Callebaut, A., Terahara, N., Declaire, M.** (1996) Anthocyanin acyltransferases in cell cultures of *Ajuga reptans*. *Plant Sci* **118**: 109-118.
- Camm, E. L., Towers, G. H. N.** (1973) Phenylalanine ammonia lyase. *Phytochemistry* **12**: 961-973.
- Carlton, R. R., Deans, S. G., Gray, A. I., Waterman, P. G.** (1991) Antifungal activity of a flavonol glycoside from the leaves of bog myrtle (*Myrica gale*). *Chemoecology* **2**: 69-71.
- Chalker-Scott, L.** (1999) Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochem Photobiol* **70**: 1-9.
- Chappell, J., Hahlbrock, K.** (1984) Transcription of plant defence genes in response to UV light or fungal elicitor. *Nature* **311**: 76-78.

- Chapple, C. C. S.** (1994) Genetic characterization of secondary metabolism in *Arabidopsis*. In: *Genetic engineering of plant secondary metabolism*. Ellis, B. E., Kuroki, G. W. and Stafford, H. A. (Hrsg), Reihe: *Recent Advances in Phytochemistry* **28**: 251-274, Plenum Press New York.
- Chibata, I., Tosa, T., Matuo, Y.** (1974) Coenzyme A. *Methods in Enzymology* **34**: 267-271.
- Chrumbach, A., Jovin, T. M.** (1983) Selected buffer systems for moving boundary electrophoresis on gels at various pH values, presented in a simplified manner. *Electrophoresis* **4**: 190-204.
- Christie, J. M., Jenkins, G. I.** (1996) Distinct UV-B and UV-A/blue light signal transduction pathways induce chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell* **8**: 1555-1567.
- Clonis, Y. D.** (1987) Dye-ligand chromatography. In: *Reactive dyes in protein and enzyme technology*. Clonis, Y. D., Atkinson, T., Bruton, C. J. and Lowe, C. R. (Hrsg), 33-50, Stockton Press New York.
- Clonis, Y. D., Atkinson, T., Bruton, C. J., Lowe, C. R.** (1987) Reactive dyes in protein and enzyme technology. Stockton Press New York.
- Conconi, A., Smerdon, M. J., Howe, G. A., Ryan, C. A.** (1996) The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature* **383**: 826-829.
- Conklin, P. L., Williams, E. H., Last, R. L.** (1996) Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 9970-9974.
- Cooper, T. G.** (1981) Biochemische Arbeitsmethoden. De Gruyter Berlin
- Cooper-Driver, G. A., Bhattacharya, M.** (1998) Role of phenolics in plant evolution. *Phytochemistry* **49**: 1165-1174.
- Crutzen, P. J.** (1996) Mein Leben mit O₃, NO_x und anderen YZO_x-Verbindungen (Nobel-Vortrag). *Angewandte Chemie* **108**: 1878-1898.
- Cuadra, P., Harborne, J. B., Waterman, P. G.** (1997) Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation. *Phytochemistry* **45**: 1377-1383.
- Day, T. A.** (1993) Relating UV-B radiation screening effectiveness of foliage to absorbing-compound concentration and anatomical characteristics in a diverse group of plants. *Oecologia* **95**: 542-550.
- De Luca, V., St-Pierre, B., Vazquez-Flota, F. A., Laflamme, P.** (1998) Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: the establishment of a model system. In: *Cellular integration of signalling pathways in plant development*. Lo Schiavo, F., Last, R. L., Morelli, G. and Raikhel, N. V. (Hrsg), Reihe: *H: Cell Biology* **H 104**: 171-188, Springer Berlin.

- Dean, P. D. G., Watson, D. H.** (1979) Protein purification using immobilised triazine dyes. *J Chromatogr* **165**: 301-319.
- Deka, N., Sun, G. Y., MacQuarrie, R.** (1986) Purification and properties of acyl-CoA:1-acyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine-*O*-acyltransferase from bovine brain microsomes. *Arch Biochem Biophys* **246**: 554-563.
- Dellus, V., Heller, W., Sandermann, H., Scalbert, A.** (1997) Dihydroflavonol 4-reductase activity in lignocellulosic tissues. *Phytochemistry* **45**: 1415-1418.
- DeLucia, E. H., Day, T. A., Vogelman, T. C.** (1992) Ultraviolet-B and visible light penetration into needles of two species of subalpine conifers during foliar development. *Plant Cell Environ* **15**: 921-929.
- Deutscher, M. P.** (1990) Guide to protein purification. Reihe: *Methods in Enzymology* **182**, Academic Press San Diego.
- Dixon, R. A., Paiva, N. L.** (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**: 1085-1097.
- Dixon, R. A., Steele, C. L.** (1999) Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci* **4**: 394-400.
- Döhring, T., Köfferlein, M., Thiel, S., Seidlitz, H. K.** (1996) Spectral shaping of artificial UV-B radiation for vegetation stress research. *J Plant Physiol* **148**: 115-119.
- Dong, Y.-H., Beuning, L., Davies, K., Mitra, D., Morris, B., Kootstra, A.** (1998) Expression of pigmentation genes and photo-regulation of anthocyanin biosynthesis in developing Royal Gala apple flowers. *Aust J Plant Physiol* **25**: 245-252.
- Dudareva, N., D'Auria, J. C., Nam, K. H., Raguso, R. A., Pichersky, E.** (1998) Acetyl-CoA:benzylalcohol acetyltransferase - an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Plant J* **14**: 297-304.
- Dunlap, W. C., Shick, J. M.** (1998) Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms: a biochemical and environmental perspective. *J Phycol* **34**: 418-430.
- Eccleston, V. S., Harwood, J. L.** (1995) Solubilisation, partial purification and properties of acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase from avocado (*Persea americana*) fruit mesocarp. *Biochim Biophys Acta* **1257**: 1-10.
- Eisinger, W., Swartz, T. E., Bogomolni, R. A., Taiz, L.** (2000) The ultraviolet action spectrum for stomatal opening in broad bean. *Plant Physiol* **122**: 99-105.
- Englard, S., Seifter, S.** (1990) Precipitation techniques. *Methods in Enzymology* **182**: 285-300.
- Fahey, D. W., Keim, E. R., Boering, K. A., Brock, C. A., Wilson, J. C., Jonsson, H. H., Anthony, S., Hanisco, T. F., Wennberg, P. O., Miake-Lye, R. C., Salawitch, R. J., Louisnard, N., Woodbrigde, E. L., Gao, R. S., Donnelly, S. G., Wamsley, R. C., Del**

- Negro, L. A., Solomon, S., Daube, B. C., Wofsy, S. C., Webster, C. R., May, R. D., Kelly, K. K., Loewenstein, M., Podolske, J. R., Chan, K. R.** (1995) Emission measurements of the Concorde supersonic aircraft in the lower stratosphere. *Science* **270**: 70-74.
- Farman, J. C., Gardiner, B. G., Shanklin, J. D.** (1985) Large loss of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO_x/NO_x interaction. *Nature* **315**: 207-210.
- Farmer, M. J., Czernic, P., Michael, A., Negrel, J.** (1999) Identification and characterization of cDNA clones encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase from tobacco. *Eur J Biochem* **263**: 686-694.
- Feeny, P.** (1992) The evolution of chemical ecology: contributions from the study of herbivorous insects. In: *Herbivores. Their interactions with secondary plant metabolites*. Rosenthal, G. A. and Berenbaum, M. R. (Hrsg), **II**: 1-44, Academic Press San Diego.
- Feucht, W., Treutter, D., Christ, E.** (1997) Role of flavanols in yellowing beech trees of the Black Forest. *Tree Physiol* **17**: 335-340.
- Fischbach, R., Kossmann, B., Panten, H., Steinbrecher, R., Heller, W., Seidlitz, H. K., Sandermann, H., Hertkorn, N., Schnitzler, J.-P.** (1999) Seasonal accumulation of ultraviolet-B screening pigments in needles of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Plant Cell Environ* **22**: 27-37.
- Fiscus, E. L., Booker, F. L.** (1995) Is increased UV-B a threat to crop photosynthesis and productivity? *Photosyn Res* **43**: 81-92.
- Fleurence, J., Negrel, J.** (1989) Partial purification of tyramine feruloyl transferase from TMV inoculated tobacco leaves. *Phytochemistry* **28**: 733-736.
- Forkmann, G., Heller, W.** (1999) Biosynthesis of flavonoids. In: *Polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives*. Sankawa, U. (Hrsg), Reihe: *Comprehensive natural products chemistry* **1**: 713-748, Elsevier Amsterdam.
- Fraser, P. J., Prather, M. J.** (1999) Uncertain road to ozone recovery. *Nature* **398**: 663-664.
- Frederick, John E.** (1990) Trends in atmospheric ozone and ultraviolet radiation: mechanisms and observations for the northern hemisphere. *Photochem Photobiol* **51**: 757-763.
- Friebolin, H.** (1988) Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Eine Einführung. VCH Weinheim.
- Frischknecht, P. M., Ulmer-Duffek, J., Baumann, T. W.** (1986) Purine alkaloid formation in buds and developing leaflets of *Coffea arabica*: Expression of an optimal defence strategy? *Phytochemistry* **25**: 613-616.
- Frohn Meyer, H., Loyall, L., Blatt, M. R., Grabov, A.** (1999) Millisecond UV-B radiation evokes prolonged elevation of cytosolic-free Ca²⁺ and stimulates gene expression in transgenic parsley cell cultures. *Plant J* **20**: 109-117.

- Fry, S. C.** (1986) Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Ann Rev Plant Physiol* **37**: 165-186.
- Fry, S. C., Willis, S. C., Paterson, A. E. J.** (2000) Intraprotoplasmic and wall-localised formation of arabinoxylan-bound diferulates and larger ferulate coupling-products in maize cell-suspension cultures. *Planta* **211**: 679-692.
- Fujiwara, H., Tanaka, Y., Fukui, Y., Ashikari, T., Yamaguchi, M., Kusumi, T.** (1998a) Purification and characterization of anthocyanin 3-aromatic acyltransferase from *Perilla frutescens*. *Plant Sci* **137**: 87-94.
- Fujiwara, H., Tanaka, Y., Fukui, Y., Nakao, M., Ashikari, T., Kusumi, T.** (1997) Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora*. Purification, characterization and its role in anthocyanin biosynthesis. *Eur J Biochem* **249**: 45-51.
- Fujiwara, H., Tanaka, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Nakao, M., Fukui, Y., Yamaguchi, M., Ashikari, T., Kusumi, T.** (1998b) cDNA cloning, gene expression and subcellular localization of anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora*. *Plant J* **16**: 421-431.
- Galliano, H., Heller, W., Sandermann, H.** (1993) Ozone induction and purification of spruce cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Phytochemistry* **32**: 557-563.
- Gläßgen, W. E., Seitz, H. U.** (1992) Acylation of anthocyanins with hydroxycinnamic acids via 1-O-acylglucosides by protein preparations from cell cultures of *Daucus carota* L. *Planta* **186**: 582-585.
- Gläßgen, W. E., Wray, V., Strack, D., Metzger, J. W., Seitz, H. U.** (1992) Anthocyanins from cell suspension cultures of *Daucus carota*. *Phytochemistry* **31**: 1593-1601.
- Gleason, J. F., Bhartia, P. K., Herman, J. R., McPeters, R., Newman, P., Stolarski, R. S., Flynn, L., Labow, G., Larko, D., Seftor, C., Wellemeyer, C., Komhyr, W. D., Miller, A. J., Planet, W.** (1993) Record low global ozone in 1992. *Science* **260**: 523-526.
- Gould, K. S., Kuhn, D. N., Lee, D. W., Oberbauer, S. F.** (1995) Why leaves are sometimes red. *Nature* **378**: 241-242.
- Grace, S. C., Logan, B. A.** (2000) Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Phil Trans R Soc Lond B* **355**: 1499-1510.
- Greenberg, B. M., Wilson, M. I., Huang, X.-D., Duxbury, C. L., Gerhardt, K. E., Gensemer, R. W.** (1997) The effects of ultraviolet-B radiation on higher plants. In: *Plants for environmental studies*. Wang, W., Gorsuch, J. W. and Hughes, J. S. (Hrsg), Lewis Publishers Boca Raton.
- Hahlbrock, K.** (1972) Malonyl Coenzyme A: flavone glycoside malonyltransferase from illuminated cell suspension cultures of parsley. *FEBS Letters* **28**: 65-68.
- Hahlbrock, K., Scheel, D.** (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 347-369.

- Hänsel, R., Hölzl, J.** (1996) Lehrbuch der pharmazeutischen Biologie. Springer Berlin.
- Harborne, J. B.** (1993) Introduction to ecological biochemistry. 4. Auflage, Academic Press London.
- Harborne, J. B., Williams, C. A.** (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**: 481-504.
- Harper, J. L.** (1989) The value of a leaf. *Oecologica* **80**: 53-58.
- Harris, E. L. V., Angal, S.** (1990) Protein purification applications: a practical approach. Reihe: *The practical approach series* Oxford University Press Oxford.
- Härtling, S., Schulz, H.** (1998) Biochemical parameters as biomarkers for the early recognition of environmental pollution in Scots pine trees. I. Phenolic compounds. *Z Naturforsch* **53c**: 331-340.
- Harwood, C. R., Williams, D. M., Lovett, P. S.** (1983) Nucleotide sequence of a *Bacillus pumilus* gene specifying chloramphenicol acetyltransferase. *Gene* **24**: 163-169.
- Hashimoto, T., Shichijo, C., Yatsunami, H.** (1991) Ultraviolet action spectra for the induction and inhibition of anthocyanin synthesis in broom sorghum seedlings. *J Photochem Photobiol B: Biol* **11**: 353-363.
- Heller, W.** (1994) Topics in biosynthesis of plant polyphenols. *Acta Hort* **381**: 46-73.
- Heller, W., Forkmann, G.** (1993) Biosynthesis of flavonoids. In: *The flavonoids: advances in research since 1986*. Harborne, J. B. (Hrsg), 499-535, Chapman & Hall London.
- Hemingway, R. W.** (1989) Biflavonoids and proanthocyanidins. In: *Natural products of woody plants*. Rowe, J. W. (Hrsg), Reihe: *Springer Series in Wood Science* 571-651, Springer-Verlag Berlin.
- Hermanson, G. T., Krishna Mallia, A., Smith, P. K.** (1992) Immobilized affinity ligand techniques. Academic Press San Diego.
- Herrmann, K.** (1976) Flavonols and flavones in food plants: a review. *J Food Technol* **11**: 433-448.
- Herrmann, K. M., Weaver, L. M.** (1999) The shikimate pathway. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 473-503.
- Higuchi, R., Donnelly, D. M. X.** (1970) Acylated flavonol glucosides of *Pinus contorta* needles. *Phytochemistry* **17**: 787-791.
- Hobbs, D. H., Lu, C., Hills, M. J.** (1999) Cloning of a cDNA encoding diacylglycerol acyltransferase from *Arabidopsis thaliana* and its functional expression. *FEBS Letters* **452**: 145-149.
- Hoff, W. D., Düx, P., Hard, K., Devreese, B., Nugteren-Roodzant, I. M., Crielgaard, W., Boelens, R., Kaptein, R., Van Beeumen, J., Hellingwerf, K. J.** (1994) Thiol ester-

- linked *p*-coumaric acid as a new photoactive prosthetic group in a protein with rhodopsin-like photochemistry. *Biochemistry* **33**: 13959-13962.
- Hohlfeld, H., Scheel, D., Strack, D.** (1996a) Purification of hydroxycinnamoyl-CoA-tyramine hydroxycinnamoyltransferase from cell-suspension cultures of *Solanum tuberosum* L. cv. Datura. *Planta* **199**: 166-168.
- Hohlfeld, H., Schürmann, W., Scheel, D., Strack, D.** (1995) Partial purification and characterization of hydroxycinnamoyl-Coenzyme A:tyramine hydroxycinnamoyltransferase from cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*. *Plant Physiol* **107**: 545-552.
- Hohlfeld, M., Veit, M., Strack, D.** (1996b) Hydroxycinnamoyltransferases involved in the accumulation of caffeic acid esters in gametophytes and sporophytes of *Equisetum arvense*. *Plant Physiol* **111**: 1153-1159.
- Holton, T. A., Cornish, E. C.** (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 1071-1083.
- Ingestad, T.** (1959) Studies on the nutrition of forest tree seedlings. II Mineral nutrition of spruce. *Physiol Plant* **12**: 568-593.
- Ishihara, A., Matsukawa, T., Miyagawa, H., Ueno, T., Mayama, S., Iwamura, H.** (1997) Induction of hydroxycinnamoyl-CoA: hydroxyanthranilate *N*-hydroxycinnamoyltransferase (HHT) activity in oat leaves by Victorin C. *Z Naturforsch* **52c**: 756-760.
- Ishihara, A., Miyagawa, H., Matsukawa, T., Ueno, T., Mayama, S., Iwamura, H.** (1998) Induction of hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyl transferase activity by oligo-*N*-acetylchitooligosaccharides in oates. *Phytochemistry* **47**: 969-974.
- Jakoby, W. B., Wilchek, M.** (1974) Affinity techniques. Enzyme purification: Part B. Reihe: *Methods in Enzymology* **34**, Academic Press New York.
- Jansen, M. A. K., Gaba, V., Greenberg, B. M.** (1998) Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci* **3**: 131-135.
- Jansen, M. A. K., Gaba, V., Greenberg, B. M., Mattoo, A. K., Edelman, M.** (1996) Low threshold levels of ultraviolet-B in a background of photosynthetically active radiation trigger rapid degradation of the D2 protein of photosystem-II. *Plant J* **9**: 693-699.
- Jansen, M. A. K., van den Noort, R. E.** (2000) Ultraviolet-B radiation induces complex alterations in stomatal behaviour. *Physiol Plant* **110**: 189-194.
- Janson, J.-C., Rydén, L.** (1989) Protein purification: Principles, high resolution methods, and applications. VCH Publishers New York.
- Jenkins, G. I.** (1997) UV and blue light signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* **20**: 773-778.

- Jenkins, G. I.** (1998) UV and blue light signal transduction in the regulation of flavonoid biosynthesis gene expression in *Arabidopsis*. In: *Cellular integration of signalling pathways in plant development*. Lo Schiavo, F., Last, R. L., Morelli, G. and Raikhel, N. V. (Hrsg), Reihe: *Cell Biology H 104*: 71-82, Springer Berlin.
- Jones, A. E., Shanklin, J. D.** (1995) Continued decline of total ozone over Halley, Antarctica, since 1985. *Nature* **376**: 409-411.
- Jordan, B. R.** (1996) The effects of ultraviolet-B radiation on plants: a molecular perspective. *Adv Bot Res* **22**: 97-162.
- Jordan, B. R., James, P. E., Strid, A., Anthony, R. G.** (1994) The effect of ultraviolet-B radiation on gene expression and pigment composition in etiolated and green pea leaf tissue: UV-B-induced changes are gene-specific and dependent upon the developmental stage. *Plant Cell Environ* **17**: 45-54.
- Jungblut, T. P.** (1996) Wirkung von UV-B Strahlung und Ozon auf den Sekundärstoffwechsel der Kiefer (*Pinus sylvestris* L.). Dissertation, Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Jungblut, T. P., Schnitzler, J.-P., Heller, W., Hertkorn, N., Metzger, J. W., Szymczak, W., Sandermann, H.** (1995) Structures of UV-B induced sunscreen pigments of the Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Angew Chem Int Ed English* **34**: 312-314.
- Kamsteeg, J., van Brederode, J., Hommels, C. H., van Nigtevecht, G.** (1980) Identification, properties and genetic control of hydroxycinnamoyl-Coenzyme A: anthocyanidin 3-rhamnosyl (1-6)glucoside, 4''-hydroxycinnamoyltransferase isolated from petals of *Silene dioica*. *Biochemie und Biophysik der Pflanzen* **175**: 403-411.
- Kellner, R., Lottspeich, F., Meyer, H. E.** (1999) Microcharacterization of proteins. Wiley-VCH Weinheim.
- Kerr, J. B., McElroy, C. T.** (1993) Evidence for large upward trends of ultraviolet-B radiation to ozone depletion. *Nature* **262**: 1032-1034.
- Kerr, R. A.** (1988) Ozone hole bodes ill for the globe. *Science* **241**: 785-786.
- Kessler, H., Gehrke, M., Griesinger, C.** (1988) Zweidimensionale NMR-Spektroskopie, Grundlagen und Übersicht über die Experimente. *Angewandte Chemie* **100**: 507-554.
- Kindel, K.-H.** (1995) Kiefern in Europa. Gustav Fischer Verlag Stuttgart.
- Kley, D., Kleinmann, M., Sandermann, H., Krupa, S. V.** (1999) Photochemical oxidants: state of the science. *Environ Poll* **100**: 19-42.
- Kohler, A., Kauss, H.** (1997) Transfer of hydroxycinnamoyl residues to microsomal proteins from parsley. *Phytochemistry* **44**: 225-228.
- Kolattukudy, P. E., Espelie, K. E.** (1989) Chemistry, biochemistry, and function of suberin and associated waxes. In: *Natural products of woody plants*. Rowe, J. W. (Hrsg), Reihe: *Springer Series in Wood Science* 304-367, Springer-Verlag Berlin.

- Konigsberg, W.** (1972) Reduction of disulfide bonds in proteins with dithiothreitol. *Methods in Enzymology* **25**: 185-188.
- Kramer, G. F., Norman, H. A., Krizek, D. T., Mirecki, R. M.** (1991) Influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Phytochemistry* **30**: 2101-2108.
- Laakso, K., Huttunen, S.** (1998) Effects of the ultraviolet-B radiation (UV-B) on conifers: a review. *Environ Poll* **99**: 319-328.
- Laakso, K., Sullivan, J. H., Huttunen, S.** (2000) The effects of UV-B radiation on epidermal anatomy in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Cell Environ* **23**: 461-472.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Landry, L. G., Chapple, C. C. S., Last, R. L.** (1995) Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol* **109**: 1159-1166.
- Larcher, W.** (1994) Ökophysiologie der Pflanzen. 5. Auflage, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart.
- Lee, H.-I., León, J., Raskin, I.** (1995) Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4076-4079.
- Lehfeldt, C., Shirley, A. M., Meyer, K., Ruegger, M. O., Cusumano, J. C., Viitanen, P. V., Strack, D., Chapple, C. C. S.** (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.
- Lewendon, A., Murray, I. A., Shaw, W. V., Gibbs, M. R., Leslie, A. G. W.** (1994) Replacement of catalytic histidine-195 of chloramphenicol acetyltransferase: evidence for a general base role for glutamate. *Biochemistry* **33**: 1944-1950.
- Li, A. X., Steffens, J. C.** (2000) An acyltransferase catalyzing the formation of diacylglycerol is a serine carboxypeptidase-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6902-6907.
- Li, J., Ou-Lee, T.-M., Raba, R., Amundson, R. G., Last, R. L.** (1993) Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* **5**: 171-179.
- Lois, R., Buchanan, B. B.** (1994) Severe sensitivity to ultraviolet radiation in an *Arabidopsis* mutant deficient in flavonoid accumulation. *Planta* **194**: 504-509.
- Loomis, W. D.** (1974) Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods in Enzymology* **31**: 528-544.
- Lotfy, S., Fleuriet, A., Macheix, J.-J.** (1994) Hydroxycinnamoyl-CoA: transferases in higher plants. II. Characterization in *Cichorium endivia* and *Raphanus sativus* and comparison with other plants. *Plant Physiol Biochem* **32**: 355-363.

- Lotfy, S., Javelle, F., Negrel, J.** (1996) Purification and characterization of hydroxycinnamoyl-Coenzyme A: ω -hydroxypalmitic acid *O*-hydroxycinnamoyltransferase from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cell-suspension cultures. *Planta* **199**: 475-480.
- Louis, V., Negrel, J.** (1991) Tyramine hydroxycinnamoyl transferase in the roots of wheat and barley seedlings. *Phytochemistry* **30**: 2519-2522.
- Madronich, S., McKenzie, R. L., Björn, L. O., Caldwell, M. M.** (1998) Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *J Photochem Photobiol B: Biol* **46**: 5-19.
- Manaf, A. M., Harwood, J. L.** (2000) Purification and characterisation of acyl-CoA:glycerol 3-phosphate acyltransferase from oil palm (*Elaeis guineensis*) tissues. *Planta* **210**: 318-328.
- Masood, E.** (1995) Major ozone thinning found over Arctic. *Nature* **374**: 487.
- Matern, U., Reichenbach, C., Heller, W.** (1986) Efficient uptake of flavonoids into parsley (*Petroselinum hortense*) vacuoles requires acylated glycosides. *Planta* **167**: 183-189.
- Matsuda, F., Miyagawa, H., Ueno, T.** (2000) β -1,3-Glucooligosaccharide induced activation of four enzymes responsible for *N-p*-coumaroyloctopamine biosynthesis in Potatoe (*Solanum tuberosum* cv.) tuber tissue. *Z Naturforsch* **55c**: 373-382.
- Matsukawa, T., Isobe, T., Ishihara, A., Iwamura, H.** (2000) Occurrence of avenanthramides and hydroxycinnamoyl-CoA:hydroxyanthranilate *N*-hydroxycinnamoyltransferase activity in oat seeds. *Z Naturforsch* **55c**: 30-36.
- McCormick, M. P., Thomason, L. W., Trepte, C. R.** (1995) Atmospheric effects of the Mt Pinatubo eruption. *Nature* **373**: 399-404.
- McFarland, M., Kaye, J.** (1992) Chlorofluorocarbons and ozone. *Photochem Photobiol* **55**: 911-929.
- McLellan, T.** (1982) Electrophoresis buffers for polyacrylamide gels at various pH. *Anal Biochem* **126**: 94-99.
- Mendez, M., Jones, D. G., Manetas, Y.** (1999) Enhanced UV-B radiation under field conditions increases anthocyanin and reduces the risk of photoinhibition but does not affect growth in the carnivorous plant *Pinguicula vulgaris*. *New Phytol* **144**: 275-282.
- Molina, M. J., Rowland, F. S.** (1974) Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalysed destruction of ozone. *Nature* **249**: 810-812.
- Mount, D. W.** (1996) Reprogramming transcription. *Nature* **383**: 763-764.
- Moya-Leon, M. A., John, P.** (1995) Purification and biochemical characterization of 1-aminocyclopropan-1-carboxylate oxidase from banana fruit. *Phytochemistry* **39**: 15-20.

- Negrel, J., Javelle, F.** (1997) Purification, characterization and partial amino acid sequencing of hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl)transferase from tobacco cell-suspension cultures. *Eur J Biochem* **247**: 1127-1135.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W.** (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**: 255-262.
- Niemann, G. J.** (1979) Some aspects of the chemistry of Pinaceae needles. *Acta Botanica Neerlandica* **28**: 73-88.
- Nogués, S., Allen, D. J., Morison, J. I. L., Baker, N. R.** (1999) Characterization of stomatal closure caused by ultraviolet-B radiation. *Plant Physiol* **121**: 489-496.
- Norin, T.** (1989) Stilbenes, conioids, and other polyaryl natural products. In: *Natural products of woody plants*. Rowe, J. W. (Hrsg), Reihe: *Springer Series in Wood Science* 512-533, Springer-Verlag Berlin.
- Olsson, L. C., Fraysse, L., Bornman, J. F.** (2000) Influence of high light and UV-B radiation on photosynthesis and D1 turnover in atrazine-tolerant and -sensitive cultivars of *Brassica napus*. *J Exp Bot* **51**: 265-274.
- Oren-Shamir, M., Shaked-Sachray, L., Nissim-Levi, A., Ecker, R.** (1999) Anthocyanin pigmentation of lisianthus flower petals. *Plant Sci* **140**: 81-86.
- Porter, L. J.** (1989) Condensed tannins. In: *Natural products of woody plants*. Rowe, J. W. (Hrsg), Reihe: *Springer Series in Wood Science* 651-690, Springer-Verlag Berlin.
- Reinhard, K., Matern, U.** (1989) The biosynthesis of phytoalexins in *Dianthus caryophyllus* L. cell cultures: induction of benzoyl-CoA:anthranilate *N*-benzoyltransferase activity. *Arch Biochem Biophys* **275**: 295-301.
- Reuber, S., Bornman, J. F., Weissenböck, G.** (1996) Phenylpropanoid compounds in primary leaf tissues of rye (*Secale cereale*). Light responses of their metabolism and the possible role in UV-B protection. *Physiol Plant* **97**: 160-168.
- Rhodes, M. J. C.** (1994) Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. *Plant Mol Biol* **24**: 1-20.
- Rhodes, M. J. C., Woollorton, L. S. C., Lourenco, E. J.** (1979) Purification and properties of hydroxycinnamoyl CoA quinate hydroxycinnamoyl transferase from potatoes. *Phytochemistry* **18**: 1125-1129.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G.** (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* **2**: 152-159.
- Richter, C. M., Eis, U., Wild, A.** (1996) Phenolic compounds as a tool of bioindication for novel forest decline at numerous spruce tree sites in Germany. *Z Naturforsch* **51c**: 53-58.

- Ries, G., Heller, W., Puchta, H., Sandermann, H., Seidlitz, H. K., Hohn, B.** (2000) Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants. *Nature* **406**: 98-101.
- Riordan, J. F., Vallee, B. L.** (1972) Reactions with *N*-Ethylmaleimide and *p*-Mercuribenzoate. *Methods in Enzymology* **25**: 449-456.
- Romussi, G., Cafaggi, S., Ciarallo, G.** (1983) Ein neues acyliertes Flavonolglycosid aus *Quercus ilex* L. *Liebigs Ann Chem* 334-335.
- Romussi, G., Parodi, B., Caviglioli, G.** (1991) Flavonoidglycoside aus *Quercus pubescens* Willd., *Quercus cerris* L. und *Quercus ilex* L. *Pharmazie* **46**:
- Rosemann, D., Heller, W., Sandermann, H.** (1991) Biochemical plant responses to ozone. II. Induction of stilbene biosynthesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Plant Physiol* **97**: 1280-1286.
- Rowe, J. W.** (1989) Natural products of woody plants. Reihe: *Springer Series in Wood Science*, Springer-Verlag Berlin.
- Roy, C. R., Gies, H. P., Elliott, G.** (1990) Ozone depletion. *Nature* **347**: 235-236.
- Sancar, A.** (1996) DNA excision repair. *Ann Rev Biochem* **65**: 43-81.
- Sandermann, H., Haas, M., Messner, B., Pflugmacher, S., Schröder, P., Wetzel, A.** (1997) The role of glycosyl and malonyl conjugation in herbicide selectivity. In: *Regulation of enzymatic systems detoxifying xenobiotics in plants*. Hatzios, K. K. (Hrsg), 211-231, Kluwer Academic Publishers Dordrecht.
- Sandermann, H., Schmitt, R., Eckey, H., Bauknecht, T.** (1991) Plant biochemistry of xenobiotics: isolation and properties of soybean *O*- and *N*-glycosyl and *O*- and *N*-malonyltransferases for chlorinated phenols and anilines. *Arch Biochem Biophys* **287**: 341-350.
- Saylor, M. H., Mansell, R. L.** (1977) Hydroxycinnamoyl: Coenzyme A transferase involved in the biosynthesis of kaempferol-3-(*p*-coumaroyl triglucoside) in *Pisum sativum*. *Z Naturforsch* **32c**: 765-768.
- Schmelzer, E., Jahnen, W., Hahlbrock, K.** (1988) *In situ* localization of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 2989-2993.
- Schmidt, A., Grimm, R., Schmidt, J., Scheel, D., Strack, D., Rosahl, S.** (1999) Cloning and expression of a potato cDNA encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl)transferase. *J Biol Chem* **274**: 4273-4280.
- Schneider, J., Kaffarnik, H., Steinmetz, A.** (1996) Alkohol, Fettstoffwechsel und koronare Herzkrankheit. *Herz* **21**: 217-226.
- Schnitzler, J.-P., Jungblut, T. P., Feicht, C., Köfferlein, M., Langebartels, C., Heller, W., Sandermann, H.** (1997) UV-B induction of flavonoid biosynthesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Trees* **11**: 162-168.

- Schnitzler, J.-P., Jungblut, T. P., Heller, W., Köfferlein, M., Hutzler, P., Heinzmann, U., Schmelzer, E., Ernst, D., Langebartels, C., Sandermann, H.** (1996) Tissue localization of UV-B-screening pigments and of chalcone synthase mRNA in needles of Scots pine seedlings. *New Phytol* **132**: 247-258.
- Schnitzler, J.-P., Langebartels, C., Heller, W., Liu, J., Lippert, M., Döhring, T., Bahnweg, G., Sandermann, H.** (1999) Ameliorating effect of UV-B radiation on the response of Norway spruce and Scots pine to ambient ozone concentrations. *Global Change Biology* **5**: 83-94.
- Schulze, J.** (1910) Über die Einwirkung der Lichtstrahlen von 280 $\mu\mu$ Wellenlänge auf Pflanzenzellen. *Botanisches Zentralblatt / Beihefte* **25**: 30-61.
- Seckmeyer, G., McKenzie, R. L.** (1992) Increased ultraviolet radiation in New Zealand (45°S) relative to Germany (48°N). *Nature* **359**: 135-137.
- Shaw, W. V., Leslie, A. G. W.** (1991) Chloramphenicol acetyltransferase. *Ann Rev Biophys Biophys Chem* **20**: 363-386.
- Shirley, B. W.** (1996) Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. *Trends Plant Sci* **1**: 377-382.
- Short, T. W., Briggs, W. R.** (1994) The transduction of blue light signals in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **45**: 143-171.
- Skaltsa, H., Vrykokidou, E., Harvala, C., Karabourniotis, G., Manetas, Y.** (1994) UV-B protective potential and flavonoid content of leaf hairs of *Quercus ilex*. *Phytochemistry* **37**: 987-990.
- Slimestad, R.** (1997) Chemical studies of flavonoids from Norway spruce, *Picea abies*. Dissertation, Department of Chemistry, University of Bergen.
- Slimestad, R.** (1998) Amount of flavonols and stilbenoids during needle development of *Picea abies*; variations between provenances. *Biochem Sys Ecol* **26**: 225-238.
- Smith, B. G., Harris, P. J.** (2001) Ferulic acid is esterified to glucuronoarabinoxylans in pineapple cell wall. *Phytochemistry* **56**: 513-519.
- Smith, C. J.** (1996) Accumulation of phytoalexins: defence mechanisms and stimulus response system. *New Phytol* **132**: 1-45.
- Stapleton, A. E., Walbot, V.** (1994) Flavonoids can protect maize from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiol* **105**: 881-889.
- Stöckigt, J., Zenk, M. H.** (1975) Chemical synthesis and properties of hydroxycinnamoyl-Coenzyme A derivatives. *Z Naturforsch* **30c**: 352-358.
- St-Pierre, B., Laflamme, P., Alarco, A.-M., De Luca, V.** (1998) The terminal *O*-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer. *Plant J* **14**: 703-713.

- Strack, D., Heilemann, J., Klinkott, E.-S., Wray, V.** (1988a) Cell wall-bound phenolics from Norway spruce (*Picea abies*) needles. *Z Naturforsch* **43c**: 37-41.
- Strack, D., Heilemann, J., Mömken, M., Wray, V.** (1988b) Cell wall-conjugated phenolics from coniferae leaves. *Phytochemistry* **27**: 3517-3521.
- Strack, D., Heilemann, J., Wray, V., Dirks, H.** (1989) Structures and accumulation patterns of soluble and insoluble phenolics from Norway spruce needles. *Phytochemistry* **28**: 2071-2078.
- Strack, D., Mock, H.-P.** (1993) Hydroxycinnamic acids and lignins. In: *Enzymes in Secondary Metabolism*. Lea, P. J. (Hrsg), Reihe: *Methods in Plant Biochemistry* **9**: 45-97, Academic Press London.
- Strasburger, E.** (1991) Lehrbuch der Botanik. Neubearbeitet von Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F. and Bresinsky, A., Gustav Fischer Verlag Stuttgart.
- Strid, A., Chow, W. S., Anderson, J. M.** (1990) Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthesis in *Pisum sativum*. *Biochim Biophys Acta* **1020**: 260-268.
- Strid, A., Chow, W. S., Anderson, J. M.** (1994) UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosyn Res* **39**: 475-489.
- Strid, A., Porra, R. J.** (1992) Alterations in pigment content in leaves of *Pisum sativum* after exposure to supplementary UV-B. *Plant Cell Physiol* **33**: 1015-1023.
- Stryer, L.** (1995) Biochemie. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Sullivan, J. H., Teramura, A. H.** (1988) Effects of ultraviolet-B irradiation on seedling growth in the pinaceae. *Amer J Bot* **75**: 225-230.
- Sullivan, J. H., Teramura, A. H.** (1992) The effects of ultraviolet-B radiation on loblolly pine. *Trees* **6**: 115-120.
- Surplus, S. L., Jordan, B. R., Murphy, A. M., Carr, J. P., Thomas, B., A.-H.-Mackerness, S.** (1998) Ultraviolet-B-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: role of salicylic acid and reactive oxygen species in the regulation of transcripts encoding photosynthetic and acidic pathogenesis-related proteins. *Plant Cell Environ* **21**: 685-694.
- Sussmann, R., Matthes, S., Jäger, H.** (1998) A midlatitude vortex distortion to the Zugspitze at 47.4°N on 5/6 March 1996: Atmospheric singularities detected from FTIR and lidar remote sensing. In: *Air pollution research report 66*. 84-87, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- Suzuki, H., Koike, Y., Murakoshi, I., Saito, K.** (1996) Subcellular localization of acyltransferases for quinolizidine alkaloid biosynthesis in *Lupinus*. *Phytochemistry* **42**: 1557-1562.
- Swain, T.** (1977) Secondary compounds as protective agents. *Ann Rev Plant Physiol* **28**: 479-501.

- Tatsuzawa, F., Ando, T., Saito, N., Kanaya, T., Kokubun, H., Tsunashima, Y., Watanabe, H., Hashimoto, G., Hara, R., Seki, H.** (2000) Acylated delphinidin 3-rutinoside-5-glucosides in the flowers of *Petunia reitzii*. *Phytochemistry* **54**: 913-917.
- Teusch, M., Forkmann, G., Seyffert, W.** (1987) Genetic control of hydroxycinnamoyl-Coenzyme A: anthocyanidin 3-glycoside-hydroxycinnamoyltransferase from petals of *Matthiola incana*. *Phytochemistry* **26**: 991-994.
- Tevini, M.** (1993) Effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial plants. In: *UV-B radiation and ozone depletion. Effects on humans, animals, plants, microorganisms, and materials*. Tevini, M. (Hrsg), 125-153, Lewis Publishers Boca Raton.
- Thiel, S., Döhring, T., Köfferlein, M., Kosak, A., Martin, P., Seidlitz, H. K.** (1996) A phytotron for plant stress research: how far can artificial lighting compare to natural sunlight? *J Plant Physiol* **148**: 456-463.
- Thiel, S., Steiner, K., Seidlitz, H. K.** (1997) Modification of global erythemally effective irradiance by clouds. *Photochem Photobiol* **65**: 969-973.
- Toivonen, A., Rikala, R., Repo, T., Smolander, H.** (1991) Autumn coloration of first year *Pinus sylvestris* seedlings during frost hardening. *Scand J For Res* **6**: 31-39.
- Trost, M.** (1994) Pinosylvin-3-O-methyltransferase aus Kiefer (*Pinus sylvestris* L.): Reinigung, Charakterisierung und Induktion durch Ozon und Elicitor. Dissertation, Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Turunen, M., Heller, W., Stich, S., Sandermann, H., Sutinen, M.-L.** (1999) The effects of UV exclusion on the soluble phenolics of young Scots pine seedlings in the subarctic. *Environ Poll* **106**: 219-228.
- Ulbrich, B., Zenk, M. H.** (1979) Partial purification and properties of hydroxycinnamoyl-CoA: quinate hydroxycinnamoyl transferase from higher plants. *Phytochemistry* **18**: 929-933.
- Villegas, M., Brodelius, P. E.** (1990) Elicitor-induced hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine hydroxycinnamoyltransferase in plant cell suspension cultures. *Physiol Plant* **78**: 414-420.
- Vogt, T., Aebershold, R., Ellis, B. E.** (1993) Purification and characterization of sinapine synthase from seeds of *Brassica napus*. *Arch Biochem Biophys* **300**: 622-628.
- Waibel, A. E., Peter, T., Carslaw, K. S., Oelhaf, H., Wetzel, G., Crutzen, P. J., Pöschl, U., Tsias, A., Reimer, E., Fischer, H.** (1999) Arctic ozone loss due to denitrification. *Science* **283**: 2064-2069.
- Walker, K., Croteau, R.** (2000) Molecular cloning of a 10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 583-587.
- Weisshaar, B., Jenkins, G. I.** (1998) Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr Opin Plant Biol* **1**: 251-257.

- Whetten, R. W., Sederoff, R.** (1995) Lignin biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 1001-1013.
- Willekens, H., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D., Langebartels, C., Sandermann, H.** (1994) Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Plant Physiol* **106**: 1007-1014.
- Wilson, K. J., Wilson, M. I., Greenberg, B. M.** (1998) Identification of the flavonoid glycosides that accumulate in *Brassica napus* L. cv. Topas specifically in response to ultraviolet B radiation. *Photochem Photobiol* **67**: 547-553.
- Winkel-Shirley, B.** (1999) Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiol Plant* **107**: 142-149.
- Yabuya, T., Yamaguchi, M.-A., Fukui, Y., Katoh, K., Imayama, T., Ino, I.** (2001) Characterization of anthocyanin *p*-coumaroyltransferase in flowers of *Iris ensata*. *Plant Sci* **160**: 499-503.
- Yang, Q., Reinhard, K., Schiltz, E., Matern, U.** (1997) Characterization and heterologous expression of hydroxycinnamoyl/benzoyl-CoA:anthranilate *N*-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase from elicited cell cultures of carnation, *Dianthus caryophyllus* L. *Plant Mol Biol* **35**: 777-789.
- Yeoman, M. M., Yeoman, C. L.** (1996) Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. *New Phytol* **134**: 553-569.
- Yonekura-Sakakibara, K., Tanaka, Y., Fukuzi-Mizutani, M., Fujiwara, H., Fukui, Y., Ashikari, T., Murakami, Y., Yamaguchi, M., Kusumi, T.** (2000) Molecular and biochemical characterization of a novel hydroxycinnamoyl-CoA: anthocyanin 3-*O*-glucoside-6-*O*-acyltransferase from *Perilla frutescens*. *Plant Cell Physiol* **41**: 495-502.
- Yoshida-Shimokawa, T., Yoshida, S., Kakegawa, K., Ishii, T.** (2001) Enzymic ferulation of arabinoxylan-trisaccharide by feruloyl-CoA:arabinoxylan-trisaccharide *O*-hydroxycinnamoyltransferase from *Oryza sativa*. *Planta* **212**: 470-474.
- Yu, M., Facchini, P. J.** (1999) Purification, characterization, and immunolocalisation of hydroxycinnamoyl-CoA: tyramine *N*-(hydroxycinnamoyl)transferase from opium poppy. *Planta* **209**: 33-44.
- Zerefos, C. S., Balis, D. S., Bais, A. F., Gillotay, D., Simon, P. C., Mayer, B., Seckmeyer, G.** (1997) Variability of UV-B at four stations in Europe. *Geophys Res Letters* **24**: 1363-1366.
- Ziegler, J., Vogt, T., Miersch, O., Strack, D.** (1997) Concentration of dilute protein solutions prior to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis. *Anal Biochem* **250**: 257-260.
- Zinser, C., Jungblut, T. P., Heller, W., Seidlitz, H. K., Schnitzler, J.-P., Ernst, D., Sandermann, H.** (2000) The effect of ozone in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.): gene expression, biochemical changes and interactions with UV-B radiation. *Plant Cell Environ* **23**: 975-982.

7 Anhang

7.1 NMR-Spektren und -Daten

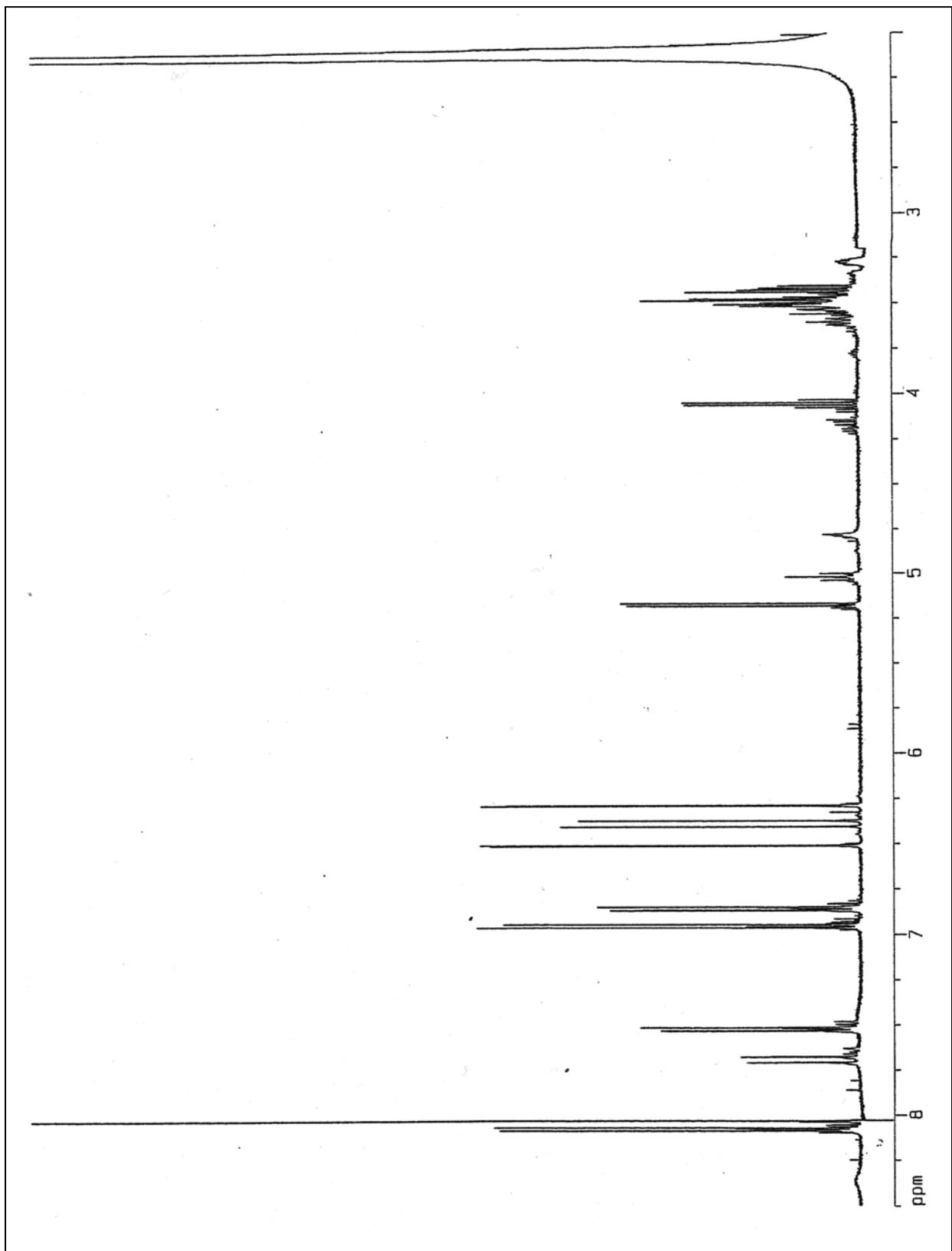


Abb 7.1: ^1H -NMR-Spektrum im Bereich 2-8,5 ppm des 3''-(Monocumaroyl)-kämpferol 3-glukosid. Die Messung wurde in CD_3CN bei 30°C durchgeführt.

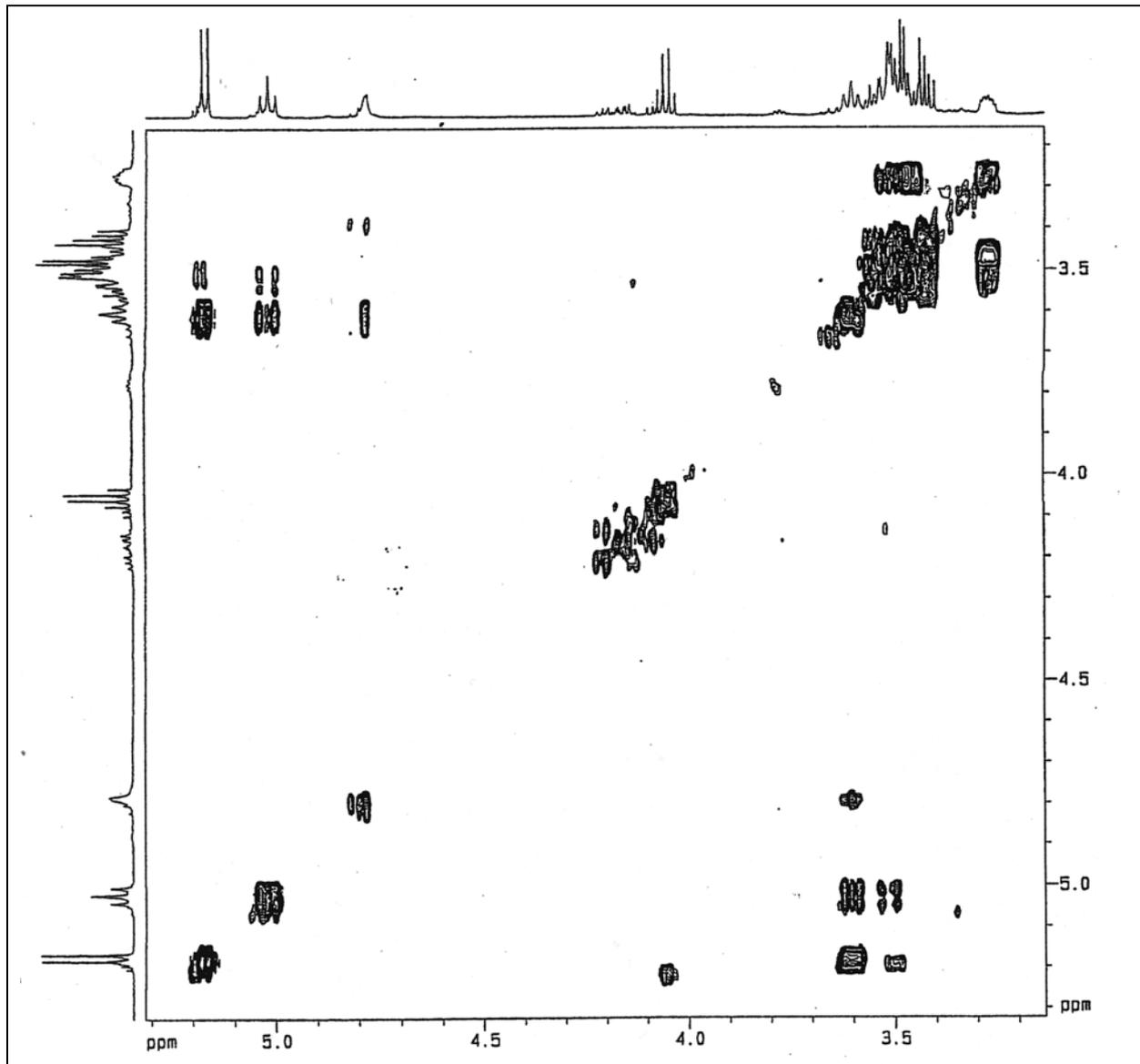


Abb. 7.2: 2D- ^1H , ^1H -COSY-Spektrum von Peak 9, 3,1 - 5,3 ppm (Bereich aliphatischer Protonen).

Anhand des Kopplungsmusters war die Zuordnung der einzelnen Protonen des Zuckerrests möglich. So koppelte der Peak bei 5,17 ppm (H-1'') mit dem Peak bei 3,60 ppm, der damit als H-2'' identifiziert werden konnte. H-2'' wiederum koppelte mit dem Signal bei 5,02 ppm (H-3''), dieses wiederum koppelte mit dem Signal bei 3,54 ppm, das dann also H-4'' darstellte. Dessen Signal koppelte mit dem Signal bei 3,28 ppm, das die typische ddd-Struktur aufwies, die auch bei H-5'' bei K3G auftrat. H-5'' zeigte Wechselwirkungen mit den Signalen bei 3,48 und 3,43 ppm, die auch untereinander koppelten und damit als H-6''A und B identifiziert wurden. Aufgrund der zu tieferem Feld hin verschobenen Lage von H-3'' bei Peak 9 gegenüber K3G (5,02 bzw. 3,34 ppm) befindet sich an dieser Position die Bindung der Cumarsäure.

Tab. 7.1: ¹H-NMR-Daten von drei Referenzsubstanzen (Kämpferol 3-glukosid, Tilirosid und 2'',6''-Di-(p-cumaroyl)-kämpferol 3-glukosid) sowie von 3''-(Monocumaroyl)-kämpferol 3-glukosid und 4''-(Monocumaroyl)-kämpferol 3-glukosid.

2'',6''-Di-(p-cumaroyl)-kämpferol 3-glukosid wurde von Prof. G. Romussi, Genua, aus *Quercus*-Arten isoliert und dankenswerter Weise als Referenz zur Verfügung gestellt.

Proton	δ [ppm]	ⁿ J [Hz]	Protonenanzahl
K3G			
H-2'/6'	8,07	<u>AA'</u> XX' 9,0	2H
H-3'/5'	6,93	AA' <u>XX'</u> 8,9	2H
H-8	6,47	d 2,1 (8-6)	1H
H-6	6,26	d 2,1 (6-8)	1H
H-1''	5,05	d* 7,6	1H
H-6''A	3,51	dd 11,8 (6''A-6''B); 5,6 (6''A-5'')	1H
H-6''B	3,40	dd 11,8 (6''B-6''A); 2,8 (6''B-5'')	1H
H-2''	3,35	m	1H
H-3''	3,34	m	1H
H-4''	3,23	t* 9,0 (4''-5'')	1H
H-5''	3,14	ddd 9,0 (5''-4''); 5,6 (5''-6''A); 2,9 (5''-6''B)	1H
* virtuelle Kopplung			
Tilirosid			
H-2'/6'	8,02	<u>AA'</u> XX' 9,0	2H
H-7'''	7,41	d 16,0 (7'''-8''')	1H
H-2'''/6'''	7,35	<u>AA'</u> XX' 8,5	2H
H-3'/5' // H-3'''/5'''	6,84	AA' <u>XX'</u> 8,9	4H
H-8	6,38	d 2,1 (8-6)	1H
H-6	6,18	d 2,1 (6-8)	1H
H-8'''	6,09	d 16,0 (8'''-7''')	1H
H-1''	5,16	d* 7,8	1H
H-6''A	4,24	dd 11,9 (6''A-6''B); 2,3 (6''A-5'')	1H
H-6''B	4,13	dd 11,9 (6''B-6''A); 6,6 (6''B-5'')	1H
H-5''	3,43	ddd 9,6 (5''-4''); 6,6 (5''-6''B); 2,3 (5''-6''A)	1H
H-2'' / H-3''	3,39	m	2H
H-4''	3,32	m	1H
* virtuelle Kopplung			
Peak 9 (3''-(Monocumaroyl)-kämpferol 3-glukosid)			
H-2'/6'	8,08	<u>AA'</u> XX' 9,0 (2'-3')	2H
H-7'''	7,70	d 16,0 (7'''-8''')	1H
H-2'''/6'''	7,53	<u>AA'</u> XX' 8,6 (2'''-3''')	2H
H-3'/5'	6,95	AA' <u>XX'</u> 8,9 (3'-2')	2H
H-3'''/5'''	6,86	AA' <u>XX'</u> 8,6 (3'''-2''')	2H
H-8	6,51	d 2,1 (8-6)	1H
H-8'''	6,39	d 15,9 (8'''-7''')	1H
H-6	6,29	d 2,1 (6-8)	1H
H-1''	5,17	d 7,9	1H
H-3''	5,02	t 9,3; 9,4	1H
H-2''	3,60	t 8,6; 8,4	1H
H-4''	3,54	m	1H
H-6''A	3,48	m	1H

Tab. 7.1 (Fortsetzung)

Proton	δ [ppm]	nJ [Hz]	Protonenanzahl
H-6''B	3,43	dd 11,1; 5,9	1H
H-5''	3,28	ddd 8,4; 5,2; 2,8	1H
Peak 8 (4''-(Monocumaroyl)-kämpferol 3-glukosid)			
H-2''/6'	8,09	<u>AA'</u> XX' 9,0	2H
H-7'''	7,64	d 16,0 (7'''-8''')	1H
H-2'''/6'''	7,50	<u>AA'</u> XX' 8,7	2H
H-3'/5'	6,94	<u>AA'</u> XX' 8,9	2H
H-3'''/5'''	6,82	<u>AA'</u> XX' 8,6	2H
H-8	6,47	2,1 (8-6)	1H
H-8'''	6,32	d 15,9 (8'''-7''')	1H
H-6	6,25	d 2,0 (6-8)	1H
H-1''	5,21	d 8,0 (1''-2'')	1H
H-4''	4,79	t 9,8 (4''-5'')	1H
H-3''	3,64	t 9,1 (3''-2'')	1H
H-2''	3,48	dd 9,1 (2''-3''); 8,0 (2''-1'')	1H
H-5''	3,37	dddd 10,0 (5''-4''); 7,6; 5,1; 2,4	1H
H-6''A	3,30	m	1H
H-6''B	3,30	m	1H
2''-6''-Di-(<i>p</i>-cumaroyl)-kämpferol 3-glukosid			
H-2''/6'	7,98	<u>AA'</u> XX' 8,9 (2'-3')	2H
H-7'''	7,68	d 15,9 (7'''-8''')	1H
H-2''/6''	7,51	d, br, 8,7 (2''-3'')	2H
H-7'''	7,39	d 16,0 (7'''-8''')	1H
H-2'''/6'''	7,34	d, br. 8,6 (2'''-3''')	1H
H-3'/5'	6,88	<u>AA'</u> XX' 8,9 (3'-2')	2H
H-3''/5''	6,83	m	2H
H-3'''/5'''	6,82	m	2H
H-8'''	6,38	d 15,9 (8'''-7''')	1H
H-8	6,29	d 2,1 (8-6)	1H
H-8''''	6,12	d 16,0 (8''''-7''''')	1H
H-6	6,07	d 2,1 (6-8)	1H
H-1''	5,73	d 8,1 (1''-2'')	1H
H-2''	4,99	dd 9,5 (2''-3''); 8,2 (2''-1'')	1H
H-6''A	4,28	dd 12,0 (6''A-6''B); 2,1 (6''A-5'')	1H
H-6''B	4,18	dd 12,0 (6''B-6''A); 6,1 (6''B-5'')	1H
H-3''	3,66	t 9,2 (3''-2'')	1H
H-5''	3,55	dddd 9,0 (5''-4''); 6,0 (5''-6''B); 2,0 (5''-6''A)	1H
H-4''	3,47	m	1H

7.2 Ergebnisse der BLAST-Suche

Ergebnisse der Homologie-Suche mit der Aminosäure-Sequenz der sequenzierten Peptide und der homologen Proteine, die mit MS EDMAN SEARCH gefunden wurden, mit dem Programm BLAST (BLASTP 2.1.2, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>, Altschul *et al.* 1997).

- Peptid der 28 kDa-Bande (KFIREDLHTK), gezeigt sind die ersten fünf von 30 Treffern. Mit den Sequenzen der beiden anderen Peptide wurden keine Homologien gefunden.

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 124505 sp P21327 INPP_BOVIN INOSITOL POLYPHOSPHATE 1-PHO...	<u>17</u>	5409
gi 1171993 sp P45724 PAL2_ARATH PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE 2	<u>17</u>	5455
gi 1709563 sp P53443 PAL2_ORYSA PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE	<u>17</u>	5455
gi 116527 sp P12210 CLPP_TOBAC PROBABLE CLPP-LIKE PROTEASE ...	<u>17</u>	6392
gi 3334285 sp O23865 PAL1_DAUCA PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE 1	<u>17</u>	6445

Alignments

```
>gi|124505|sp|P21327|INPP\_BOVIN INOSITOL POLYPHOSPHATE 1-PHOSPHATASE (IPPASE) (IPP)
      Length = 400
      Score = 17.1 bits (33), Expect = 5409
      Identities = 5/9 (55%), Positives = 8/9 (88%)
Query: 2   FIREDLHTK 10
          F+ +DLHT+
Sbjct: 205 FVSQDLHTR 213

>gi|1171993|sp|P45724|PAL2\_ARATH PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE 2
      Length = 717
      Score = 17.1 bits (33), Expect = 5455
      Identities = 6/10 (60%), Positives = 9/10 (90%)
Query: 1   KFIREDLHTK 10
          +F+RE+L TK
Sbjct: 663 RFVREELGTK 672

>gi|1709563|sp|P53443|PAL2\_ORYSA PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE
      Length = 710
      Score = 17.1 bits (33), Expect = 5455
      Identities = 6/10 (60%), Positives = 9/10 (90%)
Query: 1   KFIREDLHTK 10
          +F+RE+L TK
Sbjct: 656 RFVREELGTK 665

>gi|116527|sp|P12210|CLPP\_TOBAC PROBABLE CLPP-LIKE PROTEASE (ENDOPEPTIDASE CLP) (ORF
196)
      Length = 196
      Score = 17.1 bits (33), Expect = 6392
      Identities = 5/9 (55%), Positives = 8/9 (88%)
Query: 1   KFIREDLHT 9
          +F+R D+HT
Sbjct: 85 QFVRPDVHT 93

>gi|3334285|sp|O23865|PAL1\_DAUCA PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE 1
      Length = 708
      Score = 17.1 bits (33), Expect = 6445
      Identities = 7/9 (77%), Positives = 8/9 (88%)
Query: 1   KFIREDLHT 9
```

KFIRE+L T
Sbjct: 654 KFIREELGT 662

Database: Non-redundant SwissProt sequences
 Posted date: Mar 2, 2001 1:09 AM
 Number of letters in database: 34,249,663
 Number of sequences in database: 94,165
 Lambda K H
 0.327 0.143 0.414
 Gapped
 Lambda K H
 0.267 0.0410 0.140
 Matrix: BLOSUM62
 Gap Penalties: Existence: 11, Extension: 1
 Number of Hits to DB: 571687
 Number of Sequences: 94165
 Number of extensions: 1395
 Number of successful extensions: 55
 Number of sequences better than 10000.0: 55
 Number of HSP's better than 10000.0 without gapping: 55
 Number of HSP's successfully gapped in prelim test: 0
 Number of HSP's that attempted gapping in prelim test: 0
 Number of HSP's gapped (non-prelim): 55
 length of query: 10
 length of database: 34,249,663
 effective HSP length: 0
 effective length of query: 24
 effective length of database: 34,249,663
 effective search space: 821991912
 effective search space used: 821991912
 T: 11
 A: 40
 X1: 15 (7.1 bits)
 X2: 38 (14.6 bits)
 X3: 64 (24.7 bits)
 S1: 31 (17.4 bits)
 S2: 31 (16.5 bits)

- Peptid der 24 kDa-Bande: KGITFFDTADVYGATK, gezeigt sind die ersten 10 von 153 Treffern.

Sequences producing significant alignments:	(bits)	Value
gi 7479621 pir T35322 hypothetical protein SC5H1.06c - Str...	<u>28</u>	22
gi 7471099 pir E75296 aldo/keto reductase - Deinococcus ra...	<u>27</u>	31
gi 11279317 pir E82644 sugar-phosphate dehydrogenase XF172...	<u>27</u>	50
gi 10581452 gb AAG20187.1 (AE005096) general stress protei...	<u>26</u>	93
gi 2462761 gb AAB71980.1 (AC002292) Highly similar to auxi...	<u>26</u>	107
gi 6692675 gb AAF24809.1 AC007592_2 (AC007592) F12K11.2 [Ar...	<u>25</u>	154
gi 7447923 pir H72307 oxidoreductase, aldo/keto reductase ...	<u>25</u>	158
gi 7447940 pir S75444 hypothetical protein slr1503 - Synec...	<u>25</u>	175
gi 12312009 emb CAC22873.1 (AL512963) HYPOTHETICAL OXIDORE...	<u>25</u>	185
gi 1352461 sp P49249 IN22 MAIZE IN2-2 PROTEIN	<u>24</u>	210

Alignments

```
>gi|7479621|pir||T35322 hypothetical protein SC5H1.06c - Streptomyces coelicolor
  gi|4835309|emb|CAB42931.1| (AL049863) hypothetical protein [Streptomyces
coelicolor A3(2)]
      Length = 327
      Score = 27.8 bits (61), Expect = 22
      Identities = 11/12 (91%), Positives = 12/12 (99%)
Query: 2 GITFFDTADVYG 13
      G+TFFDTADVYG
Sbjct: 46 GVTFFDTADVYG 57
```

>[gi|7471099|pir||E75296](#) aldo/keto reductase - *Deinococcus radiodurans* (strain R1)
[gi|6460065|gb|AAF11806.1|AE002058_6](#) (AE002058) aldo/keto reductase [*Deinococcus radiodurans*]

Length = 327
Score = 27.1 bits (59), Expect = 31
Identities = 10/12 (83%), Positives = 12/12 (99%)
Query: 2 GITFFDTADVYG 13
G+TFFDTAD+YG
Sbjct: 47 GVTFFDTADIYG 58

>[gi|11279317|pir||E82644](#) sugar-phosphate dehydrogenase XF1724 [imported] - *Xylella fastidiosa* (strain 9a5c)
[gi|9106792|gb|AAF84533.1|AE003996_2](#) (AE003996) sugar-phosphate dehydrogenase [*Xylella fastidiosa*]

Length = 329
Score = 26.7 bits (58), Expect = 50
Identities = 11/12 (91%), Positives = 11/12 (91%)
Query: 2 GITFFDTADVYG 13
GI FFDTADVYG
Sbjct: 43 GINFFDTADVYG 54

>[gi|10581452|gb|AAG20187.1|](#) (AE005096) general stress protein 69; Gsp [*Halobacterium* sp. NRC-1]

Length = 352
Score = 25.5 bits (55), Expect = 93
Identities = 10/12 (83%), Positives = 11/12 (91%)
Query: 2 GITFFDTADVYG 13
GIT+FDT DVYG
Sbjct: 47 GITYFDTGDVYG 58

>[gi|2462761|gb|AAB71980.1|](#) (AC002292) Highly similar to auxin-induced protein (aldo/keto reductase family) [*Arabidopsis thaliana*]

Length = 340
Score = 25.5 bits (55), Expect = 107
Identities = 9/12 (75%), Positives = 12/12 (100%)
Query: 2 GITFFDTADVYG 13
G+TFFDT+D+YG
Sbjct: 44 GVTFFDTSDMYG 55

>[gi|6692675|gb|AAF24809.1|AC007592_2](#) (AC007592) F12K11.2 [*Arabidopsis thaliana*]

Length = 476
Score = 24.8 bits (53), Expect = 154
Identities = 10/13 (76%), Positives = 12/13 (91%)
Query: 2 GITFFDTADVYGA 14
GI FFDTA+VYG+
Sbjct: 98 GIDFFDTAEVYGS 110

>[gi|7447923|pir||H72307](#) oxidoreductase, aldo/keto reductase family - *Thermotoga maritima* (strain MSB8)

[gi|4981550|gb|AAD36088.1|AE001762_15](#) (AE001762) oxidoreductase, aldo/keto reductase family [*Thermotoga maritima*]

Length = 333
Score = 24.8 bits (53), Expect = 158
Identities = 10/12 (83%), Positives = 11/12 (91%)
Query: 2 GITFFDTADVYG 13
GI FFDTA+VYG
Sbjct: 49 GINFFDTAEVYG 60

>[gi|7447940|pir||S75444](#) hypothetical protein slr1503 - *Synechocystis* sp. (strain PCC

6803)
[gi|1653089|dbj|BAA18005.1|](#) (D90911) hypothetical protein [*Synechocystis* sp.]

Length = 330
Score = 24.8 bits (53), Expect = 175
Identities = 10/12 (83%), Positives = 10/12 (83%)
Query: 2 GITFFDTADVYG 13
GITFFDT D YG
Sbjct: 50 GITFFDTGDSYG 61

>gi|12312009|emb|CAC22873.1| (AL512963) HYPOTHETICAL OXIDOREDUCTASE IN ANSR-BMRU INTERGENIC REGION [Sulfolobus solfataricus]

Length = 354
 Score = 24.8 bits (53), Expect = 185
 Identities = 10/15 (66%), Positives = 11/15 (72%)
 Query: 2 GITFFDTADVYGATK 16
 GI F+DTAD YG K
 Sbjct: 74 GINFYDTADTYGEGK 88

>gi|1352461|sp|P49249|IN22_MAIZE IN2-2 PROTEIN
 Length = 306

Score = 24.4 bits (52), Expect = 210
 Identities = 9/12 (75%), Positives = 11/12 (91%)
 Query: 2 GITFFDTADVYG 13
 G+TF DT+DVYG
 Sbjct: 54 GVTFLDTSADVYG 65

- EST-Clon NXNV_065_F12_F aus *Pinus taeda*, angegeben sind die ersten 20 von 100 Treffern.

ANPVI PRVKLGNQGLEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEEDGISIIKYAFEKGITFFDTADVYGATKNEVLVKGKALKQLPR - NVQLAKKFGIVMVDGKMDAKGTP-Y-RKCC--SLK-LD

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 1352461 sp P49249 IN22_MAIZE IN2-2 PROTEIN	99	2e-20
gi 6562980 gb AAF17106.1 AF057715_1 (AF057715) auxin-induce...	97	7e-20
gi 2462763 gb AAB71982.1 (AC002292) Highly similar to auxi...	96	1e-19
gi 2462762 gb AAB71981.1 (AC002292) Highly similar to auxi...	96	2e-19
gi 2462741 gb AAB71960.1 (AC002292) Highly similar to auxi...	94	4e-19
gi 728744 sp P40691 A115_TOBAC AUXIN-INDUCED PROTEIN PCNT11...	94	7e-19
gi 2462750 gb AAB71969.1 (AC002292) Highly similar to auxi...	92	2e-18
gi 7447933 pir T12582 auxin-induced protein - common sunfl...	91	3e-18
gi 2462761 gb AAB71980.1 (AC002292) Highly similar to auxi...	90	8e-18
gi 4874267 gb AAD31332.1 AC007354_5 (AC007354) Strong simil...	86	1e-16
gi 11351605 pir H83328 probable oxidoreductase PA2535 [imp...	74	7e-13
gi 7447923 pir H72307 oxidoreductase, aldo/keto reductase ...	71	5e-12
gi 11691847 emb CAC18716.1 (AL451182) putative oxidoreduct...	68	3e-11
gi 7471099 pir E75296 aldo/keto reductase - Deinococcus ra...	63	1e-09
gi 7447943 pir T04984 hypothetical protein T16L1.160 - Ara...	62	2e-09
gi 10581452 gb AAG20187.1 (AE005096) general stress protei...	61	5e-09
gi 1351673 sp Q09923 YAKC_SCHPO HYPOTHETICAL 37.7 KD PROTEI...	60	7e-09
gi 12963216 gb AAK11174.1 (AF315629) stress inducible prot...	60	1e-08
gi 6562778 emb CAB62709.1 (AL133423) putative aldo/keto re...	58	4e-08
gi 7299545 gb AAF54731.1 (AE003694) CG3397 gene product [D...	57	7e-08

Alignments

>gi|1352461|sp|P49249|IN22_MAIZE IN2-2 PROTEIN
 Length = 306

Score = 98.7 bits (245), Expect = 2e-20
 Identities = 51/99 (51%), Positives = 67/99 (67%), Gaps = 1/99 (1%)
 Query: 5 IPRVKLGNQGLEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEEDGISIIKYAFEKGITFFDTADVYGAT 64
 +PR+KLG+QGLEVS G GCMG++ Y P E + I +I +A + G+TF DT+DVYG
 Sbjct: 8 VPRIKLGSQGLEVSAQGLGCMGMSAFYGPPESEMIKLIHHAVDAGVTFLDTSADVYGPH 67
 Query: 65 KNEVLVKGKALKQLPR-NVQLAKKFGIVMVDGKMDAKGTP 102
 NEVL+GKAL+ R V+LA KFG+ DGK + G P
 Sbjct: 68 TNEVLLGKALQGGVREKVELATKFGVVSFADGKREIHGDP 106

>gi|6562980|gb|AAF17106.1|AF057715_1 (AF057715) auxin-induced atb2 [Arabidopsis thaliana]

Length = 345

Score = 96.8 bits (240), Expect = 7e-20

Identities = 53/109 (48%), Positives = 69/109 (62%), Gaps = 3/109 (2%)

Query: 5 IPRVKLGNQGLEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEEDGISIIKYAFEKGITFFDADTVYGAT 64
+ R+KLG+QGLEVS G GCMGL+ Y P E + I++I +A G+T DT+D+YG
Sbjct: 7 VRRMKLGSQGLEVSAQGLGCMGLSAFYGAPKPEEAIALIHHAHHSVTLTLDTSDIYGPE 66

Query: 65 KNEVLVKGKALKQLPR-NVQLAKKFGIVMVDGKMDAKGTP--YRKCSSLK 110
NEVL+GKALK R V+LA KFGI +GK + +G P R C K

Sbjct: 67 TNEVLLGKALKDGVREKVELATKFGISYAEGKREVRGDPEYVRAACEAK 115

>gi|2462763|gb|AAB71982.1| (AC002292) Highly similar to auxin-induced protein (aldo/keto reductase family) [Arabidopsis thaliana]

Length = 342

Score = 96.0 bits (238), Expect = 1e-19

Identities = 52/110 (47%), Positives = 70/110 (63%), Gaps = 3/110 (2%)

Query: 5 IPRVKLGNQGLEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEEDGISIIKYAFEKGITFFDADTVYGAT 64
+ R+KLG+QGLEVS G GCMGL+ Y P E + I++I +A G+TF DT+D+YG
Sbjct: 7 VRRIKLGSQGLEVSAQGLGCMGLSAFYGTPKPEEAIALIHHAHHSVTFLLDTSDIYGPE 66

Query: 65 KNEVLVKGKALKQLPR-NVQLAKKFGIVMVDGKMDAKGTP--YRKCSSLKL 111
NE+L+ KALK R V+LA K+GI +GK++ KG P R C L

Sbjct: 67 TNEILLKALKDGVREKVELATKYGIRYAEGKVEFKGDPAYVRAACEASL 116

>gi|2462762|gb|AAB71981.1| (AC002292) Highly similar to auxin-induced protein (aldo/keto reductase family) [Arabidopsis thaliana]

Length = 345

Score = 95.6 bits (237), Expect = 2e-19

Identities = 54/110 (49%), Positives = 69/110 (62%), Gaps = 3/110 (2%)

Query: 5 IPRVKLGNQGLEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEEDGISIIKYAFEKGITFFDADTVYGAT 64
+ R+KLG+QGLEVS G GCMGLTG Y E + I++I +A G+TF DT+D+YG
Sbjct: 7 VRRIKLGSQGLEVSAQGLGCMGLTGHYGASKPEEAIALIHHAHHSVTFLLDTSMDYGP 66

Query: 65 KNEVLVKGKALKQLPR-NVQLAKKFGIVMVDGKMDAKGTP--YRKCSSLKL 111
NE+L+GKALK R V+LA KFGI +G + KG P R C L

Sbjct: 67 TNEILLKALKDGVREKVELATKFGISYAEGNREIKGDPAYVRAACEASL 116

>gi|2462741|gb|AAB71960.1| (AC002292) Highly similar to auxin-induced protein (aldo/keto reductase family) [Arabidopsis thaliana]

Length = 287

Score = 94.5 bits (234), Expect = 4e-19

Identities = 52/107 (48%), Positives = 67/107 (62%), Gaps = 3/107 (2%)

Query: 8 VKLGNQGLEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEEDGISIIKYAFEKGITFFDADTVYGATKNE 67
+KLG+QGLEVS G GCMGL+ Y P E + I++I +A G+T DT+D+YG NE
Sbjct: 1 MKLGSQGLEVSAQGLGCMGLSAFYGAPKPEEAIALIHHAHHSVTLTLDTSDIYGPE 60

Query: 68 VLVGKALKQLPR-NVQLAKKFGIVMVDGKMDAKGTP--YRKCSSLKL 111
VL+GKALK R V+LA KFGI +GK + +G P R C L

Sbjct: 61 VLLGKALKDGVREKVELATKFGISYAEGKREVRGDPEYVRAACEASL 107

>gi|728744|sp|P40691|A115 TOBAC AUXIN-INDUCED PROTEIN PCNT115

gi|100305|pir||S16390 auxin-induced protein - common tobacco

gi|19799|emb|CAA39708.1| (X56267) auxin-induced protein [Nicotiana tabacum]

Length = 307

Score = 93.7 bits (232), Expect = 7e-19

Identities = 57/115 (49%), Positives = 68/115 (58%), Gaps = 8/115 (6%)

Query: 5 IPRVKLGNQGLEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEEDGISIIKYAFEKGITFFDADTVYGAT 64
+PR+KLG+QGLEVS G GCMG++ Y P E D I +I +A GIT DT+DVYG
Sbjct: 8 VPRIKLGSAQGLEVSAQGLGCMGMSAFYGPPEPDMIQLIHHAHNSGITLLDTSVDYGP 67

Query: 65 KNEVLVKGKALKQLPRN-VQLAKKFGIVMVD-----GKMDAKGTP--YRKCSSLKL 111
NE+L+GKALK R V LA KFGIV+ D GK G P R C L

Sbjct: 68 TNEILLKALKGGTRERVVLATKFGIVLGDEKKAEGKRAVHGDPEYVRAACEASL 122

>gi|2462750|gb|AAB71969.1| (AC002292) Highly similar to auxin-induced protein (aldo/keto reductase family) [Arabidopsis thaliana]

Length = 374

Score = 92.2 bits (228), Expect = 2e-18

Identities = 49/100 (49%), Positives = 68/100 (68%), Gaps = 2/100 (2%)
 Query: 5 IPRVKLGNQGLEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEEDGISIIKYAFEKGITFFDADVYGAT 64
 + R+KLG+QGLEVS G GCMGL+ Y P E + +++++A G+TF DT+D+YG
 Sbjct: 8 VRRMKLGSQGLEVSAQGLGCMGLSDFYGAPTPETNAVALLRHAINAGVTFLLDTSDIYGPE 67

Query: 65 KNEVLVGKALKQLPRN-VQLAKKFGIVMV-DGKMDAKGTP 102
 NE+L+GKALK R+ V+LA KFGI DGK +G P
 Sbjct: 68 TNELLLGKALKDGLRDKVELATKFGITASEDGKFGFRGDP 107

>[gi|7447933|pir||T12582](#) auxin-induced protein - common sunflower
[gi|2606077|gb|AAB84222.1|](#) (AF030301) auxin-induced protein [*Helianthus annuus*]
 Length = 338
 Score = 91.4 bits (226), Expect = 3e-18
 Identities = 53/110 (48%), Positives = 69/110 (62%), Gaps = 4/110 (3%)
 Query: 5 IPRVKLGNQGLEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEEDGISIIKYAFEKGITFFDADVYGAT 64
 +PRVKLG+QGLEVS G GCM ++ Y P E D I++I +A G+TF DT+D YG
 Sbjct: 4 VPRVKLGSQGLEVSAQGLGCMMSAFYGPPEPDMINLIHHAVNSGVTFVDTSDYYGPK 63

Query: 65 KNEVLVGKALKQLPRN-VQLAKKFGIVMVDGKMDAKGTP--YRCCSLKL 111
 NE+L+GKALK R+ V+LA K+GI + G + KG P R C L
 Sbjct: 64 TNEILLGKALKGMRDKVELATKYGIKL-SGSWEVKGDPAYVRAACEASL 112

>[gi|2462761|gb|AAB71980.1|](#) (AC002292) Highly similar to auxin-induced protein
 (aldo/keto reductase family) [*Arabidopsis thaliana*]
 Length = 340
 Score = 90.2 bits (223), Expect = 8e-18
 Identities = 50/108 (46%), Positives = 70/108 (64%), Gaps = 4/108 (3%)
 Query: 8 VKLGNQGLEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEEDGISIIKYAFEKGITFFDADVYGATKNE 67
 +KLG+QGLEVS G GCM L+ Y P E D I+++ +A G+TFFDT+D+YG NE
 Sbjct: 1 MKLGSQGLEVSAQGLGCMALSARYGAPKPEPETAIALHHAINGVTFVDTSDMYGPETNE 60

Query: 68 VLVGKALKQ-LPRNVQLAKKFGIVMVDGKM-DAKGTP--YRCCSLKL 111
 +L+GKALK + V+LA KFG +V+G++ + +G P R C L
 Sbjct: 61 LLLGKALKDGVKEKVELATKFGFFIVEGEISEVRGDPPEYVRAACEASL 108

>[gi|4874267|gb|AAD31332.1|AC007354_5](#) (AC007354) Strong similarity to [gb|X56267](#)
 auxin-induced protein(pCNT115) from *Nicotiana tabacum* and is a member of the
 PF|00248 Aldo/keto reductase family. [*Arabidopsis thaliana*]
 Length = 348
 Score = 86.0 bits (212), Expect = 1e-16
 Identities = 49/110 (44%), Positives = 68/110 (61%), Gaps = 3/110 (2%)
 Query: 5 IPRVKLGNQGLEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEEDGISIIKYAFEKGITFFDADVYGAT 64
 + R+KLG+QGLEVS G GCMGL+ E D I++I +A GIT DT+D+YG
 Sbjct: 7 VRRIKLGSQGLEVSAQGLGCMGLSIFDGTTKVVETDLIALIHHAINSGITLLDTSDIYGPE 66

Query: 65 KNEVLVGKALKQ-LPRNVQLAKKFGIVMVDGKMDAKGTP--YRCCSLKL 111
 NE+L+G+ALK + V+LA KFG+++ D K+ +G P R C L
 Sbjct: 67 TNELLLGQALKDGMREKVELATKFGLLKQKLYRGDPAYVRAACEASL 116

>[gi|11351605|pir||H83328](#) probable oxidoreductase PA2535 [imported] - *Pseudomonas*
aeruginosa (strain PA01)
[gi|9948592|gb|AAG05923.1|AE004681_5](#) (AE004681) probable oxidoreductase
 [*Pseudomonas aeruginosa*]
 Length = 331
 Score = 73.7 bits (180), Expect = 7e-13
 Identities = 40/92 (43%), Positives = 54/92 (58%)
 Query: 9 KLGNGGLEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEEDGISIIKYAFEKGITFFDADVYGATKNEV 68
 +LG+ G VS +G GCMG+T Y ++ I+ + A E G+ FFDTAD+YG NE
 Sbjct: 5 QLGHNGPSVSAIGLGCMTDFYTTGGDRQEAIAIATLHRAVELGLNFFDTADMYGPHSNEE 64

Query: 69 LVGKALKQLPRNVQLAKKFGIVMVDGKMDAKG 100
 L+G+AL+ V LA KFGIV A+G
 Sbjct: 65 LLGEALRGKREQVFLASKFGIVRDPANPRARG 96

>[gi|7447923|pir||H72307](#) oxidoreductase, aldo/keto reductase family - *Thermotoga*
maritima (strain MSB8)
[gi|4981550|gb|AAD36088.1|AE001762_15](#) (AE001762) oxidoreductase, aldo/keto
 reductase family [*Thermotoga maritima*]
 Length = 333
 Score = 70.6 bits (172), Expect = 5e-12

Identities = 43/97 (44%), Positives = 58/97 (59%), Gaps = 1/97 (1%)
Query: 5 IPRVKLGNQGLEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEEDGISIIKYAFEKGITFFDADVYGAT 64
IP+ KLG +G EVS +G GCM ++ ++ I +I+ A E GI FFDTA+VYG
Sbjct: 3 IPKRKLGGERGPEVSAIGLGCMMRSMFGQKLLPDRKEMIKLIRTAVELGINFFDADAEVYGPY 62

Query: 65 KNEVLVGKALKQLPRNVQLAKKFGIVMV-DGKMDAKG 100
NE LVG+AL+ V +A KFG + DG+ KG
Sbjct: 63 TNEELVGEALEPFGKGEVVIATKFGFELYEDGRPGWK 99

>[gi|11691847|emb|CAC18716.1|](#) (AL451182) putative oxidoreductase [Streptomyces coelicolor]
Length = 330
Score = 68.3 bits (166), Expect = 3e-11
Identities = 41/84 (48%), Positives = 52/84 (61%), Gaps = 3/84 (3%)
Query: 10 LGNQGLEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEEDGISIIKYAFEKGITFFDADVY--GATKNE 67
LG QGL VS +G G MG++ Y P+++EDGIS I A E G+ FFDTA++Y G NE
Sbjct: 6 LGQQGLRVSAALGLGVMGMSLAY-GPSNDEEDGISTIHRRAHELGVDFDADAEVYQGQGTGSNE 64

Query: 68 VLVGKALKQLPRNVQLAKKFGIVM 91
L+G A+ V LA KFG M
Sbjct: 65 TLLGNAVNDFRDEVVLATKFGFDM 88

>[gi|7471099|pir||E75296](#) aldo/keto reductase - Deinococcus radiodurans (strain R1)
[gi|6460065|gb|AAF11806.1|AE002058_6](#) (AE002058) aldo/keto reductase [Deinococcus radiodurans]
Length = 327
Score = 63.3 bits (153), Expect = 1e-09
Identities = 35/76 (46%), Positives = 48/76 (63%), Gaps = 1/76 (1%)
Query: 15 LEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEEDGISIIKYAFEKGITFFDADVYGATKNEVLVGKAL 74
L VS +G GCMG++ Y + A E + + + A + G+TFFDAD+YG NE L+G+ L
Sbjct: 12 LTVSALGLGCMGMSEFYGD-ADEAESLRTLDRALDLGVTFDADADIYGPYHNEELLGRWL 70

Query: 75 KQLPRNVQLAKKFGIV 90
+ V LA KFGIV
Sbjct: 71 RGKRDRVVLATKFGIV 86

>[gi|7447943|pir||T04984](#) hypothetical protein T16L1.160 - Arabidopsis thaliana
[gi|3549669|emb|CAA20580.1|](#) (AL031394) putative protein [Arabidopsis thaliana]
[gi|7270315|emb|CAB80084.1|](#) (AL161583) putative protein [Arabidopsis thaliana]
Length = 319
Score = 62.1 bits (150), Expect = 2e-09
Identities = 33/73 (45%), Positives = 49/73 (66%), Gaps = 3/73 (4%)
Query: 10 LGNQGLEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEEDGISIIKYAFEKGITFFDADVYGATKNEVL 69
LGN GL+VS VG+G L ++ P +E+D ++ ++ AF GI FFDT+ YG T +E +
Sbjct: 9 LGNTGLKVS AVGFGASPLGSVF-GPVAEDDAVATVREAFRLGINFFDADSPYGGTLSEKM 67

Query: 70 VGKALK--QLPRN 80
+GK LK Q+PR+
Sbjct: 68 LGKGLKALQVPRS 80

>[gi|10581452|gb|AAG20187.1|](#) (AE005096) general stress protein 69; Gsp
[Halobacterium sp. NRC-1]
Length = 352
Score = 61.0 bits (147), Expect = 5e-09
Identities = 31/80 (38%), Positives = 52/80 (64%)
Query: 9 KLGNGLEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEEDGISIIKYAFEKGITFFDADVYGATKNEV 68
+LG+ G+EVS+VG+G + + E+D + +++YA + GIT+FDT DVYG ++E
Sbjct: 5 ELGDSGVEVSEVGFAGVVGTDWVGDRDEDDALEMVEYALDHGITYFDTGDVYVGHGRSEE 64

Query: 69 LVGKALKQLPRNVQLAKKFG 88
L+G+AL + + +A K G
Sbjct: 65 LLGEALAEHGDDEMTVATKVG 84

>[gi|1351673|sp|Q09923|YAKC_SCHPO](#) HYPOTHETICAL 37.7 KD PROTEIN C1F7.12 IN CHROMOSOME I
[gi|2130303|pir||S62584](#) probable oxidoreductase - fission yeast (Schizosaccharomyces pombe)
[gi|7492782|pir||T38106](#) probable oxidoreductase - fission yeast (Schizosaccharomyces pombe)

[gi|1067214|emb|CAA91959.1|](#) (Z67998) putative oxidoreductase [Schizosaccharomyces pombe]

Length = 340

Score = 60.2 bits (145), Expect = 7e-09

Identities = 36/86 (41%), Positives = 53/86 (60%), Gaps = 5/86 (5%)

Query: 5 IPRVKLGNQGLEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEEDGISIIKYAFEKGITFFDTADVYGAT 64
IP K+GN V +G+GCMGL +Y P+SEE +++ +A + G TF+D++D+YG
Sbjct: 3 IPTRKIGND--TVPAIGFGCMGLHAMY-GPSSEANQAVLTHAADLGCTFWDSSDMYGFG 59

Query: 65 KNEVLVGKALKQLPRNVQ--LAKKFG 88
NE +G+ KQ R + LA KFG

Sbjct: 60 ANEECIGRWFKQTGRRKEIFLATKFG 85

>[gi|12963216|gb|AAK11174.1|](#) (AF315629) stress inducible protein [Haloferax volcanii]

Length = 212

Score = 59.8 bits (144), Expect = 1e-08

Identities = 34/92 (36%), Positives = 55/92 (58%), Gaps = 1/92 (1%)

Query: 5 IPRVKLGNQGLEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEE-DGISIIKYAFEKGITFFDTADVYGA 63
I +++LG G VS +G GCM ++ I+ +E + I+ I A + GI F +T D YGA
Sbjct: 31 INQIQLGLNGPFVSSILGLGCMRMSIWWGGVTPDESESIATINEALDLGINFLNTGDFYGA 90

Query: 64 TKNEVLVGKALKQLPRNVQLAKKFGIVMVDGK 95
NE+L+GKA+K + ++ KFG + +G+

Sbjct: 91 GHNEMLIGKAIKGRRDDAFISVKFGAIFHNGQ 122

>[gi|6562778|emb|CAB62709.1|](#) (AL133423) putative aldo/keto reductase [Streptomyces coelicolor A3(2)]

Length = 338

Score = 57.9 bits (139), Expect = 4e-08

Identities = 33/85 (38%), Positives = 45/85 (52%), Gaps = 1/85 (1%)

Query: 5 IPRVKLGNQGLEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEEDGISIIKYAFEKGITFFDTADVYGAT 64
IP +LG G EV G GCMG++ Y P E + ++ A E G+T +DTAD YGA
Sbjct: 6 IPTARLGTGPEVGAQGLGCMGMSFAY-GPTDTEASRATLERALELGVTLTYDTADAYGAG 64

Query: 65 KNEVLVGKALKQLPRNVQLAKKFGI 89
+NE + K V +A KF +

Sbjct: 65 ENERFLAPFFKAHRDEVVVATKFAL 89

>[gi|7299545|gb|AAF54731.1|](#) (AE003694) CG3397 gene product [Drosophila melanogaster]

Length = 342

Score = 57.1 bits (137), Expect = 7e-08

Identities = 29/71 (40%), Positives = 45/71 (62%)

Query: 9 KLGNGGLEVSKVGYGCMGLTGIYNNPASEEDGISIIKYAFEKGITFFDTADVYGATKNEV 68
+LG+ GL VSK+ G L+ ++++ E+GI ++ A GI + DTA YG K+E
Sbjct: 26 QLGSTGLRVSKIALGGATLSKLFSDDFDREEGILTVQEAIRSGINIDTAPFYGGQKSEE 85

Query: 69 LVGKALKQLPR 79
L+G+ALK +PR

Sbjct: 86 LLGQALKDVPR 96

- Erstes Peptid der 15 kDa-Bande: KYHYLVANAK , gezeigt sind alle fünf Treffer.

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 8777326 dbj BAA96916.1 (AB019228) gene_id:MCK7.12~simil...	<u>22</u>	805
gi 2632098 emb CAA75667.1 (Y15513) Prodos protein [Drosoph...	<u>19</u>	7785
gi 7293423 gb AAF48800.1 (AE003507) prodos gene product [D...	<u>19</u>	7785
gi 7488037 pir T00951 probable 3-oxoacyl-[acyl-carrier-pro...	<u>19</u>	9916
gi 1045614 gb AAC49186.1 (U37088) beta-ketoacyl-CoA syntha...	<u>19</u>	9916

Alignments

```
>gi|8777326|dbj|BAA96916.1| (AB019228) gene_id:MCK7.12~similar to unknown
protein~sp|P72777 [Arabidopsis thaliana]
    Length = 211
    Score = 22.4 bits (47), Expect = 805
    Identities = 9/10 (90%), Positives = 10/10 (100%)
Query: 1 KYHYLVANAK 10
      KYH+LVANAK
Sbjct: 75 KYHFLVANAK 84

>gi|2632098|emb|CAA75667.1| (Y15513) Prodos protein [Drosophila melanogaster]
    Length = 328
    Score = 19.4 bits (39), Expect = 7785
    Identities = 7/8 (87%), Positives = 8/8 (99%)
Query: 1 KYHYLVAN 8
      +YHYLVAN
Sbjct: 222 EYHYLVAN 229

>gi|7293423|gb|AAF48800.1| (AE003507) prodos gene product [Drosophila melanogaster]
    Length = 328
    Score = 19.4 bits (39), Expect = 7785
    Identities = 7/8 (87%), Positives = 8/8 (99%)
Query: 1 KYHYLVAN 8
      +YHYLVAN
Sbjct: 222 EYHYLVAN 229

>gi|7488037|pir||T00951| probable 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase (EC
2.3.1.41) F20D22.1 - Arabidopsis thaliana
  gi|3142289|gb|AAC16740.1| (AC002411) Strong similarity to beta-keto-Coa synthase
gb|U37088 from Simmondsia chinensis. [Arabidopsis thaliana]
    Length = 528
    Score = 19.0 bits (38), Expect = 9916
    Identities = 6/8 (75%), Positives = 8/8 (100%)
Query: 2 YHYLVANA 9
      YHYL++NA
Sbjct: 38 YHYLISNA 45

>gi|1045614|gb|AAC49186.1| (U37088) beta-ketoacyl-CoA synthase [Simmondsia
chinensis]
    Length = 521
    Score = 19.0 bits (38), Expect = 9916
    Identities = 6/8 (75%), Positives = 8/8 (100%)
Query: 2 YHYLVANA 9
      YHYL++NA
Sbjct: 42 YHYLISNA 49

Database: nr
  Posted date: Mar 2, 2001 1:09 AM
  Number of letters in database: 2,863,827,885
  Number of sequences in database: 807,597
Lambda      K      H
  0.321      0.131    0.388
Gapped
Lambda      K      H
  0.267      0.0410   0.140
Matrix: BLOSUM62
Gap Penalties: Existence: 11, Extension: 1
Number of Hits to DB: 2989174
Number of Sequences: 640428
Number of extensions: 5830
Number of successful extensions: 9
Number of sequences better than 10000.0: 9
Number of HSP's better than 10000.0 without gapping: 9
Number of HSP's successfully gapped in prelim test: 0
Number of HSP's that attempted gapping in prelim test: 0
Number of HSP's gapped (non-prelim): 9
length of query: 10
length of database: 201,912,487
effective HSP length: 0
effective length of query: 24
effective length of database: 201,912,487
```

effective search space: 4845899688
 effective search space used: 4845899688
 T: 11
 A: 40
 X1: 16 (7.4 bits)
 X2: 38 (14.6 bits)
 X3: 64 (24.7 bits)
 S1: 38 (20.5 bits)
 S2: 38 (19.2 bits)

- Zweites Peptid der 15 kDa-Bande: KFMLDEEEHFK , gezeigt sind beide Treffer.

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 8777326 dbj BAA96916.1 (AB019228) gene_id:MCK7.12~simil...	<u>25</u>	193
gi 7301936 gb AAF57043.1 (AE003773) CG2218 gene product [D...	<u>19</u>	8117

Alignments

>[gi|8777326|dbj|BAA96916.1|](#) (AB019228) gene_id:MCK7.12~similar to unknown protein~sp|P72777 [Arabidopsis thaliana]
 Length = 211

Score = 24.8 bits (53), Expect = 193
 Identities = 10/11 (90%), Positives = 11/11 (99%)

Query: 1 KFMLDEEEHFK 11
 KFMLDEEEHF+
 Sbjct: 84 KFMLDEEEHFQ 94

>[gi|7301936|gb|AAF57043.1|](#) (AE003773) CG2218 gene product [Drosophila melanogaster]
 Length = 486

Score = 19.4 bits (39), Expect = 8117
 Identities = 6/11 (54%), Positives = 9/11 (81%)

Query: 1 KFMLDEEEHFK 11
 KF+++ EHFK
 Sbjct: 293 KFLMENSEHFK 303

Database: nr

Posted date: Mar 2, 2001 1:09 AM

Number of letters in database: 2,863,827,885

Number of sequences in database: 807,597

Lambda K H
 0.322 0.141 0.404

Gapped

Lambda K H
 0.267 0.0410 0.140

Matrix: BLOSUM62

Gap Penalties: Existence: 11, Extension: 1

Number of Hits to DB: 4188418

Number of Sequences: 640428

Number of extensions: 12700

Number of successful extensions: 6

Number of sequences better than 10000.0: 6

Number of HSP's better than 10000.0 without gapping: 6

Number of HSP's successfully gapped in prelim test: 0

Number of HSP's that attempted gapping in prelim test: 0

Number of HSP's gapped (non-prelim): 6

length of query: 11

length of database: 201,912,487

effective HSP length: 0

effective length of query: 24

effective length of database: 201,912,487

effective search space: 4845899688

effective search space used: 4845899688

T: 11
 A: 40
 X1: 16 (7.4 bits)
 X2: 38 (14.6 bits)
 X3: 64 (24.7 bits)
 S1: 38 (20.5 bits)
 S2: 38 (19.2 bits)

- Unbekanntes Protein aus *A. thaliana* (GenBank Accession-Nr.: AB019228.1),
 angegeben sind alle fünf Treffer.

MWSVTGALTVAVPPTAACRTKPFLLISSSFPKQTKKHLHSSPSSLSPSSHFSKTAATSIEQQSSVNGESTKYHFLVANAK
 FMLDEEEHFQEQLFERLRYFGERELVQDFWLVIIEPKFLDNFPKITQRLRRPAVALVSTNGTWITFMKLRDLRVLYDSFEATSL
 DEALASNPTTLEFDKPKNWVAPYPKYEPGWWDTFLLPKVTQESAV

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 8777326 dbj BAA96916.1 (AB019228) gene_id:MCK7.12~simil...	312	3e-84
gi 11465670 ref NP_053814.1 ORF108 [Porphyra purpurea] >gi...	55	8e-07
gi 6136546 sp P72777 Y54L_SYNY3 YCF54-LIKE PROTEIN >gi 7448...	48	8e-05
gi 11465546 ref NP_045062.1 unknown [Cyanidium caldarium] ...	41	0.010
gi 7470225 pir S76065 hypothetical protein slr0337 - Synec...	34	1.6

Alignments

>[gi|8777326|dbj|BAA96916.1|](#) (AB019228) gene_id:MCK7.12~similar to unknown protein~sp|P72777[Arabidopsis thaliana]

Length = 211

Score = 312 bits (799), Expect = 3e-84

Identities = 170/211 (80%), Positives = 170/211 (80%)

Query: 1 MWSXXXXXXXXXXXXXXXXXCRTPFLISSSFPKQTKXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 60
 MWS CRTKPFLLISSSFPKQTK
 Sbjct: 1 MWSVTGALTVAVPPTAACRTKPFLLISSSFPKQTKKHLHSSPSSLSPSSHFSKTAAT 60

Query: 61 XIEQQSSVNGESTKYHFLVANAKFMLDEEEHFQEQLFERLRYFGERELVQDFWLVIIEPK 120
 IEQQSSVNGESTKYHFLVANAKFMLDEEEHFQEQLFERLRYFGERELVQDFWLVIIEPK
 Sbjct: 61 SIEQQSSVNGESTKYHFLVANAKFMLDEEEHFQEQLFERLRYFGERELVQDFWLVIIEPK 120

Query: 121 FLDNFPKITQRLRRPAVALVSTNGTWITFMKLRDLRVLYDSFEATSLDEALASNPTTLEF 180
 FLDNFPKITQRLRRPAVALVSTNGTWITFMKLRDLRVLYDSFEATSLDEALASNPTTLEF
 Sbjct: 121 FLDNFPKITQRLRRPAVALVSTNGTWITFMKLRDLRVLYDSFEATSLDEALASNPTTLEF 180

Query: 181 DKPKNWVAPYPKYEPGWWDTFLLPKVTQESAV 211
 DKPKNWVAPYPKYEPGWWDTFLLPKVTQESAV
 Sbjct: 181 DKPKNWVAPYPKYEPGWWDTFLLPKVTQESAV 211

>[gi|11465670|ref|NP_053814.1|](#) ORF108 [Porphyra purpurea]
[gi|1723382|sp|P51204|YC54_PORPU](#) HYPOTHETICAL 12.7 KD PROTEIN YCF54 (ORF108)
[gi|2147499|pir||S73125](#) hypothetical protein 108 - red alga (Porphyra purpurea)
 chloroplast

[gi|1276670|gb|AAC08090.1|](#) (U38804) ORF108 [Porphyra purpurea]

Length = 108

Score = 54.8 bits (131), Expect = 8e-07

Identities = 33/92 (35%), Positives = 50/92 (53%), Gaps = 3/92 (3%)

Query: 74 TKYHFLVANAKFMLDEEEHFQEQLFERLRYFGERELVQDFWLVIIEPKFLDN--FPKITQR 131
 T Y+F +A+ F+L EE +E ER+ Y+ DFWL+ PKFL+ K
 Sbjct: 2 TTYFALASQNFLLESEEP-LEEVFRERINYYQSNKEIDFWLIPNPKFLNKPAMIKFKNL 60

Query: 132 LRRPAVALVSTNGTWITFMKLRDLRVLYDSFE 163
 + A+A++STN +I ++KLR+ V FE
 Sbjct: 61 VPNEAIAIISTNSIFINWLKLRIGYVCIGQFE 92

>[gi|6136546|sp|P72777|Y54L_SYNY3](#) YCF54-LIKE PROTEIN
[gi|7448620|pir||S74640](#) hypothetical protein slr1780 - Synechocystis sp. (strain
 PCC 6803)
[gi|1651865|dbj|BAA16792.1|](#) (D90900) hypothetical protein [Synechocystis sp.]

A: 40
 X1: 16 (7.4 bits)
 X2: 38 (14.6 bits)
 X3: 64 (24.7 bits)
 S1: 41 (21.8 bits)
 S2: 70 (31.6 bits)

7.3 Sequenzen bekannter Hydroxycinnamoyl-Transferasen

Gezeigt sind die Sequenzen aller bekannten Hydroxycinnamoyl-Transferasen, die gereinigt, sequenziert, cloniert und heterolog exprimiert wurden. Nicht angegeben sind Sequenzen, die durch Annotation als homolog zu Hydroxycinnamoyl-Transferasen beschrieben worden sind. **Fett** markiert sind die konservierten Domänen (St-Pierre *et al.* 1998). Hinter dem Namen sind Abkürzung, Species, GenBank Accession-Nr. und Literatur angegeben.

Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase (5AT, *Gentiana triflora*, AB010708, Fujiwara *et al.* 1998b)

MEQIQMVKVL EKCQVTPPSD TTDVELSLPV TFFDIPWLHL NKMQSLLFYD FPYPRTHFLD TVIPNLKASL
SLTLKHYVPL SGNLLMPIKS GEMPKFQYSR DEGDSITLIV AESDQDFDYL KGHQLVDSND LHGLFYVMPR
 VIRTMQDYKV IPLVAVQVTV FPNRGIIVAL TAHHSIADAK SFVMFINAWA YINKFGKAD LLSANLLPSF
 DRSEIKDLYG LEETFWNEMQ DVLEMFSRFG SKPPRFNKVR ATYVLSLAEI QKLKNKVLNL RGSEPTIRVT
 TFTMTCGYVW TCMVKSDDV VSEESSNDEN ELEYFSFTAD CRGLLTPPCP PNYFGNCLAS CVAKATHKEL
 VGDKGLLVAV AAIGEAIKLR LHNEKGVLD AKTWLSESNG IPSKRFLGIT GSPKFDYSGV **DFGWGKPAK**
 DITSVDYAEI IYVIQSRDFE KGVEIGVSLP KIHMDAFAKI FEEGFCSL

Drei weitere Anthocyanin 3-glucoside Hydroxycinnamoyl-Transferasen aus *Perilla frutescens* (AB029340), *Gentiana triflora* (AB026494) und *Petunia hybrida* (AB026495), alle in Yonekura-Sakakibara *et al.* 2000.

Anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase (HCBT, *Dianthus caryophyllus*, Z98758 / Z843383, Yang *et al.* 1997)

MSIQIKQSTM VRPAEETPNK SLWLSKIDMI LRTPYSHTGA VLIYKQPDNN EDNIHPSSSM YFDANILIEA
LSKALVPYYP MAGRLKINGD RYEIDCNAEG ALFVEAESSH VLEDFGDFRP NDELHRVMVP TCDYSGGISS
 FPLLMVQLTR FRCGGVSI GF AQH**HHACDGM** SHFEFNNSWA RIAKGLPAL EPVHRYLHL RLRNPPQIKY
 THSQFEPFVP SLPNELLDGK TNKSQTLFKL SREQINTLKQ KLDLSSNTTT RLSTYEVVAG HWRSVSKAR
 GLSDHEEIKL IMPVDGRSRI NNPSLPKGYC GNVVFLAVCT ATVGDLSNCP LTDTAGKVQE ALKGLDDDYD
 RSAIDHTESK PDLVPYMG S PEKTLYPNVL VNSWGRIPYQ **AMDFGWGSP** FFGISNIFYD GQCFLIPSON
 GDGSMTLAIN LFSHLSLFLK KYFYDF

N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase (*Ipomoea batatas*, AB035183, unveröffentlicht)

MASEKFKISI KESTMVKPAK PTPAKRLWNS NLDLIVGRIH LLTVYFYRPN GSPNFFDSKV MKEAL**SNV**LV
SFYPMAGRLA RDGEGRIEID CNEEGVLFVE AESDACVDDF GDFTPSLELR KFIPTVDTSG DISSFPLIIF
 QVTRFKCGGV CLGTGVF**HTL** **SDGV**SSSLHFI NTWSDMARGL SVAIPPFIDR TLLRARDPPT PAFEHSEYDQ
 PPKLKSVPES KRGSSASTM LKITPEQLAL LKTKSKEGS TYEILAAHIW RCACKARGLT DDQATKLYVA
 TDGRSRLCPP LPPGYLGNVV FTATPMAESG ELQSEPLTNS AKRIHSALSR MDDEYLRSAL DFLECQPDLS
 KLIRGSNYFA SPNLNINSWT RLPVHES**DFG** **WGRPI**HMGPA CILYEGTVYI LPSPNKDRTL SLAVCLDAEH
 MPLFKEFLYD F

Hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-Hydroxycinnamoyl-Transferase (THT, *Nicotiana tabacum*, AJ005062, Farmer *et al.* 1999)

MATTNKNLIT ITEKVYVRVR LANEADISHI YKLFYQIHEY HNYTHLYKAT ESSLCDLLFK ANPNPLFYGP
 SVLLELVSP PFENTKKDEK FKPVLKTFDL RATVEDKEAE EFKSKSCGDE KEDVFIAGYA FFYANYSCFY
 DKAGIYFESL YFRESYRKL G MGLLFGTVA SIAANNGFAS VEGIVAVWNK KSYDFYVNMG VEI FDEFYR
 KLVGDALQKY ADKEKV

Hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-Hydroxycinnamoyl-Transferase (THT, *Solanum tuberosum*, Schmidt *et al.* 1999)

MAPAPQLPTP SETITTDASS ENNNVTITEK IYRVRLATKS DLSHIYQLFY QIHEYHNYTH LYKATESSLA
 NLLFKENPLP LFYGPSVLLL EVSPTPFNEP KNTTNEGFKP VLTFDLKFP VVEGQVEEFR SKYDDKNDAY
 IAGYAFFYAN YSCFYDKPGF YFESLYFRES YRKLGMGSL LFGTVASIAAN NGFVSVEGIV AVWNKKSDF
 YINMGVEIFD EFRYGLHGE NLQKYADKKD ENGEESC

Beispiele für Sequenzen von Acetyl-CoA verwendenden Enzymen

Deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase (DAT, *Catharanthus roseus*, AF053307, St-Pierre *et al.* 1998)

MESGKISVET ETLKTLIKP SSPTPQSLSR YNLSYNDQNI YQTCVSVGFF YENPDGIEIS TIREQLQNSL
SKTLVSYYPF AGKVVKNDYI HCNDGIEFV EVRIRCRMND ILKYELRSYA RDLVLPKRVV VGSEDTTAIV
 QLSHFDCGGL AVAFGISHKV **ADGGTIASFM** KDWAASACYL SSSHVPTPL LVSDSIFPRQ DNIICEQFPT
 SKNCVEKTFI FPPEAIEKLL SKAVEFGIEK PTRVEVLTAFL SRCATVAGK SAAKNNNCGQ SLPFVVLQAI
 NLRPILELPQ NSVGNLVSII FSRTIKENDY LNEKEYTKLV INELRKEKQK IKNLSREKLT YVAQMEEFVK
 SLKEFDISNF LDIDAYLSDS WCRFPFYDVD **FGWGKPIWVC** LFQPYIKNCV VMMDYPPGDD YGIEAIVSFE
 QEKMSAFEKN EQLLQFVSN

Chloramphenicol 3-O-acetyltransferase (CAT, *Bacillus pumilus*, P00487, Harwood *et al.* 1983)

MFKQIDENYL RKEHFHMYT LTRCSYSLVI NLDITKLHAI LKEKKLVYYP VQIYLLARAV QKIPEFRMDQ
 VNDELGYWEI LHPSYTI LNK ETKTFSSIWT PFENFAQFY KSCVADIETF SKSSNLFPKP HMPENMFNIS
 SLPWIDFTSF NLNVSTDEAY LLPIFTIGKF KVEEGKIILP VAIQVH **HAVC** **DGYHAGQYVE** YLRWLIEHCD
 EWLNDSLHIT

Acetyl-CoA:benzylalcohol acetyltransferase (BEAT; *Clarkia breweri*, AF043464, Dudareva *et al.* 1998)

MNVTMHKKL LKPSIPTPNH LQKLNLSLLD QIQIPFYVGL IFHYETLSDN SDITLSKLES **SLSETLTLYY**
 HVAGRYNGTD CVIECNDQGI GYVETAFDVE LHQFLLGEES NNLDLLVGLS GFLSETETPP LAAIQLNMFK
 CGGLVIGAQF **NHII** **GMFTM** STFMNSWAKA CRVGIKEVAH PTFGLAPLMP SAKVLNIPPP PSFEGVKFVS
 KRFFVFNENAI TRLRKEATEE DGDGDDQKK KRPSRVDLVT AFLSKSLIEM DCAKKEQTKS RPSLMVHMMN
 LRKRTKLAL E NDVSGNFFIV VNAESKITVA PKITDLTESL GSACGEIISE VAKVDDAEV SSMVLNSVRE
 FYYEWGKGEK NVFLYTSWCR FPLYEV **DFGW** **GIPSLVDTTA** VPFGLIVLMD EAPAGDGI AV RACLSEHDMI
 QFQQHHQLLS YVS

Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist am Institut für Biochemische Pflanzenpathologie am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit unter der Leitung von Prof. Dr. Heinrich Sandermann entstanden.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Heinrich Sandermann für die interessante Themenstellung und die Betreuung der Arbeit bedanken.

Herrn Dr. Werner Heller danke ich besonders für die engagierte Betreuung und viele angeregte Diskussionen trotz seiner schweren Erkrankung.

Frau Susanne Stich danke ich für den unermüdlichen Einsatz rund um die HPLC und die Messung von vielen, vielen Proben.

Bei Dr. Norbert Hertkorn möchte ich mich für die Messung und Auswertung der NMR-Spektren bedanken.

Der GSF-Arbeitsgruppe EPOKA, insbesondere Herrn Dr. Harald Seidlitz, Herrn Dr. Andreas Krins, Florian Reif und Ralph Memminger danke ich für die Bereitstellung der Sonnensimulatoren und für die Strahlungsmessungen während der Experimente.

Herrn Dr. Christian Langebartels möchte ich für die Unterstützung bei der Lösung von organisatorischen Problemen sowie die stete Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Dr. Thomas Vogt vom Institut für Pflanzenbiochemie in Halle sei für einige wichtige Hinweise bei der Enzymreinigung gedankt.

Frau Elke Gerstner danke ich für die Durchführung von Enzymtests und anderen Messungen.

Herrn Prof. Dr. Giovanni Romussi von der Universität Genua danke ich für die Bereitstellung einer Probe von diacylierten Flavonolglykosiden.

Herrn Florian Loibl sei gedankt für die Synthese von Cumaroyl-CoA und die Aufarbeitung von einigem Pflanzenmaterial.

Und natürlich möchte ich mich ganz herzlich bei allen Kolleginnen und Kollegen von BIOP, besonders bei (in alphabetischer Reihenfolge) Dr. Helen Chiron, Sabine Glombitza, Lucia Gössl, Bärbel Groß, Evi Kiefer, Rosina Ludwig, Elke Mattes, Dr. Wolfgang Möder, Dr. Jan Rothenburger, Regina Schuegger, Dr. Gaby Thomas, Dr. Gerd Vogg, Dr. Sigrun Wegener, Heike Wohlgemuth für die gute Arbeitsatmosphäre und viel Abwechslung im Arbeitsalltag bedanken.

Bei meinen Eltern bedanke ich mich dafür, dass sie mir das Studium ermöglicht haben.

Mein ganz spezieller Dank geht an Dr. Nina Janich, die mir mit, nicht nur germanistischem, Rat und Tat zu Seite stand.

Lebenslauf

Name: Florian Aurelius Rudolf Kaffarnik

Geburtstag: 23. Februar 1969

Geburtsort: Würzburg

Schulbildung: 1975-1979 Grund- und Hauptschule Wehrda

1979-1988 Gymnasium Philippinum Marburg

14.06.1988 Allgemeine Hochschulreife

Studium: 1990-1991 Studium der Chemie (Diplom) an der Julius-
Maximilians-Universität Würzburg

1991-1997 Studium der Biologie (Diplom) an der Julius-

Maximilians-Universität Würzburg, Hauptfach: Botanik,

Nebenfächer: Biotechnologie, Zell- und Entwicklungsbiologie

07.05.1997 Diplom

Titel der Diplomarbeit: „Untersuchungen zum Wassertransport in Höheren
Pflanzen unter Verwendung der Drucksondentechnik: Die Effekte von Licht
und Abscisinsäure auf den Xylemdruck“

bei Prof. Dr. U. Zimmermann

Promotion: 1997-2001 am Institut für Biochemische Pflanzenpathologie des
GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg
bei Prof. Dr. H. Sandermann