

# **Gewinnung und Modifikation von Flavonoiden in Mikroorganismen**

**Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**

**dem Fachbereich Pharmazie  
der Philipps Universität Marburg  
vorgelegt von**

**Sabine Schmidt  
aus Neustadt/Aisch**

**Marburg/Lahn 2010**

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen  
am 27.07.2010.

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Ulrich Matern  
Zweitgutachterin: Frau Prof. Dr. Maike Petersen

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2010

## **Veröffentlichungen und Publikationen:**

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen veröffentlicht:

### **Posterpräsentation:**

Sabine Schmidt, Simone Witte, Yvonne Gebhardt, Ulrich Matern and Stefan Martens  
“Biotransformation of flavanones to flavones in engineered yeast cells“  
XXIVth International Conference on Polyphenols, Salamanca, Spanien, 2008

### **Vorträge:**

S. Schmidt, S. Witte, U. Matern and S. Martens  
“Biotransformation of flavanones to flavones in engineered yeast cells and identification of yeast *beta*-glucosidases“  
6. Kurt Mothes Workshop, Jena, 2008

S. Schmidt, S. Witte, U. Matern und S. Martens  
“Biotransformationsexperimente in Hefezellen und der Einfluss von internen  $\beta$ -Glucosidasen auf die Synthese von Flavonoiden“  
6. Treffen der Sektion Pflanzliche Naturstoffe der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Fulda, 2009

### **Publikation:**

S. Schmidt, S. Witte, U. Matern, S. Martens  
“Identification of a Glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* Hydrolyzing Flavonoid Glucosides“, eingereicht bei Applied and Environmental Microbiology

Diese Arbeit wurde am Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. U. Matern

im Zeitraum vom 01. Oktober 2005 bis zum 31. Mai 2009 durchgeführt und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

### **Danksagung**

Nachfolgend möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Ich danke Herrn Professor Dr. Ulrich Matern für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die wertvollen Anregungen für die Gestaltung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Stefan Martens danke ich für die Hilfe und Unterstützung während der gesamten Zeit und für die Möglichkeit viele verschiedene Arbeitsmethoden kennenzulernen.

Frau Professor Dr. Maike Petersen möchte ich für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur und für ihre tatkräftige Unterstützung danken.

Ich danke Herrn Professor Teemu Teeri, Universität Helsinki, für die Überlassung der *Nicotiana benthamiana*-Samen und die Möglichkeit verschiedene Arbeitstechniken in seinem Labor kennenzulernen.

Simone Witte ein herzliches Dankeschön für die nette gemeinsame Laborzeit und ihre „beratende Tätigkeit“. Außerdem der gesamten informellen Gruppe für die schöne Zeit.

Miriam Bredebach danke ich für die gemeinsame Laborzeit in der letzten Phase der praktischen Arbeit. Ein Dankeschön auch an alle (ehemaligen) Kollegen des Institutes für Pharmazeutische Biologie für das freundliche Arbeitsklima.

Ganz besonders danke ich Dr. Anna Berim für die große Hilfe und Unterstützung während der gesamten Laborzeit und auch darüber hinaus.

Herrn Walter Rudl ein Dankeschön für die Anzucht und Pflege der Pflanzen.

Ein ganz herzliches Dankeschön an meine Familie und Freunde für die moralische Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>I. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>I.1 FLAVONOIDE</b> .....	1
<b>1.1 Klassifizierung</b> .....	1
<b>1.2 Biosynthese der Flavonoide</b> .....	2
<b>1.3 Pharmazeutische Bedeutung</b> .....	5
<b>1.4 Bedeutung für die Pflanzen</b> .....	7
<b>I.2 ISOFLAVONOIDE</b> .....	7
<b>2.1 Biosynthese der Isoflavonoide</b> .....	7
<b>2.2 Bedeutung der Isoflavonoide</b> .....	10
<b>I.3 MONOOXYGENASEN-DIOXYGENASEN</b> .....	11
<b>I.4 HUMANE UDP-GLUCURONOSYLTRANSFERASEN</b> .....	15
<b>I.5 BEDEUTUNG DER UDP- GLUCURONOSYLTRANSFERASEN FÜR DEN MENSCHEN</b> .....	17
<b>I.6 GEWINNUNG VON NATURSTOFFEN</b> .....	19
<b>I.7 RADIOAKTIV MARKIERTE SUBSTANZEN</b> .....	23
<b>II. AUFGABENSTELLUNG</b>	<b>24</b>
<b>III. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>25</b>
<b>III.1. MATERIAL</b> .....	25
<b>1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</b> .....	25
<b>1.2 Radiochemikalien</b> .....	26
<b>1.3 Enzyme</b> .....	26
<b>1.4 Reagenziensätze (Kits)</b> .....	26
<b>1.5 Substrate, Cosubstrate und Referenzsubstanzen</b> .....	27
<b>1.6 Pflanzenmaterial</b> .....	27
<b>III.2 PUFFER UND LÖSUNGEN</b> .....	27
<b>2.1 Lösungen für die Isolierung von Plasmid-DNA</b> .....	27
<b>2.2 Lösungen zur Herstellung kompetenter Bakterien</b> .....	28
<b>2.3 Agarose-Gelelektrophorese</b> .....	28
<b>2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b> .....	28
<b>2.5 Puffer für die Proteinreinigung</b> .....	29
<b>2.6 Puffer und Lösungen für Western Blot Analyse</b> .....	29
<b>2.7 Aufschlusspuffer</b> .....	30
<b>III.3 MEDIEN FÜR BAKTERIEN</b> .....	31
<b>III.4 MEDIEN FÜR SACCHAROMYCES CEREVISIAE</b> .....	32
<b>III.5 MEDIEN FÜR PICHIA PASTORIS</b> .....	33
<b>III.6 MEDIEN FÜR DIE INFILTRATION VON NICOTIANA BENTHAMIANA UND LUCIFERASEASSAY</b> .....	34
<b>III.7 BAKTERIEN- UND HEFESTÄMME</b> .....	34
<b>III.8 VEKTOREN</b> .....	34
<b>III.9 GERÄTE</b> .....	35
<b>III.10 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b> .....	36
<b>10.1 RNA-Isolierung</b> .....	36
<b>10.2 Agarose-Gelelektrophorese</b> .....	36
<b>10.3 Reverse Transkription</b> .....	36
<b>10.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)</b> .....	37
<b>10.4.1 Synthese von Oligonukleotiden</b> .....	37
<b>10.4.2 Standard-PCR</b> .....	37
<b>10.4.3 Mutagenese</b> .....	37
<b>10.5 Enzymkatalysierte Reaktionen</b> .....	38
<b>10.5.1 Ligation</b> .....	38
<b>10.5.2 TOPO TA Cloning®</b> .....	38

10.5.3 Clonase-Reaktion.....	38
10.5.4 Restriktionsanalyse.....	39
10.6 Herstellung kompetenter Bakterien.....	39
10.7 Transformation von <i>E. coli</i> .....	39
10.8 Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> .....	39
10.9 Gelelektion.....	40
10.10 DNA Sequenzanalyse.....	40
10.11 Expression in Bakterien.....	40
10.12 Bakterienaufschluss.....	40
10.13 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	41
10.13.1 Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	41
10.13.2 Anzucht und Induktion.....	41
10.13.3 Isolierung löslicher Proteine.....	41
10.13.4 Isolierung von Mikrosomen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	41
10.14 <i>Pichia pastoris</i> .....	42
10.14.1 Transformation.....	42
10.14.2 Anzucht und Induktion.....	42
10.14.3 Isolierung löslicher Proteine.....	43
10.14.4 Isolierung von Mikrosomen aus <i>Pichia pastoris</i> .....	43
10.15 <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	43
10.15.1 Transformation von Agrobakterien.....	43
10.15.2 Infiltrationsexperimente.....	43
10.15.3 Mikrosomaler Aufschluss von Pflanzenmaterial.....	44
10.15.4 Proteinaufschluss für Luciferase-Test.....	44
III.11 BIOCHEMISCHE METHODEN.....	44
11.1 Herstellung von radioaktiv markierten Substraten.....	44
11.1.1 (2S)- [4a,6,8- <sup>14</sup> C]Naringenin.....	45
11.1.2 (2S)- [4a,6,8- <sup>14</sup> C]Eriodyctiol.....	45
11.1.3 (2S)- [4a,6,8- <sup>14</sup> C]Dihydroquercetin.....	45
11.1.4 (2S)- [4a,6,8- <sup>14</sup> C]Dihydrokämpferol.....	46
11.1.5 (2S)- [4a,6,8- <sup>14</sup> C]Kämpferol.....	46
11.2 Standardenzymtests.....	46
11.2.2 Tests für Flavonsynthase I und Flavanon-3 $\beta$ -Hydroxylase.....	47
11.2.3 Flavonoid 3'-Hydroxylase Test.....	47
11.2.4 Tests für Isoflavonsynthase und 2-Hydroxyisoflavanon-dehydratase.....	47
11.2.5 Test auf Glucosidasen.....	48
11.2.6 Test auf Glucuronosyltransferasen.....	48
11.2.7 Luciferase-Test.....	49
11.3 Biotransformationen.....	49
11.4 Proteinbestimmung.....	50
11.5 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	50
11.6 Western Blot.....	50
11.7 Reinigung über His-Tag (Immobilized metal affinity chromatographie, IMAC).....	51
11.8 Radioaktivitätsmessungen.....	52
11.9 Dünnschichtchromatographie.....	52
11.10 HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....	53
11.11 High Speed Counter Current Chromatography.....	54
IV. ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	55
IV.1 HETEROLOGE EXPRESSION HUMANER GLUCURONOSYLTRANSFERASE.....	55
1.1 UGT Assay.....	55
1.2 Expression der UGT1A1 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	56
1.3 Expression in <i>Pichia pastoris</i> .....	58
1.4 Expression in <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	61
IV.2 HERSTELLUNG VON ISOFLAVONEN.....	67
2.1 Herstellung eines Doppelkonstruktes von Isoflavonsynthase und 2-Hydroxyisoflavanondehydratase.....	67
2.2 Biotransformationsexperimente.....	69
IV.3 HERSTELLUNG VON RADIOAKTIV-MARKIERTEN FLAVONOIDEN.....	71
3.1 Inkubation mit Chalkonsynthase.....	71

3.2 Inkubation mit Flavonoid 3'-Hydroxylase.....	72
3.3 Inkubation mit Flavanon 3 $\beta$ -Hydroxylase.....	72
3.4 Inkubation mit Flavonsynthase I.....	73
3.5 Herstellung von Luteolin.....	73
3.6 Präparative Herstellung von markiertem Naringenin, Dihydrokämpferol, Dihydroquercetin, Eriodictyol und Kämpferol.....	75
3.6.1 Naringenin.....	75
3.6.2 Dihydrokämpferol.....	75
3.6.3 Kämpferol.....	76
3.6.4 Eriodictyol.....	76
3.6.5 Dihydroquercetin.....	77
IV.4 BIOTRANSFORMATIONEN MIT DER FNS I IN <i>SACHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	77
4.1 Wachstum FNS I-transformierter Hefezellen.....	78
4.2 Substratspezifität der FNS I-transformierten Hefezellen.....	79
4.3 Verschiedene Lösungsmittelleffekte.....	80
4.4 Einfluss der Temperatur auf den Umsatz in Biotransformationen.....	83
4.5 Cofaktoren.....	84
4.6 pH-Wert.....	85
4.7 Einfluss von Sauerstoff.....	86
4.8 Lokalisierung von Substrat und Produkt.....	86
4.9 Präparative Biotransformation von Naringenin in FNS I-transformierter Hefe.....	88
4.10 Biotransformation von Naringenin in FNS I-transformierter <i>E. coli</i> .....	90
IV.5 GLUCOSIDASEN.....	93
5.1 Biotransformation FNS I-transformierter Hefezellen mit Naringenin-7-O-glucosid.....	93
5.2 Kenntnisstand zu Glucosidasen aus Bäckerhefe.....	96
5.3 Expression von Hefeglucosidasen.....	98
5.4 Selektivität der Glucosidasen.....	99
5.5 Gruppenzugehörigkeit von <i>EXG1</i> , <i>SPR1</i> und <i>YIR007W</i> und Vergleich mit <i>EXG1</i> aus <i>Candida albicans</i> .....	100
5.6 Hemmung von $\beta$ -Glucosidasen mit Gluconolacton.....	103
5.8 Substratspezifitäten der $\beta$ -Glucosidasen.....	105
5.9 Vergleich der Hefe $\beta$ -Glucosidasen mit der humanen cytosolischen $\beta$ -Glucosidase.....	109
5.10 Mutagenesestudien mit <i>EXG1</i> und <i>SPR1</i> .....	111
5.11 <i>EXG1</i> , <i>SPR1</i> und <i>YIR007W</i> Knock out Hefestämme.....	112
V. ZUSAMMENFASSUNG.....	118
VI. LITERATURVERZEICHNIS.....	122
VII. ANHANG.....	141

### Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Acc. No.	Zugangsnummer ( <u>accession number</u> )
Amp	Ampicillin
Ap	Apigenin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BMGY	Buffered Glycerol-complex Medium
BMMY	Buffered Methanol-complex Medium
bp	Basenpaar(e)
Bq	Becquerel
BSA	Rinderserumalbumin ( <u>bovine serum albumin</u> )
BT	Biotransformation
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Carb	Carbenicillin
CAW	Chloroform/Essigsäure/Wasser
cDNA	komplementäre DNA
CHS	Chalkonsynthase
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
DAD	Dioden-Array-Detektor
dest.	destilliert
DC	Dünnschichtchromatographie
DHK	Dihydrokämpferol
DHQ	Dihydroquercetin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dpm	Zerfälle pro Minute ( <u>disintegration per minute</u> )
DTT	1,4-Dithiothreitol
E.C.	<u>enzyme commission number</u>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERI	Eriodictyol
g	Erdbeschleunigung
GH	Glucosidhydrolase(n)
GTE	Glucose/Tris/EDTA-Puffer
h	Stunden
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
IgG	Immunglobulin G
IMAC	Metallchelatchromatographie ( <u>immobilized metal ion affinity chromatography</u> )
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase(npaare)
kDa	Kilodalton
KPi	Kaliumphosphatpuffer

## Inhaltsverzeichnis

---

L	Liter
LB	Luria Bertani
Lu	Luteolin
M	molar
MCS	Multiple Klonierungsstelle ( <u>m</u> ultiple <u>c</u> loning <u>s</u> ite)
MD	Minimal Dextrose
MES	Morpholinopropansulfonsäure
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
min	Minute(n)
mM	millimolar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NADPH	Nikotinsäureamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
NAR	Naringenin
NBT	<i>p</i> -Nitroblau-tetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
nM	nanomolar
nmol	nanomol
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamidgelelektrophorese
PAS	Kaliumacetat-Lösung
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaktion)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PEG	Polyethylenglycol
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
Qu	Quercetin
RNA	Ribonukleinsäure ( <u>r</u> ibon <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
RT	Reverse Transkription
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <u>r</u> ounds per <u>m</u> inute)
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TTBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,05 % (v/v) Tween-20
U	Unit Enzymaktivität (µmol Substratumsatz/min)
UV	Ultraviolett Strahlung
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius

### Enzyme

ACCase	Acetyl-CoA Carboxylase
ANS	Anthocyanidinsynthase
4CL	4-Cumarat:CoA-Ligase
C4H	Zimtsäure 4-Hydroxylase
CHI	Chalkonisomerase
CHS	Chalkonsynthase
Cyt P450	Cytochrom-P450-Monooxygenasen
DFR	Dihydroflavonol 4-Reduktase
D7OMT	Daidzein 7-O-Methyltransferase
FGT	Flavonoid O-glucosyltransferase
F2H	Flavanon 2-Hydroxylase
F6H	Flavonol 6-Hydroxylase
F3'H	Flavonoid 3'-Hydroxylase
F3'5'H	Flavonoid 3',5'-Hydroxylase
FHT	Flavanon 3 $\beta$ -Hydroxylase (Flavanonhydroxyltransferase)
FLS	Flavonolsynthase
FNS I	Flavonsynthase I
FNS II	Flavonsynthase II
HID	2-Hydroxyisoflavanondehydratase
HI4'OMT	2,7,4'-Trihydroxyisoflavanon 4'-O-Methyltransferase
IFS1	2-Hydroxy-Isoflavonsynthase
IFR	Isoflavonreduktase
I2'H	Isoflavon 2'-Hydroxylase
I3'H	Isoflavon 3'-Hydroxylase
2-ODD	2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase
PAL	Phenylalanin-Ammoniak Lyase
RNase	Ribonuclease A
UGT	UDP-Glucuronosyltransferasen

# I. Einleitung

## I.1 Flavonoide

### 1.1 Klassifizierung

Auszüge aus bestimmten Pflanzen verwendete man früher als Beizenfarbstoff zum Gelbfärben von Wolle und Baumwolle. Die Inhaltsstoffe dieser Färberdrogen belegte man, als ihre Konstitution ermittelt worden war, mit der Gruppenbezeichnung Flavone (lateinisch *flavus*: gelb). Als man erkannte, dass viele andere Pflanzeninhaltsstoffe denselben chemischen Aufbau aufweisen, nannte man die gesamte Stoffklasse Flavonoide (Hänsel und Sticher 2007).

Die Flavonoide bilden eine bedeutende Klasse von Sekundärmetaboliten. Das typische Grundgerüst, ein C<sub>15</sub>-Flavan, (Abb. 1), besteht aus zwei aromatischen Ringen (A und B) verbunden durch einen Heterozyklus (Ring C).

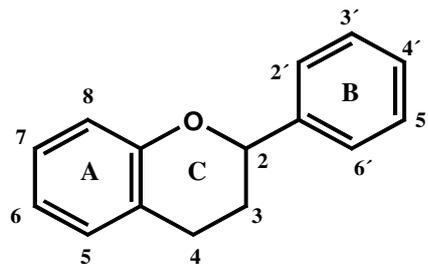


Abb. 1: Grundgerüst des Flavans.

Aufgrund unterschiedlicher Oxidationsgrade des C-Ringes werden die Flavonoide unterteilt (Abb. 2). Man unterscheidet unter anderem Flavanone, Flavone, Flavonole, Dihydroflavonole, Leucoanthocyanidine, und Anthocyanidine, die auch noch oligomerisieren können, z.B. zu Proanthocyanidinen (Schijlen *et al.* 2004).

Abweichend von diesen Flavonoiden ist bei den Isoflavonoiden der B-Ring an C3 anstatt C2 gebunden. Chalkone und Aurone sind mit den Flavonoiden eng verwandt, da sie die Vorstufe von Flavanonen bilden bzw. einen 5-gliedrigen C-Heterocyclus enthalten (Abb. 2) (Schijlen *et al.* 2004). Durch unterschiedliche Substituenten an den verschiedensten Stellen des Flavonoid-Grundgerüsts entsteht so eine Vielzahl an Verbindungen, von denen mittlerweile ca. 10000 bekannt sind (Tahara 2007). Eine Pflanzenspezies kann eine Vielzahl verschiedenster Flavonoide enthalten, die meist glykosidiert vorliegen und in der Vakuole gespeichert werden (Forkmann und Heller 1999, Koes *et al.* 2005).

## I. Einleitung

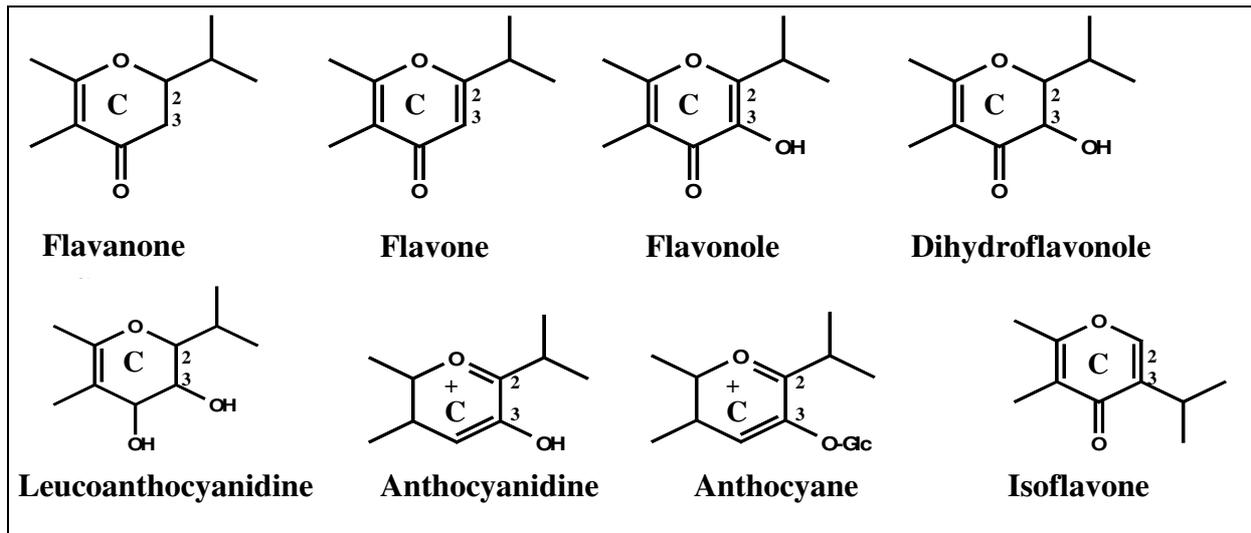


Abb. 2: Struktur des C-Ringes verschiedener Flavonoid-Gruppen (nach Martens *et al.* 2010).

### 1.2 Biosynthese der Flavonoide

Die Flavonoidbiosynthese (Abb. 3) ist in den vergangenen Jahrzehnten in verschiedenen Pflanzen intensiv untersucht worden. Es wurden Gene kloniert, exprimiert und biochemisch charakterisiert, so dass die an der Biosynthese beteiligten Enzyme weitestgehend bekannt sind (Forkmann und Heller 1999, Winkel-Shirley 2001, Springob *et al.* 2003, Schijlen *et al.* 2004, Xie und Dixon 2005). Aus L-Phenylalanin wird durch die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL, E.C.4.3.15) Zimtsäure gebildet, welche wiederum durch die Zimtsäure 4-Hydroxylase (C4H, E.C.1.14.13.11) zu 4-Cumarsäure umgesetzt wird. Die 4-Cumarat:CoA-Ligase (4CL, E.C.6.2.1.12) kann nun die 4-Cumarsäure zu 4-Cumaroyl-CoA aktivieren. Die Chalkonsynthese (CHS, E.C. 2.3.1.74) kondensiert 4-Cumaroyl-CoA mit drei Molekülen Malonyl-CoA, welches aus Acetyl-CoA und CO<sub>2</sub> durch die Aktivität der Acetyl-CoA Carboxylase (ACCase, E.C. 6.4.1.2) gebildet wird, zu Tetrahydroxychalkon. Die analoge Kondensation zu Pentahydroxychalkon mit Kaffeoyl-CoA als Startersubstrat wird ebenfalls von der CHS katalysiert. Mit der CHS beginnt der eigentliche Flavonoidbiosyntheseweg. Der anschließende Ringschluss der Chalkone zu Flavanonen kann, abhängig vom pH-Wert, spontan erfolgen. Dabei entstehen sowohl 2*S*- als auch 2*R*-Flavanone. *In situ* wird der Ringschluss durch die Aktivität der Chalkonisomerase (CHI, E.C. 5.5.1.6) katalysiert, die mit hoher Umsatzrate ausschließlich die 2*S*-Flavanone bildet (Abb. 3). Von Flavanonen aus verzweigen sich die Biosynthesewege: Aus, z.B. Naringenin (NAR) können die Isoflavone entstehen, die später näher betrachtet werden. Die Flavonsynthasen I und II (FNS I und II, E.C. 1.14.11.22) oxidieren Flavanone zu Flavonen, durch C2/C3-Desaturierung (Abb. 3). Beide Flavonsynthasen katalysieren die gleiche Reaktion, wobei es sich bei der FNS I um eine  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängige Dioxygenase (2-ODD), bei der FNS II dagegen um eine

## I. Einleitung

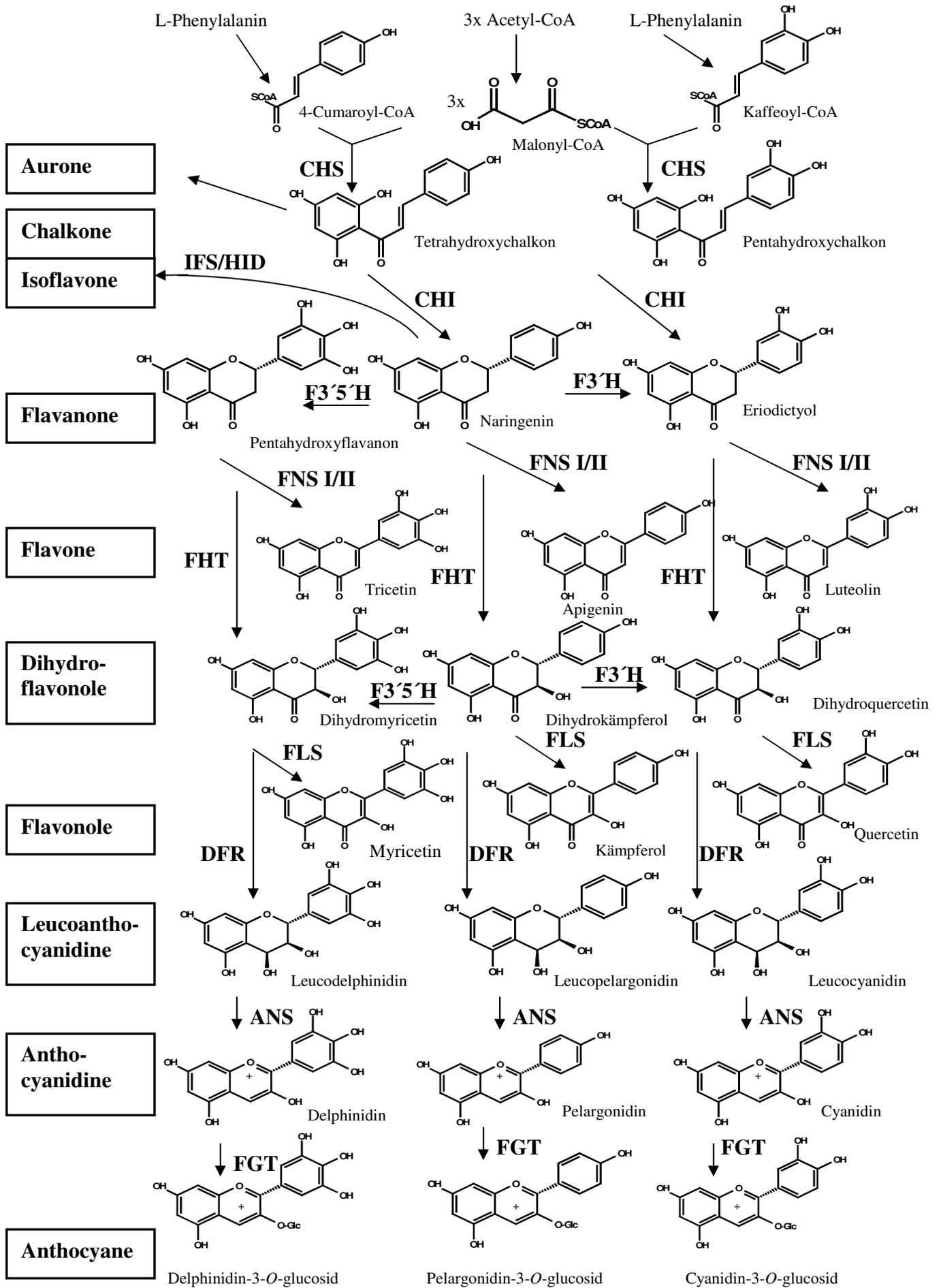
---

Cytochrom-abhängige Monooxygenase (CytP450) handelt. Die FNS I wurde bis jetzt nur in Pflanzen der Familie Apiaceae nachgewiesen, wohingegen die FNS II weit verbreitet ist. Das Flavanon NAR kann aber auch am B-Ring hydroxyliert werden, wobei die Aktivität der Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H, E.C. 1.14.13.21) das Eriodictyol (ERI) und die der Flavonoid 3'5'-Hydroxylase (F3'5'H, E.C. 1.14.13.88) das Pentahydroxyflavanon (PHF) liefert (Abb. 3). Beide Enzyme gehören zu den CytP450-Monooxygenasen.

Flavanone sind auch das Substrat für die Flavanon 3 $\beta$ -Hydroxylase (FHT, E.C.1.14.11.9), die zu den Dihydroflavonolen führt. Dieses Enzym ist eine Dioxygenase (2-ODD) und hydroxyliert an C3 *in trans* Konfiguration zum B-Substituenten (Abb. 3). Die entstandenen Dihydroflavonole können zum Teil wiederum durch die F3'H und die F3'5'H metabolisiert werden. Weiterhin werden die Dihydroflavonole durch die Flavonolsynthase (FLS, E.C.1.14.11.23) zu den Flavonolen desaturiert (Abb. 3). Dieses Enzym ist eine weitere 2-ODD, und führt eine Doppelbindung zwischen C2 und C3 ein. Des Weiteren werden die Dihydroflavonole von der Dihydroflavonol 4-Reduktase (DFR, E.C.1.1.219) zu den Flavan-3,4-diolen reduziert, die dann von der Anthocyanidinsynthase (ANS) und UDP-Glucose:Flavonoid-O-glucosyltransferasen (FGT, E.C. 2.4.1.91) über die Anthocyanidine zu den Anthocyanen überführt werden. Diese Verbindungen sind farbig und oft fargebend für die Blüte: Aufgrund der Glucosylgruppen sind sie gut wasserlöslich und im physiologischen Bereich relativ stabil, so dass sie im sauren Milieu der pflanzlichen Vakuole gut gespeichert werden können. Verschiedene Transportmechanismen vom Syntheseort Cytoplasma zu ihrem Bestimmungsort (Vakuole oder Zellwand) werden für die Anthocyanidine diskutiert, konnten aber bisher nicht bestätigt werden (Winkel-Shirley, 2001).

Schon 1974 wurde von Stafford vermutet, dass es sich bei den Enzymen der Flavonoidbiosynthese um einen Multienzymkomplex handelt, der den direkten Transfer oder ein Weiterleiten der Intermediate zwischen den aktiven Zentren erleichtert. Den ersten Hinweis dafür konnte Hrazdina (1992) liefern. Sie zeigte, dass PAL, CHS, und FGT im Cytosol lokalisiert und die P450-Enzyme C4H, F3'H und F3'5'H in der Membran verankert sind. Burbulis und Winkel-Shirley (1999) vermuteten in Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana* L., Brassicaceae) direkte Verbindungen zwischen CHS, CHI, FHT und DFR (Winkel-Shirley 2001).

# I. Einleitung



## I. Einleitung

---

**Abb. 3: Schema zur Biosynthese der Flavonoide: CHS, Chalkonsynthase; CHI, Chalkonisomerase; IFS, Isoflavonsynthase; HID, 2-Hydroxyisoflavanon-Dehydratase; FNS I+II, Flavonsynthase I+II; FHT, Flavanon 3 $\beta$ -Hydroxylase; F3'H, Flavonoid 3'-Hydroxylase; F3'5'H, Flavonoid 3'5'-Hydroxylase; FLS, Flavonolsynthase; DFR, Dihydroflavonol 4-Reduktase; ANS, Anthocyanidinsynthase; FGT, Flavonoid-O-glucosyltransferase.**

### 1.3 Pharmazeutische Bedeutung

Flavonoide sind in der Natur weit verbreitet und kommen in größeren Mengen in Früchten, Gemüse, Getreide bzw. Samen (Cola, Kaffee, Kakao) oder auch Blättern (Tee) sowie Produkten wie Bier und Rotwein vor (Skibola und Smith 2000). So wird mit dem regelmäßigen Konsum von Rotwein in einigen Regionen Frankreichs das so genannte „French paradox“ erklärt. Dort korreliert nicht, wie in den meisten Ländern der westlichen Welt, die reichhaltige Ernährung mit einer hohen Sterberate an Herz-Kreislaufkrankungen. Dieses Phänomen wird auf die regelmäßige Einnahme von Rotwein zurückgeführt (Harborne und Williams 2000), der, im Vergleich zum Weißwein, eine größere Menge an Polyphenolen enthält. Neben Stilbenen, wie z.B. Resveratrol, sind auch Flavonoide im Rotwein zu finden, wobei es sich dabei hauptsächlich um Flavan-3-ol Derivate, die Catechine, handelt. Diese liegen in einer Konzentration von bis zu 190 mg/L vor. An anderen Flavonoiden sind z.B. Malvidin-3-glucosid (24 mg/L), Rutin (9 mg/L), Quercetin (8 mg/L) oder auch Cyanidin (3 mg/L) zu finden (Frankel *et al.* 1993, Harborne und Williams 2000). Ein ähnlicher Zusammenhang konnte mit der sog. „Zutphen Elderly“-Studie wahrscheinlich gemacht werden. Bei dieser Studie wurde untersucht, wie flavonoidreiche Nahrung die Mortalität durch Herzkrankheiten bei Männern (Altersgruppe 65-84 Jahre) beeinflusst. Es zeigte sich, dass die Sterblichkeitsrate durch Aufnahme von Flavonoiden signifikant gesenkt werden konnte (Hertog *et al.* 1993, Harborne und Williams 2000).

Die Wirkung des Konsums von flavanolreichem Kakao auf das Herz-Kreislauf-System wurde von Schroeter *et al.* (2006) untersucht. Zum Vergleich nutzten die Autoren Kakaogetränke mit hohem und niedrigem Flavanolanteil und konnten nachweisen, dass sich der Verzehr von flavanolreichem Kakao positiv auf das kardiovaskuläre System auswirkt.

Für Flavonoide konnte auch eine anti-inflammatorische Wirkung nachgewiesen werden. So kann z.B. Apigenin in Konzentrationen von 0,01 bis 100 mg/mL signifikant das Wachstum von Fibroblasten hemmen (Koganov *et al.* 1999, Harborne und Williams 2000). Bei Entzündungsreaktionen spielen Fibroblasten eine wichtige Rolle in der Bildung von Narbengewebe und interagieren mit dem Immunsystem. Die Verzögerung in der Wundheilung wird auf ungenügende oder exzessive Fibroblastenaktivität zurückgeführt. So kann die Hemmung des Fibroblastenwachstums durch Flavonoide, wie Apigenin, günstig für

## I. Einleitung

---

die Heilung von Hautverletzungen sein. Auch antibakterielle und antivirale Wirkungen der Flavonoide sind nachgewiesen worden. So wirken Luteolin und Luteolin-4'-*O*-glucosid aus *Daucus carota* bakterizid auf *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*. Das Aglykon hemmt zusätzlich noch *Bacillus cereus* und *Citrobacter freundii*. Auf *Bacillus cereus* und *Lactobacillus plantarum* wirkt Luteolin-3'-*O*-glucosid bakterizid. (Kumarasamy *et al.* 2005, Gebhardt 2007).

Quercetin ist in der Lage, die Reversen Transkriptasen verschiedener Retroviren, HIV-1 Proteinase und HIV-1 Integrase zu hemmen (Middleton *et al.* 2000). Flavonoide können die Produktion von Interferonen induzieren. Diese körpereigenen Proteine haben verschiedene antivirale Effekte, so z.B. Verstärkung der Zellmembran, Induktion von Nukleasen, die das Virusgenom angreifen, und Modifizierung des Phosphorylierungsmusters in der Proteintranslation, so dass auch die virale Proteinbiosynthese gestoppt wird (Havsteen 2002). Ein Einfluss von Flavonoiden auf verschiedene Krebsarten wird ebenfalls diskutiert. So vermutet man aufgrund tierischer Studien, dass durch eine hohe Einnahme an Flavonoiden mit der Nahrung das Erkrankungsrisiko für verschiedene Krebsarten (z.B. Lungen- und Darmkrebs) gesenkt werden kann. Apigenin wurde als wirksamer Inhibitor von Zellproliferation und Angiogenese in humanen Endothelzellen gefunden. Zusätzlich konnte es das Wachstum von humanen Cervixkarzinomzelllinien (HeLa) und Neuroblastomzelllinien hemmen (Osada *et al.* 2004, Zheng *et al.* 2005). Flavon wurde als potentieller Inhibitor der Proliferation nachgewiesen. Es induziert die Differenzierung und Apoptose der Darmkrebszellen und erwies sich als besserer Inhibitor der Topoisomerase I als Camptothecin, ein Zytostatikum, das klinisch bei fortgeschrittenem Darmkrebs zur Erzeugung von Apoptose eingesetzt wird (Wenzel *et al.* 2000).

Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass höhere Dosen an Flavonoiden negative Effekte auf die Gesundheit haben können. So wird diskutiert, ob Flavonoide auch als Mutagene, als Prooxidantien zur Erzeugung freier Radikale, oder als Inhibitoren für Schlüsselenzyme des Hormonstoffwechsels wirken können. Möglicherweise könnte der Verzehr von flavonoidreicher Nahrung auch negative Auswirkungen auf die Schwangerschaft haben, da Flavonoide in der Lage sind, die Plazenta zu passieren und so Einfluss auf den Fötus zu nehmen. Die negativen Effekte der Flavonoide auf die Gesundheit des Menschen durch Verzehr von hohen Dosen können durch normale Ernährung nicht erreicht werden. Allerdings werden mittlerweile Nahrungsergänzungsmittel angeboten, mit denen wesentlich höhere Flavonoidmengen (das 10 bis 20-fache einer normalen vegetarischen Ernährung)

## I. Einleitung

---

aufgenommen werden und somit potentiell negative Effekte auslösen können (Skibola und Smith 2004).

### 1.4 Bedeutung für die Pflanzen

Flavonoide sind aus mehr als 70 Pflanzenfamilien beschrieben worden und man geht davon aus, dass sie in allen Landpflanzen vorkommen. Die meisten dieser Pflanzen zählen zu den Angiospermen, es sind aber auch flavonoidhaltige Gymnospermen bekannt, so z.B. Pinaceen oder auch Cupressaceen (Martens und Mithöfer 2005). Die Flavonoide spielen eine wichtige Rolle für die Pflanzen, so wirken sie z.B. durch Absorption schädlicher UV-Strahlung (Harborne und Williams 2000). Wichtig sind sie auch in der Wechselbeziehung von Pflanze und Insekten. Blaue Blüten bieten einen Selektionsvorteil, da sie für Bienen besonders attraktiv sind und diese so zur Bestäubung angelockt werden. Farblose Flavonoide dienen der Anlockung von Insekten, da sie unter UV-Licht für Insekten auffällige Muster bilden (Harborne und Williams 2000). Zusätzlich wirken Flavone, z.B. Luteolin-7-O-(6''-O-malonyl)- $\beta$ -D-glucosid, in Kombination mit *trans*-Chlorogensäure stimulierend für die Eiablage von bestimmten Schmetterlingsarten. Sie können aber auch Fraßschäden durch Larven verhindern, indem sie abschreckend wirken. Außerdem sind Flavone und Flavonole, neben den Isoflavonoiden, für die Stickstofffixierung in Leguminosen von Bedeutung. Durch die Abgabe der Flavonoide in den Erdboden lockt die Pflanze Knöllchenbakterien an und die dann die Expression der Nodulationsgene fördern (Harborne und Williams 2000).

Neben den Interaktionen mit Insekten können Flavonoide auch als Phytoalexine wirken. In diesem Fall ist ihre Produktion/Akkumulation häufig induzierbar und kann als Reaktion auf andere Pflanzen, Nematoden, Mollusken, Pilze oder auch Bakterien hochreguliert werden.

## I.2 Isoflavonoide

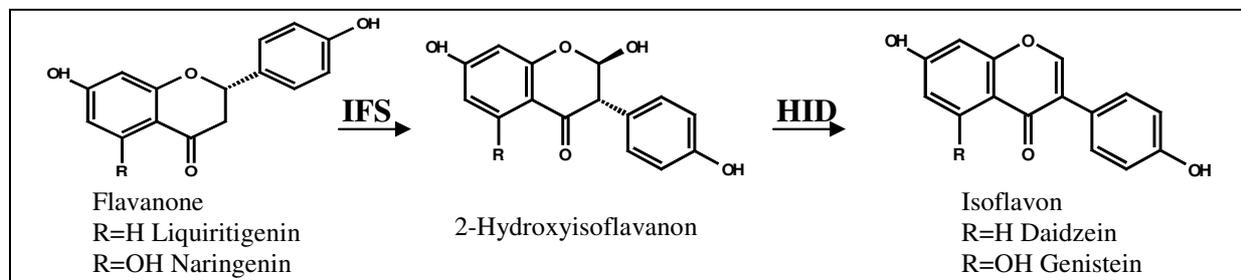
### 2.1 Biosynthese der Isoflavonoide

Mehr als 1600 Isoflavonoide, inklusive verschiedener Glucoside, sind momentan beschrieben (Veitch 2007, Lapčík 2007). Sie kommen hauptsächlich in der Familie der Leguminosae vor, es wurden aber bis jetzt auch schon 225 Verbindungen in Nicht-Leguminosen nachgewiesen (Lapčík 2007).

Isoflavonoide entstehen biosynthetisch aus Flavanonen wie NAR, Liquiritigenin und möglicherweise anderen 7-Hydroxyflavanonen (Schijlen *et al.* 2004, Lapčík 2007). So wird diskutiert, ob 7-Hydroxyflavanone, ohne Hydroxylierung im B-Ring, auch als Vorstufe

## I. Einleitung

fungieren können (Kim *et al.* 2003, Lapcık 2007). Zumindest die Isoflavone Genistein (GEN) und Daidzein entstehen in zwei Schritten: Das 2S-Flavanon NAR oder Liquiritigenin wird von der 2-Hydroxyisoflavonsynthase (IFS, E.C.1.14.13.86) (Akashi *et al.* 1999, 2005, Steele *et al.* 1999) an C-2 hydroxyliert und der B-Ring von C2 nach C3 verschoben. Anschließend dehydratisiert das Enzym 2-Hydroxyisoflavanon-Dehydratase (HID, Steele *et al.* 1999, Akashi *et al.* 2005) unter Einführung einer C-2 und C-3 Doppelbindung zu Daidzein bzw. Genistein (Abb. 4). In der Literatur kursieren unterschiedliche Akronyme für die 2-Hydroxyisoflavonsynthase, so wird diese z.B. bei Veitch (2007) als 2-HIS bezeichnet, wohingegen der Terminus IFS die Gesamtreaktion beschreiben soll. In der hier vorliegenden Arbeit werden die Begriffe IFS und HID nach Akashi *et al.* (1999, 2005) für die 2-Hydroxyisoflavonsynthase und die 2-Hydroxyisoflavanon-Dehydratase verwendet.



**Abb. 4: Umsetzung von Flavanonen zu Isoflavonen. IFS, 2-Hydroxyisoflavonsynthase, HID, 2-Hydroxyisoflavanondehydratase.**

Gene, die für die IFS kodieren, wurden schon aus vielen Leguminosen identifiziert, z.B. von Sojabohne (*Glycine max* L.), Luzerne (*Medicago sativa* L.), Süßholzwurzel (*Glycyrrhiza glabra* L.), Kichererbse (*Cicer arietinum* L.), Mungbohne (*Vigna radiata* L.), Klee (*Trifolium pratense* L.) oder auch von der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.), aus der Familie der Chenopodiaceae (Akashi *et al.* 1999, Steele *et al.* 1999, Overkamp *et al.* 2000, Kim *et al.* 2005, Lapcık 2007). Alle bekannten IFSn gehören zur CytP450-Unterfamilie CYP93C, sind NADPH abhängig, und zeigen eine hohe Sequenzähnlichkeit von 95 %. Die HID wurde aus *G. max* und *Glycyrrhiza echinata* kloniert. Diese beiden löslichen Proteine gehören einer großen Carboxylesterase-Familie an, in der die Proteine aus Pflanzen eine eigene monophyletische Gruppe bilden (Akashi *et al.* 2005).

Neben IFS und HID sind weitere Enzyme aus der Biosynthese der Isoflavonoide bekannt (Abb. 5). Dazu zählen Isoflavon O-Methyltransferasen und verschiedene Hydroxylasen. So ist z.B. aus *G. echinata* eine 2,7,4'-Trihydroxyisoflavanon 4'-O-Methyltransferase (HI4'OMT) bekannt, die für die Produktion des Formononetins aus 2,7,4-Trihydroxyisoflavanon

## I. Einleitung

verantwortlich ist (Akashi *et al.* 2003). Eine 7-*O*-Methyltransferase (D7OMT) wurde von *M. sativa* beschrieben, die Daidzein zu Isoformononetin methyliert (He *et al.* 1998) (Abb. 5). Hydroxylierungen an C-2' und C-3' des B-Rings werden durch die Isoflavon 2'-Hydroxylase (I2'H) und die Isoflavon 3'-Hydroxylase (I3'H) eingefügt. Es wurden z.B. Gene, die für entsprechende Enzyme kodieren, aus cDNA Banken von *G. max* Zellkulturen, Keimlingen von *Lotus japonicus* Regel, (Hornklee, Fabaceae) und Wurzeln von *Medicago truncatula* Gaertner (Gestutzter Schneckenklee, Fabaceae) isoliert und biochemisch getestet (Veitch 2007).

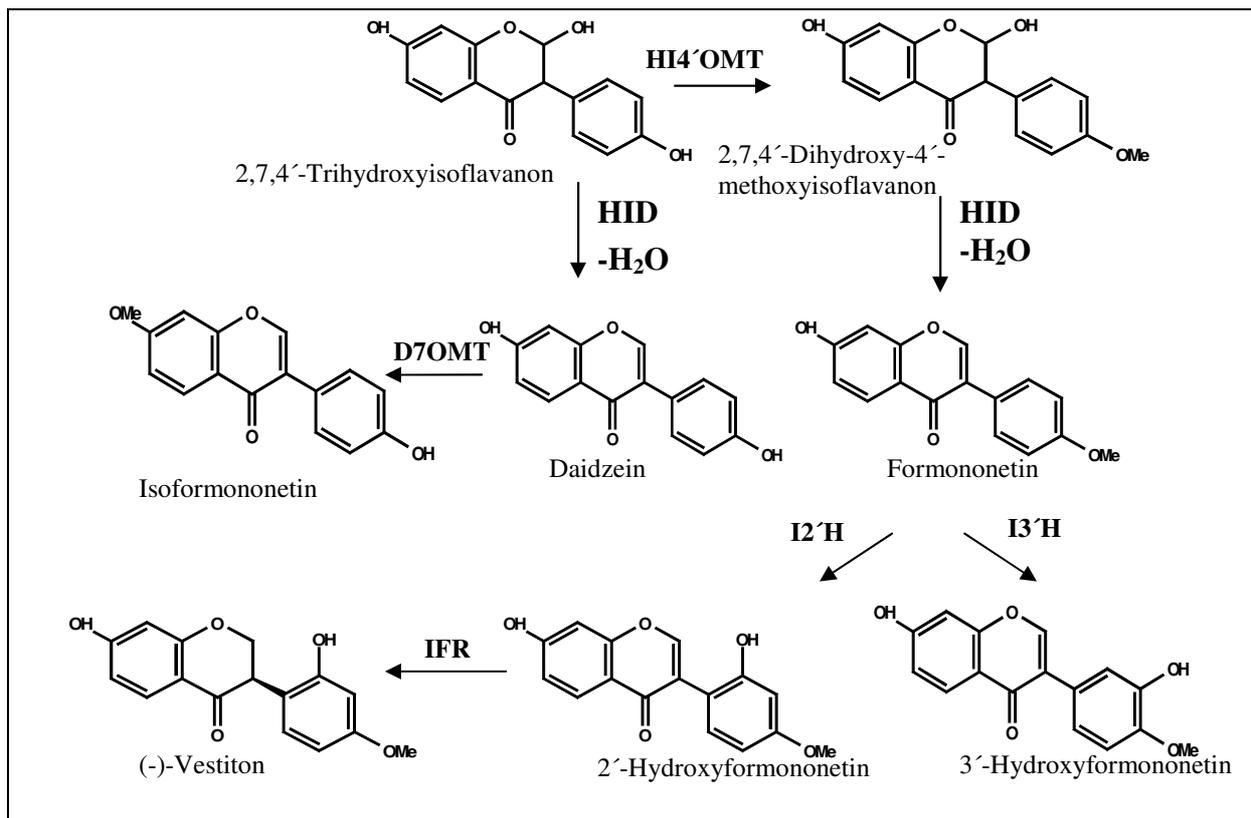
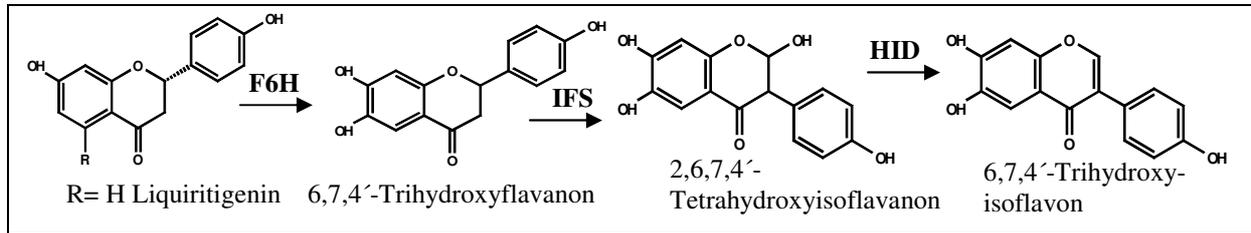


Abb. 5: Biosynthese der Isoflavone. HI4'OMT, 2,7,4'-Trihydroxyisoflavanon 4'-*O*-Methyltransferase; D7OMT, Daidzein 7-*O*-Methyltransferase; I2'H, Isoflavon 2'-Hydroxylase; I3'H, Isoflavon 3'-Hydroxylase; IFR, Isoflavonreduktase.

Außerdem wurde eine Isoflavonreduktase (IFR, E.C. 1.3.1.45) aus *Medicago sativa* als erstes Enzym der Medicago Biosynthese beschrieben. Es handelt sich um eine monomere, NADPH-abhängige Reduktase, die 2'-Hydroxyformononetin in (3*R*)-Vestiton unter Ausbildung eines chiralen Zentrums überführt (Abb. 5). Auch aus anderen Leguminosen wurden IFRn identifiziert und ihre cDNA kloniert, so z.B. aus Erbse (*Pisum sativum* L., Fabaceae), Kichererbse (*Cicer arietinum* L.), und Soja, wo sie speziell am Phytoalexinstoffwechsel beteiligt sind. Die IFR aus Soja kann 2'-Hydroxydaidzein, 2'-Hydroxyformononetin, 2'-Hydroxygenistein als Substrat nutzen, die IFR aus Erbse und Kichererbse 7,2'-Dihydroxy-4',5'-methylenedioxyisoflavanon und 2'-Hydroxyformononetin. IFRn gehören einer größeren

## I. Einleitung

Proteinfamilie an, der auch „IFR-like“ Proteine zugeordnet wurden, mit signifikanten Sequenzhomologien zu IFRn der Leguminosen, ohne dass deren Funktion vollständig verstanden ist (Wang *et al.* 2006).



**Abb. 6:** Enzymkatalysierte Reaktion von Liquiritigenin zu 6,7,4'-Trihydroxyisoflavon mit F6H, Flavonoid 6-Hydroxylase aus *Glycine max.* IFS, 2-Hydroxyisoflavonsynthase; HID, Hydroxyisoflavanondehydratase.

Aus *G. max* Zellkulturen wurde eine weitere *CytP450* cDNA isoliert, die für eine Flavonoid 6-Hydroxylase (F6H) kodiert (Latunde-Dada *et al.* 2001, Abb. 6). Das Vorkommen von z.B. Demethyltexasin (6,7,4'-Trihydroxyisoflavon) und Glycitein (7,4'-Dihydroxy-6-Methoxyisoflavon) könnte ein Hinweis darauf sein, dass F6H an der Biosynthese der Isoflavonoide beteiligt ist. Allerdings weist die, im Vergleich zu Flavonoids substraten, nur schwache Aktivität mit Isoflavonen der rekombinanten F6H nach Expression in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) darauf hin, dass die 6-Hydroxylierung wohl schon auf der Stufe der Flavanone stattfindet. Die 6-hydroxylierten Flavanone können dann von der IFS umgesetzt werden.

### 2.2 Bedeutung der Isoflavonoide

Isoflavonoide sind an Interaktionen zwischen Pflanzen und Umwelt (Bakterien, Pilze, Mollusken und herbivoren Insekten) maßgeblich beteiligt (Dakora und Phillips 1996). In der Familie der Leguminosen spielen Isoflavonoide eine wichtige Rolle in der Pflanzen-Mikroben-Wechselbeziehung. Sie ermöglichen die Symbiose von Pflanze und rhizobiellen Bakterien (*Rhizobium* spp.), da sie wie auch einige Flavonoide, Signalsubstanzen für die Stickstofffixierung durch Knöllchenbakterien sind. Sie wirken als „chemoattractans“ für die Bakterien und induzieren die *nod*-Genexpression (Van Rhijn und Vanderleyden 1995, Pueppke 1996, Yu *et al.* 2000). Des Weiteren sind die Isoflavone Bestandteile der unspezifischen Resistenzmechanismen als induzierte Abwehrstoffe gegen Schadorganismen. So ist Daidzein die Vorstufe für der Phytoalexine Medicago und Glyceollin, die z.B. in Soja und Luzerne produziert werden. (Blount *et al.* 1992, Graham 1995, Winkel-Shirley 2001). Genistein besitzt selbst eine fungizide Wirkung und stellt eine Vorstufe für das Phytoalexin

## I. Einleitung

---

Kieviton in der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) dar (Rivera-Vargas *et al.* 1993, Garcia-Arenal *et al.* 1978).

Isoflavone sind auch von pharmakologischem Interesse, da sie positive Wirkungen auf die Gesundheit des Menschen haben sollen. Zunächst wurde allerdings ein negativer Effekt der Phytoöstrogene auf die Fertilität von Schafen und Kühen beobachtet, die isoflavonreichen Klee fraßen. (Dixon 2004). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde auch vermutet, dass verringerte Fertilitätsraten in einigen menschlichen Populationen auf den Einfluss verschiedener Phytoöstrogene zurückzuführen sind. Andererseits können Genistein und 8-Prenylnaringenin die Fertilitätsrate von Mäusespermien *in vitro* in submikromolaren Konzentrationen erhöhen und in männlichen Ratten war nach längerer Exposition mit Genistein kein negativer Effekt auf die Qualität der Spermien nachweisbar (Dixon 2004).

Signifikante Korrelationen bestehen zwischen einer isoflavonreichen, auf Soja basierenden Diät, der Menge an Isoflavonen im Urin und einem verminderten Risiko an Brustkrebs zu erkranken oder auch der Mortalitätsrate an Prostatakrebs beim Menschen (Ganry 2002, Sarkar *et al.* 2002, Dixon 2004). So wurde z.B. in Untersuchungen an Frauen in Singapur festgestellt, dass der Verzehr von Soja zu einem geringeren Brustkrebsrisiko führte. Genetische Hintergründe können dabei ausgeschlossen werden, da das Risiko bei Asiatinnen, die nach Amerika immigrierten und die westliche Kost annahmen, anstieg. Isoflavon Phytoöstrogene stimulieren auch die osteoblastische Knochenbildung, vermindern den Knochenabbau und verhindern den Knochenschwund im Tiermodell. Solche Effekte konnten bei Frauen nach den Wechseljahren (aber nicht davor) bestätigt werden. Daher kann durch sojareiche Kost Osteoporose in Rücken und Hüfte behandelt werden (Yamaguchi 2002, Dixon 2004). Phytoöstrogene sollen auch andere Beschwerden der Menopause, wie Hitzewallungen oder nächtliche Schweißausbrüche, lindern können. Neben diesen genannten Effekten werden auch eine Verbesserung der Cholesterin-Werte und eine Minderung des Risikos an koronaren Herzkrankheiten zu erkranken, diskutiert (Cornwell *et al.* 2004, Dixon 2004, Deavours und Dixon 2005).

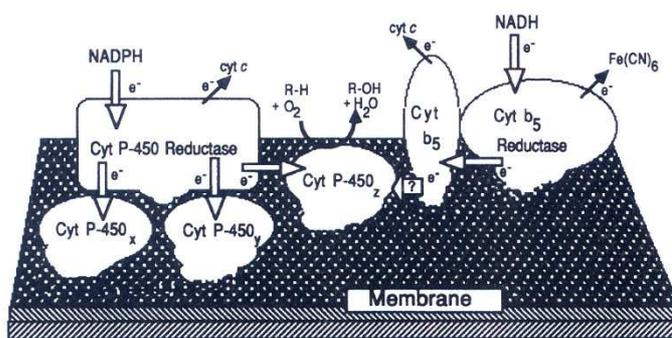
### I.3 Monooxygenasen-Dioxygenasen

Eine große Zahl von natürlichen Enzymen ist in der Lage molekularen Sauerstoff aus der Luft zu aktivieren und für vielfältige Reaktionen zu nutzen. (Bugg 2003). Diese Enzyme können in zwei Gruppen unterteilt werden: (a) Oxidasen, die Sauerstoff (O<sub>2</sub>) als Oxidanz nutzen und zu Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oder Wasser (H<sub>2</sub>O) reduzieren und (b) Oxygenasen, die die Sauerstoffatome in Produkte einbauen. Diese werden wiederum in Mono- und Dioxygenasen

## I. Einleitung

unterteilt. Monooxygenasen katalysieren den Einbau eines Sauerstoffatoms, während Dioxygenasen beide Atome in das Produkt/die Produkte integrieren.

Monooxygenasen enthalten eine Häm-Gruppierung im aktiven Zentrum, die an Stelle von  $O_2$  auch  $CO_2$  binden kann unter Verschiebung der langwelligen Absorptionsbande nach 450 nm. Dies hat zur Bezeichnung „CytP450“-Enzyme geführt. Die *CytP450*-Gene (auch als *CYP* bezeichnet) sind in nahezu allen Organismen zu finden. Der Ursprung der CytP450 Superfamilie findet sich in Prokaryonten, wo sie als lösliche Proteine vorliegen, bevor molekularer Sauerstoff in der Atmosphäre akkumulierte. Allerdings fehlen sie in *E. coli*, wohingegen z.B. *Mycobacterium tuberculosis* 20 *CytP450*-Gene enthält. In Eukaryonten sind die CytP450-Enzyme membrangebunden. Die Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) enthält drei *CYP*-Gene, das Genom der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) weist sogar 83 *CytP450*-Gene auf. Die größte Anzahl an CYPs ist aber in Pflanzen enthalten, so wurden z.B. in Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana* L., Brassicaceae) anhand von Sequenzvergleichen über 286 CYP-Sequenzen gefunden. CytP450-Enzyme können, abhängig vom Elektronentransport aus NAD(P)H in 4 Klassen unterteilt werden. Klasse II Proteine, die in Eukaryonten am weitesten verbreitete Klasse, benötigen zum Elektronentransfer eine FAD/FMN enthaltende CytP450-Reduktase. CytP450 und CytP450-Reduktase liegen als separate Enzyme assoziiert an der Außenseite des Endoplasmatischen Retikulums (ER's) vor und besitzen aminoterminale hydrophobe Anker. Der Elektronenfluss läuft vom NADPH über FAD und FMN zum Häm. Ein zusätzliches carboxyterminal verankertes Cytochrom  $b_5$  kann Elektronen vom NADH befördern und die Aktivität einiger P450-Enzyme erhöhen (siehe Abb. 7). So zeigten de Vetten *et al.* (1999), den Zusammenhang der F3'5'H mit Cytochrom  $b_5$  in blau blühenden Petunien. Durch Inaktivierung des Cytochrom  $b_5$ -Gens konnte eine verminderte Aktivität der F3'5'H und eine veränderte Blütenfarbe festgestellt werden. Daraus wurde geschlossen, dass Cytochrom  $b_5$  für die Aktivität der F3'5'H wichtig ist.

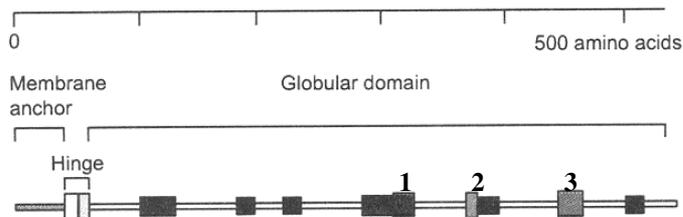


**Abb. 7: Komponenten des Cytochrom-P450-Systems auf der cytosolischen Seite des ER's (aus Donaldson und Luster, 1991).**

## I. Einleitung

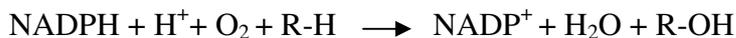
---

Die Sekundärstruktur der CytP450 wird aus einem variablen Membrananker und einer globulären Domäne gebildet, die durch ein Scharnier verbunden sind, welches ein Cluster von basischen Resten und ein Cluster an Prolinen (oft PPGP) enthält (Abb. 8). Konservierte Bereiche in der globulären Domäne bestehen aus einem distalen Element des Häms, das an der Katalyse beteiligt ist, einem Glu-X-X-Arg-Motiv und einer Häm-bindende Schleife, die ein konserviertes Cystein beinhaltet.



**Abb. 8: Sekundärstruktur der CytP450 Proteine. Mögliche Substraterkennungsstellen sind in schwarz dargestellt. 1, distales Element des Häms; 2, Glu-X-X-Arg-Motiv; 3, Häm-bindende Schleife (aus Werck-Reichhart und Feyereisen 2000, geändert).**

Die Gesamtreaktion der CytP450 Enzyme folgt der Gleichung:



Nach Spaltung der homologen  $\text{O}_2$ -Bindung wird ein Atom des Sauerstoffs mit zwei Elektronen und zwei Protonen zu Wasser umgesetzt, während das andere in das Produkt eingebaut wird.

Hydroxylasen aus dieser Enzymklasse spielen in Biosynthesen praktisch aller Sekundärstoffgruppen (Terpene, Fettsäuren, Phenylpropane, Alkaloide) eine Rolle. Zudem sind sie in der Lage, komplexe Kopplungs- und Mehrstufen-Oxidationen zu katalysieren. In der Flavonoid- bzw. Isoflavonoidbiosynthese sind unter anderem folgende CytP450-Enzyme involviert: FNS II, F3'H, F3'5'H, I2'H, I3'H und die IFS (Ayabe und Akashi 2006).

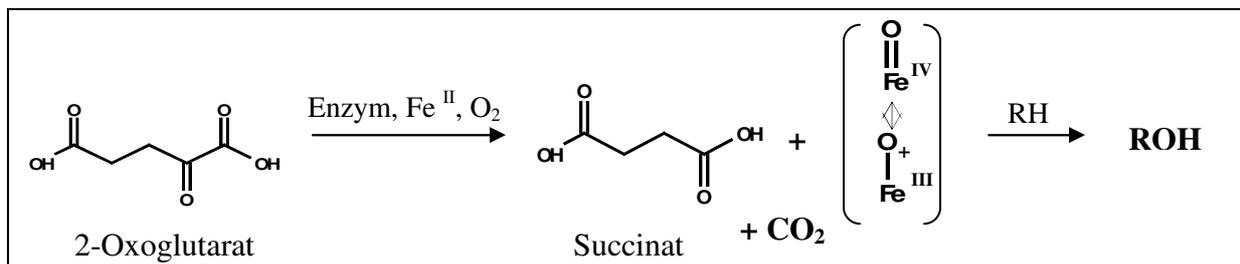
Dioxygenasen sind lösliche, Häm-unabhängige Enzyme, die an der Biosynthese von Pflanzenhormonen (z.B. Abscisinsäure, Gibberelin oder Ethylen) und auch sekundären Inhaltsstoffen (z.B. Flavonoiden oder Alkaloiden) beteiligt sind. Die Dioxygenasen der Pflanzen lassen sich zwei Klassen zuordnen, den Lipoxygenasen und den 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (2-ODDs, Prescott und John 1996).

Die 2-ODDs sind in Tieren und Bakterien in wichtige Biosynthesewege involviert wie z.B. der Bildung von Collagen oder  $\beta$ -Lactam-Antibiotika. Auch an der Modifizierung von Aminosäuren und Peptiden sind sie beteiligt (Prescott und Lloyd 2000). In der Flavonoidbiosynthese sind fünf Dioxygenasen bekannt, die alle häm-frei sind und Fe (II) und

## I. Einleitung

2-Oxoglutarat als Cofaktoren benötigen. Dies sind: FHT, ANS, FLS, FNS I und die Flavonol-6-Hydroxylase (F6H) aus *Chrysosplenium americanum* (Saxifragaceae), die die Oxidation des Flavonoid A-Ringes katalysiert (Turnbull *et al.* 2004).

Die meisten Dioxygenasen benötigen als Cofaktor ein Metall-Ion, wobei es sich oft um Fe(II) oder Fe(III) handelt (Bugg 2003). Der Reaktionsmechanismus von 2-ODDs wurde verschiedentlich beschrieben. Die Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat liefert unter Aufnahme eines Sauerstoffatoms die Elektronen zur Erzeugung einer enzymgebundenen Ferryl-Species, die z.B. die Hydroxylierung eines Substrates bewirkt (Abb. 9).



**Abb. 9: Reaktionsmechanismus der Dioxygenasen nach Turnbull *et al.* (2004).**

Dabei entsteht aus 2-Oxoglutarat Succinat und CO<sub>2</sub> (Turnbull *et al.* 2004). *In vitro* benötigen diese Dioxygenasen zum Schutz von Fe (II) zusätzlich Ascorbat (Prescott und Lloyd 2000). Ascorbat oder Dithiothreitol als Reduktionsmittel oder Zugabe von Katalase in *in vitro* Enzymtests kann das Enzym stabilisieren, das durch Fe-abhängige radikalische Seitenreaktionen geschädigt werden könnte (Gebhardt 2007). Alle 2-ODDs enthalten zwei konservierte Bereiche, einerseits ein H-X-D-Motiv, für die Bindung des Eisenions und andererseits ein R-X-S-Motiv als 2-Oxoglutarat-Bindestelle (Prescott und Lloyd 2000).

Interessanterweise können in der Flavonoidbiosynthese einige Monooxygenasen und Dioxygenasen die gleiche Substratumsetzung katalysieren. Dazu gehören sowohl die FNS I in Apiaceae und FNS II in anderen Pflanzen für die Entstehung der Flavone aus Flavanonen (Martens und Mithöfer 2005). Das gleiche Phänomen gilt für F6H, die in *Glycine max* (CytP450 Enzym) und in *C. americanum* (2-ODD) die 6-Hydroxylierung von Flavonen katalysiert (Latunde-Dada *et al.* 2001, Forkmann und Heller 1999, Anzellotti und Ibrahim 2000, 2004).

### I.4 Humane UDP-Glucuronosyltransferasen

Glycosylierungen wurden in Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Insekten, Fischen, Vögeln und dem Menschen beschrieben (Bock 2003, Radomska-Pandya *et al.* 2005). Die UDP Glycosyltransferase (UGT)-Superfamilie der Säugetiere kodiert Enzyme, die häufig lipophile Substrate mit Zuckern bzw. Zuckersäuren (z.B. Glucose, Glucuronsäure, Xylose, Galaktose) konjugieren (Mackenzie *et al.* 2005). Bis jetzt sind 117 UGT-Gene der Säugetiere bekannt, die vier UGT-Familien, UGT1, UGT2, UGT3 und UGT8 zugeordnet wurden (Mackenzie *et al.* 1997, 2005). Die UDP-Zuckerspezifität der UGT3 ist bis jetzt noch unbekannt. Das Enzym UGT8A1 zeigt Präferenzen für UDP-Galaktose. UGT1 und UGT2 bevorzugen UDP-Glucuronsäure, sie können aber laut Senafi *et al.* (1994) auch UDP-Xylose und UDP-Glucose als Donor nutzen. Als Substrate können viele verschiedene Verbindungen aus den unterschiedlichsten Stoffklassen (z.B. Lipide, biogene Amine, Steroide, fettlösliche Vitamine) fungieren. Bis jetzt konnten bereits ca. 350 mögliche Substrate für Glycosyltransferasen identifiziert werden.

In der Literatur werden UDP-Glukosyltransferasen und UDP-Glucuronosyltransferasen unter dem Akronym UGT zusammengefasst. Im Weiteren wird UGT in diesem Text aber nur für die UDP-Glucuronosyltransferase verwendet. Die Glucuronidierung ist, vor allem beim Menschen, ein wichtiger Entgiftungsprozess (Phase II-Metabolismus), der die Ausscheidung über die Leber ermöglicht.

Die Familie der humanen UDP-Glucuronosyltransferasen gehört zu den Typ I-Membranproteinen, die im ER und der inneren und äußeren Kern-Membran lokalisiert sind (Meech und Mackenzie 1998, Radomska-Pandya *et al.* 2002, 2005).

Die UGTn sind 529 bis 534 Aminosäuren lang und besitzen hoch konservierte Bereiche für die Membranbindung und Aktivität (Wooster *et al.* 1993). Das Protein besitzt eine 17 Aminosäuren umfassende hydrophobe „membran spanning“ Domäne nahe am C-Terminus, welche das Protein in der Lipiddoppelschicht verankert. Jede Isoform verfügt über ein N-terminales Signalpeptid, das während der Insertion der Polypeptidkette deletiert wird. Der Hauptteil des Proteins, welcher die Substratbindestelle beinhaltet, liegt innerhalb des Lumens der Cisternae. Die terminalen 20-30 AS enthalten einige basische Reste und sind dem Cytoplasma exponiert (Meech und Mackenzie 1997). Die Aktivität der UGTn hängt von der Anwesenheit von Phospholipiden ab (Radomska-Pandya *et al.* 2005).

Die humane UGT1 ist auf dem menschlichen Chromosom 2q37 lokalisiert und umfasst einen Bereich von mehr als 200 kb. Dieser Bereich beinhaltet 13 individuelle Promotoren (erste Exons) und ein Set von 4 Exons (2-5), das für alle UGT1-Gene identisch ist (Ritter *et al.*

## I. Einleitung

1993). Das bedeutet, dass 13 potentielle Transkripte hergestellt werden können, die einzigartige 5'-Enden, aber identische 3'-Enden besitzen (Abb. 10). Diese 13 Gene wurden von *UGT1A1*, *UGT1A2P*, *UGT1A3*,...bis *UGT1A13P* durchnummeriert. Von diesen 13 Genen weisen jedoch vier (*UGT1A2P*, *UGT1A11P*, *UGT1A12P*, *UGT1A13P*) Mutationen im ersten Exon auf und wurden deshalb als Pseudogene bezeichnet.

Die Durchnummerierung der Gene sollte ihre Position relativ zu ihrer Lage zu Exon 2-5 widerspiegeln, wobei *1A1* am Nächsten und *UGT1A13P* am Entferntesten von Exon 2-5 zu finden sein sollte. Nach Sequenzierung des Humangenoms wurde aber festgestellt, dass diese Bezeichnungen nicht ganz richtig sind und z.B. *UGT1A13P* zwischen *UGT1A9* und *UGT1A10* liegt. Auf Grund der Akzeptanz dieser Namensgebung und um weiteren Verwirrungen vorzubeugen, wurde diese aber nicht mehr geändert (Gong *et al.* 2001, Mackenzie *et al.* 2005).

Die Familie der UGT2 in Säugetieren wird in die beiden Unterfamilien UGT2A und 2B unterteilt. Die menschliche UGT2 Genfamilie ist auf dem Chromosom 4q13 gruppiert und beinhaltet drei UGT2A Mitglieder und zwölf (sieben Gene und fünf Pseudogene) die der Unterfamilie 2B angehören. Im Gegensatz zu UGT1 ist die Familie UGT2 durch unterschiedliche Gene codiert (Mackenzie *et al.* 1997), die jeweils aus sechs Exons bestehen. Eine Ausnahme stellen hier UGT2A1 und UGT2A2 dar. Ähnlich wie die Familie UGT1 besitzen diese ein variables Exon 1 und das gleiche Set von fünf Exons, was dazu führt, dass die Proteine unterschiedliche N-terminale Sequenzen, aber ein identisches C-terminales Stück von 288 Aminosäuren, aufweisen.

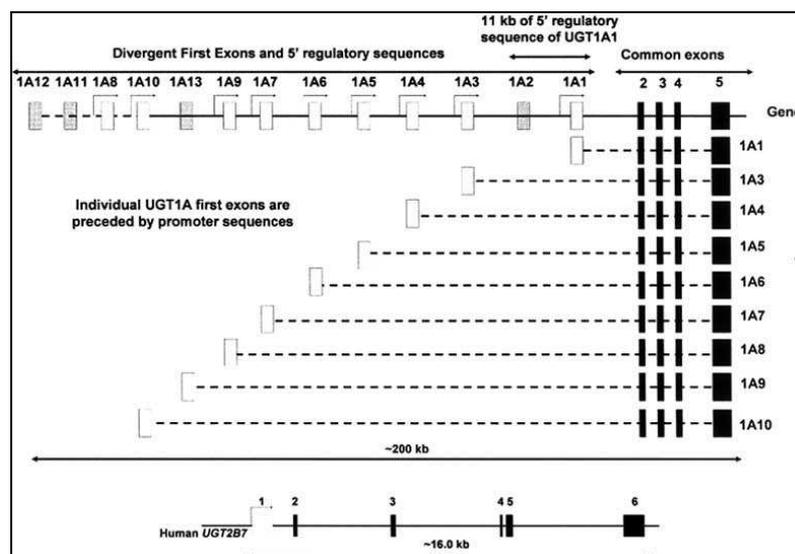


Abb. 10: Genomische Organisation des komplexen humanen UGT1A Ortes und des UGT2B7 Gens (aus Radomska-Pandya *et al.* 2005).

## I. Einleitung

Expressionsstudien der UGT1A zeigen, dass der Hauptanteil der UGTn in der Leber exprimiert wird, sie können aber u. a. auch im Gastrointestinaltrakt, Gehirn, Niere, Lunge, Ovarien, Uterus, Prostata oder der Haut gefunden werden (Radomska-Pandya *et al.* 2005).

Für die Aktivität der UGT1 und UGT2 wurden verschiedene Substratklassen getestet, z.B. Cumarine, Steroide, Opioide, primäre, sekundäre und tertiäre Amine. Für Anthrachinone und Flavone wurden Enzymaktivitäten für UGT1A1, UGT1A3, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9 und UGT1A10 beschrieben (Tukey und Strassburg 2000).

### I.5 Bedeutung der UDP- Glucuronosyltransferasen für den Menschen

Die Entgiftung lipophiler Substrate (Xenobiotika, endogene Stoffe) hängt von der Erhöhung der Wasserlöslichkeit ab (Phase II-Metabolismus). UDP-Glucuronosyltransferasen nutzen den Donor UDP-Glucuronsäure zur Übertragung des Glucuronosyl-Restes auf nukleophile Gruppen (z.B. -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, -COOH) der Substrate, erhöhen damit die Polarität und ermöglichen die Ausscheidung über Leber und Niere. Eine große Anzahl endogener Stoffe oder von Arzneimitteln kann direkt glucuronidiert werden (Abb. 11). Beispiele dafür bieten 3'-Azido-3'-deoxythymidin (AZT), nichtsteroidale Entzündungshemmer, Morphine oder auch Bilirubin, Fettsäuren, Steroide, Prostaglandine, Steroide und Thyroidhormone (Radomska-Pandya *et al.* 1999, 2005). Falls funktionelle Gruppen fehlen, werden diese (vorwiegend Hydroxyl-Reste) durch CytP450- und andere Enzyme eingeführt (Phase I Metabolismus).

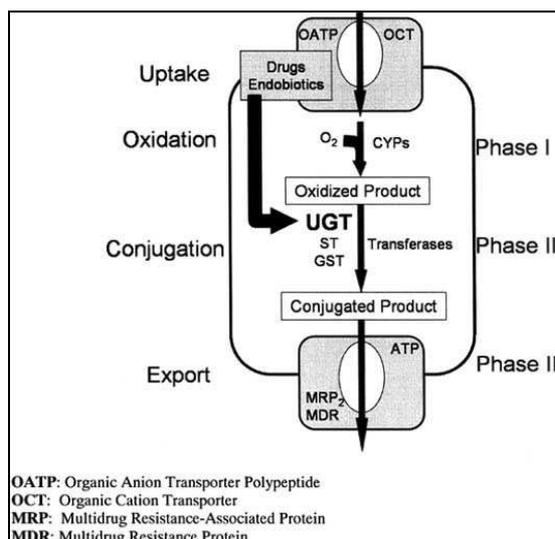


Abb. 11: Die Rolle der UGT im Kontext mit anderen Entgiftungsprozessen und Transportern (aus Radomska-Pandya *et al.* 2005).

Von allen bekannten UDP-Glucuronosyltransferasen des Menschen glucuronidiert nur die UGT1A1 das Bilirubin. Das Produkt Bilirubindigluconid ist, im Gegensatz zu Bilirubin, wasserlöslich und kann ausgeschieden werden (Strassburg *et al.* 2008). Die mangelhafte

## I. Einleitung

---

Expression von *UGT1A1* ist auch Ursache von Erbkrankheiten (Ritter *et al.* 1991, 1992, Bosma *et al.* 1994). Dabei handelt es sich um das Crigler-Najjar Syndrom Typ I und Typ II und das sog. Gilbert's Syndrom: Während beim Crigler-Najjar Syndrom Typ I überhaupt kein glucuronidiertes Bilirubin gebildet werden kann, sind beim Typ II immerhin geringe Mengen an Mono- und Diglucuroniden nachweisbar. Entsprechend unterscheidet sich die erforderliche Therapie, während für Typ I eine Lebertransplantation nötig ist, um die *UGT1A1* Allele zu ersetzen, ist bei Typ II eine Photo- oder medikamentöse Therapie ausreichend. Beim Gilbert-Syndrom ist dagegen keine Therapie erforderlich, es handelt sich hierbei um eine vorübergehende Hyperbilirubinämie bei jungen Erwachsenen, die durch psychischen Stress, Infektionen oder körperlicher Anstrengung hervorgerufen werden kann (Gilbert und Lereboullet 1901, Tukey und Strassburg 2000). Unzureichende Aktivität der UGT1A wird auch mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht. So wurde eine down-Regulierung von UGT1A mRNA und mikrosomaler katalytischer Aktivität in Tumoren des Gastrointestinaltraktes (Speiseröhre, Magen, Leber und Niere) festgestellt (Strassburg *et al.* 1997, 1998, 1999). Erstmals wurde 1950 über eine autoimmune Hepatitis berichtet (Waldenström), bei der es sich um eine chronische Leberentzündung handelt, die durch Verlust der Selbsttoleranz gegenüber der Leber gekennzeichnet ist. Es wurde unter verschiedenen Antikörpern die sog. Leber/Niere mikrosomalen Antikörper Typ 3 (LKM3) beschrieben, die an die UGT1A Proteine binden. Diese Antikörper werden als Marker für die autoimmune Hepatitis Typ II verwendet und können an die UGT1A1 UGT1A6, UGT1A4 und an die UGT1A6 des Kaninchens binden. Zusätzlich wurde noch eine geringere Reaktivität mit UGT2B Isoformen nachgewiesen (Tukey und Strassburg 2000).

Die Glucuronidierung ist auch von Bedeutung für den Metabolismus von Flavonoiden aus der Ernährung oder nach therapeutischer Applikation. Im Blut sind keine Flavonoide oder nur geringe Spuren nachweisbar, was ein Hinweis darauf ist, dass Flavonoide im Körper rasch umgesetzt werden. Die Glucuronidierung ist dabei eine der drei Hauptreaktionen (Chen *et al.* 2008). Flavonoide aus der Diät können die intestinale UDP-Glucuronosyltransferase induzieren. Galijatovic *et al.* (2001) zeigten, dass durch das Flavonoid Chrysin, die UGT-Aktivität und Expression (besonders die von UGT1A1) in der humanen Intestinal-Zelllinie induziert wird, wobei die Autoren neben Immunoblot-Analysen die Glucuronidierung von Chrysin als Marker für die Expression nutzten. Die UDP-Glucuronosyltransferaseaktivität kann wichtig sein für die die Glucuronidierung und Entgiftung von Kolon- und anderen Karzinogenen, da durch die Induktion der UGT1A1 das Kolon-Karzinogen 2-Hydroxyamino-1-methyl-6-Phenylimidazo[4,5*b*]-Pyridin (*N*-hydroxy-PhIP) besser glucuronidiert und dann

## I. Einleitung

---

vom Körper ausgeschieden werden kann. Möglicherweise kann auf diese Weise das mutagene bzw. kanzerogene Potential von *N*-hydroxy-PhIP verringert werden (Galijatovic *et al.* 2001).

### I.6 Gewinnung von Naturstoffen

Die zunehmende Bedeutung von pflanzlichen Naturstoffen, unter anderem Flavonoiden, in Pharmazie und Lebensmittelindustrie zeigt sich u.a. in dem Trend künstliche Farbstoffe in Nahrungsmitteln durch natürliche zu ersetzen, wobei die Flavonoide, insbesondere die Anthocyane, aufgrund ihrer intensiven Färbung eine wichtige Rolle spielen (Cabrita *et al.* 2000, Yan *et al.* 2008). Die benötigten Mengen an spezifischen Flavonoiden werden traditionell aus Pflanzenextrakten gewonnen. Neben regionalen und saisonalen Limitierungen enthält pflanzliches Gewebe meist nur geringe Mengen an Flavonoiden (<1 %) neben vielen anderen Verbindungen, wie z.B. Carotinoiden, Betalainen und Chlorophyllen (Bourgaud *et al.* 2001, Kolewe *et al.* 2008). So kann die Gewinnung einer spezifischen Verbindung zwar für Pflanzen, die in großen Mengen kultiviert werden können, noch rentabel sein, für Spezies für die dies aber nicht zutrifft, ist es mit hohem apparativem Aufwand und hohen Kosten verbunden (Kolewe *et al.* 2008).

Als Alternative wurden **Zellkultursysteme** entwickelt, in denen die Synthese von spezifischen Metaboliten des Sekundärstoffwechsels mehr oder weniger gezielt induziert werden können. Die meisten Pflanzenspezies können *in vitro* in undifferenzierten und differenzierten Stadien kultiviert werden. Da viele Metabolite des Sekundärstoffwechsels in spezialisierten Zellen gebildet werden, wurden Spross- oder Wurzelzellkulturen angelegt (Verpoorte *et al.* 2002, Kolewe *et al.* 2008). Diese bieten den Vorteil, dass sie induzierbar sind und im Vergleich zu vollständig differenzierten Pflanzen eine geringere Vielfalt an Metaboliten aufweisen, was die Isolierung der gewünschten Naturstoffe und somit den biotechnologischen Prozess erleichtert.

Auch Suspensionskulturen wurden intensiv für Studien genutzt. Beispielsweise konnte in dunkel propagierten Kulturen der Petersilie (*Petroselinum crispum* Mill., Apiaceae) nachgewiesen werden, dass die Bestrahlung mit UV-Licht die Bildung von Flavonen und Flavonolen induziert (Hahlbrock *et al.* 1976, Ebel und Hahlbrock 1977, Henstrand *et al.* 1992, Logemann *et al.* 2000). Zellkulturen akkumulieren zwar weniger verschiedene Sekundärmetabolite als die Pflanze, trotzdem handelt es sich immer um ein Gemisch. So wurden mehr als 20 verschiedenen Flavonol- und Flavonglucosiden aus Suspensionskulturen der Petersilie beschrieben (Hempel *et al.* 1999). Nach Hydrolyse konnten die Autoren die Aglyca Kämpferol, Quercetin, Isorhamnetin, Apigenin, Luteolin und Chrysoeriol nachweisen,

## I. Einleitung

---

wovon Chrysoeriol mit 37 % am stärksten vertreten war, gefolgt von Isorhamnetin (22 %), Quercetin (20 %), Apigenin (17 %) und sehr geringen Anteilen Kämpferol (3 %) und Luteolin (1 %). Insgesamt ist allerdings die Ausbeute an Flavonoiden pro g Zellmasse gering und für einige (z.B. Luteolin) entsprechend minimal. So konnten die Autoren 1,06 mg an Flavonoidglyca aus einem Gramm lyophilisierter Zellen der induzierten Zellkulturen gewinnen.

Angesichts der geringen Ausbeuten könnte eine **chemische Synthese** der Metabolite in Betracht gezogen werden. Im Falle einfacher chemische Strukturen wie z.B. Salicylsäurederivate oder Ephedrin ist die Synthese wirtschaftlich rentabel. Bei komplexeren Strukturen, die multiple Ringsysteme und chirale Zentren beinhalten, wird die synthetische Produktion aber kostenintensiv (Kolewe *et al.* 2008). Synthesen von Metaboliten des Flavonoiden bzw. einzelne Umwandlungen sind beschrieben worden. Von einer nichtenzymatischen Gewinnung von Leucoanthocyanidinen analog zur Umsetzung die die DFR katalysiert berichteten Stafford und Lester (1982). Dabei wird Dihydroquercetin mit  $\text{NaBH}_4$  zu zwei isomeren Flavan-3,4-diolen reduziert, von denen eines (3, 4-*cis*-konfiguriert; 2*R*, 3*S*, 4*S*) in Methanol löslich und dem enzymatischen Produkt (Leucopelargonidin) ähnlich ist. Als zweites entsteht das unnatürliche 3,4-*trans*-konfiguriertes (2*R*, 3*S*, 4*R*), wasserlösliche Produkt. Die Ausbeute ist aber sehr gering und beide Produkte sind in saurem Medium sehr instabil. In der Natur polymerisieren Leucoanthocyanidine mit den (+)-Catechinen zu Proanthocyanidin(PA)-Oligomeren und werden dadurch stabilisiert (Stafford und Lester, 1982).

Die Procyanidine B1, B2, B3, B4, C2 und deren trimere Analoga konnten aber auch synthetisch aus Catechin, Epicatechin und 4 $\alpha$ / $\beta$ -Benzylsulphanylcatechin gewonnen werden. Durch Zugabe der thiophilen Lewissäuren Dimethyl(methylthio)sulfonium tetrafluoroborat (DMTSF) und Silbertetrafluoroborat ( $\text{AgBF}_4$ ) konnten Steynberg *et al.* (1998) dann die stabilen Procyanidinoligomere gewinnen.

## I. Einleitung

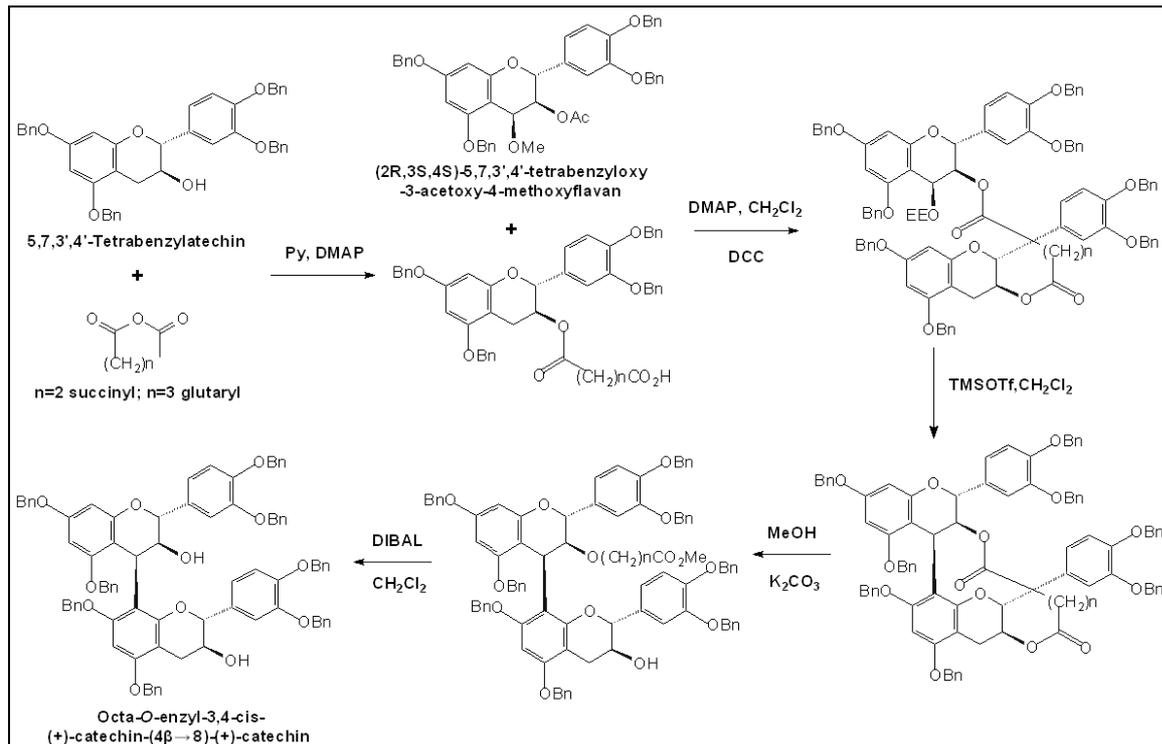


Abb. 12: Synthese von Octa-O-enzyl-3,4-cis-(+)-Catechin-(4 $\beta$ →8)-(+)-Catechin (aus He *et al.* 2008).

Eine Trimethylsilyltrifluoromethansulfonat (TMSOTf)-katalysierte, intramolekulare Kondensationsmethode zur Herstellung von Catechindimeren wurde von Saito *et al.* (2003) entwickelt. Dabei werden eine potentielle elektrophile und eine nucleophile Gruppe durch Diester-Verbindungen bei hohen Temperaturen verknüpft. Ausgehend von 5,7,3',4'-Tetrabenzylcatechin und Succinyl bzw. Glutaryl konnte so über mehrere Schritte das natürlich vorkommende (+)-Catechin-(4 $\beta$ →8)-(+)-Catechin-Dimer synthetisiert werden (Abb.12, aus He *et al.* 2008). Ein Nachteil der chemischen Synthese besteht in der meist unberücksichtigten Stereokonfiguration; z.B. entstehen zwei stereoisomere Flavanone, während nur die (2S)-Flavanone biologisch aktiv sind (Andersen und Markham 2006, Fowler und Koffas 2009). Insgesamt waren die Synthesen von Flavonoiden bisher nur mäßig erfolgreich.

Phenylpropanoide Naturstoffe können auch durch heterologe Expression der entsprechenden Enzyme in Mikroorganismen gewonnen werden, ein Verfahren der sog. Weißen Biotechnologie. Insbesondere *E. coli* ist zur Synthese von Flavonoiden genutzt worden. Aus Flavanonen und Flavan-3-olen als Ausgangsstoff konnten Yan *et al.* (2008) Anthocyane in *E. coli* herstellen. Sie klonierten dazu die Enzyme FHT, DFR, LAR, ANS und 3-GT verschiedener Pflanzen in Expressionsvektoren zur Transformation von *E. coli* und erhielten nach Fütterung von Naringenin bzw. Eriodictyol mg-Mengen an Anthocyanen (0,98 mg/L Pelargonidin- und 2,07 mg/L Cyanidin-3-O-glucosid). Durch Fütterung der entsprechenden Dihydroflavonole und Optimierung der Inkubationsbedingungen konnten sogar 78,9 mg/L

## I. Einleitung

---

Pelargonidin- und 70,7 mg/L Cyanidin-3-*O*-glucosid erhalten werden. Drei Enzyme des generellen Phenylpropanoidstoffwechsels (PAL, C4H, 4CL) und CHS aus *A. thaliana* klonierten Watts *et al.* (2004) in *E. coli* und konnten nachweisen, dass zwar alle 4 Enzyme in exprimiert werden, die C4H aber nicht funktionell war. Im Gegensatz zu den Versuchen von Yan *et al.* (2008), die nur cytosolische Enzyme exprimierten, ist die C4H ein Enzym, das membranständig ist sowie die P450-Reduktase benötigt, und damit für die Verwendung prokaryotischer Wirte limitierend wirkt. So entstand bei Watts *et al.* (2004) zuerst nur *trans*-Zimtsäure, und erst nach Fütterung von 4-Cumarsäure konnte Naringenin nachgewiesen werden. Die Autoren umgingen später das Problem, indem sie PAL und C4H durch eine Tyrosin Ammoniak-Lyase (TAL) aus *Rhodobacter sphaeroides* ersetzten und so 48 Stunden nach Fütterung mit L-Tyrosin und Induktion rund 21 mg NAR pro Liter ernten konnten. Durch Konstrukte für Fusionsproteine kann das Problem der fehlenden CytP450-Funktionsfähigkeit eventuell umgangen werden, da z.B. Hotze *et al.* (1995) oder Leonard *et al.* (2006) die C4H bzw. die F3'5'H aus *Catharanthus roseus* funktionell als Fusionsprotein mit einer P450-Reduktase in *E. coli* exprimieren konnten.

Eine Alternative zur bakteriellen Expression bietet funktionell die Gewinnung von Naturstoffen im **Hefesystem**. Die Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae*) ist als sog. GRAS (Generally Reported as Safe)-Organismus eingestuft, und bietet einen entscheidenden Vorteil als sicherer Wirt für die Produktion von Konsumgütern. Außerdem ist sie als Eukaryont in der Lage CytP450-Enzyme zu exprimieren, da sie den für diese Enzymklasse benötigten Redoxpartner, die Cytochrom P450-Reduktase, natürlicherweise besitzt (Fowler und Koffas 2009).

Da auch Enzyme aus der Flavonoidbiosynthese CytP450-abhängig sind (siehe I.1.2), wurden einige davon bereits in *S. cerevisiae* exprimiert.

Beispielsweise konnten Martens und Forkmann (1999) die FNS II aus *Gerbera hybrida* (Asteraceae) funktionell in *S. cerevisiae* exprimieren. Einige Schritte der Flavonoid- und Isoflavonoidbiosynthese in *S. cerevisiae* wurden von Ralston *et al.* (2005) etabliert. Die Autoren klonierten und charakterisierten fünf CHIn aus *G. max*, wobei CHI Typ I nur Naringenchalkon, die vom Typ II dagegen eine Reihe von Chalkonen als Substrat nutzten. Für anschließende Biotransformationen coexprimierten sie Typ II CHIn zusammen mit der IFS und Typ I CHI mit FHT oder FNS II (IFS und FNS II sind CytP450-Enzyme) funktionell in Hefe. Auch Enzyme aus anderen Abschnitten der Flavonoidbiosynthese wurden schon in *S. cerevisiae* exprimiert. PAL, 4CL und CHS wurden von Jiang *et al.* (2005) in *S. cerevisiae* coexprimiert. Die Autoren konnten so ca. 7 mg NAR/L und 0,8 mg Pinocembrin/L nach

## I. Einleitung

---

Fütterung von *p*-Cumarsäure und CoA herstellen. Ähnliches berichteten Yan *et al.* (2005), die C4H, 4CL, CHS und CHI in *S. cerevisiae* coexprimierten. Nach Fütterung von Zimtsäure konnten sie 16,3 mg/L an Pinocembrin gewinnen, durch Fütterung von *p*-Cumarsäure wurden 28,3 mg/L NAR hergestellt und Fütterung von Kaffeesäure führte zu 6,5 mg/L ERI. Dagegen konnte bei Zugabe von Ferulasäure kein Produkt (Homoeriodictyol) detektiert werden, was eventuell in der Spezifität der 4CL begründet ist.

### I.7 Radioaktiv markierte Substanzen

Radioaktiv markierte Verbindungen lassen sich relativ einfach und sehr empfindlich nachweisen. Die Intensität der radioaktiven Strahlung kann mit verschiedenen Messverfahren verfolgt werden, so erfolgt die Messung unter anderem durch die Anregung von Substanzen zur Emission von Photonen (Szintillationszählung) oder auch durch die Anregung von Übergangsmetallen in einer festen Matrix (Bio-Imager, Lukačín und Matern 2007).

Radioaktiv markierte Zwischenstufen sind ein gern genutztes Mittel für die Aufklärung pflanzlicher Biosynthesewege, z.B. wenn Pflanzengewebe knapp, das Protein labil oder nur schwach exprimiert wird oder auch die Substanzen schlecht detektierbar sind (Hänsel und Sticher 2007). So können in Enzymtests, mit potentiell nur schwach exprimiertem Protein, auch sehr geringe Umsatzraten sichtbar gemacht werden, die möglicherweise mit nicht markierten Substraten nicht detektierbar wären.

Die Synthese von radioaktiv markierten Flavonoiden ist aus der Literatur bekannt. So synthetisierte Kraus (2006) <sup>14</sup>C-markierte Anthocyanidine chemisch. Ausgehend von [Formyl-<sup>14</sup>C]-2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd und ω,4-Diacetoxyacetophenon synthetisierte er [4-<sup>14</sup>C]-Pelargonidinchlorid und mit [Formyl-<sup>14</sup>C]-benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd und ω,3,4,5-Tetraacetoxyacetophenon das [4-<sup>14</sup>C]-Delphinidinchlorid. Dazu musste aber zuvor ausgehend von [Formyl-<sup>14</sup>C]-Dimethylformamid und Phloroglucin das [Formyl-<sup>14</sup>C]-2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd gebildet werden, was mit Ausbeuten zwischen 43,9 % und 47,5 % gelang. [Formyl-<sup>14</sup>C]-2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd wurde dann mit Benzoylchlorid umgesetzt, woraus die Entstehung von [Formyl-<sup>14</sup>C]-2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd resultierte (Ausbeuten von 16,2 % und 18,9 %). So erhielt der Autor zwar schließlich 0,2 mg markiertes Pelargonidinchlorid mit einer spezifischen Aktivität von 33,6 μCi/mmol und 0,33 mg an markiertem Delphinidinchlorid mit einer spezifischen Aktivität von 30,4 μCi/mmol, das ganze Verfahren erscheint aber als sehr aufwändig.

## II. Aufgabenstellung

In Pharmazie und Lebensmittelindustrie besteht zunehmend Interesse an verschiedenen Flavonoiden. Ihre präparative Gewinnung aus Pflanzenmaterial ist angesichts geringer Gehalte kaum möglich, was insbesondere für einige seltene Vertreter und ihre Konjugate gilt. Synthesen sind andererseits schwierig, wenn es sich um chirale und/oder labile Flavonoide handelt. Hier bietet sich die Gewinnung in transformierten Mikroorganismen (Weiße Biotechnologie) als Methode der Wahl an, weil die an der Biosynthese beteiligten Enzyme inzwischen bekannt, und die Gene kloniert sind. Die Methode erlaubt ebenfalls, radioaktiv markierte Tracer für pharmakologische Studien herzustellen, da das Schicksal von Flavonoiden im tierischen bzw. humanen Metabolismus noch nicht vollständig verstanden ist. Dazu zählt auch die Gewinnung von Konjugaten, wie z. B. Glukuroniden, die nach Aufnahme von Flavonoiden im Säugerstoffwechsel Bedeutung besitzen.

In der vorliegenden Arbeit sollten Grundlagen für die Herstellung von Flavonoiden in Mikroorganismen erarbeitet werden. Ein Ziel war die Gewinnung von  $^{14}\text{C}$ -markierten Flavonoiden aus  $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{Malonyl-CoA}$  und  $\text{Cumaroyl-CoA}$  bzw.  $(2S)\text{-}[4a,6,8\text{-}^{14}\text{C}]\text{Naringenin}$ , was die Transformation von *E. coli* oder Hefezellen mit mehreren Flavonoid-spezifischen Konstrukten voraussetzt, sowie die Gewinnung von Isoflavonoiden durch Einsatz von IFS1- und HIDH-Konstrukten. Die Parameter zur Biotransformation und die Optimierung der Expression der Enzyme für hohe Ausbeuten sollten am Beispiel der FNS I aus Petersilie in transformierten Hefezellen ausgearbeitet werden. Ergänzend sollte auch der Metabolismus von Naringenin-7-*O*-glucosid als Beispiel für glykosidische Flavonoide studiert werden. Daneben sollten die zusätzliche Transformation mit einem Konstrukt der humanen Glukuronosyltransferase und ihre Auswirkung *in situ* studiert werden. Die Untersuchungen dienen dem Ziel, die Basis für eine eventuelle industrielle Herstellung und Verwendung von Flavonoiden zu schaffen.

## III. Material und Methoden

### III.1. Material

#### 1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acetosyringon (3,5-Dimethoxy-4-hydroxyacetophenon)	Fluka (Sigma-Aldrich), Taufkirchen
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Aminosäuren für SC Medien	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
DC-Zelluloseplatten (ohne Fluoreszenz)	Merck, Darmstadt
Desoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Desoxyribonukleotide	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
D-Galaktose	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
dNTP- Set (100 mM)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Gene Ruler 1kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Gasperlen, ungewaschen, 425-600 µm	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Gluconolacton	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Hefeextrakt	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Kieselgelplatten	Merck, Darmstadt
Micro-Agar	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Naringenin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Natriumascorbat	Merck, Darmstadt
Nitrocefin disks	Fluka (Sigma-Aldrich), Taufkirchen
Pepton	Duchefa Biochemie Haarlem, Niederlande
Quercetin	Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe

### III. Material und Methoden

---

Rotiszint <sup>®</sup> eco plus scintillation cocktail	Roth, Karlsruhe
SeaKem LE Agarose	Cambrex, Rockland, ME, USA
Seesand, gegläht	Merck, Darmstadt
Select Agar	Invitrogen, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Triton X 100	Roth, Karlsruhe
Tris Pufferan	Roth, Karlsruhe
Trypton	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
X-Gal	Roth, Karlsruhe
Yeast Nitrogen Base without amino acids	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

Alle weiteren Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen Merck, Roth und Sigma-Aldrich Chemie in analysenreiner Qualität bezogen.

#### 1.2 Radiochemikalien

[2-<sup>14</sup>C]Malonyl-CoA 53 mCi/mmol Moravek Biochemicals, Brea, CA, USA  
UDP-[U-<sup>14</sup>C]Glucose 297 mCi/mmol, GE Healthcare UK, Little Chalfont, England  
UDP-[U-<sup>14</sup>C]Glucuronsäure 300 mCi/mmol, American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO, USA

#### 1.3 Enzyme

Die rekombinante UGT1A1 wurde von Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen), alle weiteren verwendeten Enzyme wurden von MBI Fermentas (St. Leon Rot) bezogen.

#### 1.4 Reagenziensätze (Kits)

GenElute <sup>®</sup> Yeast Total RNA Purification Kit	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
ScEasyComp <sup>™</sup> Transformation Kit	Invitrogen, Karlsruhe
PichiaEasyComp <sup>™</sup> Transformation Kit	Invitrogen, Karlsruhe
NucleoSpin <sup>®</sup> Extract	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
QuickChange <sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA

### III. Material und Methoden

---

TOPO TA Cloning <sup>®</sup> Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Gateway <sup>®</sup> LR clonase <sup>®</sup> enzyme mix	Invitrogen, Karlsruhe
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim

#### 1.5 Substrate, Cosubstrate und Referenzsubstanzen

Ammonium Eisen(II)sulfat, Natriumascorbat, 2-Oxoglutarat und NADPH wurden von der Firma Roth (Karlsruhe), Octylgallat,  $\alpha$ - und  $\beta$ -p-Nitrophenyl-D-glucopyranosid und  $\alpha$ -Naphthol wurden von Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) bezogen. Weitere Substrate und Referenzsubstanzen stammten von Extrasynthese (Genay, Frankreich) oder aus der Laborsammlung.

#### 1.6 Pflanzenmaterial

Für die Infiltration mit Agrobakterien wurde *Nicotiana benthamiana* (Solanaceae) verwendet. Das Saatgut, wurde von Prof. T. Teeri (Department of Applied Biology, Universität Helsinki), zur Verfügung gestellt und im Gewächshaus des Institutes für Pharmazeutische Biologie, Philipps-Universität Marburg, angezogen.

### III.2 Puffer und Lösungen

#### 2.1 Lösungen für die Isolierung von Plasmid-DNA

##### GTE-Puffer:

50 mM Glukose

25 mM Tris-HCl (pH 7,5)

10 mM EDTA

Nach dem Autoklavieren Zugabe von 0,02 mg/ml RNase

##### NaOH/SDS-Lösung:

0,2 M NaOH

1 % (w/v) SDS

##### PAS-Lösung:

5 M Kaliumacetat (pH 4,8)

### III. Material und Methoden

---

#### 2.2 Lösungen zur Herstellung kompetenter Bakterien

##### Lösung I:

100 mM MgCl<sub>2</sub>

##### Lösung II:

100 mM CaCl<sub>2</sub>

15 % (v/v) Glycerin

#### 2.3 Agarose-Gelelektrophorese

50 x TAE-Puffer:

2 M Tris

5,71 % (v/v) Essigsäure

50 mM EDTA

#### 2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

##### 5 x SDS-Probenpuffer

0,25 M Tris/HCl pH 6,8

8 % Glycerin (v/v)

6 % SDS (w/v)

0,02 % Bromphenolblau (w/v)

##### Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)

##### Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)

##### 10 x Laufpuffer

0,25 M Tris-HCl

1 M Glycin

35 mM SDS

##### Coomassie-Färbelösung

45 % Methanol in Wasser (v/v)

10 % Essigsäure(v/v)

0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v)

### III. Material und Methoden

---

#### Entfärbelösung

40 % Methanol in Wasser (v/v)

10 % Essigsäure (v/v)

#### **2.5 Puffer für die Proteinreinigung**

##### Aufschlusspuffer

50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 8,0)

300 mM NaCl

5 mM Imidazol

0,2 % Desoxycholat

1 % Triton X-100

##### Binde- und Waschpuffer

50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 8,0)

300 mM NaCl

5 mM Imidazol

##### Elutionspuffer

50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 8,0)

300 mM NaCl

500 mM Imidazol

#### **2.6 Puffer und Lösungen für Western Blot Analyse**

##### Anodenpuffer I:

0,3 M Tris-HCl (pH 10,4)

10 % Methanol in Wasser (v/v)

##### Anodenpuffer II:

25 mM Tris-HCl (pH 10,4)

10 % Methanol in Wasser (v/v)

##### Kathodenpuffer:

25 mM Tris-HCl (pH 9,4)

10 % Methanol in Wasser (v/v)

40 mM Aminohexansäure

### **III. Material und Methoden**

---

#### PBS-Puffer (Phosphate-Buffered Saline):

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3

#### TPBS-Puffer (Phosphate-Buffered Saline + Tween 20)

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3

0,05 % Tween-20 (v/v)

#### TBS-Puffer (Tris-Buffered Saline)

100 mM Tris/HCl (pH 7,5)

150 mM NaCl

#### TTBS (Tris-Buffered Saline + Tween 20)

100 mM Tris/HCl (pH 7,5)

150 mM NaCl

0,05 % Tween-20 (v/v)

#### Blockierungslösung

PBS + 5 % Milchpulver (w/v)

#### Dilutionspuffer

TTBS + 1 % Milchpulver (w/v)

#### Alkalischer Phosphatase Substratpuffer

100 mM Tris/HCl (pH 9,5)

150 mM NaCl

50 mM MgCl<sub>2</sub>

### **2.7 Aufschlusspuffer**

#### Puffer (Breaking Buffer) für den Aufschluss von *Pichia pastoris*

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (6 g), EDTA (372 mg) und 50 mL Glycerol werden in 900 mL Wasser gelöst, der pH-Wert von 7,4 eingestellt und anschließend zu 1 L mit Wasser aufgefüllt. Der Puffer wird bei 4 °C aufbewahrt und direkt vor Verwendung mit Proteaseinhibitor PMSF zu einer Endkonzentration von 50 mM versetzt.

### **III. Material und Methoden**

---

#### Lysis-Puffer nach Gateway-System für *E. coli* (Invitrogen)

Der Puffer wurde nach Anleitung des Gateway-Manuals hergestellt. Dazu wurden 0,6 mL 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 9,4 mL 1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 4,6 g NaCl, 1,8 g KCl, 20 mL Glycerol, 1 mL Triton X-100 und 36 g Imidazol in einem Gesamtvolumen von 200 mL  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und der pH-Wert mit HCl auf 7,8 eingestellt.

#### Puffer zur Gewinnung von Mikrosomen aus Pflanzenmaterial

0,1 M Tris/HCl 7,5

28 mM 2-Mercaptoethanol

10 mM Natriumascorbat

#### Britton-Robinson-Puffer II

Der Puffer enthielt 6,01 g Citronensäure, 3,892 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,769 g  $\text{H}_3\text{BO}_4$  und 0,1 M HCl bei einem Gesamtvolumen von 1 L. Der pH-Wert von 4,0 bis 11,0 wurde mit 0,2 N NaOH eingestellt.

### **III.3 Medien für Bakterien**

#### LB-Medium (Luria Bertani; pH 7,5)

10 g/L Pepton

5 g/L Hefeextrakt

10 g/L NaCl

1 mL/L 1 M  $\text{MgSO}_4$

4 mL/L Glycerin

Für die Herstellung von LB- Festmedium wurde 1,5 % Bacto-Agar zugegeben.

LB/Amp 100: Zugabe von 100 mg/L Ampicillin

LB/Kan 50: Zugabe von 50 mg/L Kanamycin

LB/Tet 4: Zugabe von 4 mg/L Tetracyclin

LB/Spec 100: Zugabe von 100 mg/L Spectinomycin

LB/Carb 100: Zugabe von 100 mg/L Carbenicillin

#### SOC-Medium

20 g/L Pepton

5 g/L Hefeextrakt

0,5 g/L NaCl

20 mM Glucose

### **III. Material und Methoden**

---

#### NZY<sup>+</sup> (pH 7,5)

10 g/L NZ-Amin (Casein Hydrolysat)

5 g/L Hefeextrakt

5 g/L NaCl

12,5 mM MgCl<sub>2</sub>

12,5 mM MgSO<sub>4</sub>

4 g/L Glucose

#### **III.4 Medien für *Saccharomyces cerevisiae***

##### Sc-U

6,7 g/L Yeast Nitrogen Base

je 0,1 g/L: Adenin, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Threonin, Tryptophan

je 0,05 g/L: Asparaginsäure, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin

Nach dem Autoklavieren Zugabe von 20g/L Glucose

##### Sc-HIS

6,7 g/L Yeast Nitrogen Base

je 0,1 g/L: Adenin, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Threonin, Tryptophan, Uracil

je 0,05 g/L: Asparaginsäure, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin

Nach dem Autoklavieren Zugabe von 20g/L Glucose

##### Sc-U-HIS

6,7 g/L Yeast Nitrogen Base

je 0,1 g/L: Adenin, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Threonin, Tryptophan

je 0,05 g/L: Asparaginsäure, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin

Nach dem Autoklavieren Zugabe von 20g/L Glucose

##### SGI

1,0 g/L Pepton

6,7 g/L Yeast Nitrogen Base

0,02 g/L Tryptophan

Nach dem Autoklavieren Zugabe von 20 g/L Glucose

##### YPGE

10 g/L Hefeextrakt

10 g/L Pepton

Nach dem Autoklavieren Zugabe von 5 g/L Glucose und 3 % Ethanol

### III. Material und Methoden

---

#### YPGA

10 g/L Hefeextrakt

10 g/L Pepton

Nach dem Autoklavieren Zugabe von 20 g/L Glucose und 0,2 g/L Adenin

Für die Herstellung von Festmedium wurde jeweils 1,5 % Agar zugegeben.

#### **III.5 Medien für *Pichia pastoris***

##### 10 x YNB (Yeast Nitrogen Base with Ammonium sulfate without amino acids)

134 g YNB in 1 L Wasser lösen, sterilfiltrieren, aufbewahren bei 4°C

##### 500 x B (0,02 % Biotin)

20 mg Biotin in 100 mL Wasser, sterilfiltrieren, 4 °C

##### 10 x D (20 % Dextrose)

200 g D-Glucose in 1 L Wasser, sterilfiltrieren, 4 °C

##### 10 x M

5 ml Methanol mit 95 mL Wasser mischen, sterilfiltrieren, 4 °C

##### 10 x GY

100 ml Glycerol in 900 mL Wasser lösen, sterilfiltrieren, 4°C

##### 1 M Kaliumphosphatpuffer

132 mL 1 M  $K_2HPO_4$  werden mit 868 mL 1 M  $KH_2PO_4$  gemischt und der pH-Wert gegebenenfalls mit KOH oder Phosphorsäure auf 6,0 eingestellt.

##### MD Medium (Minimal Dextrose Medium)

800 mL Wasser werden autoklaviert und nach dem Abkühlen mit 100 mL 10 x YNB, 2 mL 500 x B und 100 mL 10 x D versetzt. Zur Herstellung von Platten werden dem zu autoklavierenden Wasser 15 g Agar zugesetzt.

##### BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium)

Hefe Extrakt (10 g) und Pepton (20 g) werden in 700 mL Wasser gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen werden 100 mL 1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0, 100 mL YNB, 2 mL 500 x B, und 100 mL 10 x GY zugegeben und bei 4 °C aufbewahrt.

##### BMMY (Buffered Methanol-complex Medium)

Das BMMY-Medium wird analog der Vorschrift für BMGY hergestellt, anstelle des Glycerols werden 100 mL 10 x M zugegeben.

### III. Material und Methoden

#### III.6 Medien für die Infiltration von *Nicotiana benthamiana* und Luciferaseassay

##### MES-Lösung (Morpholinopropan sulfonsäure)

150 µM Acetosyringon

10 mM MES (pH 6,3)

10 mM MgCl<sub>2</sub>

##### Modifizierter Lux-Buffer

50 mM Natriumphosphat, pH 7,0

4 % PVP, löslich, MW 360000

2 mM EDTA

20 mM DTT, frisch zugeben

#### III.7 Bakterien- und Hefestämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
Top10 F-	<i>mcrA</i> D( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) f80 <i>lacZ</i> ΔM15 <i>DlacX74 recA1 araD139 D(ara-leu)7697</i> <i>galUgalK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
XL1 Blue MRF'	Δ( <i>mcrA</i> )183 Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>end</i> <i>A1supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F'proAB</i> <i>lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]</i>	Stratagene, La Jolla, CA, USA
BL21StarTM (DE3) F-	<i>ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3)</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
BL21A1	F- <i>ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm araB::T7RNAP-</i> <i>tetA</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
M15[pREP4]	<i>NalS StrS rifS lac- ara- gal- mtl- FrecA+ uvr+</i>	Qiagen GmbH, Hilden
DH5α	F- φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1</i> <i>endA1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) phoA supE44 thi-1 gyrA96</i> <i>relA1 λ<sup>-</sup></i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
INVSc1	<i>MATa his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52 MAT his3D1</i> <i>leu2 trp1-289 ura3-52</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Y00000	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Euroscarf, Frankfurt
Y02343	BY4741; <i>Mat a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;</i> YIR007w::kanMX4	Euroscarf, Frankfurt
Y02446	BY4741; <i>Mat a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;</i> YOR190w::kanMX4	Euroscarf, Frankfurt
Y05210	BY4741; <i>Mat a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0;</i> YLR300w::kanMX4	Euroscarf, Frankfurt
GS115	<i>His4</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

#### III.8 Vektoren

##### Vektoren für die Klonierung von PCR-Produkten

pCR2.1 TOPO TOPO-TA Cloning Kit                      Invitrogen GmbH, Karlsruhe

pCR8    Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### III. Material und Methoden

---

#### Vektoren für die Expression in Bakterien

pDEST17 Invitrogen GmbH, Karlsruhe

#### Vektoren für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae*

pYES2.1 Invitrogen GmbH, Karlsruhe

pYeDP60 Pompon *et al.* (1996)

p423GPD Mumberg *et al.* (1995)

#### Vektoren für die Expression in *Pichia pastoris*

pPIC3-BLA Smilović *et al.* (2007)

#### Vektoren für die Expression in *Nicotiana benthamiana*

pGV2260 Disarmed Ti plasmid DeBlaere *et al.* (1985)

pTAT823 Superpromoter-TEV-luc+ intron Prof. T.Teeri, Department of Applied Biology,  
Universität Helsinki, Finnland

pCH32 CaMV35S – *virG* – *virE* Hamilton *et al.* (1996)

pE1801 Lee *et al.* (2007)

#### III.9 Geräte

Spektrophotometer UV-1602 Shimadzu Europa, Duisburg

Sorvall RC-5C Plus DuPont, Newtown, Connecticut, USA

Sorvall RMC 14 DuPont (Newtown, Connecticut, USA)

Heraeus Biofuge pico Kendro, Hanau

Thermomixer 5436 und 5336 Eppendorf, Hamburg

PAGE-Apparatur: Miniprotean II Multicell Bio-Rad, München

Elektrophorese Power Supply EPS 3500 XL Pharmacia, Freiburg

1214 Rackbeta Szintillationszähler LKB Wallac, Turku, Finnland

BAS FLA-2000 Bioimaging Analyzer Fuji Photo Film, Tokyo, Japan

Software AIDA, Version 4.15 Raytest, Straubenhardt

Robocycler Gradient 96 Stratagene, Amsterdam, Niederlande

Eppendorf MasterCycler Gradient 5331 Eppendorf, Hamburg

Ultraschallgerät Sonifier Dr. Hielscher UP200S, Dr. Hielscher, Teltow

1253 Luminometer BioOrbit, Turku, Finnland

Western-Blot Apparatur Sammy Dry Schleicher & Schuell, Dassel

HSCCC-System, Zinsser Analytic, Frankfurt

mit Merck-Hitachi L-6000 Pumpe Tokio, Japan

### III. Material und Methoden

---

und manueller Probenschleife von 10 mL

LaChrom HPLC-System

Merck/Hitachi, Darmstadt

Modell D-7000 HSM

bestehend aus den Dioden Array Detektor (DAD)

L 4500, UV-Detektor L 4250

Interface D 6000, Pumpen L 6200A

und Autosampler AS 4000 A.

#### III.10 Molekularbiologische Methoden

##### 10.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus Hefe wurde mit Hilfe des GenElute™ Total RNA Purification Kit (Sigma) durchgeführt. Dazu wurde eine Flüssigkultur von *InvSc*-Zellen in YPGE-Medium angelegt und bei 30° C im Schüttler bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 1,0 inkubiert. Ein Aliquot (1,5 mL) der Kultur wurde zur Isolierung der RNA nach Herstellerangaben verwendet.

##### 10.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren dienten 1,5 % (w/v) TAE-Agarosegele denen Ethidiumbromid zur Detektion der RNA oder DNA unter UV-Bestrahlung zugefügt wurde. Nach dem Auftragen der Proben erfolgte die Auftrennung der Nukleinsäuren unter Verwendung von 1 x TAE-Puffer (III.2.3) als Laufpuffer und Anlegung einer Spannung von 120 V.

##### 10.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription (RT) wurde unter Verwendung der RevertAid™ H Minus M-MuLV-Reversen Transkriptase der Firma MBI Fermentas (St. Leon Rot) durchgeführt.

Der Ansatz enthielt 5 µg Gesamt-RNA und 1 µL 25 pM oligo-(dT)-Primer bei einem Gesamtvolumen von 11 µL. Nach 5-minütiger Inkubation bei 70 °C und kurzem Abkühlen auf Eis wurden 4 µL 5 x Reaktionspuffer, 2 µL 10 mM dNTPs und steriles Wasser zu einem Gesamtvolumen von 19 µL zugesetzt. Nach 5-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Reverse Transkriptase (1 µL, 200 U) hinzugegeben und der Ansatz für 1 Stunde bei 42 °C inkubiert. Die so gewonnene cDNA konnte bei -20 °C gelagert werden.

### III. Material und Methoden

---

#### 10.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

##### 10.4.1 Synthese von Oligonukleotiden

Die verwendeten Oligonucleotide wurden von der Firma Eurofins MWG, GmbH (Martinsried) bezogen und auf eine Konzentration von 25 pmol/ $\mu$ L eingestellt.

##### 10.4.2 Standard-PCR

Die Standard PCR wurde in einem Volumen von 50  $\mu$ L 10 x Polymerasepuffer mit 0,2 mM dNTPs, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U Taq-Polymerase, 0,2  $\mu$ M je Primer und 1  $\mu$ L cDNA angesetzt. Nach 5 min Denaturierung bei 95 °C wurden 40 Zyklen á 1 min Denaturierung bei 95 °C, 1 min Annealing (Temperaturen siehe Tab. 8, Anhang) und 2 min Elongation bei 72 °C durchgeführt. Danach folgte eine letzte Elongationsphase von 10 min bei 72 °C.

##### 10.4.3 Mutagenese

Zur Einführung von gezielten Mutationen wurde das QuickChange<sup>®</sup> *Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene (Heidelberg) verwendet. Die Mutationen können mit jedem Plasmid durchgeführt werden, es muss nur methylierte Template DNA aus dam<sup>+</sup> *E. coli* Stämmen vorliegen. Nach Herstellerangaben wurden zwei gegenläufige Primer konstruiert, bei denen sich der zu mutierende Bereich in der Mitte befand und die an den gleichen Sequenzabschnitt des Plasmids binden. Der Reaktionsansatz enthielt 5  $\mu$ L 10x Reaktionspuffer, 50 ng DNA, 1  $\mu$ L der mitgelieferten dNTPs, 100 ng je Primer und wurde mit dest. Wasser zu einem Volumen von 49  $\mu$ L aufgefüllt. Schließlich wurde 1  $\mu$ L (2.5 U) *PfuTurbo*<sup>®</sup> DNA Polymerase zugegeben, gemischt und wie folgt vervielfältigt: Nach 30-sekündiger Denaturierung bei 95 °C folgten 12 Zyklen mit jeweils 30 sek Denaturierung bei 95 °C, 1 min Annealing bei 55 °C und 1 min/kb Länge des Plasmids Elongation bei 68 °C.

Danach wurde durch Zugabe von 1  $\mu$ L des Restriktionsenzym DpnI die methylierte Template DNA für 1 h bei 37 °C verdaut, so dass nur noch die mutierte DNA übrig blieb.

Da die mutierte DNA wieder zu einem Plasmid hybridisieren kann, konnte die DNA direkt nach der Restriktion in XL1-Blue-Zellen transformiert werden. Das neue mutierte DNA-Plasmid-Konstrukt weist zwar noch Lücken auf, diese können aber durch die Bakterien repariert werden.

### III. Material und Methoden

#### 10.5 Enzymkatalysierte Reaktionen

##### 10.5.1 Ligation

Für Ligationen von Restriktionsfragmenten in entsprechende Vektoren mit kompatiblen überhängenden Enden wurde T4-DNA Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Dazu wurde ein Insert/Vektor-Verhältnis von 3:1 hergestellt und bei 22 °C über Nacht inkubiert.

##### 10.5.2 TOPO TA Cloning<sup>®</sup>

In die Vektoren pYES2.1/V5-His-TOPO<sup>®</sup>, pCR8 TOPO<sup>®</sup>, pCR2.1 TOPO<sup>®</sup> wurden die PCR-Produkte mithilfe der Topoisomerase I analog der Herstellerangaben (Invitrogen, Karlsruhe) ligiert.

Die Vektoren liegen linearisiert, mit 3'-Thymidin(T)-Überhängen vor und sind zusätzlich an Topoisomerase I aus *Vaccinia* Virus kovalent gebunden. Da bei der PCR durch die Aktivität der *Taq*-Polymerase an das PCR Produkt ein Desoxyadenosin (A) an das 3'-Ende angehängt wird, kann das Produkt mithilfe der Topoisomerase in den Vektor ligiert werden.

##### 10.5.3 Clonase-Reaktion

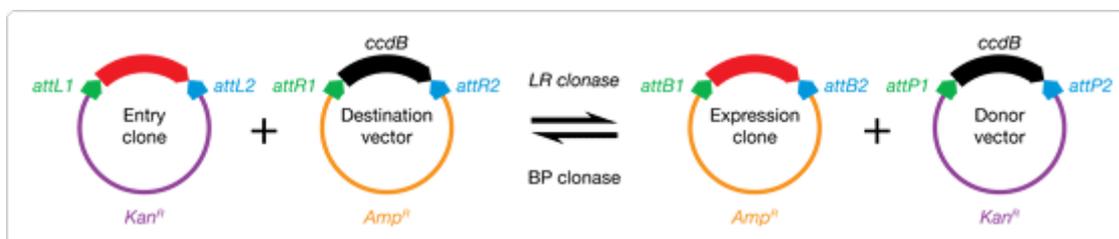


Abb. 13: Clonase Reaktion aus Gateway<sup>®</sup> Clonase<sup>®</sup> Enzymmix Anleitung (Invitrogen).

Für die Klonierung in den pDEST17-Vektor wurde das Gateway-System von Invitrogen verwendet. Von einem sog. „Entry clone“ (enthält das Gen in einem Bereich flankiert von attL sites) kann das entsprechende Insert durch einen Enzym-Mix (LR clonase<sup>®</sup>) in einen zweiten Vektor (Destination vector, enthält attR sites) eingebracht werden, der dann als Expressionsvektor verwendet werden kann. Der Clonase-Enzymmix besteht aus einer Mischung aus Integrase, einem „Integration host factor“ und einer Excisionase, welche die *in vitro* Rekombination zwischen den beiden Vektoren katalysieren (siehe Abb. 13). Als Entry clone fungierte ein Gen- pCR8-Vektor-Konstrukt.

### III. Material und Methoden

---

Die Clonase Inkubationsmischung enthielt folgende Bestandteile:

Entry clone (50–150 ng/Reaktion)	1–7 $\mu\text{L}$
Destination vector (150 ng/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$
mit TE Buffer, pH 8,0	auf 8 $\mu\text{L}$

Der LR Clonase-Enzymmix wurde auf Eis aufgetaut, kurz geschüttelt (Vortex), 2  $\mu\text{L}$  der Inkubationsmischung zugegeben und diese kurz gemischt. Nach Inkubation bei 25 °C (1 h) wurden 1  $\mu\text{L}$  Proteinase K zugegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden kompetente DH5 $\alpha$ -Zellen mit 1  $\mu\text{L}$  der Reaktion transformiert.

#### 10.5.4 Restriktionsanalyse

Restriktionsanalysen isolierter Plasmide wurden mit Enzymen der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### 10.6 Herstellung kompetenter Bakterien

Unter sterilen Bedingungen wurde eine *E. coli*-Kultur in 2 mL LB-Medium angelegt und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Ein Aliquot (1 mL) der Übernachtskultur wurde in 100 mL LB-Medium überführt und der Ansatz bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,6 angezogen (37 °C, 220 rpm). Nach Zentrifugation (10 min, 3000 x g, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Präzipitat in 20 mL eiskalter Lösung I (III.2.2) wieder aufgenommen. Die Suspension wurde 30 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert (10 min, 2500 x g, 4 °C), das Sediment anschließend in 2 mL eiskalter Lösung II (III.2.2) suspendiert und zu jeweils 150  $\mu\text{L}$  aliquotiert. Die kompetenten Bakterien wurden langsam eingefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 10.7 Transformation von *E. coli*

Die vorbereitete Mischung zur Ligation (5  $\mu\text{L}$ ) wurde zu 150  $\mu\text{L}$  kompetenten Bakterienzellen gegeben und für 30 min auf Eis belassen. Nach Hitzeschock bei 42 °C für 30 s und Zugabe von 250  $\mu\text{L}$  SOC-Medium wurden die Zellen bei 37 °C für 30 min unter ständigem Schütteln inkubiert. Der Ansatz wurde auf LB-Platten (Zugabe des jeweiligen Antibiotikums) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 10.8 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli*

Eine über Nacht bei 37 °C angezogene *E. coli* Kultur (3 mL) wurde bei 10000 x g für 5 min zentrifugiert und das erhaltene Sediment in 100  $\mu\text{L}$  GTE-Puffer (III.2.1) suspendiert. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  NaOH/SDS-Lösung und leichtem Mischen, erfolgte eine 5-minütige

### **III. Material und Methoden**

---

Inkubation auf Eis, um die Bakterien zu lysieren. PAS-Lösung (150 µL) wurde zugegeben, die Lösung für 5 min auf Eis gelagert und erneut zentrifugiert (10000 x g, 10 min). Der erhaltene Überstand wurde in ein frisches 1,5 mL-Gefäß überführt und mit 1 mL 100 %-igem Ethanol versetzt. Nach kurzem Mischen wurde die DNA durch Zentrifugation (10000 x g, 5 min) sedimentiert. Die gefällte Plasmid-DNA wurde nach zweimaligem Waschen mit je 500 µL Ethanol (70 %) getrocknet und in 50 µL sterilem H<sub>2</sub>O dest. resuspendiert. Die Analyse der DNA fand per Restriktionsverdau und Trennung auf Agarosegel statt.

Für Sequenzierungen wurde Plasmid DNA mithilfe des NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid-Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben isoliert.

#### **10.9 Gelelution**

Nach Gelelektrophorese wurden Banden der gesuchten Größen aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution von DNA-Fragmenten aus dem Gel erfolgte mit dem NucleoSpin Extract II Kit von Macherey & Nagel nach Herstellerangaben.

#### **10.10 DNA Sequenzanalyse**

Die Sequenzierungen erfolgten durch die Firma Eurofins MWG GmbH (Martinsried).

#### **10.11 Expression in Bakterien**

Für die Expression wurde ein geeigneter Expressionsstamm mit dem jeweiligen Konstrukt transformiert und auf LB-Platten (Zugabe des jeweiligen Antibiotikums) ausplattiert. Nach 16 h Inkubation bei 37 °C wurden Kolonien gepickt und über Nacht in je 3 mL LB-Medium angezogen (37 °C, 220 rpm). Das LB-Medium (100 mL) wurde mit 2 mL Vorkultur angeimpft und die Bakterien unter Schütteln (220 rpm) bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 angezogen. Konstrukte im pDEST17 TOPO-Vektor wurden mit 20 % Arabinose (Endkonzentration 0,2 %), alle anderen mit IPTG (Endkonzentration 1mM) induziert. Die Kulturen wurden für 4-6 h bei 37 °C (pDEST-Konstrukt) oder 30 °C inkubiert.

#### **10.12 Bakterienaufschluss**

Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4 °C (10 min, 5000 x g) geerntet und in 3 mL Aufschlusspuffer (III.2.7) resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte durch Ultraschall (Sonifier, Cycle 0.6, Amplitude 100 %, 1 min) auf Eis. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (30000 x g, 4 °C, 10 min) abgetrennt und der Überstand für Enzymtests verwendet. Die Expression der rekombinanten Proteine wurde durch SDS-PAGE überprüft.

### III. Material und Methoden

---

#### 10.13 *Saccharomyces cerevisiae*

##### 10.13.1 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Kompetente *S. cerevisiae* wurden mithilfe des ScEasy Comp-Kits (Invitrogen) hergestellt und transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf Platten mit entsprechendem Mangelmedium aufgebracht und für 2-4 Tage bei 30 °C angezogen.

##### 10.13.2 Anzucht und Induktion

Etwa 10 Kolonien wurden in Sc-U, Sc-HIS oder Sc-U-HIS-Medium (50 mL) überführt und bei 28 °C und 200 rpm für 24 h angezogen. Zur Kontrolle des Hefewachstums in der Vorkultur wurde diese im Verhältnis 1:10 mit Kulturmedium verdünnt und die OD<sub>600</sub> gemessen, die bei ca. 0,5 liegen sollte. Für die Hauptkultur wurde YPGE Medium mit der Menge an Vorkultur angeimpft, die nötig war, um eine OD<sub>600</sub> der Hauptkultur von 0,2 zu erreichen. Die Induktion erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 – 1,2 ( $8 \times 10^7$  Zellen/mL) mit 1/10 Volumen wässriger, steriler 20 %-iger Galactoselösung. Die Hefezellen wurden 12 - 15 h nach Induktion geerntet und die Proteine isoliert.

##### 10.13.3 Isolierung löslicher Proteine

Um die Hefezellen zu ernten wurden 270 mL Hauptkultur zentrifugiert (5 min, 5500 rpm) in 27 mL Aufschlusspuffer (Tris/HCl 7,5 oder KPi 6,5) resuspendiert und bei RT für 5 min inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 5500 rpm) wurde das Hefepellet in 2,5 mL eiskaltem Puffer resuspendiert und anschließend in einem Falconröhrchen mit 7,5 g Glasperlen (Sigma) versetzt. Durch 20 Zyklen je 30 sec kräftiges vertikales Schütteln und 30 sec Inkubation auf Eis wurden die Zellen aufgeschlossen. Nach Zugabe von weiteren 5 mL eiskaltem Aufschlusspuffer wurden die unlösliche Zellbruchstücke durch Zentrifugation (10 min, 30000 x g, 4 °C) entfernt. Der Hefehextrakt wurde für die Lagerung mit 10 % Glycerol gemischt, in Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

##### 10.13.4 Isolierung von Mikrosomen aus *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Isolierung von Mikrosomen aus Hefe wurde zuerst analog der Vorschrift zur Isolierung löslicher Proteine (III.10.13.3) verfahren. Nach Aufschluss der Hefezellen mit Glasperlen wurde die Suspension bei 10000 x g (4 °C) zentrifugiert und der Überstand zu 25 mL mit eiskaltem Puffer aufgefüllt. Die Lösung wurde durch Zugabe von 940 µL 4 M NaCl auf einer Endkonzentration von 150 mM NaCl eingestellt. Der Suspension wurden 2,5 g PEG 4000

### III. Material und Methoden

---

zugegeben, dies durch Rühren mit einem Glasstab auf Eis gelöst und dort für 15 min inkubiert. Die gefällte Proteinfraction wurde bei 30000 x g für 10 min abzentrifugiert und anschließend in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator in 2,5 mL Puffer wieder resuspendiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C, nachdem der Proteinsuspension vorher 10 % Glycerin zugesetzt wurde und diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde.

#### 10.14 *Pichia pastoris*

##### 10.14.1 Transformation

Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* besitzt das *Pichia*-System keine eigenen stabilen, episomalen Plasmide, so dass die entsprechende Gen-Vektorkonstrukte direkt ins Genom dieser Hefe integriert werden müssen. Um das zu ermöglichen, muss das Konstrukt vor der Transformation linearisiert werden.

Kompetente *Pichia pastoris* -Zellen wurden mithilfe des PichiaEasyComp<sup>TM</sup> Transformation Kits (Invitrogen) hergestellt und anschließend transformiert. Zu 50 µL kompetenter *P. pastoris* GS 115 Zellen wurde 3 µg Expressionskonstrukt gegeben, welches zuvor für 2 h mit BglIII linearisiert wurde. Nach Zugabe von 1 mL Solution II (aus Transformations-Kit) wurden die Zellen für 1 h bei 30 °C inkubiert, wobei alle 15 min intensiv gemischt (Vortex) wurde. Die Zellen wurden danach für 10 min bei 42 °C hitzeschockbehandelt und anschließend für 5 min bei 3000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL Solution III (aus Transformations-Kit) resuspendiert, wieder sedimentiert, schließlich in 100-150 µL Solution III gelöst und auf einer MD-Agarplatte (III.5) ausgestrichen. Diese wurde für 2-4 Tage bei 30 °C inkubiert. Auf die gewachsenen Kolonien wurde jeweils 1 Nitrocefinplättchen gegeben und nach kurzer Inkubationszeit die rotgefärbten Kolonien für die anschließende Expression verwendet.

##### 10.14.2 Anzucht und Induktion

Von der Platte wurden einzelne Kolonien gepickt und in 100 mL BMGY-Medium (III.5) in einem 1 L Kolben inokuliert. Nach Inkubation für 16-18 Stunden bei 28-30 °C wurde die Kultur bei 1500-3000 x g abzentrifugiert und 1/5 bis 1/10 des ursprünglichen Volumens in BMMY-Medium wieder aufgenommen, um die Expression zu starten. Alle 24 h wurde der Kultur reines Methanol zu einer Endkonzentration von 0,5 % zugegeben.

### III. Material und Methoden

---

#### 10.14.3 Isolierung löslicher Proteine

Der Aufschluss erfolgte mit Breaking Buffer (III.2.7) analog der Vorschrift zur Isolierung löslicher Proteine aus *S. cerevisiae*.

#### 10.14.4 Isolierung von Mikrosomen aus *Pichia pastoris*

Der Aufschluss erfolgte mit Breaking Buffer (III.2.7) analog der Vorschrift zur Isolierung von Mikrosomen aus *S. cerevisiae*.

#### 10.15 *Nicotiana benthamiana*

##### 10.15.1 Transformation von Agrobakterien

*Agrobacterium tumefaciens* wurde durch die so genannte Elektroporation transformiert. Dazu wurde der Stamm C58C1, der bereits die Plasmide pGV 2260 und pCH32 enthielt (zur Verfügung gestellt von Prof. T. Teeri, Department of Applied Biology, Universität Helsinki) über Nacht bei 28 °C in 3 mL LB-Medium mit Carbenicillin und Tetracyclin inkubiert. Die Bakterien wurden zentrifugiert (12000 rpm, 4 min) und in 100 µL H<sub>2</sub>O wieder aufgenommen. Dieser Waschschrift wurde 5 x wiederholt, das Pellet anschließend in 50 µL H<sub>2</sub>O wieder aufgenommen und auf Eis gehalten. Die Zellsuspension (40 µL) wurden mit 10 µL entsalztem Plasmid versetzt und die Mischung 2 min auf Eis inkubiert. Die anschließende Elektroporation erfolgte bei 2,5kV, 200Ω, 25 µF. Die transformierten Bakterien wurden in 1 mL LB-Medium aufgenommen, für 1 Stunde bei 28 °C im Schüttler inkubiert und schließlich auf Selektionsmedium ausplattiert.

##### 10.15.2 Infiltrationsexperimente

Die Infiltration wurde nach Santos del Blanco (2006) durchgeführt. Dazu wurde von der Agar-Platte (III.10.15.1) jeweils eine Kolonie gepickt und in 5 mL LB Medium mit Carbenicillin, Kanamycin und Tetracyclin inokuliert und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Die 5 mL Kultur wurde zu 50 mL LB Medium gegeben, das neben den bereits erwähnten Antibiotika zusätzlich 10 mM MES (Morpholinopropansulfonsäure, pH 6,3) and 20 µM Acetosyringon (3,5-Dimethoxy-4-hydroxyacetophenon) enthielt. Nach Inkubation über Nacht bei 28 °C wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 3000 x g für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde mit 10 mL Wasser gewaschen, erneut zentrifugiert und in 10 mL MES-Lösung (III.6) resuspendiert. Die Bakteriensuspensionen wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 eingestellt und für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

### **III. Material und Methoden**

---

Die Pflanzen sollten vor der Infiltration ausreichend Wasser zur Verfügung haben, um die Stomata offen zu halten. Auf der Unterseite des Blattes wurde mit einem Skalpell ein Loch gestochen in das mit einer 2 mL-Spritze (ohne Nadel) die Bakteriensuspension gespritzt wurde bis das Blatt vollständig gefüllt war. Die infiltrierten Blätter wurden markiert und die Pflanzen unter Dauerlicht bei 23 °C inkubiert.

#### **10.15.3 Mikrosomaler Aufschluss von Pflanzenmaterial**

Der mikrosomale Aufschluss des Pflanzenmaterials erfolgte nach Diesperger *et al.* (1974).

Der Ansatz enthielt Blätter, Dowex in Tris/HCl pH 7,5, Seesand und Puffer in einem Verhältnis von 1:1:0,5:6 (w/w/w/v). Die Mischung wurde mit Mikropistillen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gemörsert, anschließend zentrifugiert (20 min, 12000 x g, 4 °C) und der Überstand für die Mikrosomen-Fällung verwendet. Dazu wurde die Lösung mit 1 M MgCl<sub>2</sub> auf eine Endkonzentration von 30 mM eingestellt, vorsichtig gemischt und der Ansatz für 10 min auf Eis gehalten. Nach erneuter Zentrifugation (20 min, 17000 x g, 4 °C) wurde das Pellet in Puffer für anschließende Enzymtests suspendiert.

#### **10.15.4 Proteinaufschluss für Luciferase-Test**

Infiltrierte Blätter wurden nach verschiedenen Inkubationszeiten geerntet, kleine Blattstücke ausgeschnitten, in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und gewogen. Eiskalter modifizierter Lux-Puffer (III.6, 400 µL) und eine Spatelspitze Seesand wurden zugegeben und die Mischung mit einem Mikropistill gemörsert, bis keine Blattstücke mehr vorhanden waren. Nach 10 minütiger Zentrifugation (12000 x g, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und für Messungen der Luciferaseaktivität und UGT-Tests verwendet. Alternativ dazu wurde der Aufschluss für den UGT-Enzymtest auch mit KPi-Puffer (pH 7,5) durchgeführt.

### **III.11 Biochemische Methoden**

#### **11.1 Herstellung von radioaktiv markierten Substraten**

Für Enzymtests benötigte radioaktiv markierte Substrate wurden mit Hilfe der rekombinanten Enzyme selbst hergestellt. Die Produkte wurden jeweils mit 2 x 4 mL Ethylacetat extrahiert und der Umsatz durch Messung eines Aliquots im Scintillationszähler sowie nach erfolgter DC (Fließmittel CAW) mit dem BAS FLA 2000 Bioimaging Analyzer von Fuji (Tokyo, Japan) quantifiziert.

### III. Material und Methoden

---

Folgende Konstrukte kamen für die Synthesen zum Einsatz:

- Chalkonsynthase (CHS) aus *Pinus sylvestris* im pKK233-2-Vektor, exprimiert in *E. coli*, verwendet wurde der rohe Extrakt (III.10.13);
- Chalkonisomerase (CHI) aus *Petunia hybrida*, im pYES2-Vektor, exprimiert in Hefezellen; verwendet wurde roher löslicher Extrakt (III.10.14.3);
- Flavanon-3 $\beta$ -Hydroxylase (FHT) aus *Anethum graveolens*, im pYES2-Vektor, exprimiert in Hefezellen; verwendet wurde roher löslicher Extrakt (III.10.14.3);
- Flavonolsynthase 1 (FLS1), aus *Arabidopsis thaliana*, im pDEST14-Vektor, exprimiert in *E. coli*, verwendet wurde der rohe Extrakt (III.10.13);

#### 11.1.1 (2S)- [4a,6,8- <sup>14</sup>C]Naringenin

Der Ansatz für die Synthese von (2S)- [4a,6,8- <sup>14</sup>C]Naringenin ([<sup>14</sup>C]NAR) wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und enthält in 3 mL 0,1 M KPi-Puffer (pH 6,5):

- 60  $\mu$ L 1mM 4-Cumaroyl-CoA
- 200  $\mu$ L [2-<sup>14</sup>C]Malonyl-CoA (60 nmol)
- 300  $\mu$ L CHI
- 500  $\mu$ L CHS

#### 11.1.2 (2S)- [4a,6,8- <sup>14</sup>C]Eriodyctiol

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C bei 450 rpm inkubiert und enthält in 3 mL 0,1 M KPi-Puffer (pH 6,5):

- 60  $\mu$ L Caffeoyl-CoA (1 mM)
- 200  $\mu$ L [2-<sup>14</sup>C]Malonyl-CoA (60 nmol)
- 500  $\mu$ L CHS
- 300  $\mu$ L CHI

#### 11.1.3 (2S)- [4a,6,8- <sup>14</sup>C]Dihydroquercetin

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C bei 450 rpm inkubiert und enthält in 3 mL 0,1 M KPi-Puffer (pH 6,5):

- 60  $\mu$ L Caffeoyl-CoA (1 mM)
- 200  $\mu$ L [2-<sup>14</sup>C]Malonyl-CoA (60 nmol)
- 500  $\mu$ L CHS
- 300  $\mu$ L CHI

### III. Material und Methoden

---

Nach erfolgter Inkubation wurde 1mL FHT zugegeben und der Ansatz für eine weitere Stunde bei 30 °C und 450 rpm inkubiert.

#### 11.1.4 (2S)- [4a,6,8- <sup>14</sup>C]Dihydrokämpferol

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und enthält in 3 mL KPi-Puffer (0,1 M, pH 6,5):

60 µL 4-Cumaroyl-CoA (1 mM)

200 µL [2-<sup>14</sup>C]Malonyl-CoA (60 nmol)

300 µL CHI

500 µL CHS

Dem Ansatz wurden anschließend 1 mL FHT zugegeben, dieser für eine weitere Stunde bei 30 °C inkubiert und wie bereits erwähnt extrahiert und analysiert.

#### 11.1.5 (2S)- [4a,6,8- <sup>14</sup>C]Kämpferol

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und enthält in 3 mL 0,1 M Tris/HCl (pH 7,5):

60 µL 4-Cumaroyl-CoA (1 mM)

200 µL [2-<sup>14</sup>C]Malonyl-CoA (60 nmol)

300 µL CHI

500 µL CHS

Dem Ansatz wurden nach erfolgter Inkubation 1 mL FHT zugegeben, und anschließend für eine weitere Stunde bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 mL FLS1 zugegeben, der Ansatz wurde für eine Stunde bei 30 °C inkubiert und anschließend quantifiziert.

### 11.2 Standardenzymtests

#### 11.2.1 Chalkonsynthase Test

Die Bestimmung der Chalkonsynthaseaktivität (CHS) erfolgte modifiziert nach Fliegmann *et al.* (1992). [2-<sup>14</sup>C]Malonyl-CoA (5 µL 110000 dpm, 1,5 nmol) wurde mit 10 µL 200 mM 4-Cumaroyl-CoA und 150 µL 0,1 M KPi (pH 6,5) gemischt und die Reaktion durch Zugabe des rohen rekombinaten Enzyms (50 µg) aus Bakterien gestartet. Nach 30 min bei 37 °C und 550 rpm wurde das entstandene Produkt durch Zugabe von 2 x 200 µL Ethylacetat extrahiert, der Extrakt durch CAW aufgetrennt und die Menge mit dem BAS FLA 2000 Bioimaging Analyser ausgewertet.

### III. Material und Methoden

---

#### 11.2.2 Tests für Flavonsynthase I und Flavanon-3 $\beta$ -Hydroxylase

Die Tests wurden modifiziert nach Britsch (1990), Britsch *et al.* (1992) und Gebhardt (2007) durchgeführt. Es wurden jeweils 5000 dpm [<sup>14</sup>C]NAR (45 pmol) in 150  $\mu$ L 0,1 M KPi (pH 6,5) aufgenommen. Das jeweilige Enzym (150  $\mu$ g) wurde als löslich aufgeschlossene Rohfraktion (III.10.14.3) zugegeben. Des Weiteren enthielt der Ansatz die für Dioxygenasen benötigten Kosubstrate (jeweils 10  $\mu$ L der wässrigen Lösung): Ascorbat (0,05 mM), Ammoniumeisen-II-sulfat (1 mM) sowie 2-Oxoglutarat (2 mM). Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für 30 min unter Schütteln (550 rpm) mit geöffnetem Deckel, um die Sauerstoffsättigung sicher zu stellen. Die Reaktion wurde durch Extraktion mit Ethylacetat (zweimal mit je 200  $\mu$ L) beendet, und die Produktbildung wie oben beschrieben analysiert.

#### 11.2.3 Flavonoid 3'-Hydroxylase Test

Die Aktivität der Flavonoid 3'-Hydroxylase (F3'H) wurde modifiziert nach Stotz *et al.* (1985) bestimmt. Jeweils 5000 dpm [<sup>14</sup>C]NAR (45 pmol) wurden in 150  $\mu$ L 0,1 M Tris/HCl (pH 7,5) aufgenommen und mit 50  $\mu$ L (150  $\mu$ g) mikrosomalem rekombinatem Enzym (III.10.13.4) versetzt. Nach Zusatz von 10  $\mu$ L NADPH (20,4 mM) wurde die Mischung für 30 min bei 30 °C und 550 rpm inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion und die Auswertung erfolgten wie oben beschrieben.

#### 11.2.4 Tests für Isoflavonsynthase und 2-Hydroxyisoflavanon-dehydratase

Die Bestimmung der IFS1 Aktivität erfolgte modifiziert nach Kim *et al.* (2003). [<sup>14</sup>C]NAR (5000 dpm, 45 pmol) wurden in 165  $\mu$ L KPi-Puffer (pH 6,5) aufgenommen. Zum Starten der Reaktion wurden 10  $\mu$ L NADPH (1,7 mg/100  $\mu$ L) und 25  $\mu$ L (150  $\mu$ g) des mikrosomalen rekombinaten Enzyms (III.10.13.4) zugegeben und bei 30 °C (550 rpm) für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Extraktion mit Ethylacetat (2x 200  $\mu$ L) abgestoppt, der Extrakt eingengt, auf DC aufgetragen und mittels BAS FLA 2000 Bioimaging Analyzer (Fuji, Tokyo, Japan; Bio-Imager) analysiert.

Falls die HIDH auch getestet werden sollte, wurden dem Ansatz zusätzlich 25  $\mu$ L HIDH (50  $\mu$ g) zugegeben, wobei die Puffermenge dann entsprechend reduziert wurde.

### III. Material und Methoden

---

#### 11.2.5 Test auf Glucosidasen

Für die Unterscheidung der Hefe-Hydrolasen in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucosidasen wurde p-Nitrophenyl- $\alpha$ - oder  $\beta$ -D-glucopyranosid (pPNP) als Substrat verwendet.

##### - $\alpha$ -Glucosidase Test:

Die Zugehörigkeit zur Familie der  $\alpha$ -Glucosidasen wurde durch  $\alpha$ -Glucosidasetests nach Anleitung von Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) ermittelt. Dazu wurden 20  $\mu$ L der Proteinrohfraktion (50  $\mu$ g) in einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ L 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 6,8) mit 3 mM Glutathion (reduziert) und 10 mM  $\alpha$ -pPNP bei 45 °C für 20 min unter Schütteln (550 rpm) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 800  $\mu$ L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pro 200  $\mu$ L Test gestoppt und photometrisch ( $\text{OD}_{400}$ ) ausgewertet.

##### - $\beta$ -Glucosidase Test:

Die Zuordnung zur Familie der  $\beta$ -Glucosidasen wurde modifiziert nach Pack *et al.* (2002) gemessen. Das rohe Protein (100  $\mu$ L, 250  $\mu$ g) wurde in einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ L 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 5,8) mit 10 mM  $\beta$ -pPNP bei 37 °C für 20 min inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach Zugabe von 500  $\mu$ L Puffer photometrisch bei einer Wellenlänge von 420 nm.

##### - Test auf Flavonoid $\beta$ -Glucosidasen:

Für diesen Test wurde Naringenin-7-*O*-glucosid als Substrat genutzt. Aus einer Stammlösung (1 mg/mL in Ethylacetat) wurden 15  $\mu$ L unter vermindertem Druck eingengt und in 150  $\mu$ L 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 5,8) aufgenommen. Das rekombinante, über His-Tag gereinigte und über PD10-Säulen in 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 5,8 umgepufferte Enzym (50  $\mu$ L, 20  $\mu$ g Protein) wurde zugegeben und die Mischung für 30 min bei 30 °C und 550 rpm inkubiert. Die Reaktion wurde durch Extraktion mit Ethylacetat (2 x 200  $\mu$ L) abgestoppt, die vereinigten Ethylacetatphasen eingengt und für DC und HPLC-Analysen verwendet.

#### 11.2.6 Test auf Glucuronosyltransferasen

Der Test auf UGT-Aktivität wurden leicht modifiziert nach Ikushiro *et al.* (2004) durchgeführt. Als Substrat wurde 2 mM Gallussäureoctylester verwendet und die Inkubation mit 10 mM Saccharolacton, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  und 55000 dpm  $\text{UDP}[^{14}\text{C}]\text{Glucuronsäure}$  (spezifische Radioaktivität 300mCi/mmol) sowie 20  $\mu$ L Protein (250  $\mu$ g) in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu$ L 0,1 M KPi-Puffer (pH 6,5) durchgeführt. Die Reaktion wurde

### III. Material und Methoden

mit 10  $\mu\text{L}$  24 % Trichloressigsäure gestoppt und die entstandenen Produkte mit Ethylacetat (2 x 100  $\mu\text{L}$ ) extrahiert. Die Analyse der radioaktiven Produkte erfolgte mittels Scintillationszähler und Auswertung im BAS FLA 2000 Bioimaging Analyzer (Fuji, Tokyo, Japan) nach erfolgter DC in Fließmittel 1 (III.11.9).

#### 11.2.7 Luciferase-Test

Die Transformation von *Nicotiana benthamiana* durch *Agrobacterium tumefaciens* wurde mit Luciferase des Glühwürmchens, *Photinus pyralis* (Promega), als Reportergen geprüft. Luciferase oxidiert das Substrat Luciferin mithilfe der Cofaktoren  $\text{Mg}^{2+}$  und ATP in zwei Schritten, indem das Luciferylcarboxylat durch ATP zu einem gemischtes Anhydrid aktiviert wird das dann mit Sauerstoff zu den Endprodukten Oxyluciferin und  $\text{CO}_2$  reagiert (Abb. 14). Die Reaktion lässt sich durch die Emission von Photonen im sichtbaren Bereich bei einer Wellenlänge von 550-570 nm (grün bis gelber Bereich) im Luminometer verfolgen. Für die Bestimmung wurde das Luciferase Substrat (80  $\mu\text{L}$ ; Promega Luciferase Assay System) mit dem rohen Enzym (15  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{g}$ ) in einer Luminometer Küvette (Sarstedt) gemischt und im 1253 Luminometer (BioOrbit; Turku, Finnland) vermessen. Die Ausgabe des Messergebnisses erfolgte in relativen Lichteinheiten (Relative light units, RLU).

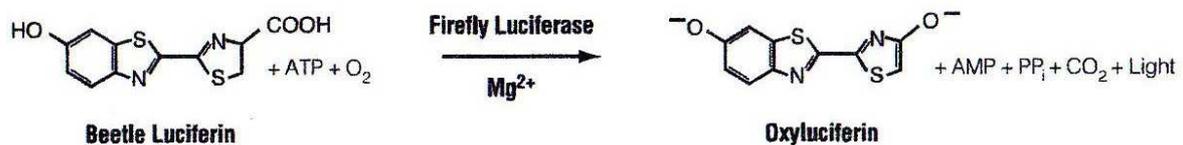


Abb. 14: Reaktionsschema der Luciferase (aus Luciferase Assay System Anleitung, Promega).

#### 11.3 Biotransformationen

Für Biotransformationen wurden 250 mL YPGE-Medium mit der jeweiligen Vorkultur beimpft, bei 30 °C unter Schütteln (180 rpm) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bis 1,2 inkubiert und anschließend mit steriler 20 % Galaktoselösung (Endkonzentration: 2 %) induziert. Unmittelbar nach erfolgter Induktion wurde zu jeweils 50 mL der Kultur Substrat (gelöst in DMSO) zugesetzt und für 12-17 h weiter inkubiert. Die Produkte wurden mit Ethylacetat extrahiert, die Extrakte eingengt und mittels DC oder HPLC analysiert.

### III. Material und Methoden

---

#### 11.4 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Gesamtproteins wurde die Methode von Bradford (1976) verwendet. Als Standard diente Rinderserumalbumin Fraktion V (Roth, Karlsruhe).

#### 11.5 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Miniprotean-II Apparatur (Bio-Rad, München).

##### **Trenngel [12,2 %]**

4100  $\mu\text{L}$  Acrylamid (30 %)

2500  $\mu\text{L}$  Trenngelpuffer (III.2.4)

400  $\mu\text{L}$  10 % SDS (w/v)

3000  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  dest.

16  $\mu\text{L}$  TEMED

70  $\mu\text{L}$  10 % APS (w/v)

##### **Sammelgel [4,5 %]**

375  $\mu\text{L}$  Acrylamid (30 %)

625  $\mu\text{L}$  Sammelgelpuffer (III.2.4)

100  $\mu\text{L}$  10 % SDS (w/v)

1400  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  dest.

5  $\mu\text{L}$  TEMED

15  $\mu\text{L}$  10 % APS (w/v)

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit 5  $\mu\text{L}$  SDS-Probenpuffer (III.2.4) und 5  $\mu\text{L}$  DTT (16 mg DTT/mL  $\text{H}_2\text{O}$  dest.) versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert.

Bei geringer Proteinkonzentration wurde das Protein zuvor durch Zugabe von 24 %-iger Trichloressigsäure im Verhältnis 1:1 für 30 min auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation bei 10000 x g, zweimaligem Waschen mit 500  $\mu\text{L}$  eiskaltem Aceton und anschließendem Trocknen wurde das Protein wie oben beschrieben vorbereitet und bei einer Spannung von 180 V für ca. 1 h aufgetrennt. Durch Anfärbung mit einer 0,25 %-igen Coomassie-Lösung (II.2.4) und anschließender Behandlung mit Entfärbelösung (III.2.4) wurden die Banden sichtbar gemacht.

#### 11.6 Western Blot

Für Western Blot Analysen wurden der Anti-V5-AP Antikörper (Invitrogen) oder der monoklonale Anti-poly-Histidine, Clone HIS-1-Antikörper (Sigma-Aldrich) verwendet.

Die gewonnenen Rohextrakte der Hefeglucosidasen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (III.11.5) und auf PVDF-Membran (9 x 6 cm) geblottet (Semi-Dry-Blot, Schleicher & Schuell, Dassel). Der Proteintransfer erfolgte bei 100 V für 30 min. Anschließend wurde die Membran in Blockierungslösung (III.2.6) überführt und für eine Stunde äquilibriert. Bei Verwendung des Anti-V5-AP-Antikörpers wurde die Membran 3 x für jeweils 5 Minuten mit

### III. Material und Methoden

---

TBST-Puffer gewaschen und anschließend mit AP-konjugiertem Antikörper in Dilutions-Puffer für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Durch dreimaliges Waschen der Membran in TTBS wurde unspezifisch gebundener Antikörper entfernt. Nach 5 minütiger Inkubation in TBS-Puffer und zweimaligem Waschen in Alkalischem Phosphatase-Puffer wurden 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) [50 µL einer Stammlösung von 50 mg/mL in 100 % DMF] und p-Nitroblau-tetrazoliumchlorid (NBT) [70 µL einer Stammlösung von 75 mg/mL in 70 % DMF] in 10 mL des Alkalischen Phosphatase-Puffers zum Starten der Farbreaktion zugegeben.

Nach einer ausreichenden Entwicklung (bis zu 30 min) wurde die Färbung durch Waschen der Membran in H<sub>2</sub>O dest. beendet.

Bei Verwendung des monoklonalen Anti-poly-Histidine-Antikörpers erfolgte die Blockierung ebenfalls in Blockierungslösung, die Inkubation des primären Antikörpers jedoch in PBS-Puffer, der 1 % Rinderserumalbumin enthält. Für sämtliche Waschschritte sowie die Inkubation mit sekundärem Antikörper (AntiMouseIgG-Alkaline Phosphatase, Sigma-Aldrich) wurde TPBS-Puffer verwendet.

#### 11.7 Reinigung über His-Tag (Immobilized metal affinity chromatographie, IMAC)

Rekombinante His-Tag-gebundene Proteine wurden an Profinity IMAC Resin (BIO-RAD, München) Nickel-Affinitätssäulenmaterial der Partikelgröße 45 - 90 µm gereinigt. Das System besteht aus kovalent an UNOsphere Matrix gebundener Iminodiessigsäure, die Ni<sup>2+</sup> und andere Übergangsmetallionen unter Chelatkomplexbildung fixieren kann.

His-Tag-Fusionsproteine können an die Ni<sup>2+</sup>-Ionen binden, durch Waschschritte von anderen störenden Komponenten befreit werden und anschließend durch hohe Imidazolkonzentrationen wieder von der Säule eluiert werden. Die Bindekapazität für His-Tag Proteine beträgt ≥ 15 mg/mL.

Für die Reinigung wurde das Batch-Verfahren angewandt, das besonders für Reinigung bei geringem Expressionslevel geeignet ist. Eine entleerte, saubere PD-10-Säule wurde mit 1 mL Profinity IMAC Resin gefüllt und mit Bindepuffer equilibriert. Hefekulturen wurden mit 5 mL Lysispuffer aufgeschlossen (III.10.14.3) und die gewonnene rohe Proteinfraction auf die Säule gegeben. Bakterien wurden mit Lysispuffer nach III.10.12 aufgeschlossen. Die His-Tag-Säule wurde auf einem Schüttler (120 rpm) bei 4 °C für 30 min inkubiert und anschließend mit 10 mL Waschpuffer gewaschen. Danach wurde das Enzym mit 2,5 mL Elutionspuffer (III.2.5) in 500 µL-Fractionen von der Säule eluiert. Die enzymhaltigen Eluate wurden vereinigt und über eine PD-10 Säule nach Herstellerangaben mit entsprechenden

### III. Material und Methoden

---

Puffern umgepuffert, mit 10 % Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C.

#### 11.8 Radioaktivitätsmessungen

Die quantitative Bestimmung der Radioaktivität erfolgte mittels Szintillationszähler (1214 Rackbeta, PerkinElmer, Wellesley, USA) oder durch Auswertung im Bio Imager FLA-2000 (Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) mit der dazugehörigen Auswertungssoftware AIDA (Raytest, Straubenhardt).

#### 11.9 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (DC) der Produkte erfolgte auf Zellulose- oder Kieselgelplatten der Firma Merck (Darmstadt).

Es wurden folgende Laufmittel verwendet:

##### Laufmittel

1 für Flavanone, Flavonole, Flavone, Cumarine und Stilbene:

Chloroform/Essigsäure/Wasser 10:9:1 (CAW)

2 für Isoflavone: 30 % Essigsäure

3 für Anthocyane: Essigsäure/Salzsäure/Wasser 30:3:10 (Forestal)

4 für Ginsenoside: Oberphase aus Ethylacetat/Wasser /1-Butanol 25:50:100

5 für Cardenolide: Wasser/Methanol/ Trichlormethan 2:18:80

6 für Sennoside: Essigsäure/Wasser/Ethylacetat/1-Propanol 1:30:40:40

7 für Cyanoglucoside: Ethylacetat/Aceton/Trichlormethan/Methanol/Wasser 40:30:12:10:8

Dünnschicht-Chromatogramme wurden unter UV-Licht oder nach Anfärbung mit Sprühreagenzien ausgewertet.

##### Sprühreagenz

1 für Flavanone, Flavonole, Flavone, Isoflavone, Coumarine und Stilbene:

Echtblausalz/0,1 N NaOH

2 für Ginsenoside und Cardenolide: Anisaldehyd in Schwefelsäure/Essigsäure/Methanol 5:10:85, 5 min bei 105 °C

3 für Sennoside: 20 % Salpetersäure, 10 min bei 120 °C, nach Abkühlen besprühen mit KOH (50g/L) in Ethanol 50 %

4 Natriumborhydrid-Lösung: 100 mg in 1 mL Wasser + 9 mL Isopropanol; bedampfen mit HCl

### III. Material und Methoden

---

#### 11.10 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Sämtliche HPLC-Analysen wurden mit dem LaChrom HPLC-System (Merck/Hitachi, Darmstadt) durchgeführt. Dafür wurden folgende Protokolle verwendet:

##### Protokoll 1:

Die Biotransformationsexperimente der mit FNS I oder FHT transformierten Hefezellen wurden nach Akashi *et al.* (1999) ausgewertet.

Die Produkte wurden auf einer Nucleodur 125/4 Sphinx RP 5µm-Säule (Macherey Nagel, Düren) in 50 % wässrigem Methanol (v/v) mit 3 % Essigsäure (v/v) aufgetrennt.

##### Protokoll 2:

Die Aktivität der Glucosidasen wurde nach Isayenkova *et al.* (2006) bestimmt. Als Fließmittelsystem wurde ein Gradient aus A: 1,5 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> und B: 100% Acetonitril genutzt, die stationäre Phase bestand aus einer Nucleosil 100-10 C18-Säule (Macherey Nagel, Düren).

Zeit (min)	A	B	Flussrate (mL/min)
0	85	15	1
13	45	55	1
15	85	15	1
20	85	15	1

##### Protokoll 3:

Die Biotransformationsexperimente der Hefe-Mutanten wurden mit folgendem Protokoll analysiert: Das Fließmittelsystem bestand aus einem Gradienten aus A: Wasser (pH 3,2 mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> eingestellt), B: Methanol und C: Acetonitril. Als stationäre Phase fungierte eine Nucleosil 100-10 C18-Säule (Macherey Nagel, Düren).

Zeit (min)	A	B	C	Flussrate (mL/min)
0	88	0	12	1
10	82	0	18	1
15	82	0	18	1
30	55	0	45	1
35	0	55	45	1
42	0	55	45	1
45	88	0	12	1
50	88	0	12	1

#### 11.11 High Speed Counter Current Chromatography

Die Reinigung von Produkten aus Biotransformationsexperimenten erfolgte durch High Speed Counter Current Chromatography (HSCCC). Der Aufbau einer HSCCC-Anlage besteht im Wesentlichen aus einer Pumpe, einem Injektionsventil mit Probenschleife und einer Trennsäule, die aus Teflonschlauch besteht der in mehreren Schichten um einen Säulenhalter gewickelt ist (sog. multilayer coil). Ein Ende der Säule wird als „head“ das andere als „tail“ bezeichnet. Die Trennung erfolgt in begrenzt mischbaren Lösungsmittelsystemen. Für eine optimale Verteilung der zu trennenden Verbindungen wird zuvor der Verteilungskoeffizient bestimmt. Während der Trennung dreht das „Coil“ sich in einer planetaren Bewegung sowohl um sich selbst als auch um die Zentralachse, wobei dann auf das „Coil“ unterschiedlich starke Kräfte wirken, was einem mehrmaligen Ausschütteln im Scheidetrichter entsprechen würde. Diese sind in der Nähe der Zentralachse geringer, im äußeren Teil des „Coils“ wirken dagegen größere Kräfte (Ito 2005).

Das Zweiphasenfließmittelsystem bestand aus: *n*-Hexan/Ethylacetat/Methanol/Wasser in einem Verhältnis von 22,2:27,8:22,2:27,8, wovon die untere Phase zuerst auf das 420 mL „Coil“ geladen wurde. Eine Flussrate von 2 mL/min (1000 rpm, forward) wurde eingestellt und nun die obere Phase über die Säule gepumpt. Die jeweilige Probe wurde eingespritzt und Fraktionen von jeweils 10 mL gesammelt und mittels DC analysiert.

# IV. Ergebnisse und Diskussion

## IV.1 Heterologe Expression humaner Glucuronosyltransferase

Humane Glucuronosyltransferase (UGT) besitzt relativ breite Substratspezifität und kann unterschiedlichste chemische Verbindungen glukuronidieren (Tukey und Strassburg 2000). In der Literatur finden sich Berichte über Aktivitätsbestimmungen von UGT1 und UGT2 mit z.B. Cumarinen, Steroiden, Opioiden, oder auch primären, sekundären und tertiären Aminen. Anthrachinone und Flavone können von UGT1A1, UGT1A3, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9 und UGT1A10 umgesetzt werden (Tukey und Strassburg 2000). Entsprechend sollte eines der Enzyme für die präparative Gewinnung von glukuronidierten Flavonoiden genutzt werden und für diesen Zweck wurde UGT1A1 (Acc.No: NM\_000463) ausgewählt. Expressionssysteme für UGTn sind beschrieben. So konnten humane Glucuronosyltransferasen in Säugerzellen, wie z.B. in der Nierenzelllinie COS des Affen, in Lungen-Fibroblastenzellen (V79) des Hamsters oder in humanen Embryonierenzellen HEK293, exprimiert werden. Auch die Expression über Baculoviren in Insektenzellen war möglich (Radomiska-Padaya *et al.* 2005) und entsprechende Fusionsproteine wurden in *E. coli* exprimiert (Ouzzine *et al.* 1994). In der hier vorliegenden Arbeit sollten die in der Literatur gut beschriebenen Hefen *S. cerevisiae* und *Pichia pastoris* als Wirt genutzt werden. Zusätzlich wurde auch die Expression in *Nicotiana benthamiana* studiert, die allerdings vorher noch nicht beschrieben wurde.

### 1.1 UGT Assay

Der Test zur Messung der UGT Aktivität wurde zunächst mit käuflicher UGT1A1 (Sigma) für die spätere Kontrolle der Expression optimiert. Umsetzungen (III.12.2.6) mit verschiedenen Testsubstraten und UDP-[U-<sup>14</sup>C]Glucuronsäure als Donor wurden durch DC-Auftrennung und Bioimaging (Abb. 15) ausgewertet. Octylgallat, das vom Hersteller benutzte UGT1A1-Substrat, und verschiedene Vertreter der Flavanone (NAR), der Flavone (Apigenin und Luteolin), bzw. Flavonole (Kämpferol) und Isoflavone (Genistein und Daidzein) sowie ein Chalkon (Xanthohumol) wurden eingesetzt.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

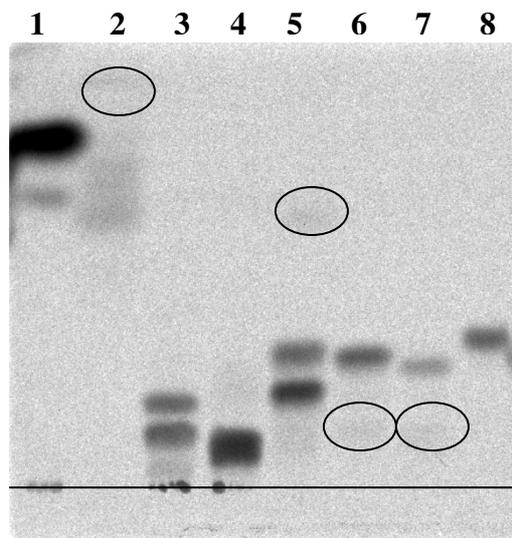


Abb. 15: Test der UGT1A1 Aktivität.

Die Inkubationen erfolgten mit Octylgallat (Bahn 1), Xanthohumol (2), Kämpferol (3), Luteolin (4), Apigenin (5), Genistein (6), Daidzein (7) oder Naringenin (8) als Substrat und in Gegenwart von UDP-[U-<sup>14</sup>C]Glucuronsäure. Die Produkte wurden nach Extraktion auf Zellulose-Dünnschichtplatten in CAW aufgetrennt und im Bioimager ausgewertet. UGT1A1 war von Sigma (Taufkirchen). Der Pfeil gibt die Laufrichtung an, mit Ovalen sind schwach sichtbare Banden markiert.

Startlinie

Alle getesteten Substrate wurden von der UGT1A1 glucuronidiert. Während Xanthohumol (Bahn 2) nur sehr schwach umgesetzt wurde und eventuell mehr als ein Produkt zeigt, lieferten Octylgallat (Bahn 1) und Kämpferol (Bahn 3) zwei, Apigenin (Bahn 5) sogar drei verschiedene Produkte. Im Falle von Genistein (Bahn 6) und Daidzein (Bahn 7) ist möglicherweise jeweils ein zweites Produkt nachweisbar. Diese Erkenntnisse decken sich teilweise mit den Untersuchungen von Chen *et al.* (2008), die verschiedene Flavonoide mit rekombinanter UGT1A3 und UGT1A9 getestet haben. Die Autoren beschrieben für Daidzein ein Produkt und für Kämpferol zwei Produkte, wobei es sich hier jeweils um Monoglucuronide handeln soll, wohingegen für Luteolin drei und Apigenin nur ein Produkt gefunden wurde. Die Unterschiede zu den eigenen Ergebnissen sind aber nicht weiter verwunderlich, da es sich um verschiedene, wenn auch ähnliche, Enzyme handelt, die durchaus verschiedene Substratspezifitäten aufweisen können. Jedenfalls zeigten die Inkubationen, dass UGT1A1 Flavonoide glucuronidiert, und konnten als Referenz für die späteren Untersuchungen dienen.

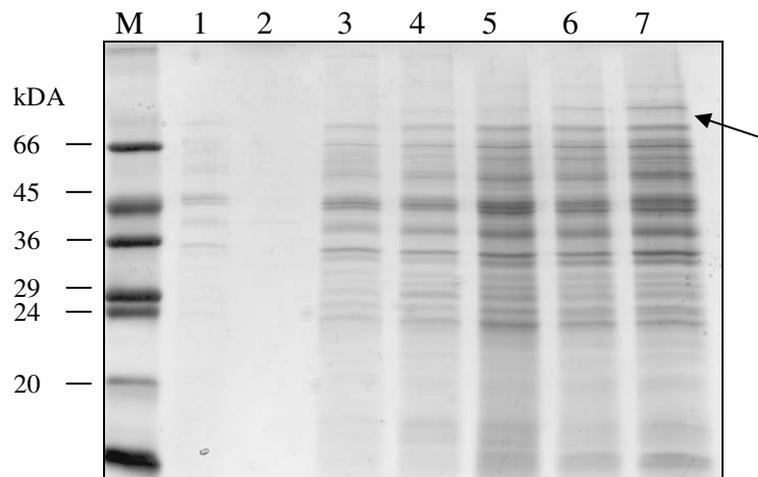
### 1.2 Expression der UGT1A1 in *Saccharomyces cerevisiae*

#### UGT1A1- pYES 2.1-Konstrukt in *Saccharomyces cerevisiae*

Das Expressionskonstrukt UGT1A1-pYES2.1 war von Simone Witte (Institut für Pharmazeutische Biologie der Philipps-Universität Marburg) hergestellt worden und wurde nun zur Transformation von Hefezellen (III.11.13.1) eingesetzt. Das Molekulargewicht der UGT1A1 liegt bei 60 kDa, durch das Anhängen des V5-Epitops müssen weitere 5 kDa addiert werden. Die Hefezellen wurden in Sc-U-Medium, anstatt des sonst verwendeten YPGE-Mediums, zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 angezogen. Das Sc-U-Medium ist ein Mangelmedium, in dem nur die Transformanten mit dem Plasmid wachsen können, was die Expression bzw.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

Aktivität maximieren soll. Dem Medium wurde zum sofortigen Start der Expression bereits Galaktose anstatt der sonst üblichen Glucose zugesetzt. Nach Inkubationszeiten von einer Stunde bis zu sieben Tagen wurden jeweils Proben entnommen und die Mikrosomenfraktion aus den Zellen gewonnen (III.11.13.4). Zur Überprüfung der Expression wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (Abb. 16).



**Abb. 16: Überprüfung der UGT1A1 Expression nach Auftrennung durch SDS-PAGE. Dargestellt sind die gewonnenen Mikrosomenpräparationen zu Beginn der Expression (Bahn 1), nach einer Stunde (Bahn 2), zweieinhalb Stunden (Bahn 3), sechs Stunden (Bahn 4), einem Tag (Bahn 5), drei Tagen (Bahn 6) und sieben Tagen (Bahn 7) Inkubation.**

Das Bandenmuster aus Zellen nach sieben Tagen Wachstum und Auftrennung durch SDS-PAGE weist eine zusätzliche Bande auf (mit Pfeil markiert), die nach 6 Stunden bereits erkennbar war, aber in der Intensität kontinuierlich zunahm. Diese Bande entspricht allerdings nicht der erwarteten Größe des UGT1A1-V5 Konstruktes. Auch mittels Western-Blot konnte eine Expression nicht eindeutig nachgewiesen werden (nicht dargestellt). In anschließenden Standardenzymtests konnte entsprechend auch keine Aktivität detektiert werden.

### UGT1A1- pYeDP60-Konstrukt in *Saccharomyces cerevisiae*

Die *UGT1A1* wurde mit der Primerkombination UGT1A1\_Bamf -UGT1A1\_Smar (siehe Anhang) in den pYeDP60-Vektor kloniert und anschließend INVSc- Zellen mit diesem Konstrukt transformiert. Bei diesem von Pompon *et al.* (1996) entwickelten Vektor handelt es sich um einen Expressionsvektor, der ebenfalls unter Kontrolle eines mit Galaktose induzierbaren Promoters steht. Es handelt sich aber im Gegensatz zu pYES2.1 um einen Hybridpromotor (GAL10-CYC1). Auch hier war nach Anzucht in YPGE-Medium und anschließender Mikrosomenpräparation der Zellen keine Glucuronosyltransferase -Aktivität nachweisbar.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Eine Coexpression von UGT1A6 in *S. cerevisiae* AH22 mit CYP1A1 (beide aus der Ratte) hatten Ikushiro *et al.* (2004) beschrieben, um den Phase I und II-Metabolismus von 7-Ethoxycoumarin (7EC) zu untersuchen. Grund war die Vermutung, dass Phase I und II Metabolismus gekoppelt ablaufen, da sie beide Prozesse in der ER-Membran lokalisiert sind. Um eine stabile Expression zu gewährleisten, wurde *UGT1A6* mittels pAUR101-Vektors ins Genom integriert. Die Expression stand unter Kontrolle eines Hefealkoholdehydrogenase I Promotors und Terminators. *CYP1A1* und NADPH-P450 Reduktase befanden sich auf einem episomalen multicopy-Plasmid(pGYR1). Der Metabolismus von 7EC zu 7-Hydroxycoumarin (7HC) und den glucuronierten Konjugaten (7GC) wurde mittels HPLC untersucht. Das Produkt 7HC entstand relativ schnell, wohingegen das Glucuronsäure-Konjugat 7GC erst nach einer lag-Phase von 2 Min detektiert werden konnte. Eine Mischung aus Mikrosomen, die P4501A1 oder UGT1A6 exprimieren, führte aber zum gleichen Testergebnis, so dass daraus geschlossen werden kann, dass keine Kopplung der Enzyme notwendig ist. Ikushiro *et al.* waren die Ersten, die eine Coexpression von UGT und P450-Monooxygenase in *S. cerevisiae* zeigen konnten bzw. bewiesen, dass funktionale UGT auch unabhängig von einem zweiten Enzym exprimiert werden kann. Die Autoren verwendeten allerdings einen anderen Vektor (pAUR101) als in dieser Arbeit, der möglicherweise für die Expression der UGT besser geeignet ist. Das könnte erklären, warum *UGT1A1* weder mit dem pYES2.1 noch mit dem pYeDP60-Vektor funktional exprimiert werden konnte. Für weitere Expressionsversuche in *S. cerevisiae* sollte deshalb ein anderer Vektor in Betracht gezogen werden.

### 1.3 Expression in *Pichia pastoris*

Da eine funktionale Expression der UGT1A1 in *S. cerevisiae* nicht gelang, wurde die Expression in *Pichia pastoris* versucht. *Pichia*-Transformanten können einerseits hohe Produktionsraten erreichen und sogar verschiedene Proteine direkt in das Medium sekretieren, zum anderen können die Zellen einfach und effektiv im Fermenter angezogen werden. Außerdem zeigt *Pichia* eine genetische Stabilität, so dass auch bei hohen Zelldichten keine Verminderung der Ausbeute eintritt (Weiss und Reiländer 2002). Im Gegensatz zu *Saccharomyces* besitzt der *Pichia*-Vektor einen AOX1-Promotor der einer sehr effizienten Regulation unterliegt. Er ist durch hohe Konzentrationen an Glucose oder anderer Kohlenstoffquellen komplett reprimierbar, wird aber durch Zugabe von Methanol aktiviert. Die Alkoholoxidase 1 (*AOX 1*) wird nach Zugabe von Methanol unter Kontrolle des AOX-Promotors transkribiert und translatiert, akkumuliert in den Peroxisomen und stellt bis zu

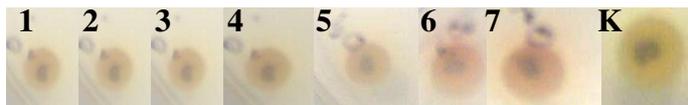
## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

30 % des Gesamtproteins dar. Das zeigt, dass es sich um einen sehr starken Promotor handelt. Da *Pichia* im Vergleich zu *Saccharomyces* eine stark reduzierte ethanolische Gärung besitzt, kommt es selbst bei sehr hohem Zelldichten nicht zur Akkumulation von toxischen Ethanolkonzentrationen (Weiss und Reiländer 2002).

Die *UGT1A1* cDNA wurde mit der Primerkombination UGT1A1\_Bamf-UGT1A1\_Bamr (siehe Anhang) in den pPIC3BLA-Vektor, zur Transformation von *Pichia*-Zellen (III.10.15.1), kloniert. Der Vorteil dieses von Smilović *et al.* (2007) entwickelten Vektorsystems besteht darin, dass *beta*-Lactamase (BLA) als Reportersystem verwendet wird und die Aktivität der BLA direkt zur Feststellung der Transformationseffizienz genutzt werden kann. Das Reportergen wird in den Genort kloniert, in den auch die *UGT1A1*-cDNA inseriert wird. Beide Enzyme werden somit proportional exprimiert (Smilović *et al.* 2007).

Nach Ausplattieren der transformierten *Pichia*-Zellen auf MD-Platten und Inkubation für zwei Tage bei 28 °C (III.10.15.1) konnten nach Zugabe der Nitrocefin-Plättchen unterschiedlich stark gefärbte Kolonien detektiert werden, die von 1-7 nummeriert wurden (Abb.17). Als Negativ-Kontrolle (K) wurde ein Nitrocefin-Plättchen auf die leere Platte gegeben. Es war zu erkennen, dass Kolonien Nr. 6 und 7 die stärkste Rotfärbung aufwiesen, Kolonie 5 nur schwach gefärbt war, die anderen dagegen fast nicht. Nach Smilović *et al.* (2007) ist die Intensität der braunen (in diesem Fall aber eher roten) Kolonien proportional zur Aktivität der BLA, wobei dunkel gefärbte Kolonien eine höhere BLA -Aktivität aufweisen als helle Kolonien.



**Abb. 17 : Einzelkolonien (1-7) von *Pichia*-Transformanten mit verschiedenen UGT1A1-pPIC3-BLA-Konstrukten (GS115-Zellen) nach Zugabe der Nitrocefin-Plättchen.**

Die mehr oder weniger stark gefärbten Kolonien wurden jeweils in BMGY Medium überführt und wie unter III.10.15.2 beschrieben weiter behandelt.

Nach Isolierung der Mikrosomen (III.10.14.4) wurden Enzymtests mit Octylgallat als Substrat und UDP-[U-<sup>14</sup>C]Glucuronsäure (100000 dpm) durchgeführt.

Nur mit Kolonie Nr.6 konnte mittels Scintillationszähler schwache Aktivität (1000 dpm) nachgewiesen werden, was einer sehr geringen Umsatzrate von ca. 1 % entspricht. Nach Auftrennung durch DC (Abb.18) war eine schwache Bande detektierbar, deren R<sub>F</sub>-Wert dem Hauptprodukt der käuflichen UGT1A1 (Sigma) aus dem Substrat Octylgallat entsprach.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---



**Abb. 18: Aktivitätstest von Mikrosomen aus UGT1A1 transformierten *P. pastoris* Zellen (Kolonie Nr. 6). Die Mikrosomen wurden mit Octylgallat und UDP-[U-<sup>14</sup>C]-Glucuronsäure inkubiert und das Produkt durch DC auf Zellulose in CAW identifiziert.**

Diese Umsatzrate war leider viel zu gering für die Gewinnung größerer Mengen an glucuronidierten Verbindungen. Mit Flavonoiden (Kämpferol, Luteolin, Apigenin, Quercetin, Genistein, Daidzein und Xanthohumol) als Substrat konnte weder im Scintillationszähler noch nach DC Umsatz detektiert werden (nicht dargestellt). Auch Änderungen der Inkubationsbedingungen (Änderung der Substrat- und Proteinmengen und Inkubationszeiten) und Biotransformationsexperimente (mit Octylgallat und UDP-Glucuronsäure als Substrat, Inkubation bis zu 5 Tage) brachten nicht den gewünschten Erfolg. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Expression grundsätzlich möglich ist, für die Zwecke einer Substratsynthese aber zu schwach ausfällt.

Die Expression von humaner UGT1A6, Mutanten und Wildtyp, in *Pichia pastoris* wurde von Ouzzine *et al.* (2000) beschrieben. Es wurde vermutet, dass Histidin eine Schlüsselrolle in der Glucuronidierung spielt, und die Funktion von His<sup>38</sup>, His<sup>361</sup>, His<sup>370</sup> und His<sup>485</sup> mit 4-Methylumbelliferon als Reportersubstrat überprüft. Demnach ist eine Expression in *P. pastoris* prinzipiell möglich. Im Unterschied zu den eigenen Versuchen isolierten die Autoren die Mikrosomen durch Ultrazentrifugation, was im Falle von Pflanzen meist bessere Ergebnisse liefert. So beschreiben beispielsweise Menting *et al.* (1994), dass die Mikrosomen aus Ultrazentrifugation von Petunie-Extrakt drei- bis vierfach mehr Protein enthalten als diejenigen aus MgCl<sub>2</sub>-Fällung. Deshalb sollte in Zukunft die Ultrazentrifugation zur Gewinnung rekombinanter UGT1A1 aus *Pichia* in Betracht gezogen werden.

Möglicherweise könnte auch in einem anderen Vektor (z.B. picZ) die Expressionrate erhöht werden.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

### 1.4 Expression in *Nicotiana benthamiana*

Da die Expression der UDP-Glucuronosyltransferase in *Saccharomyces* oder *Pichia* unbefriedigend war, wurde *Nicotiana benthamiana* (Solanaceae) als weiteres Expressionssystem getestet. *Nicotiana benthamiana* bietet im Vergleich zu *N. tabacum* den Vorteil von kleinerem Wuchs und kürzerem Lebenszyklus (Santos del Blanco 2006).

Pflanzen lassen sich außerdem kostengünstig anziehen, in großer Fläche anbauen und das plastidäre Genom kann für hohe Effizienz der Proteinproduktion transformiert werden. Im Falle von Glykoproteinen unterscheidet sich zwar die Glykanstruktur von Tieren und Pflanzen, aber im Vergleich zu Hefen sind die der Pflanzen dem tierischen System ähnlicher (Larrick und Thomas 2001, Santos del Blanco 2006).

Das gramnegative Bakterium *Agrobacterium tumefaciens* verursacht in Pflanzen Wurzelhalsgallentumore. Die infizierten Zellen produzieren Aminosäure-ähnliche Opine (z.B. Nopaline, Octopine und Mannopine), die nur von den Bakterien genutzt werden können. Die Information zur Opin-Produktion ist auf einem Tumorinduzierenden Plasmid (Ti) kodiert, von dem ein Segment, die T-(transferred) DNA mit den Opine-Genen in das Wirtsgenom integriert wird. Die T-DNA wird flankiert von 25 bp „direct repeats“. Ein großer Teil der DNA zwischen den „direct repeats“ kann entfernt und durch beliebige DNA ersetzt werden, die dann vom Bakterium in die Pflanze eingebracht wird (Gelvin 2003, Santos del Blanco 2006). Für die Übertragung der T-DNA sind *vir*-Gene erforderlich, die auf einem separaten Plasmid lokalisiert sein können (binäre Systeme). Diese binären Vektoren enthalten neben der T-DNA die von den sog. left border (LB) und right border (RB)-Sequenzen flankiert wird, Selektionsmarker, die für Antibiotika-Resistenzen kodieren (meist Kanamycin) und haben den Vorteil, dass sie sowohl in *E. coli* als auch in *Agrobacterium* repliziert werden können. In den binären Vektoren wird die Tatsache genutzt, dass die *vir* Region des Ti Plasmids *in trans* mit der T-DNA arbeiten kann und somit zwei Sequenzen in separaten Replikons lokalisiert sein können. Ein Replikon beinhaltet das sog. disarmed Ti-Plasmid, bei dem die Tumor induzierenden Eigenschaften eliminiert wurden, den „*vir* Helfer“, der die *vir* Gene aber keine oder leere T-DNA beinhaltet und in das Genom des *Agrobacterium* integriert werden kann. Das zweite Replikon enthält die T-DNA.

Phenolische Verbindungen aus der Wirtspflanze (z.B. Acetosyringon) induzieren die Expression der *vir*-Gene und die Übertragung der T-DNA.

Der in dieser Arbeit verwendete *Agrobacterium*-Stamm C58 enthält die geklusterten Gene *virA*, *virB*, *virC*, *virD* und *virE*. Der Stamm beinhaltet ein zirkuläres und ein lineares Chromosom, daneben zwei Plasmide von denen eines das Ti-Plasmid ist (Wood *et al.* 2001,

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Santos del Blanco 2006). Die Infektion erfolgte durch sog. Agroinfiltration, indem die Bakteriensuspension mit virulenzinduzierenden Chemikalien direkt in die Interzellularräume der Blätter gespritzt wird. Dort sind die Agrobakterien in der Lage, fast jede Zelle zu infizieren (Kapila *et al.* 1997, Johansen und Carrington 2001, Santos del Blanco 2006). Die Aktivität des exprimierten Proteins kann schon nach kurzer Zeit gemessen werden (Santos del Blanco 2006). Die Agroinfiltration dient normalerweise zur Prüfung der Stabilität der transformierten Pflanzen und liefert nur kleinere Proteinmengen. Es wurden aber auch schon Methoden entwickelt, um mehrere 100 Milligramm Protein pro Woche zu erhalten (Fischer *et al.* 2004).

Humane *UGT1A1* wurde aus dem Konstrukt UGT1A1-pYES2.1 mit Hind III und BamHI herausgeschnitten und in den pE1801-Vektor kloniert. Nach positiver Restriktionsanalyse und Sequenzierung wurden die Agrobakterien mit dem Konstrukt durch Elektroporation transformiert (siehe III.10.15.1) auf LB-Platten angezogen und für die Infiltration von *Nicotiana* vorbereitet (III.10.15.2). Die Agrobakterien enthielten zusätzlich das Reportergen für Luciferase und einen Suppressor für Gensilencing, das p19-Protein des Tomato Stunt Bushy Virus (TSBV).

Dabei wurden folgende Konstrukte verwendet:

- 1: Disarmed Ti Plasmid, CaMV35S – *virG* – *virE*, Superpromoter-TEV-; Luciferase
- 2: Disarmed Ti Plasmid, CaMV35S – *virG* – *virE*, p19
- 3: Disarmed Ti Plasmid, CaMV35S – *virG* – *virE*, UGT1A1

Diese 3 Konstrukte wurden folgendermaßen kombiniert und nach einer Inkubationszeit von drei Stunden bei RT infiltriert:

Transformationsversuche:

- I: Mischung aus 1, 2 und 3 im Verhältnis 1:1:1
- II: Mischung aus 1 und 2 im Verhältnis 1:1
- III: Mischung aus 1 und 3 im Verhältnis 1:1
- IV: Mischung aus 1, 2 und 3 im Verhältnis 1:1:2
- V: Mischung aus 1, 2 und 3 im Verhältnis 2:1:1
- VI: Mischung aus 1 und 2 im Verhältnis 2:1
- VII: nur MES-Lösung
- K: nicht infiltrierte Blätter

Nach 2, 5, 8 und 16 Tagen wurde Blattmaterial gewonnen und wie unter III.10.15.3 beschrieben für Luciferase (Tab. 1)- und UGT-Tests aufgearbeitet.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

**Tab. 1: Luciferase-Aktivität der Extrakte aus verschiedenen transformierten *N. benthamiana* Blättern. Die Aktivität wurde in RLU (relative light units) /mg Blattmaterial gemessen.**

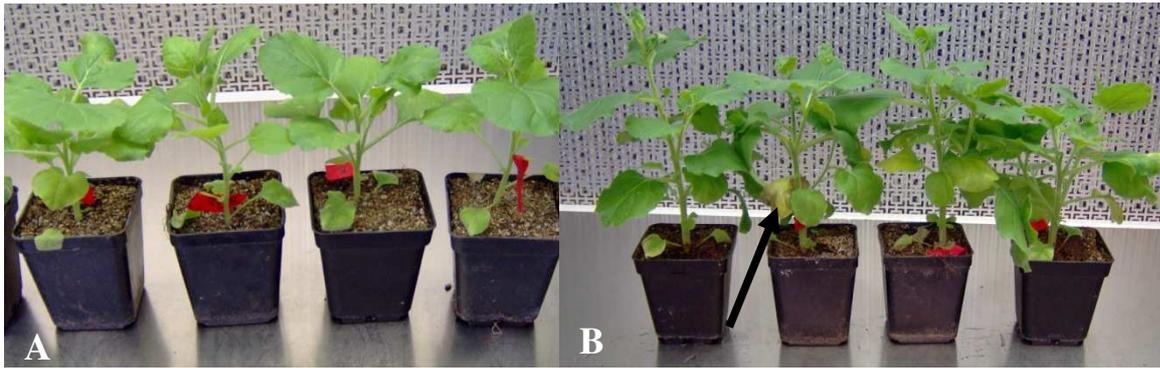
<b>Transformations- versuche</b>	<b>Tag 2</b>	<b>Tag 5</b>	<b>Tag 8</b>	<b>Tag 16</b>
<b>I</b>	170	1290	2500	1420
<b>II</b>	10	170	2000	1210
<b>III</b>	0	0	0	0
<b>IV</b>	70	160	270	940
<b>V</b>	50	450	2490	7150
<b>VI</b>	70	30	670	8530
<b>VII</b>	0	0	0	0
<b>K</b>	0	0	0	0

In allen Kombinationen war mit Ausnahme der Kontrollen III (ohne Luciferase-Gen), VII (nur MES-Lösung) und K (nur "leeres" Blattmaterial) Luciferase-Aktivität nachweisbar, die in jeweils bis Tag 8 nach Infiltration zunahm, bei IV-VI sogar bis zum 16. Tag, wobei im Versuch VI sich die Aktivität von Tag 8 auf Tag 16 vervielfachte (Faktor 18). Die späte, deutliche Zunahme an Aktivität der Luciferase in Versuch VI, aber auch Versuch V, ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass in beiden Fällen der Anteil an Luciferase in der jeweiligen Kombination im Vergleich zu den anderen Bestandteilen doppelt so hoch war (Mischungsverhältnis von 2:1 siehe vorher). Konstrukt IV erreicht insgesamt nur niedrige Werte im Vergleich zu den anderen Kombinationen. Konstrukt I zeigt anfänglich (bis Tag 5) im Vergleich zu II, welches keine UGT aber die anderen Bestandteile in der gleichen Konzentration enthält, höhere Aktivität, ab Tag 8 befinden sich beide auf einem ähnlichen Niveau

Zur Überprüfung der Expression wurden die gewonnen Proteinfractionen durch SDS-PAGE (III.11.5) aufgetrennt und im Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (nicht dargestellt). Eine Expression konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Keiner der Blattextrakte zeigte im Test UDP-Glucuronosyltransferaseaktivität. Auch Tests mit Mikrosomenfraktionen (III.10.15.3) lieferten keine Umsätze.

## IV. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 19: *N. benthamiana* Pflanzen 5 (A) und 16 Tage (B) nach Infiltration. Ein gelbes Blatt nach Infiltration mit *UGT1A1*-Konstrukt ist mit Pfeil gekennzeichnet.**

Nach 16 Tagen konnten keine weiteren Proben gewonnen werden, da das mit UGT infiltrierte Blattmaterial sich zunehmend gelb färbte und von der Pflanze abfiel. Blätter der infiltrierten Kontrollpflanzen (ohne UGT-Konstrukt) blieben dagegen grün (Abb. 19).

Sowohl Glucuronsäure als auch Xylulose sind Bestandteil der Zellwand, welche beide von der *UGT1A1* metabolisiert werden können (Mohnen 2008, Tukey und Strassburg 2000). Da sich nur die mit UGT-Konstrukten infiltrierten Blätter verfärbten, würde darauf hinweisen, dass das heterologe Protein möglicherweise trotz nicht nachgewiesener Expression und Aktivität exprimiert wird. Der Aufbau der Zellwand wäre dann durch Verbrauch von Glucuronsäure und Xylose negativ beeinflusst und die Blätter verfärben sich gelb.

Gelbfärbung der Blätter, infolge eines Eingriffs in den Zuckerstoffwechsel, ist aus der Literatur bekannt. So haben Ahn *et al.* (2006) für ein rekombinantes NbAXS1 Enzym *in vitro* eine UDP-D-apiose/UDP-D-xylose-Synthase-Aktivität nachgewiesen. Die so genannte UDP-D-apiose/UDP-D-xylose-Synthase katalysiert die Umwandlung von UDP-D-glucuronat zu UDP-D-apiose und UDP-D-xylose. Virus induziertes Gen-silencing (VIGS) des Gens *NbAXS1* in *Nicotiana benthamiana* führt zu Wachstumsstopp und Gelbfärbung der Blätter verbunden mit Zelltodsymptomen. Weiterhin zeigten die Blätter abnormale Zellwandstrukturen wie verdickte Zellwände, Lücken in den Wänden und hohe Anlagerung an Stärke (Ahn *et al.* 2006). Die Mutanten enthielten signifikant geringere Mengen an D-Apiose, 2-O-Methyl-L-fucose und 2-O-Methyl-D-xylose, die als Marker für die Seitenketten des Rhamnogalakturonan II (RG II) dienen. RG II ist neben Rhamnogalakturonan I (RG I) und Homogalakturonanen (HG's) ein Bestandteil des Pektins, welches in primären Zellwänden von dicotylen und monokotylen Pflanzen vorkommt (Iwai *et al.* 2002, Ahn *et al.* 2006, Mohnen 2008).

Ähnliche Beobachtungen zu verfärbten Blättern konnten Iwai *et al.* (2002) machen. Die Autoren stellten eine Mutante nolac-H18 (nonorganogenic callus with loosely attached cells)

## IV. Ergebnisse und Diskussion

in Blattkulturen von haploiden *Nicotiana plumbaginifolia* mit T-DNA Transformation her, mit der sie beweisen konnten, dass eine Pectin-Glucuronosyltransferase essentiell für interzelluläre Anhaftung in Pflanzenmeristem und Gewebe ist. Das Gen, welches mit T-DNA verbunden ist, wird als *NpGUT1* (Glucuronosyltransferase 1) bezeichnet und wird in Spross- und Wurzel-Apikalmeristem exprimiert. Die Mutation verursacht Defekte in der Glucuronsäure des RG II in Pektin, was die Bildung der Borat-Verbindung in RG II drastisch reduziert. Bei starker Expression des antisense *NpGUT1* waren die Spross-Entwicklung und das „intercellular attachment“ dramatisch vermindert und die Blätter wurden blass. Beide Veröffentlichungen schreiben der UDP-Glucuronsäure im Aufbau der pflanzlichen Zellwand eine bedeutsame Rolle zu. Ist der Einbau der Glucuronsäure und der Aufbau der Zellwand gestört, verfärben sich die Blätter. *NpGUT1* weist außerdem Sequenzähnlichkeiten zu einer humanen Glucuronosyltransferase (*EXT2*, Heparansulfatsynthase, Acc.No. AAB62718) auf (Iwai *et al.* 2002), was auch dafür sprechen würde, dass es sich bei der UGT1A1 und *NpGUT1* um konkurrierende Enzyme mit ähnlichen Substratspezifitäten handeln könnte. Ein Ausschnitt des Alignments der UGT1A1 mit *NpGUT1* und der Substratbindestelle von *EXT2* ist in Abb. 20 dargestellt und zeigt, dass durchaus auch zwischen diesen drei Sequenzen Ähnlichkeiten gefunden werden können.

```
EXT2          VRKRCHKHQVFDYPQVLQEATFCVVLRGARLGQAVLSDV-----LQAGCVPVVIADS 347
NpGUT1       T-----EHPTTYEDMQRAIFCLCPLGWAPWSPRLVEA-----VIFGCIPVIIADD 236
UGT1A1       SDFVKDYPRPIMPNMVFGVINCLHQNPLSQEFAYINASGEHGIVVFSLSGMVSEIPEK 317
              :           : . * :           : . * : : * : :
EXT2          YILPFSEVLWDKRAVSVVPEE-----KMSDVYSILQSIPQRQIEEMQRQLFMEFVRRENW 402
NpGUT1       IVLPFADAIPWEDIGVFVAEK-----DVPNLDTILTSIPPEEILRKQRLLANP----- 284
UGT1A1       KAMAIADALGKIPQTVLWRYTGTRPSNLANNTILVKWLPQNDLLGHPMTRAFITHAGSHG 377
              : : : : : * .           : : : : : * : : :
```

**Abb. 20: Alignment von UGT1A1, NpGUT1 und EXT2 Sequenzabschnitten. Übereinstimmungen wurden mit einem Stern, konservativer Austausch mit Doppelpunkt, semikonservativer Austausch mit Punkt gekennzeichnet, Sequenzübereinstimmungen von NpGUT1 und UGT1 wurden zusätzlich fett markiert.**

Eine Erklärung, für die fehlende UGT-Aktivität wäre, dass die Expression zu diesem Zeitpunkt aber möglicherweise noch zu gering war. Eine Anreicherung der Mikrosomen mittels Ultrazentrifugation könnte eventuell dieses Problem lösen. Längere Inkubationszeiten der Pflanzen sind auch nicht möglich, da nach 16 Tagen keine infiltrierten lebenden Blätter mehr vorhanden waren. Bis jetzt ist noch keine Expression einer humanen Glucuronosyltransferase in Tabak oder anderen Pflanzen beschrieben worden, weswegen keine relevanten Vergleiche möglich sind.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

So ist abschließend festzustellen, dass ein funktionierendes System für den Test von (käuflicher) UDP-Glucuronosyltransferase mit verschiedenen Flavonoiden als Substrat etabliert werden konnte, eine Expression in *Nicotiana benthamiana* ebenso wie in *S. cerevisiae* aber nicht erfolgreich war. Für weitere Versuche zur Gewinnung glucuronierter Flavonoide sollte die Expression der UGT1A1 in *Pichia* in Betracht gezogen werden. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist UGT1A1 in diesem System, wenn auch nur schwach, zu exprimieren. Aus Zeitgründen war es nicht mehr möglich, die Expressionsbedingungen noch weiter zu optimieren. Für weitere Optimierungsversuche sollte möglicherweise auch die Verwendung eines anderen Vektors getestet werden, so ist beispielsweise eine erfolgreiche Expression von UGT in *Pichia* mit Verwendung des pPICZ - Vektors beschrieben (Ouzzine *et al.* 2000). Generell sollte dann auch die sog. "codon usage" bedacht werden. Verschiedene Organismen verwenden unterschiedlich häufig Codons des degenerierten Codes, was der t-RNA-Verteilung in der Zelle entspricht. So könnte die Expression möglicherweise durch Verwendung der für *P. pastoris* (oder für *S. cerevisiae*) geläufigeren Codes gesteigert werden. Mit Hilfe des Internetprogramms: [www.gcu.schoedl.de](http://www.gcu.schoedl.de) können die Übereinstimmungen der Triplet-Verwendung verschiedener Organismen verglichen werden. So wird beispielsweise das in der menschlichen *UGT1A1* verwendete Triplet CGG für Arginin in *P. pastoris* nur zu 10 % favorisiert, AGA zeigt dagegen eine Übereinstimmung von 100 %. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei *S. cerevisiae*: dieser Organismus hat Präferenzen für AGA (100 %) im Gegensatz zu CGG (8 %) für Arginin. So könnte durch die Verwendung des jeweiligen favorisierten Triplets für Arginin möglicherweise die Expression erhöht werden, was aber weiterer Untersuchungen bedarf.

Mittlerweile sind aber auch pflanzliche UGTn erfolgreich in *E. coli* exprimiert worden. So konnten Noguchi *et al.* (2009) eine Flavonoid 7-O-glucuronosyltransferases (F7GAT) in den Expressionsvektor pET15b klonieren und in *E. coli* funktionell exprimieren. Dieses Enzym ist in der Lage z.B. Apigenin zu glucuronidieren. Des Weiteren ist eine Glucuronosyltransferase aus *Bellis perennis* bekannt, die ebenfalls in *E. coli* exprimiert werden kann und als Substrate Cyanidin- und Delphinidin-3-O-glucosid akzeptiert (Osmani *et al.* 2008). Für weitere Versuche glucuronidierte Flavonoide herzustellen, sollte also auch dieses System in Betracht gezogen werden.

### IV.2 Herstellung von Isoflavonen

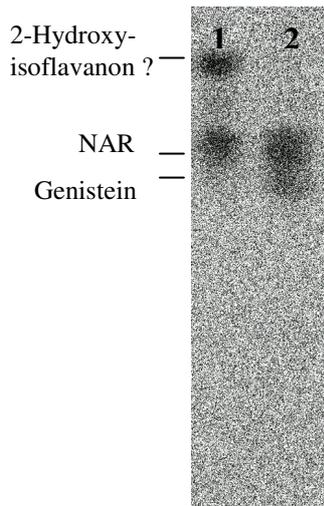
#### 2.1 Herstellung eines Doppelkonstruktes von Isoflavonsynthase und 2-Hydroxyisoflavanondehydratase

Die Bildung von Isoflavonen aus (2*S*)-Naringenin wird in zwei Schritten katalysiert durch IFS und HID (Abb. 4). Zur Gewinnung größerer Mengen, sollten beide Gene in einem Doppelkonstrukt in *S. cerevisiae* exprimiert werden. Konstrukte der *IFS1* aus *G. max* (Jung *et al.* 2000) in pBluescript und der *HIDH*, ebenfalls aus *G. max* (Akashi *et al.* 2005) in pET28a standen zur Verfügung. Die *HIDH* aus *G. max* wurde dem ebenfalls verfügbaren *HID*-Konstrukt aus *Glycyrrhiza echinata* (*HIDM*) vorgezogen, da die *HIDH* eine breitere Substratspezifität aufweist. *HIDM* ist spezifisch für 2,7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavan, wohingegen die *HIDH* sowohl 4'-hydroxylierte als auch 4'-methoxylierte 2-Hydroxyisoflavanone metabolisieren kann (Akashi *et al.* 2005).

Mithilfe der Primerkombination *GMIFS\_H* und *GMIFS\_R* wurde die *IFS1* cDNA aus *IFS1*-pBluescript amplifiziert, das Produkt in den pYES2.1-Expressionsvektor kloniert und in TOP10-Zellen überführt. Nach Kontrolle durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung wurde das neue Konstrukt in *S. cerevisiae* überexprimiert. Die Mikrosomenfraktion aus den Zellen (III.10.13.4) in 0,1 M KPi-Puffer (pH 6,5) wurde mit 5000 dpm <sup>14</sup>C-NAR (45 pmol) als Substrat und NADPH als Cosubstrat auf Aktivität getestet. Zusätzlich wurde einer zweiten Inkubation *HIDH* zugegeben, die zuvor in BL21-Zellen exprimiert und aus den Zellen gewonnen worden war (III.10.12). Die Inkubationen wurden durch Extraktion (Ethylacetat) beendet, und die Extrakte durch DC in 30 %-iger Essigsäure aufgetrennt und anschließend mittels Phosphor-Imager analysiert (Abb. 21). Ohne Zugabe von *HIDH* entsteht ein Produkt (Bahn 1), das bei Inkubation in Gegenwart von *HIDH* (Bahn 2) fehlt, während ein neues Produkt auftaucht, das durch Co-Chromatographie mit authentischer Referenz als Genistein identifiziert wurde. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich beim Produkt in Bahn 1 um das Zwischenprodukt 2-Hydroxyisoflavanon handelt, was aber ohne Referenzsubstanz nicht verifiziert werden konnte.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

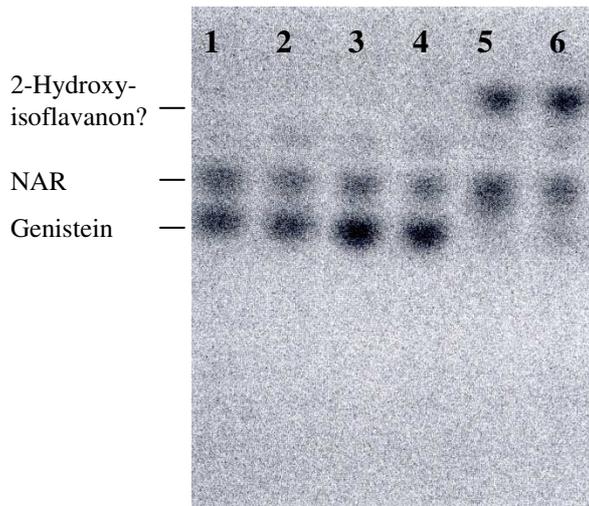


**Abb. 21:** Umsetzung von  $^{14}$  C-NAR mit rekombinanter IFS1 (Bahn 1) oder IFS1 und HIDH (Bahn 2) in Gegenwart von NADPH. Die Inkubationen wurden auf Zellulose-Dünnschichtchromatographie in 30%-iger Essigsäure aufgetrennt und im BioImager analysiert.

Da die separat exprimierten Enzyme aktiv waren, sollte nun ein Doppelkonstrukt zur Expression in *S. cerevisiae* hergestellt werden. Dazu wurde *HIDH* mit den beiden Restriktionsenzymen *Xba*I und *Xho*I aus dem pET28a-Konstrukt geschnitten und in den p423-GPD-Vektor kloniert. Für diese Untersuchung wurde der Vektor p423-GPD (Abb. 55, Mumberg *et al.* 1995) gewählt, der den relativ starken Promotor Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GPD) und Auxotrophie für die Aminosäure Histidin besitzt, um für spätere Doppeltransformation einen alternativen Selektionsmarker zu Uracil (Auxotrophie auf pYES2.1) zu haben.

*S. cerevisiae*-Zellen wurden mit dem *HIDH*-p423GPD-Konstrukt transformiert und lösliche Zellextrakte auf Aktivität getestet. Nachdem der Enzymtest positiv ausfiel (nicht dargestellt), wurde eine Doppeltransformation von *S. cerevisiae* mit *IFS1*-pYES2.1 und *HIDH*-p423-GPD durchgeführt. Kompetente *INVSc*-Zellen, die bereits das Konstrukt der *IFS1* enthielten (III.10.13.1), wurden mit dem *HIDH*-Konstrukt transformiert, auf Sc-U-His-Medium plattiert und angezogen. Einzelkolonien wurden, zur Inokulation von YPGE-Medium, in Sc-U-His-Medium angezogen, induziert und anschließend lösliche Extrakte und Mikrosomenfraktion gewonnen, da es sich bei der *HIDH* um ein lösliches Protein (Akashi *et al.* 2005), bei der *IFS1* aber um ein mikrosomal gebundenes Enzym handelt (Akashi *et al.* 1999, Steele *et al.* 1999). Die Überprüfung der Aktivität (Abb. 22) zeigt, dass sowohl der lösliche Extrakt als auch die Mikrosomen NAR zum Genistein umwandelten (Abb. 22, Bahn 1/2 und 3/4). Zum Vergleich wurde wieder ein Enzymtest nur mit rekombinanter IFS durchgeführt. Das Ergebnis entsprach den Erwartungen insoweit, dass dann wieder nur das Zwischenprodukt (2-Hydroxyisoflavanon?) entstand (Bahn 5/6). Die Herstellung des Doppelkonstruktes war also erfolgreich.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

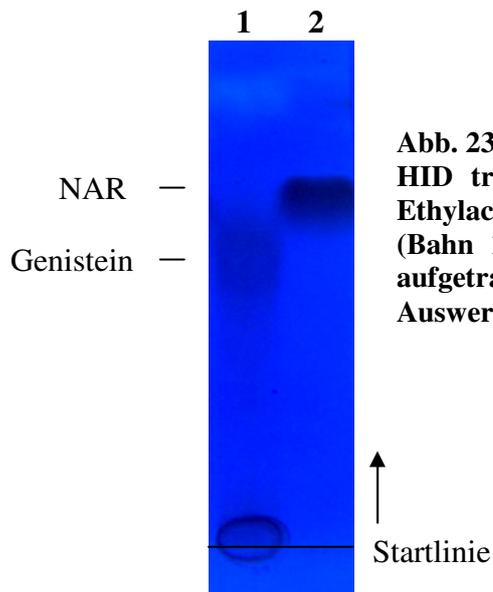


**Abb. 22:** Umsetzung von  $^{14}\text{C}$ -NAR mit rekombinanter IFS1 und HIDH aus löslichem Extrakt (Bahn 1/2), IFS1 und HIDH aus Mikrosomenfraktion (Bahn 3/4) oder nur IFS1 aus löslichem Extrakt (Bahn 5/6) in Gegenwart von NADPH. Die Inkubationen wurden auf Zellulosplatten in 30%-iger Essigsäure aufgetrennt und im BioImager analysiert.

### 2.2 Biotransformationsexperimente

Um möglicherweise größere Ausbeuten an Isoflavonen erzielen zu können, wurden Biotransformationsversuche mit dem Doppelkonstrukt IFS1/HIDH durchgeführt. Dazu wurden Kulturen des Konstruktes (IV.2.1) mit YPGE-Medium und Sc-U-His-Medium angelegt. Zu 50 mL induzierter Kultur wurden 20 mg NAR gegeben und für mehrere Tage inkubiert. Überraschenderweise war selbst nach fünf Tagen keine Umsetzung zum Genistein erkennbar. Nach der erfolgreichen Expression in den vorangegangenen Experimenten kann ausgeschlossen werden, dass die beiden Enzyme nicht exprimiert waren. Neben der Biotransformation im YPGE-Vollmedium, wurde auch die Transformation im Mangelmedium versucht. Damit wird vermieden, dass ein Konstrukt wieder aus den Zellen ausgeschleust werden kann, bzw. können diese Zellen dann nicht oder nur sehr schlecht wachsen. Akashi *et al.* (1999) haben beschrieben, dass bei Umsetzungen mit der IFS die Zugabe von Säure die Produktausbeute, im beschriebenen Fall ausgehend vom Liquiritigenin zu Daidzein, deutlich erhöht. Dies beruht auf der Wasserabspaltung unter Säurekatalyse. Den extrahierten Biotransformationsproben wurde deshalb HCl zugesetzt und unter diesen Bedingungen war das Produkt Genistein nachweisbar (Abb. 23, bestätigt durch Co-Chromatographie mit authentischen Referenzen, nicht dargestellt).

## IV. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 23: Biotransformation von (2S)-Naringenin in IFS und HID transformierten Hefekulturen nach Extraktion mit Ethylacetat (Bahn 2) und anschließender Säurezugabe (Bahn 1). Die Extraktionen wurden auf Zelluloseplatten aufgetragen und in 30%-iger Essigsäure aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht.**

So ist festzustellen, dass die Herstellung eines Doppelkonstruktes IFS1/HIDH für präparative Zwecke ungeeignet zu sein scheint. In Biotransformationen konnte nur durch anschließende Säurezugabe das entsprechende Produkt detektiert werden.

Allerdings können aus dem Hefestamm, der beide Proteine exprimiert, IFS1 und HIDH gemeinsam gewonnen und anschließend für Enzymtests verwendet werden, was z.B. für die Synthese von  $^{14}\text{C}$ -Isoflavanonen gut geeignet wäre. Ausgehend von diesem Doppelkonstrukt könnten so weitere Konstrukte erstellt werden. Beispielsweise könnte die D7OMT zusätzlich auf einem dritten Plasmid mit einer anderen Auxotrophie in das Doppelkonstrukt gebracht werden und so z.B. ausgehend vom Liquiritigenin über das Zwischenprodukt Daidzein das pharmazeutisch interessante Isoformononetin hergestellt werden.

Neben den hier beschriebenen Methoden in Hefesystemen wurde in verschiedenen Arbeitsgruppen auch versucht, die Isoflavone in Pflanzen anzureichern. So wurde die IFS der Sojabohne schon in vielen Nicht-Leguminosen so z.B. in der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana* L., Brassicaceae), Mais (*Zea mays* L., Poaceae), Reis (*Oryza sativa* L., Poaceae) oder auch Tabak (*Nicotiana tabacum* L., Solanaceae) exprimiert, und war dort auch in der Lage zusammen mit endogenen Proteinen nicht nur Genistein sondern auch modifizierte Produkte, wie z.B. Genistin und/oder auch 6''-Malonylgenistin zu produzieren (Jung *et al.* 2000, 2003, Sreevidya *et al.* 2006). Kürzlich konnten Shih *et al.* (2008) Genistein auch durch Überexpression der IFS in transgenen Tomaten gewinnen. Die Autoren überexprimierten nur die IFS ohne zusätzlich die HID zu exprimieren. Die Wasserabspaltung zur Bildung der Isoflavone kann aber, neben der katalysierten Reaktion, auch spontan erfolgen (Akashi *et al.* 2005, Davies und Schwinn 2006), was dann die beschriebene Produktbildung erklärt.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

So sollte für weitere Versuche zur Gewinnung von Isoflavonoiden auch in Betracht gezogen werden, diese präparativ aus Pflanzen zu gewinnen. Allerdings sollte dabei bedacht werden, dass hier sicherlich mehr Nebenprodukte zu erwarten sind als im Hefesystem.

### IV.3 Herstellung von radioaktiv-markierten Flavonoiden

Radioaktiv-markierte Flavonoide (Naringenin, Dihydrokämpferol, Dihydroquercetin, Eriodictyol, Kämpferol und Luteolin) können aus 2-[<sup>14</sup>C]Malonyl-CoA und Cumaroyl-CoA hergestellt werden. Inkubationsbedingungen für die dazu notwendigen Enzyme sind jeweils in der Literatur beschrieben. Für gemischte Inkubation mit mehreren Enzymen (CHS, FNS I, FHT und F3'H) müssten allerdings die pH- und Temperaturbedingungen neu festgelegt werden. Die Bestimmung des pH-Optimums wurde jeweils mit den häufig verwendeten Tris/HCl und KPi- Puffern und mit Britton-Robinson-Puffer II (III.2.7) zur Abdeckung eines größeren pH-Bereiches durchgeführt. Die Auswertung für die CHS erfolgte im Scintillationszähler, für alle anderen Enzyme nach DC und Autoradiographie. Zugabe der jeweiligen Cofaktoren und allgemeine Inkubationsbedingungen wurden, wie in Kapitel III beschrieben, gehandhabt. Für alle Tests wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

#### 3.1 Inkubation mit Chalkonsynthase

Für die Umsetzung mit CHS erscheint der Britton-Robinson-Puffer am besten geeignet und erreichte zwei Maxima bei pH 6,0 bzw. pH 8-9. Bei Ermittlung des Temperaturoptimums zeigte sich die CHS bei Temperaturen von 37 °C bis zur höchsten getesteten Temperatur von 60 °C als relativ stabil (nicht dargestellt).

Die Temperaturangaben in der Literatur variieren zwischen 30 °C (Kumar und Ellis 2003) und 37 °C (Fliegmann *et al.* 1992). Auch die verwendeten Puffer waren verschieden. So kam entweder Kpi (pH 8,0 bzw. 7,0, Schroeder *et al.* 1979, Spribille und Forkmann 1982) oder HEPES-Puffer zum Einsatz (50 mM, pH 7,5, Kumar und Ellis 2003). Bei Fliegmann *et al.* (1992) wurde die Aktivität ebenfalls in 50 mM HEPES-KOH-Puffer (pH 7,0) gestartet, dem zusätzlich 1 mM EDTA zugesetzt wurde. Nach 10 - 20 min Inkubation fügten sie der Reaktion Tris/HCl- oder HEPES-KOH-Puffer (pH 8,0) zu, um die Chalkone in die Flavanone zur besseren Detektierbarkeit zu überführen. Die Ergebnisse wurden bei dieser Autorengruppe per DC ausgewertet, da sie parallel zur CHS auch die Aktivität einer Stilbensynthase (STS) testeten. Die entstandenen Flavonoide konnten so besser von den Stilbenen unterschieden werden, als es auf der Stufe der Chalkone möglich gewesen wäre. Auf Zugabe eines zweiten Puffers zum Reaktionsansatz wurde in den hier beschriebenen Versuchen verzichtet, die

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Reaktion wurde pro Ansatz nur in einem Puffer durchgeführt. Nach eigenen Untersuchungen scheint der von Fliegmann *et al.* (1992) gewählte Anfangs-pH-Wert von 7,0 als nur bedingt geeignet, wobei aber in dieser Versuchsreihe kein HEPES-Puffer verwendet wurde. Außerdem ist anzumerken, dass es sich bei Bestimmung der Optimalbedingungen für pH und Temperatur nur um Richtwerte handelt, da aufgrund mangelnder markierter Substrate auf eine Bestimmung im Sättigungsbereich verzichtet werden musste. Dennoch waren Tendenzen erkennbar, so dass weitere CHS-Tests bei einem pH-Wert von 8-9 und einer Inkubationstemperatur von 37 °C durchgeführt wurden.

### 3.2 Inkubation mit Flavonoid 3'-Hydroxylase

Verschiedene mit F3'H transformierte Hefestämme standen zur Verfügung. Dabei stammten die F3'Hn aus folgenden Pflanzen: *Osteospermum* L. (Kopfkörbchen, Asteraceae) Klon 1 und Klon 11, *Gerbera* L. (Asteraceae) Klon 1, 8 und 9, *Echinops bannaticus* Rochel ex Schrader (Kugeldistel, Asteraceae) Klon 1 und Klon 6 und ein Klon von *Centaurea* L. (Flockenblume, Asteraceae) Sämtliche Klone wurden von Dr. Christian Seitz, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau, Technische Universität München, zur Verfügung gestellt (Seitz *et al.* 2006). Zur Auswahl des aktivsten Klons wurde die jeweilige Mikrosomenfraktion des rekombinaten Enzyms (150 µg) auf ihre F3'H Aktivität überprüft. Die Auswertung am Phosphorimager zeigte die höchste Aktivität für die beiden Echinops-Klone und den Osteospermum Klon 11 (nicht dargestellt). Für weitere Analysen wurde somit der Echinops Klon Nr. 1 verwendet.

Sämtliche F3'Hn zeigten bei pH 7,0 in allen Puffern die besten Umsätze, wobei in Britton-Robinson-Puffer der höchste Wert erzielt wurde. Von 20-30 °C änderte sich die F3'H Aktivität kaum, dagegen fiel sie ab 30 °C deutlich ab, weshalb eine höhere Temperatur vermieden werden sollte.

Stotz *et al.* (1985) inkubierten die F3'H aus *Petunia hybrida* bei 30 °C und in KPi (pH 7,5), was den hier ermittelten Optimalwerten entspricht, wobei aber auch hier, wie schon bei der CHS auf eine genaue Bestimmung der Optima, aufgrund des Mangels an markiertem Substrat, verzichtet werden musste.

### 3.3 Inkubation mit Flavanon 3β-Hydroxylase

Die Aktivität der FHT zeigte sich unter den gegebenen Bedingungen bei einem pH-Wert von 6,0 bis 11,0 bei allen gemessenen Puffern als relativ stabil. Das Temperaturoptimum der FHT lag bei ca. 45-50 °C, wobei auch bei niedrigeren Temperaturen kein wesentlicher Aktivitätsverlust feststellbar war (nicht dargestellt).

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Die Bestimmung der FHT-Aktivität aus *Petunia hybrida* wurde in der Literatur bei 37 °C und einem pH-Wert von 8,5 (Britsch und Grisebach 1986, Lukačín und Britsch 1997), aus Petersilie dagegen in KPi-Puffer (pH 6,0) bei 30 °C (Gebhardt 2007) durchgeführt. In den eigenen Versuchen erwies sich die Wahl des Puffers als relativ irrelevant. Auch scheint es keine besonders geeignete Temperatur für die FHT-Aktivität zu geben, wobei auch hier wieder aufgrund des Mangels an markiertem Substrat auf genaue Bestimmung der Optima verzichtet werden musste. Die Ergebnisse wurden als Richtwerte verwendet.

### 3.4 Inkubation mit Flavonsynthase I

Die FNS I-Aktivität erreichte ein deutliches Optimum bei pH 6,5. Die größte Aktivität konnte dabei in Tris/HCl-Puffer erzielt werden. Der größte Umsatz der FNS I wurde bei 45 °C gemessen, wohingegen schon bei 50 °C nahezu kein Produkt mehr detektiert werden konnte (nicht dargestellt).

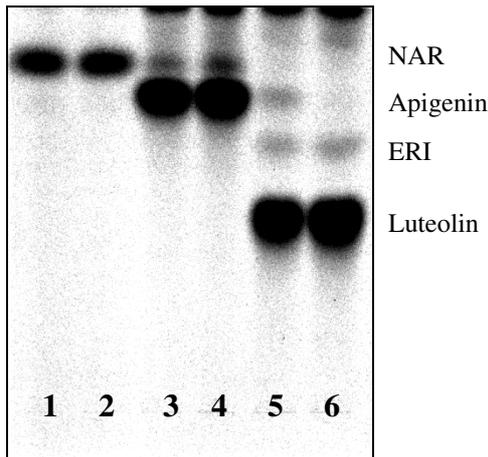
Die Temperaturangaben zur Messung der FNS I-Aktivität sind nicht einheitlich. So inkubierte Gebhardt (2007) bei einer Temperatur von 30 °C, andere Autoren (Britsch, 1990, Martens *et al.* 2001) bei 37 °C. Auch die pH-Bedingungen variierten. So kamen entweder KPi- (6,0), Tris/HCl (8,0) oder Natriumglycinat-Puffer (8,0) zum Einsatz. Dabei ist aber zu beachten, dass es sich bei Britsch (1990) um aus Pflanzenmaterial gereinigtes Protein, bei Gebhardt (2007) teilweise um in *E. coli* exprimiertes und über His-tag gereinigtes Protein handelt. In dieser Arbeit wurden dagegen rekombinante Rohfraktionen aus Hefe gemessen, was eine Erklärung für die gefundenen Unterschiede liefern könnte.

### 3.5 Herstellung von Luteolin

Auf Basis der Ergebnisse zu den einzelnen Enzymen sollte nun eine mehrstufige Inkubation, durch schrittweise Zugabe der Enzyme, durchgeführt werden. Für die Gewinnung von Luteolin aus 4-Cumaroyl-CoA und 2-[<sup>14</sup>C]Malonyl-CoA waren CHS/CHI, FNS I und F3'H in der genannten Reihenfolge erforderlich, wobei die Reihenfolge der Zugabe von FNS I und F3'H gewechselt werden könnte. Die Zugabe von CHI sollte die ausschließliche Bildung des 2S-Flavanon sicherstellen, welches von den nachfolgenden Enzymen den 2R-Verbindungen vorgezogen wird. FNS I setzt dann NAR zu Apigenin um, das von der F3'H metabolisiert werden kann. Ebenso kann die FNS I Eriodictyol umwandeln, falls dieses zunächst von der F3'H aus NAR gebildet wird (Winkel-Shirley 2001, Gebhardt 2007).

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---



**Abb. 24:** Nachweis der Produkte aus einer Inkubation von  $[2-^{14}\text{C}]$ Malonyl-CoA und 4-Cumaroyl-CoA mit CHS/CHI (Bahn 1/2) die schrittweise erweitert wurde durch Zugabe von FNS I (Bahn 3/4) und anschließend F3'H (Bahn 5/6). Die Auftrennung erfolgte auf Zelluloseplatten in CAW.

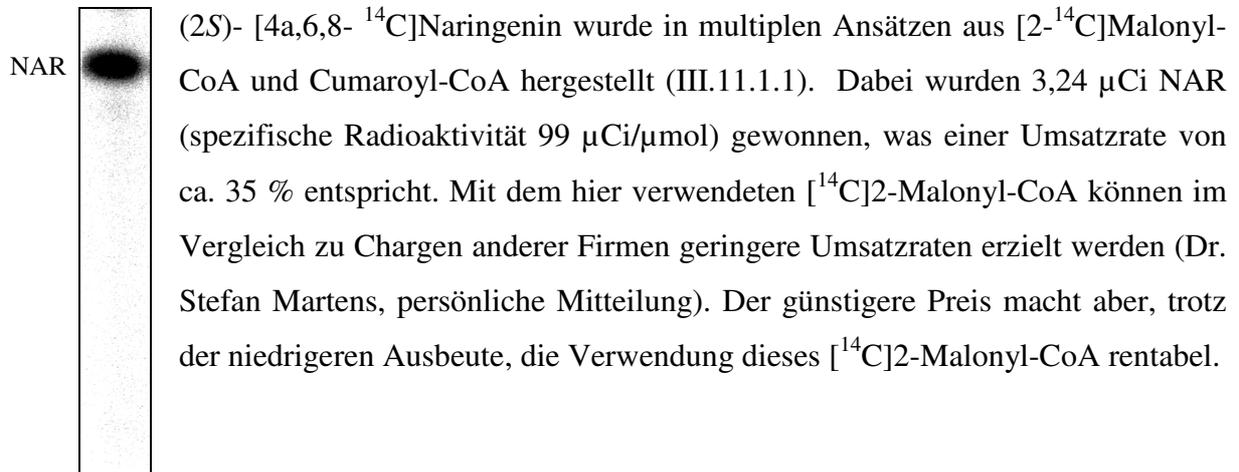
Es wurden sechs identische Tests mit  $[2-^{14}\text{C}]$ Malonyl-CoA und Cumaroyl-CoA angesetzt. Gestartet wurde durch Zugabe von CHS und CHI bei 37 °C. Nach 30 min wurden Ansatz 1 und 2 abgestoppt und zu den anderen FNS I zugegeben. Nach weiteren 30 min wurde auch Ansatz 3 und 4 abgestoppt und zu Ansatz 5 und 6, nach Abkühlen auf 30 °C, F3'H zugefügt. Auch diese beiden Ansätze wurden nach einer finalen Inkubation (30 min) abgestoppt und die jeweiligen Ansätze auf DC-Celluloseplatten in CAW aufgetrennt (Abb. 24). Nach Zugabe aller Enzyme war Luteolin als Hauptprodukt detektierbar, wohingegen NAR verbraucht und ERI schwach detektierbar waren. In Ansatz 3 und 4 sind 93 % Apigenin, in 5 und 6 im Durchschnitt 94 % Luteolin und 3 % ERI entstanden.

Apigenin war nur noch in Spur 5 nachweisbar, trotz Zugabe gleicher Enzymmengen. Möglicherweise variierten die Enzymmengen in 5 und 6 geringfügig, so dass in Ansatz 6 Apigenin komplett umgesetzt werden konnte.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

### 3.6 Präparative Herstellung von markiertem Naringenin, Dihydrokämpferol, Dihydroquercetin, Eriodictyol und Kämpferol

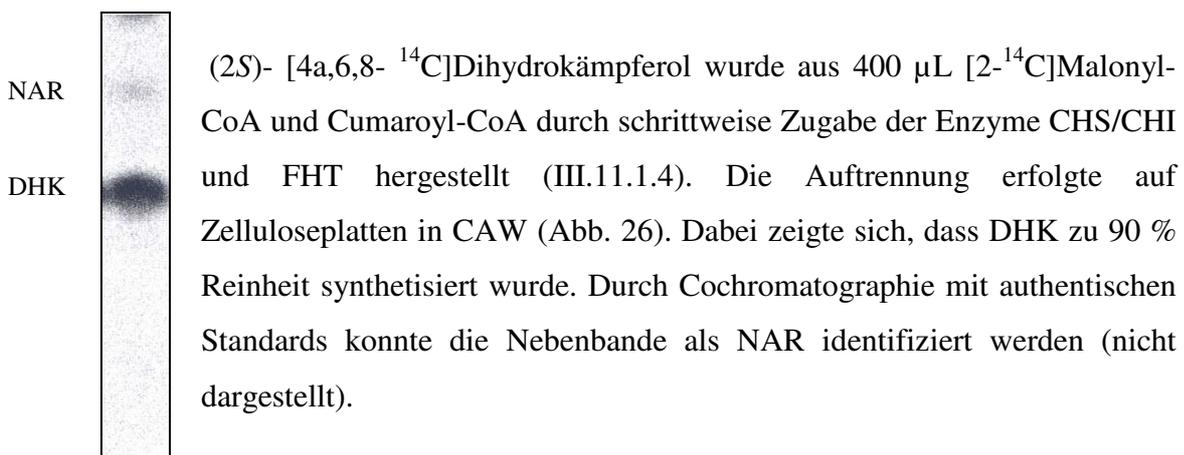
#### 3.6.1 Naringenin



**Abb. 25: Präparative Herstellung von markiertem Naringenin, die Auftrennung erfolgte auf Zelluloseplatten in CAW.**

Zur Überprüfung der Reinheit des entstandenen NAR wurde dies auf Zelluloseplatten aufgetragen und in CAW aufgetrennt (Abb. 25). Nach Auswertung im Phosphorimager waren keinerlei Nebenprodukte detektierbar.

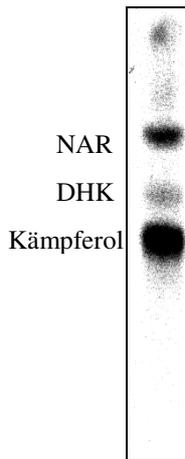
#### 3.6.2 Dihydrokämpferol



**Abb. 26: Präparative Herstellung von markiertem Dihydrokämpferol, die Auftrennung erfolgte auf Zelluloseplatten in CAW.**

Mit diesem Ansatz konnten 0,46  $\mu\text{Ci}$  DHK (spezifische Radioaktivität 99  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) hergestellt werden.

### 3.6.3 Kämpferol

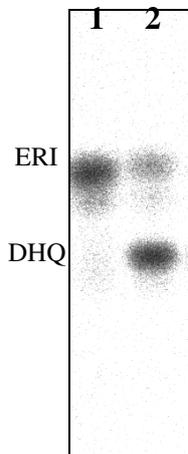


Die Enzyme CHS/CHI, FHT, FLS1 wurden der Inkubation, die  $[2-^{14}\text{C}]$ Malonyl-CoA und Cumaroyl-CoA enthielt schrittweise zugesetzt (III.11.1.5), anschließend der Gesamtansatz extrahiert und durch DC auf Zellulose in CAW aufgetrennt (Abb. 27). Dabei konnte ca.  $14\ \mu\text{Ci}$  (2S)-  $[4\text{a},6,8-^{14}\text{C}]$ Kämpferol mit einer spezifischen Radioaktivität von  $99\ \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$  gewonnen werden.

**Abb. 27: Präparative Herstellung von markiertem Kämpferol, die Auftrennung erfolgte auf Zelluloseplatten in CAW.**

Neben dem Hauptprodukt Kämpferol (64 %) waren zusätzlich Nebenbanden detektierbar, die durch Cochromatographie mit authentischen Standards als DHK (12 %) und NAR (24 %) identifiziert werden konnten (nicht dargestellt).

### 3.6.4 Eriodictyol



(2S)-  $[4\text{a},6,8-^{14}\text{C}]$ Eriodictyol wurde aus  $[2-^{14}\text{C}]$ Malonyl-CoA und Kaffeoyle-CoA mit der Enzymkombination CHS/CHI (III.11.1.2) synthetisiert. Aus  $400\ \mu\text{L}$   $[2-^{14}\text{C}]$ Malonyl-CoA-Mix konnten so ca.  $0,79\ \mu\text{Ci}$  ERI (spezifische Radioaktivität  $99\ \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) hergestellt werden, was einer Umsatzrate von ca. 30 % entspricht (Abb. 28, Spur 1).

**Abb. 28: Präparative Herstellung von markiertem Eriodictyol (Bahn 1) und Dihydroquercetin (Bahn 2), die Auftrennung erfolgte auf Zelluloseplatten in CAW.**

Ein Nachteil der direkten Synthese von ERI ist, dass die Effizienz der CHS für Kaffeoyle-CoA im Vergleich zu 4-Cumaryl-CoA schlechter ist. Die hier verwendete CHS aus *P. sylvestris* ist zwar in der Lage Kaffeoyle-CoA und auch Feruoyl-CoA als Substrat *in vitro* zu nutzen, das hauptsächliche physiologische Substrat stellt aber 4-Cumaroyl-CoA dar (Forkmann 1991).

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Die Synthese von ERI ist auch mit Hilfe der F3'H in zwei Schritten möglich, wurde aber nicht genutzt, sondern die Herstellung in einem Schritt mit einer Umsatzrate von 30 % bevorzugt.

### 3.6.5 Dihydroquercetin

(2S)- [4a,6,8- <sup>14</sup>C]Dihydroquercetin wurde, aus Kaffeooyl-CoA und 400 µL [2-<sup>14</sup>C]Malonyl-CoA hergestellt (III.11.1.3), wobei die Enzyme CHS/CHI und FHT schrittweise zugesetzt wurden. Die Auftrennung erfolgte auf Zelluloseplatten in CAW. Die Auswertung am Phosphoimager (Abb. 28, Spur 2) zeigte noch Reste des Zwischenprodukts, was durch Cochromatographie mit authentischen Standards als ERI (40 %) identifiziert werden konnte (nicht dargestellt). Die Ausbeute wurde mittels Scintillationszähler als ca.1,7 Mio. dpm bestimmt, sodass reines DHQ ca. 0,46 µCi (spezifische Radioaktivität 99 µCi/µmol) entspricht.

Die enzymatisch gewonnenen Dihydroflavonole (DHK und DHQ) konnten mit etwa 90 % bzw. 60 % Reinheit extrahiert werden. Mittels HSCCC sollte es auch möglich sein, diese bis zur Homogenität zu reinigen. Entsprechende Protokolle für unmarkierte Flavonoide sind etabliert. Für die Synthese der Anthocyanidine, die auch chemisch hergestellt werden können (Kraus 2006), müssten ausgehend von diesen Substraten dann noch enzymatische Reaktionen mit DFR und ANS durchgeführt werden, die heterolog verfügbar und gut exprimierbar sind. Dass kombinierte Enzymtests möglich sind, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Luteolin wurde bereits in einer Reinheit von 94 % durch Kombination von drei Enzymen aus [2-<sup>14</sup>C]-Malonyl-CoA und Cumaroyl-CoA hergestellt, ebenso wie Kämpferol mit einer Reinheit von 64 %.

### IV.4 Biotransformationen mit der FNS I in *Sacharomyces cerevisiae*

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* katabolisiert Flavonoide nicht oder kaum und verfügt im Gegensatz zu Bakterien über membrangebundene CYP450/P450-Reduktase. Damit scheint sie geeignet zu sein für die Expression mehrerer sequentieller Enzyme der Flavonoid-Biosynthese (Akashi *et al.* 1999, Katsuyama *et al.* 2007). Die Biotransformation mit Hefe basiert auf der Prämisse, dass exogen zugeführte Flavonoid-Substrate von den Zellen aufgenommen und durch rekombinant exprimierte Enzyme umgesetzt werden.

Das Produkt muss nur noch aus der Zellsuspension extrahiert werden. Zur Prüfung der Bedingungen für die Biotransformation wurde hier die FNS I aus Petersilie verwendet, die von Martens *et al.* (2001) in den pYES2-Vektor kloniert und in *S. cerevisiae* erfolgreich

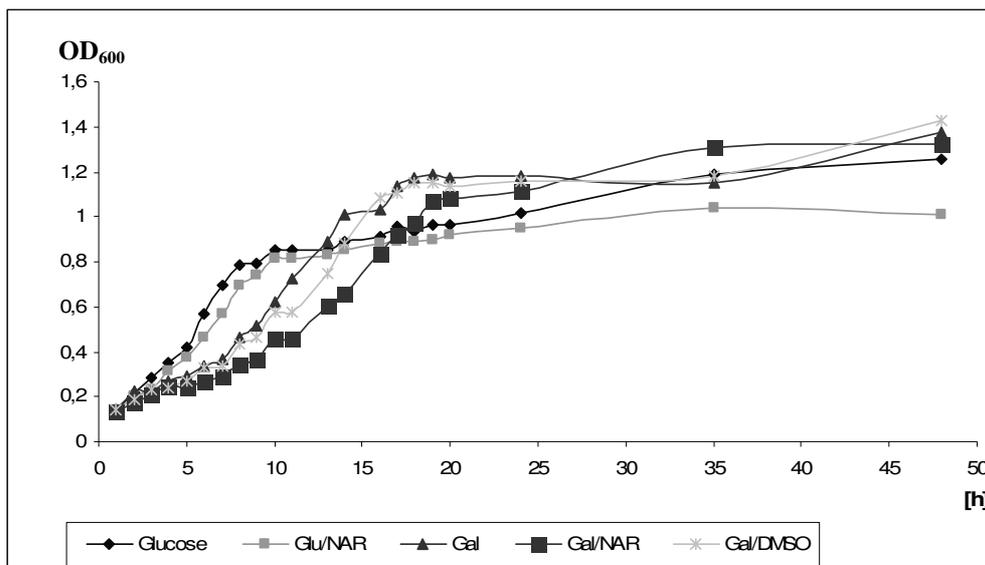
## IV. Ergebnisse und Diskussion

exprimiert worden war. Bei der FNS I handelt es sich um eine 2-ODD, die auch in Bakterien exprimierbar ist. Die Ergebnisse sollten aber auch relevant sein für CytP450- und andere Enzyme.

Für die Auswertungen aller Biotransformationsexperimente wurden, falls nicht anders beschrieben, jeweils Aliquots der Zellsuspensionen entnommen und diese mit Ethylacetat extrahiert.

### 4.1 Wachstum FNS I-transformierter Hefezellen

Zu Beginn wurde eine Wachstumskurve der FNS I exprimierenden *S. cerevisiae*-Zellen bis zu 48 Stunden nach Induktion (Abb. 29) aufgenommen. Hefekulturen wurden bei einer  $OD_{600}$  von 0,9 aufgeteilt, ein Teil wurde mit Galaktose induziert, einem zweiten zusätzlich NAR/DMSO zugegeben und eine dritte Kultur nach Induktion nur mit DMSO versetzt. Zusätzlich wurde auch das Wachstum von nicht induzierten Zellen analysiert. So wurde ein Kolben nur mit Glucose inkubiert und ein weiterer mit Glucose und NAR/DMSO.



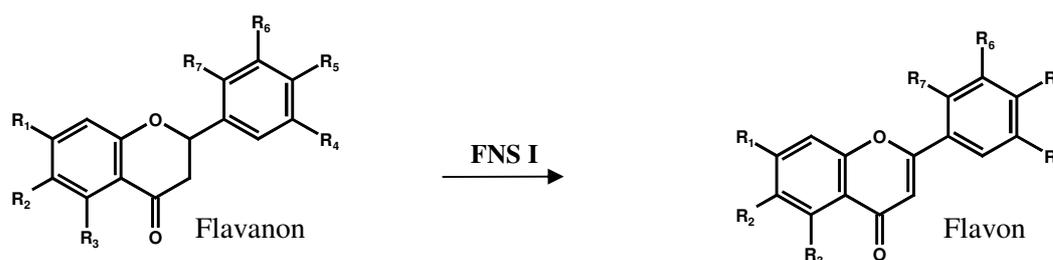
**Abb. 29: Wachstum FNS I -transformierter INVSc Zellen. Die Zellen wurden mit Glucose kultiviert (Kontrolle) oder mit Glucose/Naringenin (■), Galaktose (▲), Galaktose/Naringenin (■) und Galaktose/DMSO ( \* ) induziert.**

Nach 24 h Inkubation war die stationäre Phase erreicht. Bei 1:10 Verdünnungen zeigten die Zellsuspensionen, mit Ausnahme der mit Glucose/NAR/DMSO versetzten Kultur, eine  $OD_{600}$  von 1,2 bis 1,4 was Zellzahlen von  $27 \times 10^7$  Zellen/mL bis  $38 \times 10^7$  Zellen/mL entspricht. Erstaunlicherweise lagen die Werte für Galaktose/Naringenin, nicht hinter den anderen zurück, obwohl die Zellen durch Expression heterologen Proteins erhöhten Energieaufwand haben sollten.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

### 4.2 Substratspezifität der FNS I-transformierten Hefezellen

Die Biotransformation verschiedener Flavanone durch die FNS I-transformierte Hefe wurde gemessen. Neben NAR standen Pentahydroxyflavanon, Hesperetin, Eriodictyol, Homoeriodictyol, Flavanon, Pinocembrin, Liquiritigenin, Pinocembrin-7-methylether, 2'-Hydroxyflavanon, 4'-Hydroxyflavanon, 5-Methoxyflavanon, 6-Methoxyflavanon, 6-Hydroxyflavanon und 7-Hydroxyflavanon zur Verfügung (Abb. 30).



Flavanon	Produkt (Flavon)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
<b>Naringenin (NAR)</b>	<b>Apigenin (Ap)</b>	OH	H	OH	H	OH	H	H
Pentahydroxyflavanon	Tricetin	OH	H	OH	OH	OH	OH	H
<b>Hesperetin</b>	<b>Diosmetin</b>	OH	H	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
<b>Eriodictyol (ERI)</b>	<b>Luteolin</b>	OH	H	OH	H	OH	OH	H
<b>Homoeriodictyol</b>	<b>Chrysoeriol</b>	OH	H	OH	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Flavanon	Flavon	H	H	H	H	H	H	H
<b>Pinocembrin</b>	<b>Chrysin</b>	OH	H	OH	H	H	H	H
<b>Liquiritigenin</b>	<b>7,4'-Dihydroxyflavon</b>	OH	H	H	H	OH	H	H
Pinocembrin-7-methylether	Chrysin-7-methylether	OCH <sub>3</sub>	H	OH	H	H	H	H
2'-Hydroxyflavanon	2'-Hydroxyflavon	H	H	H	H	H	H	OH
4'-Hydroxyflavanon	4'-Hydroxyflavon	H	H	H	H	OH	H	H
5-Methoxyflavanon	5-Methoxyflavon	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	H
6-Methoxyflavanon	6-Methoxyflavon	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	H	H
6-Hydroxyflavanon	6-Hydroxyflavon	H	OH	H	H	H	H	H
7-Hydroxyflavanon	7-Hydroxyflavon	OH	H	H	H	H	H	H

**Abb. 30: Flavanone, die als Substrate für die Biotransformation in FNS I-Transformanten angeboten wurden. Substrate, die umgesetzt werden konnten, und entsprechende Produkte sind fett gedruckt.**

Nach Extraktion der Flavonoide aus der Kulturbrühe mit Ethylacetat wurden die Produkte mittels DC und HPLC analysiert. Umgesetzt wurden: NAR, Hesperetin, ERI, Homoeriodictyol, Pinocembrin und Liquiritigenin (Abb. 30 fett gedruckt)

Offensichtlich müssen die Flavanon-Substrate der FNS I in 5- und 4'-Position hydroxyliert sein, da weder 7-Hydroxyflavanon noch Pinocembrin-7-methylether, 2'- und 4'-Hydroxyflavanon oder 6-Hydroxyflavanon akzeptiert wurden. Andererseits stört die Dreifachhydroxylierung des B-Ringes wie in Pentahydroxyflavanon.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Britsch (1990) testete gereinigte FNS I aus Pflanzen mit verschiedenen Substraten und konnte für (2*S*)-NAR und ERI Umsätze nachweisen, aber weder für DHK, (2*R*)-NAR oder Pentahydroxyflavanon.

Auf den Test von Dihydroflavonolen wurde in dieser Arbeit verzichtet, auch wurden keine reinen (2*R*)-Verbindungen getestet, die in der Natur keine Rolle spielen.

Zusätzlich wurde aber Naringenin-7-*O*-glucosid als vermeintliche Negativkontrolle getestet, worauf später (IV.1) noch ausführlich eingegangen wird.

### 4.3 Verschiedene Lösungsmittelleffekte

Standardmäßig wurde das Substrat für die Biotransformation in DMSO gelöst zugegeben. Hier sollte nun untersucht werden, ob mit anderen Lösungsmitteln höhere Produktausbeuten erreicht werden können.

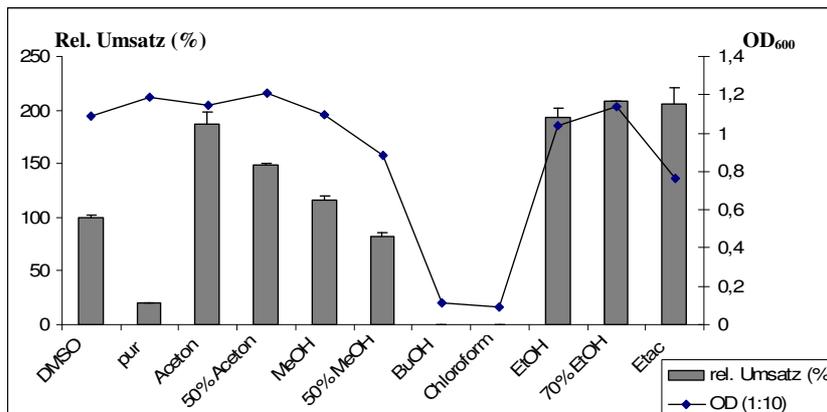
Dazu wurde zunächst das kleinstmögliche Volumen ermittelt, in dem sich 10 mg NAR noch lösen (Tab. 2). Die Volumina variierten erheblich, da nur 0,2 mL DMSO oder Aceton ausreichten, wohingegen 0,3 mL Ethanol bzw. 80 % wässr. Ethanol oder 0,4 mL Methanol und 50 % wässr. Aceton sowie 0,5 mL Ethylacetat erforderlich waren. Wenig bis gar nicht geeignet sind dagegen Chloroform (6 mL), Triton X-100 (6 mL), 0,5 % Tween-20 (>11 mL), 25 % wässr. Ethanol (14 mL) und Wasser (25 mL).

**Tab. 2: Löslichkeit von 10 mg Naringenin.**

Lösungsmittel	Volumen (mL)	Endkonzentration im 50 ml Ansatz (%)
DMSO	0,2	0,4
Ethylacetat	0,5	1
Wasser	25	50
reines Triton X 100	6	12
0,5 % Tween-20	>11	>22
n-Butanol	1	2
Chloroform	6	12
Aceton 100%	0,2	0,4
wässriges Aceton 50 %	0,5	1
Methanol 100 %	0,4	0,8
wässriges Methanol 50 %	0,9	1,8
Ethanol 100 %	0,3	0,6
wässriges Ethanol 80 %	0,3	0,6
wässriges Ethanol 70 %	0,5	1
wässriges Ethanol 50 %	3	6
wässriges Ethanol 25 %	14	28

## IV. Ergebnisse und Diskussion

Naringenin (10 mg) wurde entsprechend im kleinstmöglichen Volumen des jeweiligen Lösungsmittels aufgenommen und zur Biotransformation eingesetzt. Nach 17 h wurden jeweils Proben der Kulturen entnommen, mit Ethylacetat extrahiert und analysiert (Abb. 31). Einem Ansatz wurde NAR „pur“, ungelöst zugegeben. Es zeigte sich, dass die Zellen durch die Zugabe von n-Butanol und Chloroform nicht mehr in der Lage waren zu wachsen und das angebotene Substrat umzusetzen. Bei Zugabe des Substrats in Ethanol, 70 % wässr. Ethanol, Ethylacetat und Aceton konnte die Ausbeute gegenüber der Lösung in DMSO (Kontrolle) etwa verdoppelt werden. Das Wachstum der Hefezellen variierte um den Faktor 0,8 bis 1,2 was Zellzahlen von ca. 14 bis ca.  $26 \times 10^7$  Zellen/mL entspricht.



**Abb. 31: Biotransformation von (2S)-Naringenin in FNS I transformierten Hefekulturen. Das Wachstum der Zellen (—◆—) wurde nach 1:10 Verdünnung der Kulturen als OD<sub>600</sub> verfolgt. Der relative Umsatz von Naringenin (Balkendiagramm, n=6), gelöst in verschiedenen Lösungsmitteln, bezieht sich auf die Lösung in DMSO (100 %).**

Da durch die Zugabe von Ethylacetat und Aceton relativ gute Umsätze erzielt werden konnten, wurden den Biotransformationen nach Induktion verschiedene Konzentrationen von diesen Lösungsmitteln zugesetzt (jeweils 1-5 %). Zusätzlich wurde als Kontrolle in gesonderten Ansätzen 1-5 % DMSO zugegeben.

Auch der Einfluss von Ethanol auf den Umsatz wurde analysiert. Da YPG-Medium bereits Ethanol enthält (3 %), wurden die Zellen in YPG-Medium (ohne Ethanol) angezogen und nach Induktion und Substratzugabe mit 1-7 % Ethanol versetzt.

Die DMSO-Konzentration bis 5 % scheint geringen Einfluss auf den Umsatz zu haben (Abb. 32 A), ebenso ändert sich das Wachstum der Zellen kaum, entspricht Zellzahlen von  $10 \times 10^7$  Zellen/mL- $12 \times 10^7$  Zellen/mL. Nach Zugabe von NAR in 1-4 % Aceton werden relative Umsätze von 160 % (4 % Aceton) und 180 % (1 % Aceton) gemessen, bezogen auf den Umsatz nach Zugabe von NAR in 2 % DMSO (Standard, 100 %). Bei Zugabe von 5 % Aceton fiel die Ausbeute dagegen um ca. die Hälfte. Interessanterweise liegen die Umsätze relativ hoch im Vergleich zum verminderten Wachstum. Schon bei Zugabe von 2 % Aceton

## IV. Ergebnisse und Diskussion

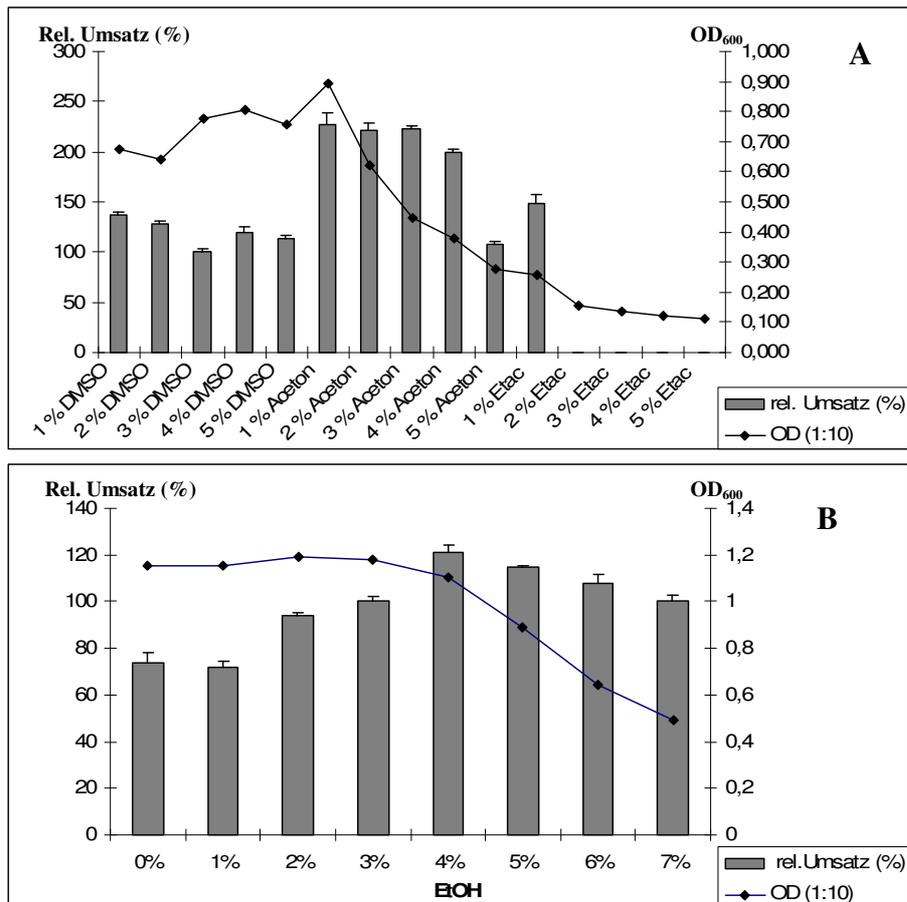
---

war die Zelldichte ( $9,7 \times 10^7$  Zellen/mL) deutlich niedriger als bei einem Gehalt von 1 % ( $15,2 \times 10^7$  Zellen/mL) und sank mit weiterer Zugabe weiter ab ( $3,6 \times 10^7$  Zellen/mL bei 5 %). Zusätzlich wurde der Einfluss von Aceton auf das Wachstum der induzierten und nicht induzierten Hefekulturen (ohne Substratzugabe) untersucht (nicht dargestellt). Dabei war ebenfalls festzustellen, dass die Zelldichten ab einer Zugabe von 2 % Aceton geringer wurden. So betragen die Zellzahlen der nicht induzierten Kulturen  $17 \times 10^7$  Zellen/mL (0 % und 1 % Aceton) bzw.  $6 \times 10^7$  Zellen/mL (5 % Aceton), die der induzierten Kulturen  $26-27 \times 10^7$  Zellen/mL (0 % und 1 % Aceton) und  $4 \times 10^7$  Zellen/mL (5 % Aceton).

Ethylacetat scheint sehr toxisch für die Zellen zu sein, schon nach Zugabe von 2 % Ethylacetat lässt sich kein Umsatz mehr nachweisen. Die Zellzahlen liegen auch schon bei einem Gehalt von 1 % Ethylacetat ( $3,3 \times 10^7$  Zellen/mL) deutlich unter dem Normalwert des Standardansatzes (2 % DMSO,  $9,3 \times 10^7$  Zellen/mL).

Der Einfluss von Ethanol ist in Abb. 32 B dargestellt. 3 % Ethanol entspricht der Menge an Ethanol, die im YPGE-Medium enthalten ist, weshalb dieser Wert gleich 100 gesetzt wurde. Es zeigte sich, dass ein Gehalt von 4-6 % Ethanol sich positiv auf den relativen Umsatz auswirkt. Der relative Umsatz bei einer Gesamtkonzentration von 7 % Ethanol liegt genau bei 100 % der Nullkontrolle (3 % Ethanol). Die gemessenen Zellzahlen fallen dagegen schon ab einem Ethanol-Gehalt von 4 % (Zellzahl:  $22 \times 10^7$  Zellen/mL) kontinuierlich auf einen Wert von  $6,8 \times 10^7$  Zellen/mL (7 % Ethanol).

## IV. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 32: Biotransformation von (2S)-Naringenin in FNS I transformierten Hefekulturen. Das Substrat wurde DMSO, Ethylacetat oder Aceton gelöst (1-5 % Lösungsmittel im Ansatz, A). Der Einfluss von Ethanol (0-7 %) wurde gesondert untersucht (B). Das Wachstum der Zellen (—◆—) wurde nach 1:10 Verdünnung der Kulturen als OD<sub>600</sub> verfolgt. Der relative Umsatz von Naringenin (Balkendiagramm, n=6), gelöst in verschiedenen Lösungsmitteln, bezieht sich auf die Lösung in 3 % DMSO (100 %, A) bzw. 3 % Ethanol (B).**

### 4.4 Einfluss der Temperatur auf den Umsatz in Biotransformationen

Die Hefezellen wurden standardmäßig bei 30 °C (Invitrogen Manual) kultiviert. Eine Veränderung der Temperatur könnte aber Einfluss auf die Biotransformation haben. Deshalb wurden induzierte Kulturen nach Zugabe von Naringenin gedrittelt und je eine dieser Teilkulturen bei 25 °C, 30 °C oder 37 °C für 17 h inkubiert (Abb. 33). Erstaunlicherweise konnte eine Inkubation bei 37 °C den Umsatz um das 3-fache steigern bei annähernd gleicher OD<sub>600</sub> bei 25 °C und 37 °C. Bei 25 °C lag die Ausbeute an Apigenin nur unwesentlich unter dem Wert der Kontrolle.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

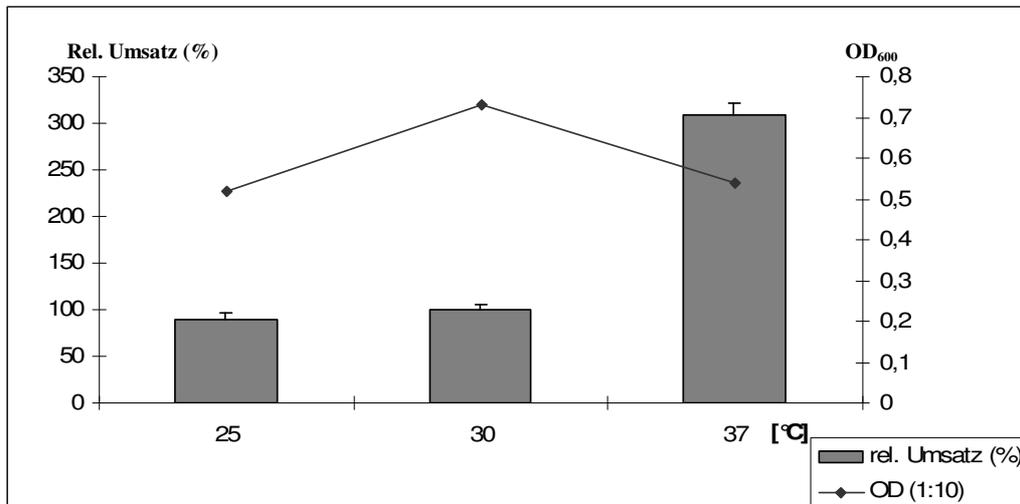


Abb. 33: Biotransformation von (2S)-Naringenin in FNS I transformierten Hefekulturen bei verschiedenen Temperaturen (25 °C, 30 °C, 37 °C). Das Wachstum der Zellen (—◆—) wurde nach 1:10 Verdünnung der Kulturen als OD<sub>600</sub> verfolgt. Der relative Umsatz von Naringenin (Balkendiagramm, n=6) bezieht sich auf die Inkubation bei 30 °C (100 %).

### 4.5 Cofaktoren

Da es sich bei der FNS I um eine 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase handelt, sollte nun getestet werden, ob durch eine zusätzliche Zugabe der Cofaktoren Ascorbat, Eisen und 2-Oxoglutarat die Ausbeute gesteigert werden kann. Nach Induktion und Substratzugabe wurde deshalb eine Hefekultur in fünf gleiche Teile aufgeteilt, wobei einem Ansatz als Nullwert keine, den anderen jeweils einer der Faktoren und einem Ansatz alle drei Cofaktoren (Ascorbat 0,05 mM, Ammoniumeisen-II-sulfat 1 mM, 2-Oxoglutarat 2 mM) zugegeben wurden (Abb. 34).

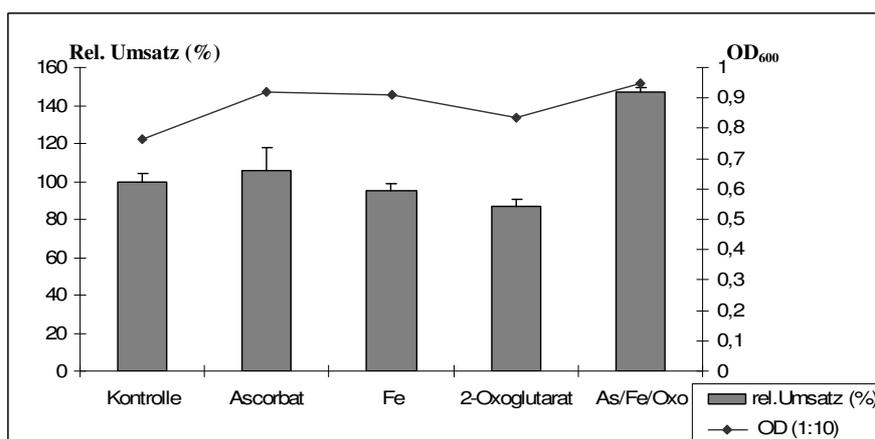


Abb. 34: Biotransformation von (2S)-Naringenin in FNS I transformierten Hefekulturen nach Zugabe der Cofaktoren Ascorbat (As), Eisen (Fe(II)) und 2-Oxoglutarat (Oxo). Das Wachstum der Zellen (—◆—) wurde nach 1:10 Verdünnung der Kulturen als OD<sub>600</sub> verfolgt. Der relative Umsatz von Naringenin (Balkendiagramm, n=6) bezieht sich auf die Kontrolle (100 %).

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Der Ansatz ohne Cofaktorenzugabe wurde gleich 100 % gesetzt. Eine Zugabe der einzelnen Faktoren beeinflusste den Umsatz nur gering bis gar nicht, durch Zugabe aller Faktoren konnte der Umsatz aber um ca. 40 % gesteigert werden. Dagegen war auch durch Zugabe eines einzelnen Cofaktors die Wachstumsrate schon leicht erhöht. Die Zahlen des Normalansatzes lagen bei  $11,8 \times 10^7$  Zellen/mL, die nach Zugabe einzelner Cofaktoren im Mittelwert bei ca.  $15 \times 10^7$  Zellen/mL und nach Zugabe aller drei Cofaktoren bei  $16,7 \times 10^7$  Zellen/mL.

### 4.6 pH-Wert

In dieser Versuchsreihe sollte festgestellt werden, ob sich der pH-Wert der Kultur nach Zugabe des Substrates verändert und ob sich Unterschiede zwischen induzierten und nicht induzierten Kulturen feststellen lassen (Tab. 3). Dazu wurde einzelnen Subkulturen entweder nur Glucose, Glucose und NAR in 1 mL DMSO gelöst, nur Galaktose oder NAR gelöst in 1 mL DMSO, 1-5 % Aceton und 1 % Ethylacetat, zugegeben. Zusätzlich sollte ermittelt werden, ob sich eine Exposition der Ansätze bei verschiedenen Temperaturen (25 °C, 30 °C, 37 °C) bemerkbar macht.

**Tab. 3: pH-Wert induzierter FNS I-transformierter Hefekulturen.**

<b>Induktor</b>	<b>Sofort nach Zugabe</b>	<b>Nach 17 h Inkubation</b>
Glucose (Kontrolle)	5,79	6,2
Glucose/NAR in DMSO	5,81	6,06
Galactose (Kontrolle)	5,84	4,93
Galactose/NAR/DMSO	5,85	4,84
Galactose/NAR/1 % Aceton	5,85	4,93
Galactose/NAR/2 % Aceton	5,83	5,1
Galactose/NAR/3 % Aceton	5,94	5,27
Galactose/NAR/4 % Aceton	5,93	5,4
Galactose/NAR/5 % Aceton	5,92	5,54
Galactose/NAR/1 % Ethylacetat	5,9	5,12
Galactose/NAR/DMSO 25 °C	5,88	5,15
Galactose/NAR/DMSO 37 °C	5,88	5,19

Der pH-Wert der Ausgangskultur lag bei 5,8. Diese Kultur wurde aufgeteilt, die Subkulturen mit Galaktose als Induktor versetzt und eine der NAR-Substratlösungen jeweils einer Kultur zugesetzt. Unmittelbar nach Zugabe wurden pH-Werte von 5,79 (Glucose-Kontrolle) bis 5,94 (NAR/3 % Aceton) gemessen. Nach Zugabe war festzustellen, dass in den nicht induzierten Kulturen der pH-Wert ansteigt, in den induzierten dagegen der pH-Wert absinkt. Eine Korrelation von Produktausbeute und pH-Wert lässt sich nicht feststellen, so lagen die pH-

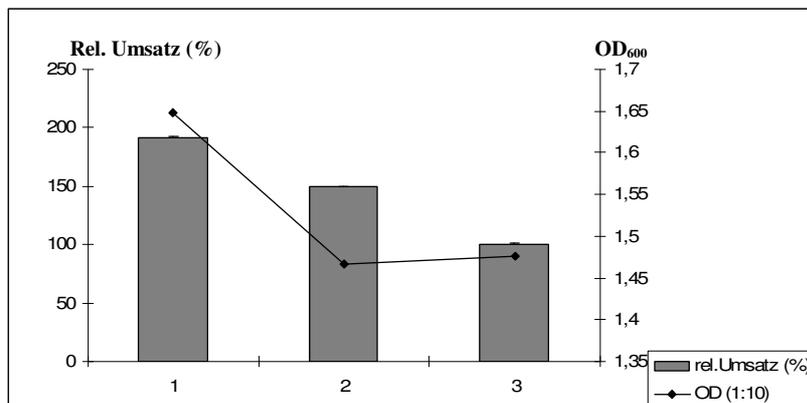
## IV. Ergebnisse und Diskussion

Werte der Kulturen, die Naringenin gelöst in 1-5 % Aceton enthielten, ungefähr gleich (Tab. 3), wohingegen der relative Umsatz bei einer Zugabe von 5 % Aceton deutlich niedriger war (Abb. 32 A).

Unterschiede bei den Inkubationstemperaturen scheinen auch keinen Einfluss auf den pH-Wert zu haben, die gemessenen Werte bei 25 °C (pH 5,15) und 37 °C (pH 5,19) waren nahezu identisch.

### 4.7 Einfluss von Sauerstoff

Da es sich bei der FNS I um ein Sauerstoff-abhängiges Enzym handelt, wurde in diesem Versuch der Einfluss von Sauerstoff auf die relativen Umsätze und zusätzlich auf das Wachstum der Zellen untersucht. Dazu wurde eine Hefekultur nach Induktion und Substratzugabe gedrittelt. Ein Drittel wurde 24 h geschlossen gehalten (Kolben mit Alufolie verschlossen), das zweite 17 h bis 24 h nach erfolgter Induktion jeweils stündlich unter sterilen Bedingungen kurz geöffnet und der letzte Teil über die gesamte Inkubationsdauer offen gehalten. Der Kontrollansatz (geschlossener Kolben) wurde gleich 100 % gesetzt. Es zeigte sich, dass allein durch Luftzufuhr der relative Umsatz nahezu verdoppelt werden konnte (Abb. 35). Die bestimmten Zellzahlen betragen dabei ca.  $50 \times 10^7$  Zellen/mL für den über die gesamte Zeit offen gehaltenen Kolben und für ca.  $42 \times 10^7$  Zellen/mL für den stündlich geöffneten und geschlossenen Kolben.



**Abb. 35: Biotransformation von (2S)-Naringenin in FNS I transformierten Hefekulturen nach Zufuhr von Sauerstoff mit über die gesamte Inkubationsdauer geöffneten (1), stündlich kurz geöffneten (2) oder geschlossenem Kolben (3). Das Wachstum der Zellen (—◆—) wurde nach 1:10 Verdünnung der Kulturen als OD<sub>600</sub> verfolgt. Der relative Umsatz von Naringenin (Balkendiagramm, n=6) bezieht sich auf die Kontrolle (geschlossener Kolben, 100 %).**

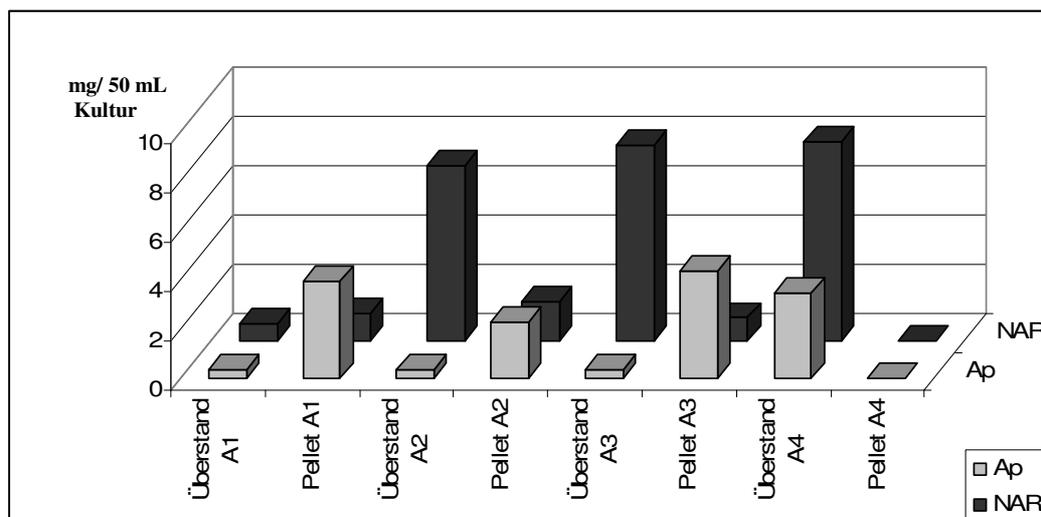
### 4.8 Lokalisierung von Substrat und Produkt

Mit diesem Experiment sollte festgestellt werden, ob das zugesetzte Substrat und die entstehenden Produkte in Biotransformationen hauptsächlich in den Zellen zu finden sind, oder in das Medium abgegeben werden.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

Für die Bestimmung der Produktausbeute sind verschiedene Methoden in der Literatur beschrieben. So werden teilweise die Überstände nach Zentrifugation direkt (Leonard *et al.* (2007, 2008) oder nach anschließender Methanolzugabe (Jiang und Morgan 2004) analysiert. Für die Bestimmung von Anthocyanidinen in *E. coli*-Biotransformationen wurde das Medium auch angesäuert und nach Abtrennung der Zellen direkt untersucht. Zusätzlich wurden dann die Zellen in angesäuertem Wasser aufgeschlossen (Yan *et al.* 2008).

Um störende Begleitstoffe aus dem Medium in der HPLC-Messung möglichst gering zu halten, wurde in dieser Arbeit die Extraktion mit Ethylacetat bevorzugt. Dazu wurden Aliquots einer induzierten Kultur der FNS I-transformierten Hefezellen 17 h nach Zusatz der NAR-Substratlösung entweder direkt oder nach Abtrennung der Zellen durch Zentrifugation extrahiert. Die abzentrifugierten Zellen wurden direkt bzw. nach Suspension oder nach Aufbrechen (Glasperlen) extrahiert. Die Überstände (Medium) der Ansätze 1 bis 3 wurden alle mit Ethylacetat extrahiert und anschließend analysiert. Ansatz 4 wurde direkt mit Ethylacetat extrahiert, ohne dass eine Abtrennung der Zellen vom Medium erfolgte (Abb. 36).



**Abb. 36: Lokalisierung von Substrat und Produkt nach Biotransformation von (2S)-Naringenin in FNS I transformierten Hefekulturen. Die Zellen wurden direkt (A 4) oder nach Abtrennung durch Zentrifugation extrahiert. Anschließend wurden sie dann nach Suspension in Wasser (A1), direkt (A2) oder nach Aufbrechen (A3) extrahiert.**

Das Produkt der FNS I, Apigenin, akkumulierte hauptsächlich in den Zellen, wohingegen der größte Teil des Substrates NAR aus dem Kulturfiltrat extrahiert wurde. Nach Glasperlenaufschluss ließ sich die größte Menge an Produkt (Abb. 36, A3, 4,7 mg) isolieren, die aber nur geringfügig höher war als nach Extraktion der kompletten Hefekultur (A4, 4,3 mg). Hier wird allerdings das Produkt nicht vom Substrat getrennt, während die Abtrennung der Hefezellen mit (eventuell) Glasperlenaufschluss in wässriger Suspension dieses Problem

## IV. Ergebnisse und Diskussion

löst. Ein direktes Aufschließen des abzentrifugierten Hefesediments mit Ethylacetat lieferte dagegen nicht den gewünschten Erfolg und führte zur geringsten gemessenen Ausbeute der Versuchsreihe (Abb. 36, A2).

### 4.9 Präparative Biotransformation von Naringenin in FNS I-transformierter Hefe

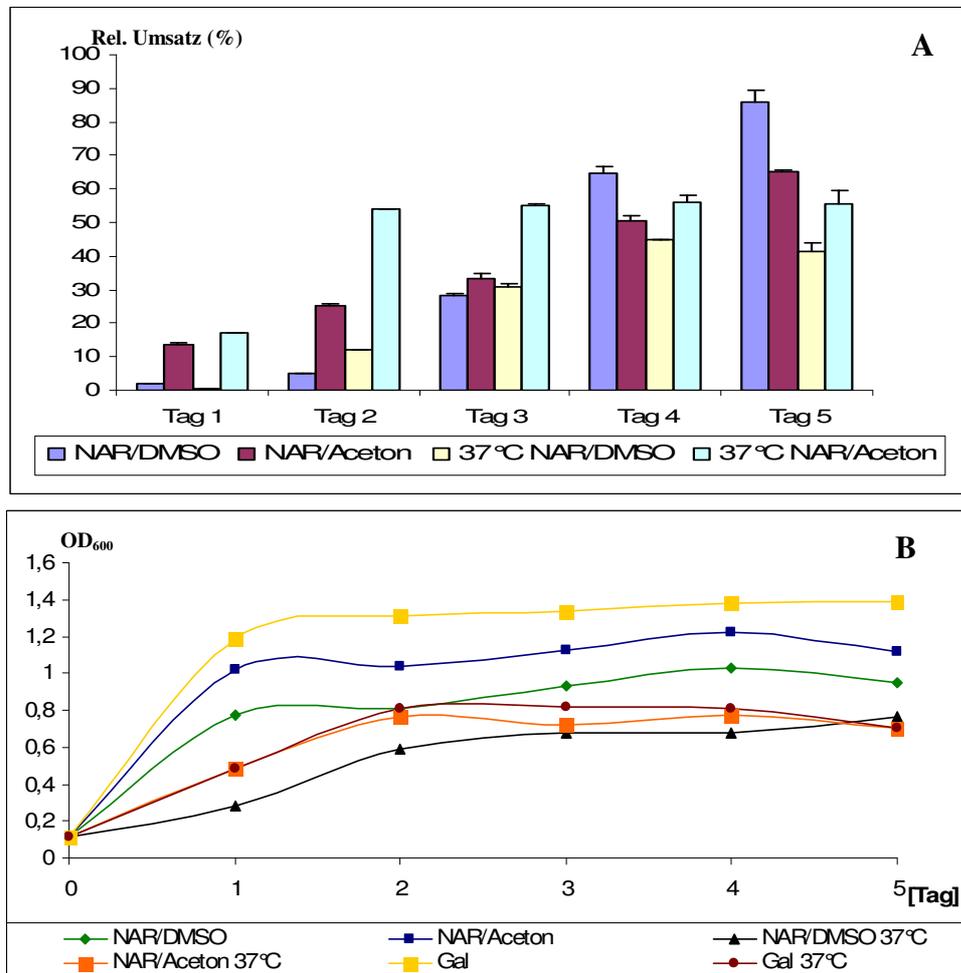


Abb. 37: Präparative Biotransformation von (2S)-Naringenin in FNS I transformierten Hefezellen mit einer Inkubationsdauer bis zu 5 Tagen (A, n=3). Das Wachstum der Zellen (B) wurde nach 1:10 Verdünnung der Kulturen als OD<sub>600</sub> verfolgt mit Naringenin/DMSO (—◆—), Naringenin/Aceton (—■—), Naringenin/DMSO bei 37 °C (—▲—), Naringenin/Aceton bei 37 °C (—■—) und als Kontrolle das Wachstum der induzierten Zellen bei 30 °C (—■—) und 37 °C (—●—).

Aufgrund aller beschriebenen Ergebnisse wurden nun Biotransformationen in einem Volumen von einem Liter mit jeweils 400 mg NAR als Substrat getestet. So wurden jeweils 4 Kulturen ausgehend von einer OD<sub>600</sub> von 0,11 zu jeweils 1 L angesetzt und nach Induktion mit folgenden Supplementen versetzt: als Standardansatz 1: NAR/DMSO, Ansatz 2: NAR/Aceton, Ansatz 3 und 4 entsprachen 1 und 2, sie wurden aber nach Induktion bei 37 °C inkubiert. Alle Ansätze wurden offen gehalten und für fünf Tage inkubiert, ohne dann weitere Nährlösungen zu zugeben. Nach jedem Inkubations-Tag wurden Proben entnommen.

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

---

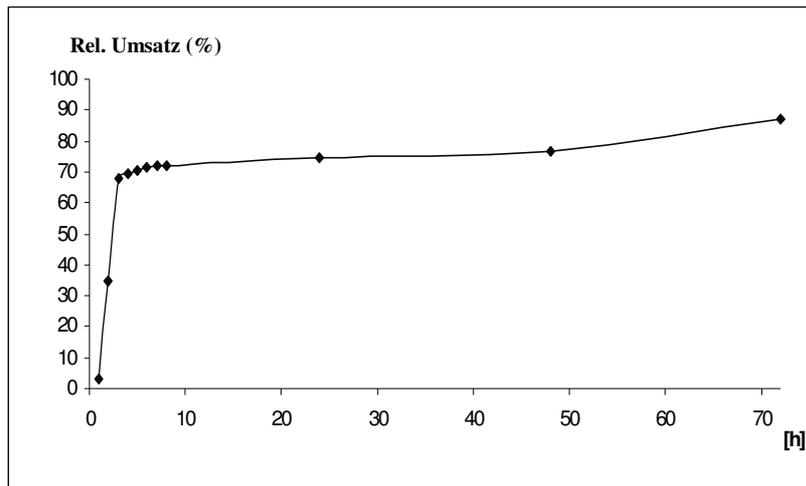
Erstaunlicherweise zeigt sich, dass nach fünf Tagen die Ausbeute im Standardansatz am größten war (Abb. 37 A). Hier betrug die relative Umsatzrate 85 %. Erwartet wurde aufgrund der zuvor beschriebenen Ergebnisse, dass die größte Ausbeute in Ansatz Nr. 4: NAR/Aceton, 37 °C zu finden sein würde. Am zweiten Tag zeigte sich hier auch noch der höchste relative Umsatz (50 %) im Vergleich zu den anderen. Der Wert blieb aber konstant und konnte nicht mehr gesteigert werden. NAR/DMSO erreichte zu diesem Zeitpunkt nur relative Umsatzraten von 25 %, steigerte sich dafür aber bis zum Abschlusstag erheblich. Auch die Produktausbeuten der anderen Ansätze konnten über die längere Inkubationszeit erhöht werden, blieben aber auch zum Abschluss hinter den Werten von Ansatz Nr. 1 zurück. Diese Ergebnisse können nur darauf zurückgeführt werden, dass längere Inkubation bei 37 °C die Zellen doch zu stark beeinträchtigt, so dass kein Protein mehr synthetisiert werden kann oder das gebildete Protein sich bei dieser erhöhten Temperatur über längeren Zeitraum als instabil erweist. Auch ein Einfluss von Aceton scheint über einen längeren Zeitraum nicht förderlich zu sein. Tag 1, 2 und 3 entsprachen noch den Erwartungen, hier waren die Produktausbeuten bei NAR/Aceton auch noch am höchsten, wenn auch schon an Tag 3 sich die Werte für NAR/DMSO zumindest dem Wert NAR/Aceton 30 °C annäherten. Das Wachstum der Zellen wurde ebenfalls betrachtet und ist in Abb. 37 B dargestellt. Interessanterweise ist das Wachstum der Zellkulturen sehr unterschiedlich, obwohl zu Beginn der Messreihe alle Kulturen die gleiche Zelldichte aufwiesen. Zusätzlich zu den oben beschriebenen Ansätzen wurden 2 weitere Ansätze mit inkubiert, die beide nur induziert, und bei 30 °C (Ansatz 5) bzw. 37 °C (Ansatz 6) inkubiert wurden. Dabei zeigte sich, dass bei allen 37 °C-Ansätzen, wie erwartet, die Zelldichte hinter den 30 °C-Ansätzen zurück blieb. So betrug die Anzahl der Zellen am fünften Tag bei 37 °C  $3,6 \times 10^7/\text{mL}$  bzw.  $6,7 \times 10^7/\text{mL}$  für NAR/DMSO und NAR/Aceton, bei 30 °C dagegen für die gleichen Ansätze  $16,7 \times 10^7/\text{mL}$  bzw.  $23,4 \times 10^7/\text{mL}$ . Die gemessenen Werte der Ansätze 5 und 6 (induziert, ohne Substratzugabe) lagen dabei auch wieder über denen mit Substratzugabe, hier wurden am fünften Tag Zelldichten von  $10,5 \times 10^7/\text{mL}$  (37 °C) und  $37,6 \times 10^7/\text{mL}$  (30 °C) bestimmt.

Das mit Ethylacetat aus den Zellsuspensionen extrahierte Material konnte mittels HSCCC (III.11.11) aufgereinigt werden. In 90 min (180 mL Fließmitteldurchfluss) wurde das Substrat vom Produkt abgetrennt und vollständig eluiert. Danach konnte das eingesetzte Substrat von der Spule ausgewaschen werden. Die Reinheit des durch HSCCC abgetrennten Apigenins wurde mit HPLC-Messung zu 98 % bestimmt.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

### 4.10 Biotransformation von Naringenin in FNS I-transformierter *E. coli*

Die Experimente zur Biotransformation in *S. cerevisiae* sollten die Grundlagen liefern für die Nutzung weiterer Enzyme, insbesondere CytP450-abhängige Monooxygenasen. Für andere Enzyme, wie z.B. die Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen, eignet sich aber die Expression in Bakterien wegen ihres schnelleren Wachstums und der einfacheren Handhabung. Dies sollte in *E. coli* überprüft werden. Tatsächlich wurde NAR in FNS I-transformierter *E. coli* effizient umgesetzt mit 75 % nach 48 Stunden und 85 % nach 72 Stunden (Abb. 38).



**Abb. 38: Biotransformation von (2S)-Naringenin in FNS I transformierten Bakterienkulturen (500 mL Kultur, Zugabe von 25 mg Naringenin).**

Im Falle von *S. cerevisiae* hatte die Luftzufuhr starken Einfluss auf die Produktausbeute. Da die Produktausbeuten von Ansatz zu Ansatz Schwankungen unterlagen, wurden die Versuche mindestens einmal wiederholt, wobei immer jeweils 3 Proben pro Versuchsansatz analysiert wurden. Auch wurde immer der Normalansatz NAR gelöst in DMSO als „Standardansatz“ mit inkubiert und als Kontrolle gleich 100 gesetzt. Die Variation der Produktraten ist auch von anderen Biotransformationsansätzen mit *E. coli* bekannt (persönliche Mitteilung Dr. Britta Rohde und Dr. Stefan Martens).

Die hier beschriebene Biotransformation von NAR kann übertragen werden auf die Gewinnung von Diosmetin, Luteolin, Chrysoeriol, Chrysin oder 7,4'-Dihydroxyflavon, soweit die jeweiligen Vorstufen zur Verfügung stehen. Die Produkte können dann rasch und verlustfrei durch HSCCC gereinigt werden.

Außerdem können die Ergebnisse auf FHT-Transformanten in Hefe bzw. F3'H oder F3'5'H Transformanten übertragen werden. Die Auswirkung der Inkubationsdauer konnte bereits in Biotransformationen mit F3'5'H transformierten Hefezellen nachgewiesen werden (nicht dargestellt), die bei einer Inkubation von fünf Tagen Pentahydroxyflavanon aus NAR lieferte,

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

das mittels HSCCC gereinigt wurde. In diesem Fall war nach einem Tag noch kein Produkt detektierbar.

In der Literatur wird von noch längeren Inkubationszeiten berichtet. Lindahl *et al.* (2006) inkubierten ihre *S. cerevisiae*-Zellsuspensionen sogar über einen Zeitraum von 16 Tagen im Batch-Verfahren und konnten dann 600 µg/L der Artemisinin-Vorstufe gewinnen. Allerdings setzen die Autoren ihrer Biotransformation in „regelmäßigen Abständen“ frisches galaktosehaltiges Medium zu.

Darauf wurde in den eigenen Ansätzen bisher verzichtet, sollte aber für mögliche weiterführende Experimente in Betracht gezogen werden.

Die Bedingungen für die Biotransformation wurden bislang nur im Labormaßstab geprüft und müssen für präparative Zwecke optimiert und überwacht werden. Industrielle Fermentationen mit *S. cerevisiae* werden meist im sog. Fed-batch Verfahren durchgeführt (Papagianni *et al.* 2006), das im Gegensatz zum Batch-Verfahren, Substrate, portionsweise oder kontinuierlich füttert (Kreis *et al.* 2001). Glucose ist für Hefen die bevorzugte Kohlenstoffquelle, die allerdings bei hoher Konzentration zu unerwünschtem Ethanol verarbeitet wird, was durch die schrittweise Zugabe des Zuckers zur Vermeidung kritischer Konzentrationen im Fed-batch-Verfahren begrenzt werden kann (Papagianni *et al.* 2006).

In der Literatur wird Sauerstoffzufuhr für die Verbesserung der Produktion von Metaboliten in *S. cerevisiae* beschrieben. So berichteten Lindahl *et al.* (2006), dass sie für die Produktion von Amorpha-4,11-dien, einer Vorstufe des Artemisinins, einen Versuchsaufbau nutzten, in dem sie ständig sterile Luft in die Hefezellsuspension einleiten konnten. Um optimales Wachstum der Hefezellen zu gewährleisten, sind aerobe Bedingungen im Reaktor nötig. Zucker wird dann zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O oxidiert und liefert damit die benötigte Energie für Wachstum und Metabolismus (Papagianni *et al.* 2006). So konnte auch in den oben beschriebenen Biotransformations-Experimenten die Ausbeute durch Luftzufuhr um 20 % gesteigert werden.

FNS I benötigt 2-Oxoglutarat als Co-Substrat, das unter Decarboxylierung zu Succinat Elektronen für die Übertragung eines Sauerstoffatoms bzw. Bildung der reaktiven Ferrylspezies liefert. Ascorbat fungiert nur als Schutz für Fe (II) im aktiven Zentrum (Turnbull *et al.* 2004, Prescott und Lloyd 2000). Die Zugabe der Cofaktoren ist *in vitro* erforderlich, kann aber auch im Biotransformationsexperiment die Ausbeute um 40 % erhöhen. Vermutlich sind die Konzentrationen dieser Faktoren *in situ* limitierend.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Eisen ist essentiell für Wachstum und Proliferation vieler Mikroorganismen als wichtiger Faktor im Elektronentransport (Kosman 2003). Deshalb existieren verschiedene Fe-Aufnahmemechanismen. Neben Reduktasen, Fe-Permeasen und Ferroxidasen sind besonders sog. Siderophorpermeasen studiert worden, die Fe (III) komplexieren. (Kosman 2003). Singh *et al.* (2007) untersuchten den Fe-Flux zwischen Vakuole und Cytoplasma in *S. cerevisiae* und beschrieben, die Vakuole als Speicherort für Eisen in der Zelle.

Die Expression heterologer Proteine kann in *S. cerevisiae* durch Ethanol gesteigert werden (van de Laar *et al.* 2006). Diese Beobachtung wurde am Ende einer Expression im Batch-Verfahren gemacht. So stellten die Autoren fest, dass am Ende des von ihnen verwendeten Verfahrens, in dem Ethanol als Kohlenstoffquelle genutzt wurde und die Ausbeute an heterologem Produkt (AntikörperVHH-BC15) um das 4,8-fache anstieg. Die Autoren betrachten eine Konzentration von 1 % v/v Ethanol in der Lösung als optimal, da sich zu hohe Ethanolkonzentrationen auch negativ auf das Wachstum der Hefen auswirken können. In den eigenen Versuchen zeigte sich eine Konzentration von 4 % Ethanol im Medium als am Besten geeignet, wobei aber van de Laar *et al.* (2006) durch ständige Messungen ein gleich bleibendes Ethanolverhältnis einstellten, wohingegen in den hier beschriebenen Versuchsanordnungen nur der Anfangswert bestimmt werden konnte, der sich sicherlich während der Inkubation änderte. (Abb.32 B).

Der Grund für den Ethanoleffekt ist noch nicht aufgeklärt. So induziert Ethanol eine Hitzeschock-ähnliche Antwort und verändert das Redox-Gleichgewicht in der Zelle. Die Proteinfaltung im ER ist abhängig von diesem Gleichgewicht und so könnte Ethanol die Effektivität der Proteinfaltung steigern. Ethanol bewirkt weitere physiologische Effekte, kann passiv in die Zelle transportiert werden, oder durch Einfluss auf die Membran Lipid-Zusammensetzung der Membran ihre Permeabilität ändern (van de Laar *et al.* 2006, Mishra und Prasad 1989). Die erhöhte Permeabilität der Membran könnte die Aufnahme des Substrates NAR in die Zelle erhöhen. Möglicherweise liefert das auch die Erklärung der erhöhten Ausbeute durch Zugabe von Aceton und in geringen Konzentrationen auch des Ethylacetats. Beides ist aber wahrscheinlich nur in sehr geringen Konzentrationen hilfreich, in höheren Dosen zerstört es dann möglicherweise die Membran vollständig und wirkt somit toxisch.

Die Produktion von Flavonoiden in *E. coli* kann durch Acetat als Kohlenstoffquelle, neben Glucose (bzw. Galaktose) erhöht werden (Leonard *et al.* 2007). Dazu wurden die Acetat-Assimilationswege kombiniert mit der Expression von Acetyl-CoA Carboxylase amplifiziert, um intrazellulär einen höheren Gehalt an Malonyl-CoA zu erzielen. Acetat wird im Gegensatz

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

zu Malonat leicht aufgenommen. Fütterung von Acetat erhöhte die Produktion der Flavonoide NAR, Pinocebrin und ERI in diesen gentechnisch in ihrem Grundstoffwechsel modifizierten *E. coli*. Für Hefezellen ist dieses Verfahren zwar nicht beschrieben, wäre aber ebenfalls für Synthesen verschiedener Flavanone denkbar.

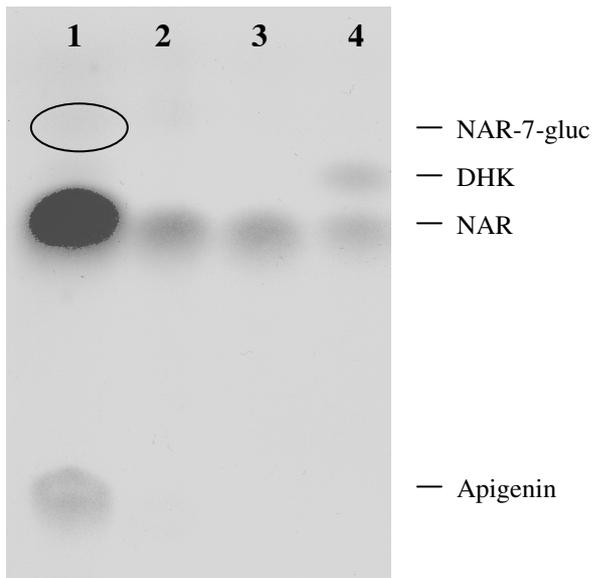
Die Auswirkungen von erhöhten Temperaturen auf Hefezellen werden in der Literatur ebenfalls diskutiert. So werden bei steigenden Temperaturen schnell Hitzeschockproteine (Hsps) induziert. Viele dieser Proteine fungieren als molekulare Chaperone in der Synthese, Faltung oder auch beim Transport von Proteinen. Hitze-induzierte HSP-Gene werden in *S. cerevisiae* unter anderem durch den Hitzeschocktranskriptionsfaktor Hsf1 geregelt. Hsf1 bindet an Hitzeschockelemente (HSEs) innerhalb der Promoterregionen von HSP-Genen. Unter physiologischen Bedingungen bindet Hsf1 mit niedriger, bei Stress dagegen mit hoher Affinität. Dieser Transkriptionsfaktor wird ebenfalls bei oxidativem Stress, Ethanol Behandlung oder auch bei Mangel an Glucose induziert (Hashikawa *et al.* 2007, Yamamoto *et al.* 2008). Da die Zelle auf erhöhte Temperatur mit der Bildung des gleichen Faktors reagiert, der auch bei Behandlung mit Ethanol auftritt, könnte in beiden Fällen die Permeabilität der Zelle für NAR betroffen sein, was höhere Produktausbeuten bei Temperaturerhöhung auf 37 °C erklären könnte.

### IV.5 Glucosidasen

#### 5.1 Biotransformation FNS I-transformierter Hefezellen mit Naringenin-7-O-glucosid

Naringenin-7-O-glucosid (NAR-7-gluc) wird von der FNS I nicht umgesetzt (Britsch 1990). Wenn dieses Glucosid zur Biotransformation in FNS I transformierter Hefe eingesetzt wurde, wurde es vollständig deglucosidiert und weder in HPLC (nicht dargestellt) noch nach DC (Abb. 39) nachweisbar, nur noch NAR und das entsprechende Flavon Apigenin. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch in einem nicht induzierten Ansatz und mit untransformierten InvSc-Zellen erzielt, hier war jeweils nur noch NAR nachweisbar (Abb. 39, Spur 2 und 3). Die analoge Biotransformation mit FHT transformierter Hefe lieferte ein ähnliches Ergebnis, da nur NAR und der FHT-Produkt DHK detektiert wurden (Abb. 39, Spur 4).

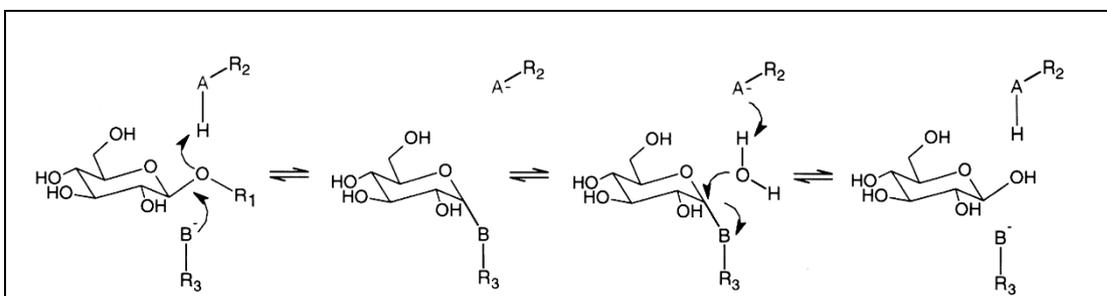
## IV. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 39: Biotransformation von Naringenin-7-glucosid in FNS I (Bahn 1) oder FHT (Bahn 4) transformierten Hefekulturen. Als Kontrollen wurden ein nicht induzierter Ansatz (Bahn 2) und untransformierte InvSc-Zellen (Bahn 3) mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte mit Zellulose-Dünnschichtchromatographie in Fließmittel 2, die Detektion erfolgte mit Echtblausalz-Lösung.**

Die Experimente weisen darauf hin, dass Hefen Glucosidaseaktivität zur Hydrolyse von Naringenin-7-*O*-glucosid besitzen müssen. Aus der Literatur ist bekannt, dass *S. cerevisiae* - Stämme Glucoseaktivität besitzen (McMahon *et al.* 1999).

Um ein Hefe-System für die Biotransformation von Flavonoidglucosiden zu entwickeln, sollten die verantwortlichen  $\beta$ -Glucosidasen, für ein späteres „Silencing“, identifiziert werden. Glucosidasen oder Glycosidhydrolasen (GH; EC 3.2.1.-) sind weit verbreitet und werden nach Sequenzähnlichkeiten in momentan 113 Familien eingeteilt. Einige der Enzyme besitzen ähnliche 3D-Strukturen so dass sie in Clans gruppiert wurden. Bis jetzt wurden fünf Clans beschrieben, darunter besonders umfangreich Clan GH-A (manchmal auch als 4/7 Superfamilie beschrieben, weil der Protonendonator und die nucleophile Aminosäure auf Strang 4 und 7 des  $(\alpha/\beta)_8$  -Barrels gefunden wurden (Jenkins *et al.* 1995, Henrissat und Davies 1997)). Er beinhaltet die Familien 1, 2, 5, 10, 17, 26, 35, 39, 42, 53 (Henrissat und Davies 1997).



**Abb. 40: Reaktionsmechanismus der  $\beta$ -Glucosidasen aus Morant *et al.* (2008).**

$\beta$ -Glucosidasen hydrolysieren die glucosidische Bindung durch elektrophilen Angriff der sauren Gruppe AH auf den Sauerstoff und unter Erhalt der anomeren Konfiguration. Die

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Spaltung wird von der nukleophilen Base  $B^-$  unterstützt (Abb. 40). Der resultierende Glucosyl-Enzym-Komplex wird durch ein Wassermolekül hydrolysiert und generiert ein Produkt, von ursprünglicher Konfiguration an C1. Zwei konservierte Glutaminsäurereste fungieren dabei als katalytische Nucleophile und als Säure/Base-Katalysator (Davies und Henrissat 1995, Morant *et al.* 2008).

$\beta$ -Glucosidasen spielen eine wichtige Rolle im Stoffwechsel von Pflanzen. Sie sind an Bildung und Transport von Zwischenprodukten der Lignifizierung beteiligt (Dharmawardhana *et al.* 1995, Escamilla-Trevino *et al.* 2006), der Zellwand-Degradation im Endosperm während der Keimung und der Aktivierung von Phytohormonen und chemischen Abwehrstoffen. Für den letztgenannten Aspekt hat die subzelluläre Lokalisation besondere Bedeutung, was z.B. in *Avena* eingehend untersucht wurde, wo Avenoside in der Vakuole zur Abwehr gespeichert werden. So sind Glucosidasen und Glucoside in verschiedenen Kompartimenten der Zelle lokalisiert. Während die Flavonoid-Glucoside in der Vakuole gespeichert sind (Koes *et al.* 2005), unterscheidet sich die Lokalisierung der Glucosylhydrolasen in Monokotyledonen und Dikotyledonen. Die  $\beta$ -GHn der einkeimblättrigen Pflanzen besitzen ein N-terminales Transit-Peptid zum Transfer in die Plastiden. Die Eudikotyledonen enthalten dagegen ein N-terminales Signalpeptid, mithilfe dessen die Glucosidasen über den sekretorischen Weg des ER's cotranslational glycosyliert werden und in Apoplasten oder intrazellulär in Proteinkörpern eingeschlossen werden. Diese Trennung in verschiedenen Kompartimenten liefert der Pflanze ein Zwei-Phasen-Abwehrsystem. Während in der intakten Pflanze beide Teile (Glucosid und Glucosidase) getrennt sind, wird das System durch Verletzung aktiviert, die Glucoside kommen in Kontakt mit der entsprechenden  $\beta$ -Glucosidase und die Pflanze verfügt sofort über toxische Abwehrstoffe (z.B. cyanogene Glucoside). Die größte Menge dieses Zweiphasensystems ist in Keimlingen und jungen Pflanzen zu finden, um die Pflanze in diesem empfindlichen Stadium vor Herbivoren oder Pathogenen zu schützen (Morant *et al.* 2008). Neben dem Vorkommen in jungen Pflanzen werden aber auch toxische endogene Abwehrstoffe wie z.B. das Podophyllotoxin in Rhizomen glucosidiert, um dann in der Vakuole gespeichert zu werden. Die Glycosidierung stellt auch hier eine (vorübergehende) Entgiftung und einen Selbstschutz für die Pflanze dar. Das Vorkommen von Lignanglucosid-spezifischen  $\beta$ -Glucosidasen ist in *Podophyllum* und *Linum* gut belegt (Berim 2007).

Die  $\beta$ -Glucosidasen aus anderen Organismen sind für die eigene Arbeit nicht relevant, sollen aber im Kontext kurz angesprochen werden. Humane saure  $\beta$ -Glucosidase (GCCase, Glucosylceramidase, EC 3.2.1.45) wurde als membranassoziiertes Protein beschrieben,

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

welches normalerweise das natürliche Substrat Glucosylceramid, aber auch synthetisches  $\beta$ -Glucosid spaltet (Liou und Grabowski 2009). Bei verschiedenen Varianten der sog. Gaucher-Krankheit (Typ 1, 2 und 3), ist die Funktion dieses Enzyms gestört, und es kommt zu einer Anhäufung großer Mengen an Glucocerebrosid, was zu Vergrößerung von Leber und Milz führt (Beutler *et al.* 1971).

Dagegen kommt die humane cytosolische  $\beta$ -Glucosidase (hCBG) in Leber, Darm, Niere und Milz vor. Dieses Enzym ist vermutlich im Metabolismus von Xenobiotika involviert, was aber *in vivo* erst noch bestätigt werden muss (Berrin *et al.* 2002, 2003).

Bakterien besitzen häufig  $\beta$ -Glucosidaseaktivität, die im Falle von Darmbakterien, die am Metabolismus von Xenobiotika und sekundären Pflanzenstoffen beteiligt sind. Bekannt dafür sind z.B. verschiedene Stämme von *Bifidobacterium* spp. und *Bacteroides thetaiotaomicron* (Dabek *et al.* 2008).

Glucosidasen sind schon seit langer Zeit von technologischem Interesse. Zusammen mit Pektinasen haben sie z.B. Einfluss auf Aroma von Früchten und Gemüsearten. In der Weinindustrie werden sie zur Verbesserung des Weinaromas verwendet, indem sie glucosylierte Vorstufen modifizieren sollen (Bhat 2000). Außerdem werden sie in der Pharmazie, Kosmetik- und Waschmittelindustrie eingesetzt. (Gargouri *et al.* 2004, Bhat 2000). Auch zur Spaltung komplexer Kohlenhydrate werden  $\beta$ -Glucosidasen genutzt. So wurden verschiedene  $\beta$ -Glucosidasen kloniert, die Cellulose spalten und zur Bildung von Bioethanol als Ersatz für fossile Brennstoffe führen (Kotaka *et al.* 2008).

### 5.2 Kenntnisstand zu Glucosidasen aus Bäckerhefe

Die Hefedatenbank (<http://www.yeastgenome.org>) wurde nach Genen für O-Glucosidasen durchsucht, und daraus *BGL2*, *EXG1*, *SPR1*, *YIR007W*, *SUC2*, *YGR287C*, *YJL216C*, *YIL172C*, *DSE 2* und *CWH41* (entsprechende Genorte: Anhang Tab. 9) ausgewählt. Die Auswahl orientierte sich an der noch nicht endgültigen Funktionsbeschreibung bzw. der Beteiligung an z.B. „drug resistance“. *YIL172C* wurde z. B. als Protein mit Ähnlichkeiten zu Glucosidasen aber unbekannter Funktion beschrieben (Tatusov *et al.* 2000, Huh *et al.* 2003), das mit Hilfe des „green fluorescent protein“ (GFP)-Fusionsprotein als im Cytoplasma lokalisiert werden konnte. Das gleiche gilt für *YIR007W*, auch hier handelt es sich um ein putatives Protein mit bisher nicht genau bekannter Funktion (Giaever *et al.* 2002, Huh *et al.* 2003). *BGL2* kodiert für eine endo- $\beta$ -1,3-glucanase, die in der Zellwand vorkommt (Klebl und Tanner 1989, Mrsa *et al.* 1993). Homologe zu *BGL2* wurden auch in vielen anderen Pilzen gefunden, so z.B. auch in *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus* (Sarchy *et al.*

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

1997, Mouyna *et al.* 1998). Mutationen von *BGL2* führten zu Defekten in der Zellwand und zu osmotischem Stress. Bei **DSE 2** handelt es sich um ein sekretorisches Enzym, das ebenfalls Ähnlichkeit zu Glucanasen aufweist. Es degradiert Zellwand von der Tochter-Seite der Zelle und führt somit dazu, dass sich diese von der Mutterzelle abtrennt (Colman-Lerner *et al.* 2001, Tadi *et al.* 1999, Doolin *et al.* 2001). Eine wichtige Exo-1,3- $\beta$ -Glucanase ist **EXG1**. Das Enzym ist am *beta*-Glucan Aufbau der Zellwand beteiligt und kommt in drei unterschiedlich glycosylierten Isoenzymen vor (Lariba *et al.* 1993, Capellaro *et al.* 1998). EXG1 aus *S. cerevisiae* wurde bereits in *E. coli* exprimiert und charakterisiert (Suzuki *et al.* 2001). Eine EXG1 Deletionsmutante zeigte Insensitivität zum Hefekillertoxin. Das Killertoxin K1 ist ein virales sekretorisches Protein, das sensitive Zellen angreift. Das Toxin bindet an Rezeptoren der Zelloberfläche die  $\beta$ -1,6-Glucan-Komponenten enthalten, und führt zu letalen Kationenkanälen in der Plasmamembran (Roemer *et al.* 1993). Suzuki *et al.* (2001) testeten verschiedene  $\beta$ -glucosidische Substrate wie Cellobiose, Laminarbiose, Gentiobiose oder pNPG und konnten breite Spezifität für  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1,6-Oligosaccharide nachweisen. **SPR1** ist eine Sporulations-spezifische Exo- $\beta$ -1,3-Glucanase, die für die Thermoresistenz der Ascosporen verantwortlich ist (Muthukumar *et al.* 1993) und sehr große Ähnlichkeiten zu EXG1 aufweist (Vazquez de Aldana *et al.* 1991). Das Gen wird nur in der späten Phase der Sporulation transkribiert. Mutanten von SPR1 konnten pNPG und Laminarin nicht mehr hydrolysieren und zeigten auch geringere Thermoresistenz im Vergleich zum Wildtyp. EXG1 und SPR1 sind sich insgesamt sehr ähnlich und scheinen eng verwandt zu sein. So kodiert *S. cerevisiae* scheinbar für 2 Exo-1,3-glucanasen: *EXG1* wird während der S zur G2-Phase des vegetativen Zellzyklus maximal exprimiert, während *SPR1* spezifisch während der Ascosporwandbildung exprimiert wird. Auch *SPR1* Transkripte sind zur selben Zeit nachweisbar in der auch *EXG* transkribiert wird. Daneben weist das SPR1-Peptid 64 % Homologie zu EXG auf. Dass es sich bei SPR1 um ein sporulationsspezifisches Enzym handelt, konnte mit Mutanten gezeigt werden. Diese produzieren keine Exo-1,3-glucanase während der Sporulation (Muthukumar *et al.* 1993). Die **CWH41**, auch als *GLS1* (E.C. 3.2.1.106) bekannt (Jiang *et al.* 1996), kodiert für ein ER- Glycoprotein, das die terminale Glucose von größeren Oligosaccharidketten entfernt (Simons *et al.* 1998). Das Enzym **SUC2** wurde als Invertase, auch bekannt als *beta*-Fructofuranosidase, *beta*-Fructosidase oder Sucrase, beschrieben. Es katalysiert die Hydrolyse des Disaccharids Sucrose zu Fruktose und Glucose und des Trisaccharids Raffinose zu Fruktose und Melibiose (Gascon *et al.* 1968, Taussig und Carlson 1983).

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Für eine mögliche Abgrenzung der  $\beta$ - zu den  $\alpha$ -Glucosidasen wurden auch zwei Glucosidasen ausgewählt, die Ähnlichkeiten zu  $\alpha$ -Glucosidasen zeigen. **YGR287C** ist als Protein mit unbekannter Funktion beschrieben worden, dass möglicherweise mit Ribosomen interagiert und Ähnlichkeiten zu alpha-D-Glucosidase (Maltase) aufweist. Das native Protein wurde in gereinigten Mitochondrien nachgewiesen (Sickmann *et al.* 2003, Fleischer *et al.* 2006, Reinders *et al.* 2006). Auch **YJL216C** ist ein Protein mit unbekannter Funktion und Ähnlichkeit zu alpha-D-Glucosidasen. Mit verschiedenen Transportern und anderen Genen ist es im sog. „pleiotropic drug resistance“ (PDR)-Phänomen involviert (Vandenbol *et al.* 1994, Hikkel *et al.* 2003, Lucau-Danila *et al.* 2003).

### 5.3 Expression von Hefeglucosidasen

Aus *S. cerevisiae* wurde RNA isoliert (siehe III.10.1) und daraus, wie unter III.10.3 beschrieben, cDNA hergestellt. Zunächst wurden die Gene *CWH41*, *SCW10*, *YIL172C* mit den adäquaten Primerkombinationen (siehe Anhang) amplifiziert und in den pDEST17-Vektor für anschließende Expression kloniert. Nach Kontrollsequenzierung wurde *E. coli* damit transformiert (III.10.11). Leider zeigte die SDS-PAGE Trennung der Proteinextrakte, dass nur YIL172 C erfolgreich exprimiert wurde (nicht dargestellt). Auf weitere Expressions-Optimierungsversuche in *E. coli* wurde verzichtet, stattdessen wurde nun versucht, alle anderen Gene in den pYES2.1 Vektor, zur Expression in INVSc-Zellen, zu klonieren. Da es sich um Proteine aus Hefe handelt, sollte eine homologe Expression einfacher sein. Nach positiver Restriktionsanalyse und Sequenzierung wurden INVSc-Zellen mit diesen Konstrukten transformiert, in Sc-U-Medium selektiert und in jeweils 250 mL YPGE-Medium angezogen (III.10.13.2). Die Hefezellen wurden aufgeschlossen (III.10.13.3) und die rohen Extrakte zur Überprüfung der Expression in Western Blots eingesetzt (Abb. 41).

## IV. Ergebnisse und Diskussion

Tab. 4: Molekulargewichte der getesteten Glucosidasen.

Protein	MW (kDa)
YIL172C	69
YJL216C	67
BGL2	34
EXG1	51
SPR1	52
SUC2	60
YIR007W	87
DSE2	33
CWH41	97
YGR287C	69

In den Extrakten von allen 10 Transformanten war das jeweilige Protein in der erwarteten Größe (Tab. 4) nachweisbar, wobei in einigen Fällen mehrere Banden auftauchten.

Die apparenten Molekulargewichte erhöhen sich jeweils um 5 kDa, da zur Identifizierung mit Antikörper das V5-Epitop an das jeweilige Protein angehängt wurde. Bei mehreren Banden pro Spur ist die relevante Bande mit Pfeil markiert.

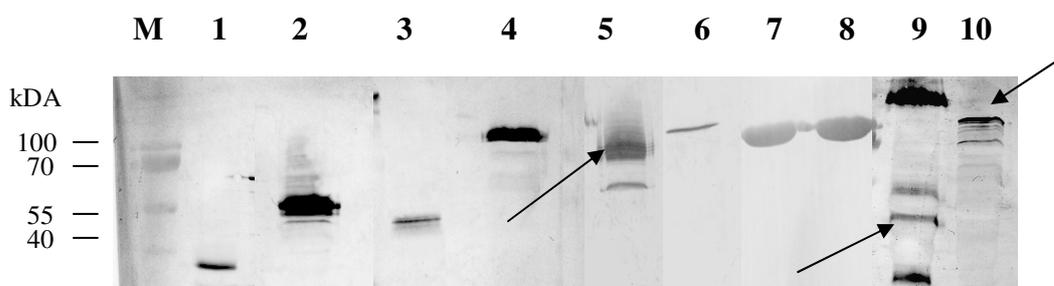


Abb. 41: Western-Blot zum Nachweis der Glucosidasen in Hefe-Transformanten. M, Marker #SM0671 (Fermentas); 1, BGL2; 2, EXG1; 3, SPR1; 4, YIR007W; 5, SUC2; 6, YGR287C; 7, YJL216C; 8, YIL172C; 9, DSE2; 10, CWH41.

### 5.4 Selektivität der Glucosidasen

Der Enzymrohextrakt der *INVS<sub>c</sub>*-Zellen besitzt  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucosidaseaktivität, mit spezifischen Aktivitäten von 0,071 U/mg bzw. 0,017 U/mg. Diese Werte wurden als Basis für die Messung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucosidaseaktivität verwendet und gleich 100 % gesetzt (Tab. 5). Alle Enzymrohextrakte der zehn genannten Glucosidasen wurden mit Pseudosubstrat ( $\alpha$ - bzw.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

$\beta$ -pNPG) getestet (II.11.2.5), welches als Substrat für Glucosidasen beschrieben ist (Bhiri *et al.* 2008). Erwartet wurde, dass die Expression der einzelnen Glucosidasen als Beitrag zur spezifischen Aktivität der Rohextrakte messbar wird. Bei der Messung der  $\alpha$ -Glucosidaseaktivität wurden hohe Werte für YIL172C (0,222 U/mg Enzym), YGR287C (0,306 U/mg Enzym) und YJL216C (0,409 U/mg Enzym) ermittelt. Die anderen Enzymwerte reichten von 0 U/mg Enzym für BGL2 bis 0,058 U/mg Enzym für EXG1. Im  $\beta$ -Glucosidasetest wurden für YIR007W, SPR1 und EXG1 spezifische Aktivitäten von 0,091 U/mg, 0,082 U/mg bzw. 0,107 U/mg gemessen. Die anderen potentiellen Glucosidasen erreichten Werte von 0 U/mg Enzym (YIL172C) bis 0,022 U/mg Enzym (CWH41).

**Tab. 5: Bestimmung der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Glucosidaseaktivität der zehn Hefeglucosidasen mit  $\alpha$ -/  $\beta$ -pNPG als Substrat im Verhältnis zu „leeren“ InvSc-Zellen (100 %).**

	$\alpha$ -Glucosidase-Test	$\beta$ -Glucosidase-Test
YJL216C	670	160
EXG1	180	70
SPR1	110	580
YIR007W	160	630
DSE 2	180	210
CWH41	160	230
SUC2	200	160
YGR287C	530	170
YIL172C	410	90
BGL2	90	120
INVSc "leer"	100	100

Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse wurden YGR287C, YIL172C und YJL 216 C den  $\alpha$ -Glucosidasen EXG1, SPR1 und YIR007W den  $\beta$ -Glucosidasen zugeordnet. Für die anderen vier Enzyme (BGL2, DSE 2, CWH41 und SUC2) konnte keine genaue Zuordnung getroffen werden, da sich die Ergebnisse im Test für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucosidasen nicht deutlich unterschieden und sich auch nicht wesentlich von den endogenen Aktivität der „leeren“ INVSc-Zellen abhoben, die an sich schon Glucosidaseaktivität aufweisen.

### 5.5 Gruppenzugehörigkeit von EXG1, SPR1 und YIR007W und Vergleich mit EXG1 aus *Candida albicans*

EXG1, SPR1 und YIR007W gehören zur Gruppe der  $\beta$ -Glucosidasen und wurden mit dem Internetprogramm Prosite (<http://www.expasy.ch/prosite>) der Familie 5 der Glycosylhydrolasen zugeordnet. Zu dieser Familie gehören auch die „bakers yeast glucan 1,3-

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

$\beta$ -glucosidase 2“ (EXG2, EC 3.2.1.58) und das Protein YBR056w, sowie die  $\beta$ -Mannanase (manA, EC 3.2.1.78) aus *Caldocellum saccharolyticum*, außerdem eine Reihe weiterer Enzyme aus Bakterien (z.B. aus Clostridium, Pseudomonas, Ruminococcus oder Streptomyces). Eine Exo- $\beta$ -1,3-Glucanase (EXG1) aus *Candida albicans* wurde beschrieben und acht konservierte Aminosäuren, die das aktive Zentrum der Familie 5-Glycosylhydrolasen bilden, identifiziert (Chambers *et al.* 1993, Cutfield *et al.* 1999). Es handelt sich um Arg<sup>92</sup>, His<sup>135</sup>, Asn<sup>191</sup>, Glu<sup>192</sup>, His<sup>253</sup>, Tyr<sup>255</sup>, Glu<sup>292</sup> and Trp<sup>363</sup>, wovon Glu<sup>192</sup> als Protonendonator und Glu<sup>292</sup> als nucleophiler Rest fungieren. Die EXG1 aus *Candida albicans* faltet sich zu einer irregulären ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>-Barrel-Tertiärstruktur, in der Helix 5 fehlt, Helix 8 sehr klein ist und Helix 1 ein weiteres helikales Segment vorausgeht. Loops verbinden das C-terminale Ende des  $\beta$ -Stranges mit den Helices, und sind verantwortlich für die Bildung einer flachen Rinne, die zu einer tiefen zentralen Tasche führt. In dieser Tasche sind die oben genannten aktiven Reste exponiert. Zwei Phenylalanine (Phe<sup>144</sup> und Phe<sup>258</sup>, im Alignment gelb markiert), an gegenüberliegenden Seiten, formen ein „Tor“, ungefähr 10 Å oberhalb des Grundes der Tasche, die definiert wird durch das schon erwähnte Trp<sup>363</sup>.

Im Alignment von EXG1, SPR1 und YIR007W aus Hefe mit EXG1 aus *C. albicans* (Abb. 42), zeigte sich, dass die acht katalytisch relevanten Aminosäuren in EXG1 und die zwei Phenylalanin-Reste (fett bzw. gelb markiert) auch in SPR 1 vertreten sind. In der Sequenz von YIR007W konnten nur zwei analoge Reste (His<sup>135</sup> und Phe<sup>258</sup>) zugeordnet werden. Allerdings ist die Sequenz deutlich länger als die der anderen, was die Zuordnung einzelner konservierter Aminosäuren erschwert.

Ein Alignment der drei Protein-Sequenzen mit der NCBI- Datenbank (blastP) ergab eine Übereinstimmung von 89 % von EXG 1 mit EXG 1 aus *S. bayanus* und 70 % mit einem Protein unbekannter Funktion aus *Lachancea thermotolerans*. SPR1 zeigte 84 % und 66 % Übereinstimmung mit SPR1 bzw. EXG1 aus *S. bayanus*. Schließlich konnte für YIR007W höchste Homologien von 53 % und 50 % für Polypeptide mit unbekannt Funktionen aus *Vanderwaltozyma polyspora* und *Lachancea thermotolerans* gefunden werden.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

```

Sc_EXG1      ----KDLAKSRLQSHWST-----FYQEQDFANIAS--QGFNLVRIPIGYWAFQTL 142
Sc_SPR1      ----YEKAKERLYSHWST-----FYKEEDFAKIAS--QGFNLVRIPIGYWAFTTL 143
Ca_EXG1      ----KEAASRILQKHWST-----WITEQDFKQISN-LGLNFVRIPIGYWAFQLL 141
Sc_YIR007W   CARIKEKAPELFESNCIIGLESMNEPNCGYIGETNLDVIPKERNLKLKPTAFQSFMLG 300
              : *   : .:                : * :: *.. .::: : * .: :*

Sc_EXG1      D-----DDPYVSGLQESYLDQAIGWARNNSLK---VW 171
Sc_SPR1      S-----HDPYVTAEQEYFLDRAIDWARKYGLK---VW 172
Ca_EXG1      D-----NDPYVQG-QVQYLEKALGWARKNNIR---VW 169
Sc_YIR007W   EGIECTIDQYKRTFFGFSGKPKCTINPKGKKAWLSAERDAIDAKYNWERNPEWKPDTCI 360
              .                   . . . . . : * * :

Sc_EXG1      VDLHGGAAGSQNGFDNSGLRDSYKFLEDSNLAVTTNVLNYILKKYSAEEYLDTVIGIELIN 231
Sc_SPR1      IDLHGGAAGSQNGFDNSGLRDSYKFLEDENLSATMKALTYILSKYSTDVYLDTVIGIELLN 232
Ca_EXG1      IDLHGAPGSQNGFDNSGLRDSYNFQNGDNTQVTLNVLNTIFKKYGGNEYSDDVIGIELLN 229
Sc_YIR007W   WKLHGVWEIQNGKRPVLLKPNYFSQPDATVF INNHFVDYYTGIYNKFRFEDQELFIIIQP 420
              .***.   ***   * : . *   . . : :   * .   * : * :

Sc_EXG1      EPLGPVLMDK-----MKNDYLAPAYEYLRNNIKSDQVIII 267
Sc_SPR1      EPLGPVIDMER-----LKNLLLKPAYDYLRNKINSNQIIVI 268
Ca_EXG1      EPLGPVLNMDK-----LKQFFLD-GYNSLR-QTGSVTPVII 263
Sc_YIR007W   PVMKPPPNLQNSKILDNRTICACHFYDGMTLMYKTWNKRIGIDTYGLVNKKYSNPAFAVV 480
              : *   . . . . . : :   *   . . : .   : :

Sc_EXG1      HDAFQPPYNYWDDFMTENDGYWGVTDIDHHYQVFASDQLERSIDEH---IKVACEWGTGVL 324
Sc_SPR1      HDAFQPPYHYWDGFLNDEKNEYGVIIDHHYQVFASQVELTRKMNER---IKIACQWGKDAV 325
Ca_EXG1      HDAFQVFGYWNFLTVAEGQWNVVDHHYQVFASGGELSRNINDH---ISVACNWGWDAK 320
Sc_YIR007W   LGENNIRKCIKQQLSEMQDKAKSMLGKKVPVFTEIGIPFMDDDKKAYITNDYSSQTAAL 540
              . :           : . .           : : :   . * : : : : * . . .

Sc_EXG1      NESHWTVCEFAAALTDCTKWLNSVGFGARYDG----- 357
Sc_SPR1      SEKHWSVAGEFAAALTDCTKWLNGVGLGARYDG----- 358
Ca_EXG1      KESHWNVAGEWSAALTDCAKWLNGVNRGARYEG----- 353
Sc_YIR007W   DALGFALEGSNLSYTLWCYCSINSHIWGDWNNEDFSIWSPDDKPLYHDTRAKTPTPEPS 600
              . : : * . : * : * . * . . .

Sc_EXG1      -----SWVNGDQTSSYIG-----SCANNDDIA----- 379
Sc_SPR1      -----SWTKDNEKSHYIN-----TCANNENIA----- 380
Ca_EXG1      -----AYDN---APYIG-----SCQPLDIS----- 371
Sc_YIR007W   PASTVASVSTSTSKSGSSQPPSFIKPDNHLDLDSPCTLKSDLSGFRALDAIMRFPPIQI 660
              :           . : *           : *   : :

Sc_EXG1      -----YWSDERKENTRRYVEAQLDAFEMRG 404
Sc_SPR1      -----LWPEERKQNTKRFIEAQLDAFEMTG 405
Ca_EXG1      -----QWSDEHKDTRRYIEAQLDAFEYTG 396
Sc_YIR007W   HGRFEFAEFNLCNKSULLKLVGKTTPPEQITVPTYIFIPRHHTPSRLSIRSSSGHYTYNT 720
              . . :   : *   . . . . .

Sc_EXG1      GWIIWCYKTESSELEWDAQRLMFLNGLFPQPLTDRK--YPNQCGTISN 448
Sc_SPR1      GWIMWCYKTENSIEWDVEKLIQLNIFPQPINDRK--YPNQCH---- 445
Ca_EXG1      GWVFSWKTENAPEWSFQTLTYNGLFPQPVTDTRQ--FPNQCGFH-- 438
Sc_YIR007W   DYQVLEWFHEPGHQFIEICAKSKSRPNTPGSDTSDNLPACVIS-- 764
              . . . : * . : :           . * . * . * : *

```

**Abb. 42: Alignment von EXG1, SPR1, YIR007W aus *S. cerevisiae* und EXG1 aus *Candida albicans*. Acht konservierte Aminosäuren in aktiven Zentren der Familie 5-Glycosylhydrolasen sind fett gedruckt; zwei Phenylalanin-Reste, die an der Katalyse beteiligt sind, sind gelb hervorgehoben.**

## IV. Ergebnisse und Diskussion

### 5.6 Hemmung von $\beta$ -Glucosidasen mit Gluconolacton

Die Aktivität von  $\beta$ -Glucosidasen kann durch Zugabe von Gluconolacton gehemmt werden (Parry *et al.* 2001, Bhiri *et al.* 2008). Deshalb wurde den rohen Enzymextrakten von EXG1, SPR1 und YIR007W im Test mit pNPG als Substrat 1,25 mM bzw. 2,5 mM oder 3,75 mM Gluconolacton zugesetzt. Eine Hemmung der Aktivität trat ab 1,25 mM Gluconolacton (Abb. 43) auf, von der YIR007W am stärksten betroffen war. Bei dieser Konzentration sank die Aktivität (0,016 U/mg Enzym) auf 16 % der Kontrolle ohne Gluconolactonzugabe (0,100 U/mg Enzym). Im Falle von EXG1 (0,036 U/mg Enzym) bzw. SPR1 (0,029 U/mg Enzym) waren die Aktivitäten nach Zugabe von 3,75 mM Gluconolacton auf 31 % bzw. 27 % erniedrigt. Die  $IC_{50}$ -Werte wurden als 1,7 mM (EXG1), 1,5 mM (SPR1) und 0,6 mM (YIR007W) bestimmt. Zusätzlich wurde der Effekt des Gluconolactons auf  $\alpha$ -Glucosidasen (YJL216C und YGR287C) getestet (nicht dargestellt), was aber zu keiner Hemmung führt. Das Ergebnis bestätigt Berichte, dass Gluconolacton nur  $\beta$ -Glucosidasen hemmen kann. Hemmstoffe für  $\alpha$ -Glucosidasen sind in der Literatur beschrieben, z.B. Nojirimycin, N-butyldeoxynojirimycin und Castanospermin. Auch Genistein scheint ein potentieller Inhibitor für  $\alpha$ -Glucosidasen zu sein (Lee und Lee 2001). Diese Naturstoffe wurden nicht getestet, da in dieser Arbeit nur  $\beta$ -Glucosidasen von Interesse sind.

Glucose hat, selbst bei einer Konzentration von 100 mM, keinen hemmenden Effekt auf die drei  $\beta$ -Glucosidasen EXG, SPR1 und YIR007W (nicht dargestellt).

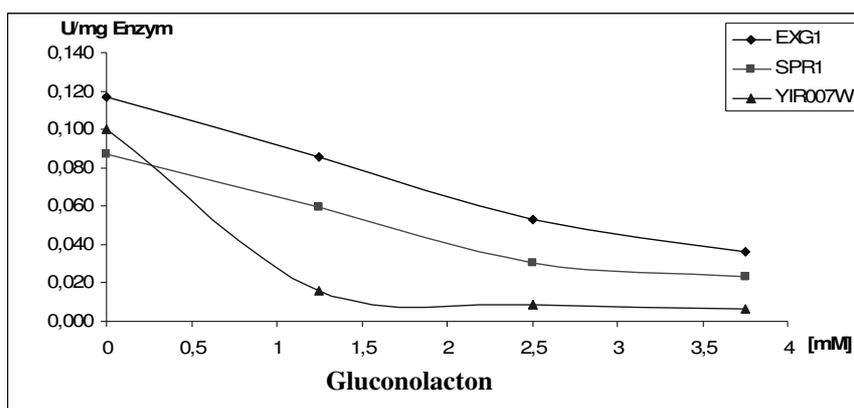


Abb. 43: Hemmung der Glucosidaseaktivität von EXG1 (—◆—), SPR1 (—■—) und YIR007W (—▲—) aus Hefe nach Zugabe von 1,25 mM, 2,5 mM und 3,75 mM Gluconolacton.

Die Effekte von Gluconolacton oder Glucose auf verschiedene  $\beta$ -Glucosidasen sind beschrieben. Zum Beispiel wurden zwei extrazelluläre  $\beta$ -Glucosidasen der Pol6 Mutante von *Penicillium occitanis* durch 0,03 mM Gluconolacton oder 1 mM Glucose gehemmt (Bhiri *et al.* 2008). Eine thermostabile  $\beta$ -Glucosidase aus *Thermoascus auranticus* wurde durch Gluconolacton stärker als durch Glucose gehemmt (0,28 mM Glucose; 8,3 nM

## IV. Ergebnisse und Diskussion

Gluconolacton, Parry *et al.* 2001). Diese Berichte unterscheiden sich deutlich von den Ergebnissen mit  $\beta$ -Glucosidasen aus Hefe, da die Hefe-Enzyme wesentlich unempfindlicher sind. Die Hemmkonzentration von 1,25 mM Gluconolacton übersteigt etwa 40-fach die Konzentration von Bhiri *et al.* (2008) und bei 100 mM Glucose konnte keine Hemmung festgestellt werden (nicht dargestellt). Bhiri *et al.* führten ihre Tests im Vergleich zu den hier beschriebenen Versuchen aber mit gereinigtem Enzym durch, was die höhere Sensitivität erklären kann, da weniger störende Begleitstoffe im Test enthalten sind.

Zusätzlich können einige pflanzliche Glucosidasen durch Zugabe von  $\text{Ag}^+$  - und  $\text{Hg}^{2+}$  -Ionen gehemmt werden (Hösel und Barz 1975, Hsieh und Graham 2001). Eine hemmende Wirkung der Ionen  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  auf  $\beta$ -Glucosidasen aus *Bacillus subtilis* natto wurde von Kuo und Lee (2008) nachweisen. Metall-Ionen wurden in diese Arbeit aber nicht miteinbezogen.

Ein Effekt von Gluconolacton *in situ* wurde geprüft, indem Biotransformationen mit Hefetransformanten und in Gegenwart von 3,75 mM Gluconolacton durchgeführt wurden. In diesen Konzentrationen konnte keinerlei hemmende Wirkung nachgewiesen werden.

### 5.7 Reinigung der rekombinanten His-tag Glucosidasen

Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucosidasen wurden als His-tag Konstrukte exprimiert und aus den Rohextrakten der induzierten transformierten Hefezellen durch IMAC gereinigt. Die Kontrolle der Reinigung erfolgte durch SDS-PAGE in 12,2 % Gelen (Abb. 44).

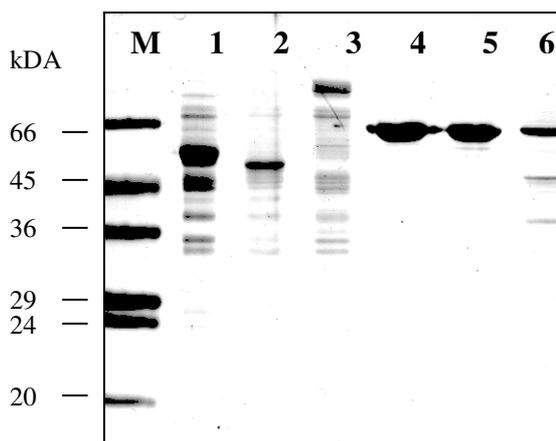


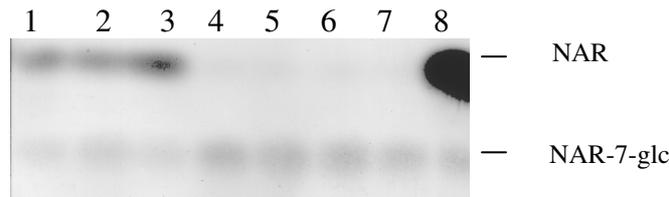
Abb. 44: Die Enzyme wurden mit His-Tag in Hefe exprimiert, aus dem Rohextrakt über IMAC gereinigt und durch SDS-PAGE auf 12,2 % Gelen aufgetrennt. Spur 1, EXG1; Spur 2, SPR1; Spur 3, YIR007W; Spur 4, YIL172C; Spur 5, YJL216C; Spur 6, YGR287C; M, Marker SDS7.

Die Anfärbung mit Coomassie-Blue zeigte auch Nebenbanden, jedoch korrelierte die jeweils stärkste Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht (IV.5.3).

## IV. Ergebnisse und Diskussion

### 5.8 Substratspezifitäten der $\beta$ -Glucosidasen

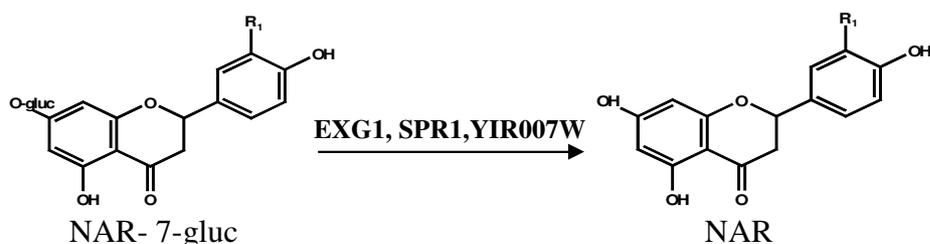
Die mit His-tag markierten und gereinigten Glucosidasen (drei  $\alpha$ - und drei  $\beta$ -Glucosidasen) wurden mit NAR-7-glc als Substrat auf ihre Aktivität überprüft. (Abb. 45). Eine Inkubation ohne Protein diente als Kontrolle. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Mischungen extrahiert (Ethylacetat), auf DC-Celluloseplatten aufgetragen, in CAW aufgetrennt und anschließend die entstandenen Banden mit Echtblausalzlösung sichtbar gemacht.



**Abb. 45: Test auf Glucosidaseaktivität mit Naringenin7-O- $\beta$ -glucosid. Die Enzyme waren als His-tag Konstrukte in Hefe exprimiert und über IMAC gereinigt worden. Die Auftrennung erfolgte auf Zelluloseplatten in CAW, die Detektion mit Echtblausalzlösung. Spur 1, EXG1; Spur 2, SPR1; Spur 3, YIR007W; Spur 4, YIL172C; Spur 5, YJL216C; Spur 6, YGR287C; Spur 7, Inkubation ohne Protein (Kontrolle); Spur 8, Naringenin7-O- $\beta$ -glucosid und Naringenin.**

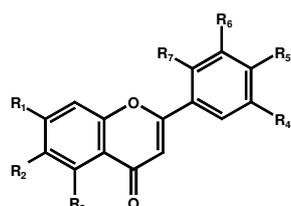
Die  $\beta$ -Glucosidasen EXG1, SPR1 und YIR007W (Spuren 1 bis 3) hydrolysierten das Substrat zu Naringenin, wohingegen die  $\alpha$ -Glucosidasen (Spuren 4 bis 6) keine Hydrolyse bewirkten. Das Substrat ist unter den Inkubationsbedingungen stabil. Im Folgenden wurden folglich nur noch die drei  $\beta$ -Glucosidasen mit verschiedenen Substraten getestet (Abb. 46).

## IV. Ergebnisse und Diskussion

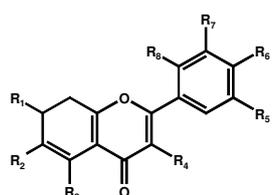


Eriodictyol-7-glucosid,  $R_1 = \text{OH}$

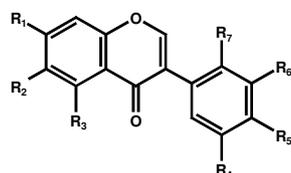
Eriodictyol,  $R_1 = \text{OH}$



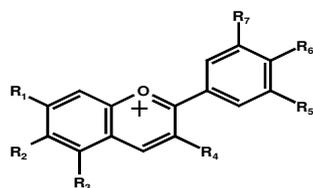
Flavonoglucoside	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$R_5$	$R_6$	$R_7$
Luteolin-7-O-glucosid	O-gluc	H	OH	H	OH	OH	H
Luteolin-3,7'-O-diglucosid	O-gluc	H	OH	H	OH	O-gluc	H
Luteolin-4'-O-glucosid	OH	H	OH	H	O-gluc	OH	H
Apigenin-7-O-glucosid (Apigetrin)	O-gluc	H	OH	H	H	H	H
Homoorientin (Lut-6-C-glucosid)	OH	gluc	OH	H	OH	OH	
Isovitexin (Apigenin 6-C-glucosid)	OH	gluc	OH	H	H	OH	H



Flavonolglycoside	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$R_5$	$R_6$	$R_7$	$R_8$
Kämpferol-3,7-O-diglucosid	O-gluc	H	OH	O-gluc	H	OH	H	H
Kämpferol-7-O-glucosid	O-gluc	H	OH	OH	H	OH	H	H
Kämpferol-3-O-glucosid	OH	H	OH	O-gluc	H	OH	H	H
Kämpferol-3-O-rutinosid	OH	H	OH	O-rut	H	OH	H	H
Kämpferol-7-O-neohesperosid	O-neoh	H	OH	OH	H	OH	H	H
Quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucosid	OH	H	OH	O-gluc	H	OH	OH	H
Quercetin-4'-O-glucosid (Spiraeosid)	OH	H	OH	OH	H	O-gluc	OH	H
Isorhamnetin-3-O-glucosid	OH	H	OH	O-gluc	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H



Isoflavonoglucoside	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$R_5$	$R_6$	$R_7$
Genistein-7-glucosid (Genistin)	O-gluc	H	OH	H	OH	H	H
Daidzein-7-glucosid (Daizin)	O-gluc	H	H	H	OH	H	H



Anthocyane	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$	$R_5$	$R_6$	$R_7$
Cyanidin-3-glucosid (Kuromanin)	OH	H	OH	O-gluc	H	OH	OH
Cyanidin-3-O-rhamnosid	OH	H	OH	O-rham	H	OH	OH
Cyanidin-3,5 diglucosid (Cyanin)	OH	H	O-gluc	O-gluc	H	OH	OH
Delphinidin-3-O-glucosid	OH	H	OH	O-gluc	OH	OH	OH
Delphinidin-3-O-rhamnosid	OH	H	OH	O-rham	OH	OH	OH
Delphinidin-3,5-diglucosid	OH	H	O-gluc	O-gluc	OH	OH	OH
Pelargonidin-3-O-glucosid	OH	H	OH	O-gluc	H	OH	H
Pelargonidin-3,5-diglucosid	OH	H	O-gluc	O-gluc	H	OH	H
Peonidin-3-O-glucosid	OH	H	OH	O-gluc	H	OH	OCH <sub>3</sub>
Peonidin-3,5-diglucosid	OH	H	O-gluc	O-gluc	H	OH	OCH <sub>3</sub>
Petunidin-3-O-glucosid	OH	H	OH	O-gluc	OCH <sub>3</sub>	OH	OH

**Abb. 46: Potentielle Substrate für  $\beta$ -Glucosidasen.**

Eine breite Palette von Flavonoidglucosiden, Flavonolglycosiden, Isoflavonolglycosiden und Anthocyanen (Abb. 46) wurde als potentielle Substrate für die  $\beta$ -Glucosidasen qualitativ geprüft. Es zeigte sich, dass die drei  $\beta$ -Glucosidasen aus Hefe präferentiell 7-Glucoside and

## IV. Ergebnisse und Diskussion

4'-Glucoside aus den Gruppen der Flavanon-, Flavon-, Flavonol-, und Isoflavonglucosiden akzeptierten (Tab. 6).

**Tab. 6: Hydrolyse von Flavonoidglycosiden durch die  $\beta$ -Glucosidasen EXG1, SPR1 und YIR007W oder hCBG.**

<b>Flavonone</b>	<b>EXG1</b>	<b>SPR1</b>	<b>YIR007W</b>	<b>hCBG</b>
Naringenin-7- <i>O</i> -glucosid	+	+	+	+
Eriodictyol-7- <i>O</i> -glucosid	+	+	+	+
<b>Flavonole</b>				
Kämpferol-3- <i>O</i> -glucosid	-	-	-	-
Kämpferol-3-7- <i>O</i> -diglucosid	+	+	+	*
Kämpferol-7- <i>O</i> -glucosid	+	+	+	*
Quercetin-4'-glucosid (Spiraeosid)	+	+	+	+
Quercetin-3 $\beta$ - <i>D</i> - <i>O</i> -glucosid	-	-	-	*
Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucosid	-	-	-	-
Kämpferol-3- <i>O</i> -rutinosid	-	-	-	*
Kämpferol-7- <i>O</i> -neohesperidosid	-	-	-	*
<b>Flavone</b>				
Apigenin-mono-glucosid	+	+	+	*
Apigenin-7- <i>O</i> -glucosid (Apigetrin)	+	+	+	+
Luteolin-7- <i>O</i> -glucosid	+	+	+	+
Luteolin-3',7-di- <i>O</i> -glucosid	+	+	+	+
Luteolin-4'- <i>O</i> -glucosid	+	+	+	+
Isovitexin (Apigenin-6-C-glucosid)	-	-	-	*
Homoorientin(Luteolin-6-C-glucosid)	-	-	-	*
<b>Anthocyane</b>				
Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid (Kuromanin)	+	+	-	-
Cyanidin-3,5-diglucosid (Cyanin)	-	-	-	-
Delphinidin-3- <i>O</i> -glucosid	+	+	-	*
Delphinidin-3,5-diglucosid	-	-	-	*
Peonidin-3- <i>O</i> -glucosid	+	+	-	*
Peonidin-3,5-diglucosid	-	-	-	*
Pelargonidin-3- <i>O</i> -glucosid (Callistephin)	+	+	-	*
Pelargonidin-3,5-diglucosid	-	-	-	*
Petunidin-3- <i>O</i> -glucosid	+	+	-	*
Delphinidin-3- <i>O</i> -rhamnosid	-	-	-	*
<b>Isoflavone</b>				
Genistein-7-glucosid (Genistin)	+	+	+	+
Daidzein-7-glucosid (Daizin)	+	+	+	+

\*nicht getestet, + Hydrolyse findet statt, - keine Hydrolyse

Im Falle der Anthocyane wurden alle 3-*O*-Glucoside von EXG1 und SPR1 gespalten, wohingegen YIR007W keines der eingesetzten Anthocyane umsetzte.

Dies steht im Gegensatz zu den Flavanonen, Flavonen, Flavonolen und Isoflavonen deren 3-*O*-Glucoside von EXG1 und SPR1 nicht metabolisiert wurden (Tab. 6). Die Anthocyanidin-3-*O*-diglycoside wurden nicht von EXG1 und SPR1 gespalten, was möglicherweise auf die Größe bzw. Dimension der Bindungstasche in den Enzymen zurückzuführen ist. Jedoch ist auch die Struktur des Zuckers von Bedeutung, da Delphinidin-3-*O*-rhamnosid nicht umgesetzt

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

wurde. Analog zu den Anthocyanen wurde auch Kämpferol-7-*O*-neohesperidosid nicht umgesetzt, im Gegensatz zu Kämpferol-7-*O*-glucosid, das von allen drei Enzymen akzeptiert wurde (Tab. 6).

Neben den genannten *O*-Glucosiden wurden auch Flavonoid-*C*-glucoside (Isovitexin und Homoorientin) getestet. Keines der beiden Substrate wurde von EXG1, SPR1 oder YIR007W umgesetzt (Tab. 6). Hier handelt es sich um C6-substituierte Flavone und es wurde kein 6-*O*-Glucosid zum Vergleich getestet. Allerdings erfordert die Spaltung einer Glykosylbindung ohnehin einen anderen oxidativen Mechanismus als die Spaltung eines Glucosids.

Zum Vergleich wurden auch andere Glykoside weiterer Naturstoffklassen zum Test eingesetzt, darunter Ginsenoside (Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1), Sennoside (Sennoside A and B), Cyanogenes Glucosid (Amygdalin) und Cardenolide (Lanatosid A und C, Desacetyl lanatosid C, Erysimosid, Cymarín). Davon wurde nur Desacetyl lanatosid C von YIR007W zum entsprechenden Produkt umgesetzt. Außerdem wurden Cumarine (Fraxin und Esculin) als mögliche Substrate getestet, die bityklich sind und ein ähnliches starres Grundgerüst aufweisen wie Flavonoide. Alle drei Glucosidasen waren in der Lage Esculin zu spalten, wohingegen Fraxin nur von EXG1 und SPR1 akzeptiert wurde. Piceid wurde als Vertreter der Stilbene getestet, hier konnte nur mit YIR007W ein positives Ergebnis erzielt werden. (Tab. 7).

**Tab. 7: Hydrolyse von glykosidischen Naturstoffen durch  $\beta$ -Glucosidasen aus Hefe.**

<b>Cumarine</b>	<b>EXG1</b>	<b>SPR1</b>	<b>YIR007W</b>
Fraxin (Fraxetin-8- <i>O</i> -glucosid)	+	+	-
Esculin (Esculetin-6- <i>O</i> -glucosid)	+	+	+
<b>Ginsenoside</b>			
Rb1	-	-	-
Rb2	-	-	-
Rc	-	-	-
Rd	-	-	-
Re	-	-	-
Rg1	-	-	-
<b>Cardenolide</b>			
Lanatosid A	-	-	-
Lanatosid C	-	-	-
Desacetyl lanatosid C	-	-	+
Erysimosid	-	-	-
Cymarín	-	-	-
<b>Sennoside</b>			
Sennosid A	-	-	-
Sennosid B	-	-	-
<b>Cyanogenes Glucosid</b>			
Amygdalin	-	-	-
<b>Stilben</b>			
Piceid	-	-	+

+ Hydrolyse fand statt, - keine Hydrolyse

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Es fällt auf, dass einerseits EXG1 und SPR1 und andererseits YIR007W sich in ihren Substratspezifitäten unterscheiden. Während Anthocyanidin-3-*O*-glucoside (Tab. 6) und Fraxin (Tab. 7) von EXG1 und SPR1 metabolisiert werden, zeigt nur YIR007W Aktivität mit Desacetylannatosid C und Piceid (Tab. 7). Offensichtlich unterscheiden sich die relevanten Bindungsstellen in YIR007W von denen in EXG1 oder SPR1. Unterschiede in der Sequenz von YIR007W hatten sich bereits im Alignment (Abb. 42) gezeigt.

### 5.9 Vergleich der Hefe $\beta$ -Glucosidasen mit der humanen cytosolischen $\beta$ -Glucosidase

Eine humane cytosolische  $\beta$ -Glucosidase (hCBG) (Acc-No.: AF317840), mit hoher Substratspezifität für 4'- und 7-*O*-Glucoside der Isoflavone, Flavonole, Flavone und Flavanone wurde bereits beschrieben (Berrin *et al.* 2002, 2003). Umgesetzt wurden Naringenin-7-*O*-glucosid, Eriodictyol-7-*O*-glucosid, Daidzein-7-*O*-glucosid und die 7- und 4'-*O*-Glucoside von Luteolin und Quercetin. Dagegen hydrolysiert das Enzym keine 3-*O*-Glucoside.

Auffällig ist, dass auch EXG1, SPR1 und YIR007W die 7- und 4'-Glucoside hydrolysieren, 3-*O*-Verbindungen von Flavonolen und Flavonen (und vermutlich Flavanen) dagegen nicht (Tab. 6). Der einzige Unterschied in den Substratspezifitäten von Hefeglucosidasen zur hCBG betrifft Anthocyane, da Berrin *et al.* (2002, 2003) keinen Umsatz von Kuromanin und Cyanin messen konnten, wohingegen die Hefeenzyme EXG1 und SPR1 Kuromanin hydrolysieren (Tab. 6).

Die räumlichen Strukturen von hCBG und EXG1 aus *C. albicans* wurden durch Röntgenkristallographie ermittelt (Berrin 2003, Tribolo *et al.* 2007). Das aktive Zentrum der humanen CBG liegt in einer Tasche von 16 Å Tiefe, wobei die Bindestelle für den glucosidischen Rest am Grund des aktiven Zentrums, die Bindestelle für das Aglykon dagegen am Eingang der Tasche lokalisiert wurde. Die katalytisch aktiven Reste Glu<sup>165</sup> und Glu<sup>373</sup> und vier überwiegend hydrophobe Reste His<sup>120</sup>, Phe<sup>121</sup>, Trp<sup>417</sup> und Trp<sup>425</sup>, sowie Gln<sup>17</sup>, Arg<sup>75</sup>, Asn<sup>164</sup>, Tyr<sup>309</sup> und Glu<sup>424</sup> sind hochkonserviert in den Familie 1-Glucosidasen und gruppieren sich alle um das aktive Zentrum.

Noch vor Aufklärung der Kristallstruktur erzeugten Berrin *et al.* (2003) vier Punktmutationen in hCBG (Val<sup>168</sup>Tyr, Phe<sup>225</sup>Ser, Tyr<sup>308</sup>Ala und Tyr<sup>308</sup>Phe). Die Auswahl der zu mutierenden Aminosäuren wurde aufgrund eines 3D-Modells getroffen. Die Autoren beobachteten eine Verringerung der katalytischen Aktivität der Mutanten mit Flavonoidglucosiden oder pNPG-Glucosiden als Substrat. Die Mutationen Phe<sup>225</sup>Ser, Tyr<sup>308</sup>Ala, Tyr<sup>308</sup>Phe hatten einen dramatischen Effekt auf die Aktivität, egal welches Substrat genutzt wurde, während die

## IV. Ergebnisse und Diskussion

Val<sup>168</sup>Tyr Mutation die Hydrolyse von Flavonoidglucosiden stärker verringerte als die von pNPG. Die drei Aminosäuren Val, Phe und Tyr gehören zu einem Cluster von hydrophoben Aminosäuren in der Aglyconbindestelle nahe der glycosidischen Bindung, wobei Val besonderen Einfluss haben soll. Nach Kenntnis der Kristallstruktur wurde mit Quercetin-4'-*O*-glucosid ein Modell zur Katalyse erstellt, das die früheren, durch „site-directed-mutagenesis“ gewonnen Ergebnisse bestätigte (Tribolo *et al.* 2007).

Das Alignment von hCBG mit EXG1, SPR1 und YIR007W (Abb. 47) zeigt insgesamt relativ wenig Übereinstimmung. Allerdings scheint das katalytisch wichtige Val (Val<sup>168</sup> in hCBG) in EXG1 und SPR1 konserviert zu sein. Die anderen angeblich relevanten Aminosäuren im aktiven Zentrum fanden sich nicht in den Sequenzen von EXG1, SPR1 oder YIR007W (nicht dargestellt). Um die Bedeutung dieses Val für die Aktivität der Enzyme mit Flavonoid-Glucosiden zu überprüfen, sollte versucht werden, EXG1 und SPR1 ebenfalls an dieser Stelle zu mutieren.

EXG1	D-----DDPYVSGLQESYLDQAIGWARNNSLK---VW	171
SPR1	S-----HDPYVTAEQYFLDRAIDWARKYGLK---VW	172
YIR007W	EGIECTIDQYKRTFFGFSKGPCTINPKGKKAWLSAEERDAIDAKYNWERNPEWKPDTCI	360
hCBG	ES-----FDKYAQFCFSTFGDRVKQWITINEAN---VL	169
	. : * * :	
EXG1	VDLHGAAGSQNGFDNSGLRDSYKFLEDSNLAVTTNVLNYILKKYSAEEYLDTVIGIELIN	231
SPR1	IDLHGAAGSQNGFDNSGLRDSYKFLEDENLSATMKALTYILSKYSTDVYLDTVIGIELLN	232
YIR007W	WKLHGVEIQNGKRPVLLKPNYFSQPDATVFINNHFDYTYGIYNKFREFDQELFIIIQP	420
hCBG	SVMSYDLGMFPPGIPHFGTGGYQAAHNLKAHARSWHSYDSLFRKKQKGMVSLSLFAVWL	229
	: . * : * . : :	
EXG1	EPLGPVLDMDK-----MKNDYLAPAYEYLRNNIKSDQV III	267
SPR1	EPLGPVIDMER-----LKNLLKPAYDYLRNKINSNQIIVI	268
YIR007W	PVMKPPPNLQNSKILDNRTICACHFYDGMTLMYKTWNKRIGIDTYGLVNKKYSNPAFAVV	480
hCBG	EPADPNSVSDQE-----AAKRAITFHLDLFAKPIFIDGDYPEVVKSQI	272
	* :. : . . :	
EXG1	HDAFQPYNYWDDFMTENDGYWGTIDHHHYQVFASDQLERSIDEH---IKVACEWGTGVL	324
SPR1	HDAFQPYHYWDGFLNDEKNEYGVIIDHHHYQVFSQVELTRKMNER---IKIACQWGKDAV	325
YIR007W	LGENNIRKCIKQLSEMOKDAKSMLGKKVPVFFTEIGIPFDMDDKKAYITNDYSSQTAAL	540
hCBG	ASMSQKQGYPPSSRLPEFTEEKKMIKGTADFFAVQYTTTRLIKYQ-----ENKKGEL	324
	. : : : . . :. : . . :	

**Abb. 47: Ausschnitt des Polypeptidalignments von hCBG mit EXG1, SPR1 und YIR007W. Die von Berrin *et al.* (2003) mutierten Aminosäuren sind fett gedruckt (Val<sup>168</sup>, Phe<sup>225</sup>, Tyr<sup>308</sup>).**

Die drei Hefe-Enzyme gehören der Familie 5-Glucosidasen an, die hCBG der Familie 1. Beide Familien werden aufgrund von Ähnlichkeiten in der 3D-Struktur zum Clan GH-A gruppiert. Deshalb werden ähnliche Substratbindestellen für beide Familien erwartet.

## IV. Ergebnisse und Diskussion

### 5.10 Mutagenesestudien mit EXG1 und SPR1

Mutationen wurden nur für *EXG1* und *SPR1* geplant, da die Sequenz von *YIR007W* deutliche Abweichungen zeigte (Abb. 42 und 47). Für dieses Enzym ist ein gesondertes Modell erforderlich.

Die Aminosäure Val<sup>168</sup> wurde in *EXG1* und *SPR1* durch Amplifikation (III.10.4.3) mit den Primerkombinationen mEXG1f-mEXG1r bzw. mSPR1f-mSPR1r (VII. Tab. 8) zu Tyr ersetzt. Nach Sequenzanalyse wurden die beiden Proteine in *S. cerevisiae*-Zellen exprimiert.

Die Expression der mutierten Proteine mEXG1 und mSPR1 wurde mittels Western-Blot und Vergleich mit den nicht-mutierten Enzymen überprüft. Beide Proteine wurden als His-tag Konstrukte exprimiert (Abb. 48).

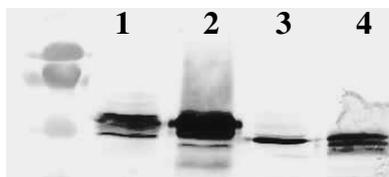


Abb. 48: Western Blot der His-tag markierten, mutierten Enzyme mEXG1 und mSPR1 nach Reinigung durch IMAC. Die nicht-mutierten Enzyme EXG1 und SPR1 dienen zum Vergleich. Spur 1, mEXG1; Spur 2, EXG1; Spur 3, mSPR1; Spur 4, SPR1.

Die über His-tag gereinigten Proteine wurden zum enzymatischen Test mit NAR-7-gluc Substrat eingesetzt und Extrakte der Inkubationen durch DC (Abb.49) und HPLC (Abb. 50) auf Produkte überprüft. Im Gegensatz zur nicht-mutierten SPR1- Kontrolle, konnten mEXG1 und mSPR1 das Substrat nicht zu NAR hydrolysieren. Die Mutation von Val wirkte sich also negativ auf die Aktivität mit NAR-7-gluc aus.

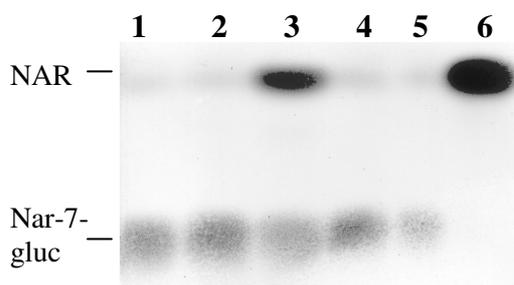
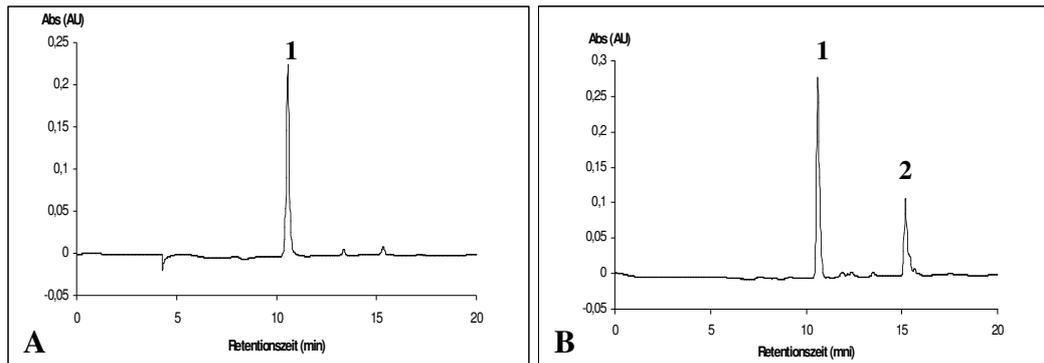


Abb. 49: Test auf Glucosidaseaktivität mit Naringenin-7-glucosid. Die Enzyme waren als His-tag Konstrukte in Hefe exprimiert und über IMAC gereinigt worden. Die Extrakte wurden auf Zelluloseplatten in CAW aufgetrennt, die Detektion erfolgte mit Echtblausalzlösung. Spur 1, mEXG1; Spur 2, mSPR1; Spur 3, SPR1; Spur 4, Kontrolle; Spur 5, Naringenin-7 -glucosid; Spur 6, Naringenin.

## IV. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 50: Test auf Glucosidaseaktivität der mutierten Enzyme mEXG1 und mSPR1 mit Naringenin-7-glucosid, dargestellt als repräsentatives Chromatogramm (A). Ein Test mit nicht mutiertem Enzym SPR1 diente als Vergleich (B). Die Enzyme waren als His-tag Konstrukte in Hefe exprimiert und über IMAC gereinigt worden. Die Chromatographie erfolgte nach Protokoll 3. 1, Naringenin-7-glucosid; 2, Naringenin.**

Damit konnte gezeigt werden, dass Val<sup>170</sup> (EXG1) bzw. Val<sup>171</sup> (SPR1), wie Val<sup>168</sup> in hCBG, eine wichtige Funktion für die Aktivität der Enzyme haben. Vermutlich ist auch in diesem Fall die Bindestelle des Aglycons betroffen.

### 5.11 EXG1, SPR1 und YIR007W Knock out Hefestämme

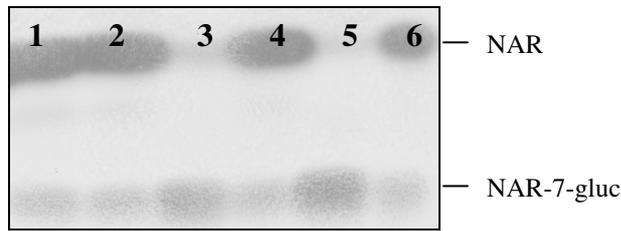
Es blieb zu prüfen, ob Hefestämme, bei denen die Gene für diese Glucosidasen ausgeschaltet wurden, noch fähig sind, Flavonoidglucoside zu metabolisieren. Dazu wurden die Knock out Hefestämme (Y02343: YIR007W, Y02446: SPR1, Y05210: EXG1, Y00000: Wildtyp) für die Enzyme EXG1, SPR1 und YIR007W von Euroscarf (Frankfurt) genutzt und zur Biotransformation getestet. Die Knock out Hefestämme werden laut Euroscarf dadurch hergestellt, dass das auszuschaltende Gen aus dem Genom restrigiert wird und durch ein Kanamycinresistenz-Gen ersetzt wird. Als Substrat wurde wieder NAR-7-gluc verwendet, welches von den nicht-mutierten Hefestämmen zu NAR umgesetzt wird. Dies sollte als Indiz für Hefe-Transformanten dienen.

Die Hefestämme wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,2 in 50 mL Kultur angezogen (III.11.3), induziert und mit 20 mg NAR-7-gluc versetzt. Parallel wurde das Substrat in YPGE-Medium bei 30 °C und 180 rpm inkubiert (Stabilitätskontrolle). Nach 17 h Inkubation wurden Proben entnommen, die Gesamtsuspension mit Ethylacetat extrahiert und mittels DC analysiert. Es zeigte sich, dass in den Mutantenstämmen Y02343, Y02446 und dem zugehörigen Wildtyp Y00000 das Glucosid abgespalten werden kann. Im Mutantenstamm Y05210 (mutierte EXG1) war dagegen nahezu kein NAR detektierbar. Die nachweisbare Menge an NAR entspricht in etwa der detektierbaren Menge in der Kontrolle (Abb. 51). Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch in der HPLC-Analyse (Protokoll 3), auch hier war die Umwandlung bei

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Y02343, Y02446 und Y00000 zu NAR nachweisbar, in Y05210 dagegen nicht (Abb.54 A und B).



**Abb. 51: Biotransformation von Naringenin-7-glucosid in den knockout-Hefestämmen Y02343 (Spur 1), Y02446 (Spur 2) und Y05210 (Spur 3). Als Kontrolle diente eine Biotransformation mit dem Wildtyp Y00000 (Spur 4) und eine Inkubation in YPGE-Medium (Spur 5). In Spur 6 sind die Referenzen (NAR und NAR-7-gluc) aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte auf Zelluloseplatten in CAW, die Detektion mit Echtblausalzlösung.**

Zur weiteren Überprüfung wurde ein Hefestamm, der die FNS I erfolgreich exprimiert, herangezogen. Dieses Enzym ist nicht in der Lage Glucoside (z.B. NAR-7-gluc) zu spalten, kann aber gerade deshalb als Modellsystem genutzt werden, da damit zusätzlich zu untransformierten Hefezellen ein Expressionssystem zur Verfügung steht, in dem das erfolgreiche Ausschalten der entsprechenden Glucosidase überprüft werden kann.

Somit wurden aus den Mutantenstämmen Y02343, Y02446, Y05210 und dem Wildtyp Y00000 kompetente Zellen hergestellt (III.10.13.1). Diese wurden anschließend mit den Expressionskonstrukten der FNS I oder der FHT (zur zusätzlichen Überprüfung mit einem anderen Enzym der Flavonoidbiosynthese) transformiert und induziert. Aus der Biotransformation mit NAR-7-gluc wurden nach 17 h Proben entnommen und mittels DC und HPLC analysiert. Erfreulicherweise zeigte sich auch hier, dass der Stamm Y05210 NAR-7-gluc nicht metabolisieren konnte, die mutierten Stämme Y02343 und Y02446 sowie der Wildtypstamm (Y00000) dagegen schon. Aufgrund der exprimierten Enzyme war dann auch bei 2343, Y02446 und Y00000 mit der FNS I Apigenin (Abb.52 und Abb. 54 C), mit der FHT DHK (Abb. 53 und Abb. 54 E) detektierbar. Beides war in den jeweiligen Proben von Y05210 nicht bzw. nur in sehr geringer Menge nachweisbar (Abb.52 Spur 3, Abb. 53 Spur 3 und Abb.54 D und F).

## IV. Ergebnisse und Diskussion

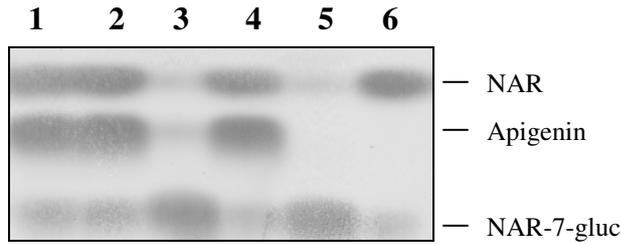
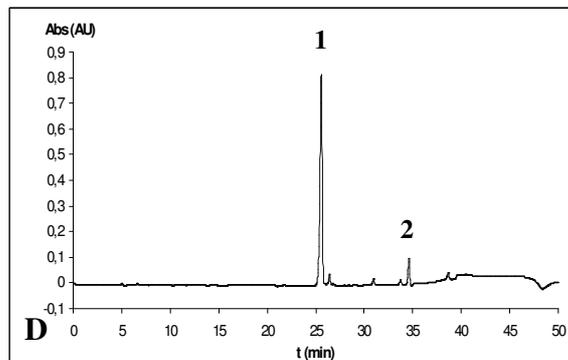
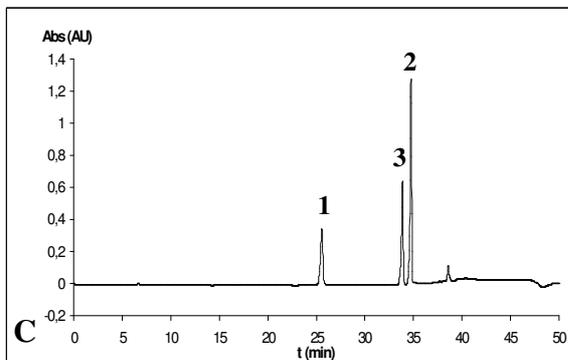
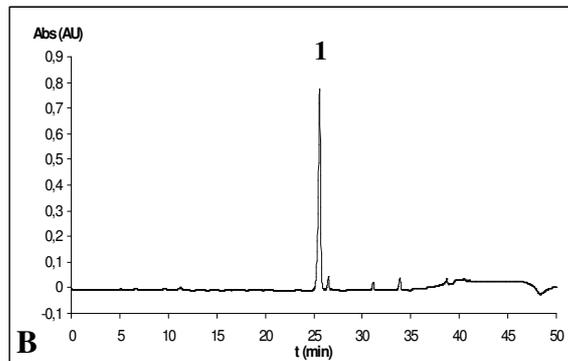
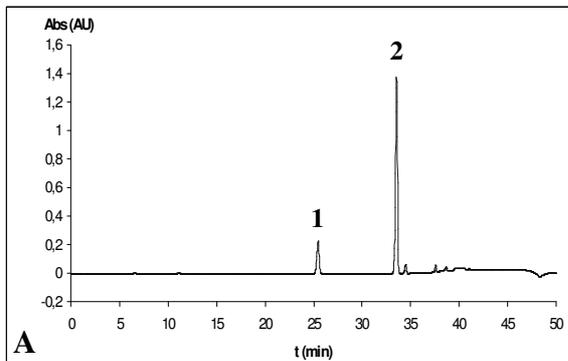


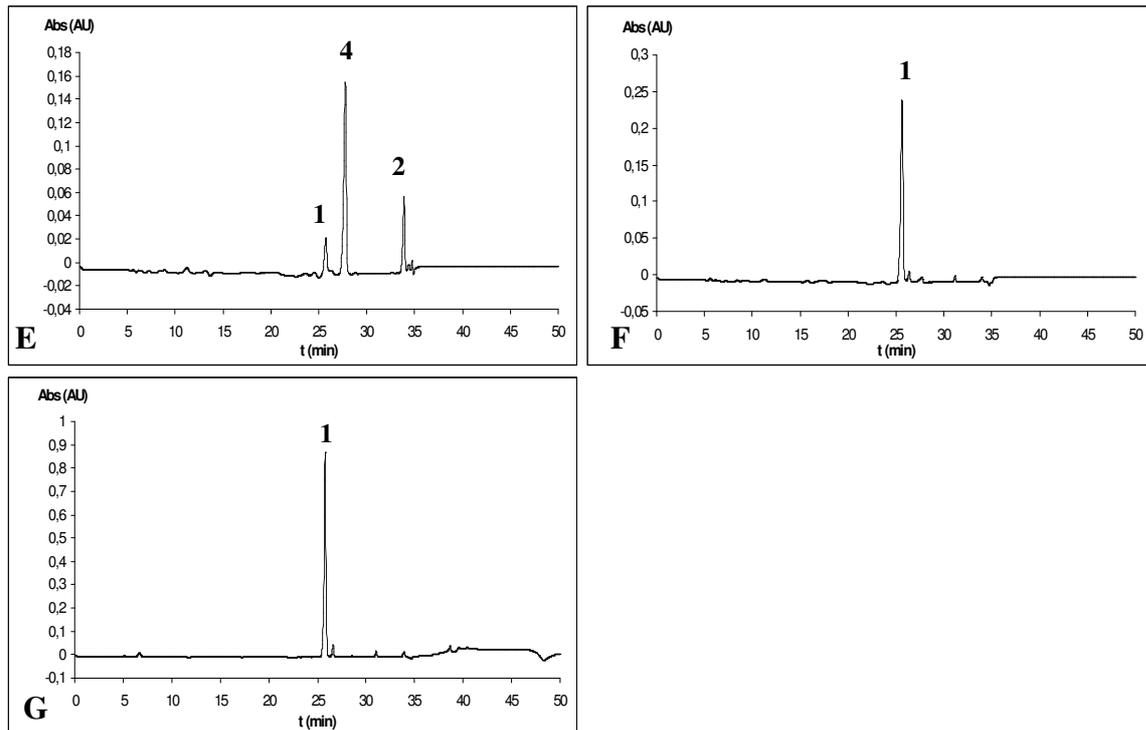
Abb. 52: Biotransformation von Naringenin-7-glucosid in FNS I transformierten knockout-Hefestämmen Y02343 (Spur 1), Y02446 (Spur 2) und Y05210 (Spur 3). Als Kontrolle diente eine Biotransformation im Wildtyp Y00000 (Spur 4) und eine Inkubation in YPGE-Medium (Spur 5). In Spur 6 sind die Referenzen (Naringenin-7-glucosid, Naringenin und Apigenin) aufgetragen. Die Extrakte wurden auf Zellulose-Dünnschichtplatten in CAW aufgetrennt und mit Echtblausalzlösung besprüht.



Abb. 53: Biotransformation von Naringenin-7-glucosid in FHT transformierten knockout-Hefestämmen Y02343 (Spur 1), Y02446 (Spur 2) und Y05210 (Spur 3). Als Kontrolle diente eine Biotransformation im Wildtyp Y00000 (Spur 4). In Spur 5 sind die Referenzen (Naringenin-7-glucosid, Naringenin und Dihydrokämpferol) aufgetragen. Die Extrakte wurden auf Zellulose-Dünnschichtplatten in CAW aufgetrennt und mit Echtblausalzlösung besprüht.



## IV. Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 54: Biotransformationen von Naringenin-7-glucosid in Mutantenstamm Y05210 (B) bzw. mit FNS I (D) bzw. FHT (F) transformierten Mutantenstamm Y05210. Als Kontrollen fungierten die jeweiligen Stämme Y02343, Y02446 und Y00000, die jeweils als repräsentatives Chromatogramm dargestellt sind (Kontrollen nicht transformiert (A), mit FNS I (C) bzw. FHT (E) transformiert). Zusätzlich wurde eine Inkubation in YPGE-Medium mitgeführt (G). 1, Naringenin-7-glucosid; 2, Naringenin; 3, Apigenin; 4, Dihydrokämpferol.**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass endogene Hefeglucosidasen in der Lage sind, Flavonoide und andere natürliche Substrate zu hydrolysieren. Diese Tatsache könnte für Schwierigkeiten in Biotransformationen mit Hefezellen sorgen, in denen Glucosyltransferasen (GTn) eingesetzt werden sollen. So zeigte sich beispielsweise, dass pflanzliche Flavonoidglucosyltransferasen (FGTn) nicht bzw. nur mäßig aktiv in Biotransformationsexperimenten mit Hefezellen sind, wohingegen in Bakterienkulturen deutlicher Umsatz zu erkennen war (persönliche Mitteilung Simone Witte). Dieser Umstand könnte auf die endogenen Glucosidasen in den verwendeten Hefestämmen zurückzuführen sein. Jedoch gibt es auch einige Berichte von pflanzlichen Glucosyltransferasen die erfolgreich in *S. cerevisiae* exprimiert werden konnten und zu aktiven rekombinaten Proteinen bzw. erfolgreiche Synthese von natürlichen Stoffen führten. So wurde beispielsweise die Klonierung eine GT aus Kartoffel und deren Expression in Hefe beschrieben (Moehs *et al.* 1997) Die Autoren klonieren die cDNA einer GT aus Kartoffel aus einer Expressionsdatenbank, die das Substrat Solanin glucosidieren kann. Andere Autoren (Poppenberger *et al.* 2006) etablierten einen *S. cerevisiae* Stamm, in dem verschiedene *A. thaliana* GTn exprimiert werden können, die Zearalenon (ZON), ein Mycotoxin, zu

## IV. Ergebnisse und Diskussion

---

Zearalenon 4-*O*-glucosid (ZON 4-Glu) umwandeln können. Ausgehend von sechs *GT*-Genen konnte ein Produkt gefunden werden, das im Bioassay ZON zu ZON 4-Glu umwandelt. In einem *S. cerevisiae*-Stamm, der diese *GT* exprimiert und der in ZON-haltigem Medium angezogen wurde, konnte ZON-4-Glu mit einer Umsatzrate von 90 % gewonnen werden. In beiden Studien wird keine Degradierung (Deglucosidierung) der Glucoside beschrieben, was aber möglicherweise auch in den Substratpräferenzen der Hefeglucosidasen begründet sein könnte.

Dagegen wurde erst kürzlich von einer erfolgreichen Expression einer *FGT* aus *Dianthus* in *S. cerevisiae* berichtet, die Naringenin zu Naringenin-7-*O*-glucosid metabolisieren kann. Die Autoren (Werner und Morgan 2009) beobachteten aber auch eine Deglucosidierung von NAR-7-gluc zu NAR in Hefebiotransformationen und machten dafür endogene Glucosidasen verantwortlich. Sie bestätigen damit die in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen.

Die eigenen Ergebnisse zeigen, dass EXG1, SPR1 und YIR007W *in vitro* alle befähigt sind, die Flavonoidglucoside zu metabolisieren, interessanterweise *in vivo* diese aber nur von EXG1 umgesetzt werden. Huh *et al.* (2003) haben die Proteinlokalisierung in Hefen mittels *gfp* analysiert und eine Datenbank (<http://yeastgfp.ucsf.edu>) entwickelt, in der man den Ort der Protein-Expression in der Zelle nachvollziehen kann. Sie beschreiben EXG1 als ein Protein, das in der Vakuole lokalisiert ist, YIR007W ist im Cytoplasma zu finden. Für das Enzym SPR1 waren keine Daten verfügbar.

Das bedeutet, dass die glycosidischen Substrate in den Biotransformationen immer in die Vakuole der Zelle transportiert werden müssen, da EXG1 dort lokalisiert sein soll und die zugesetzten Substrate deglucosyliert werden.

Für *S. cerevisiae* sind verschiedene Membran-Transportmechanismen beschrieben worden. Die Hefe verfügt über ATP-abhängige Pumpen, Kanäle und sekundäre Transportsysteme, wobei letztere am weitesten verbreitet sind. Das sekundäre Transportsystem arbeitet mittels Konzentrationsgradienten von Co-Transportmolekülen, mit dem eine Vielzahl an Stoffen von außen nach innen transportiert wird (Nagata *et al.* 2008). Des Weiteren können Stoffe über Endocytose in der Zelle in die Vakuole gelangen. Die Vakuole verfügt intern über einige Hydrolasen wie z.B. Nucleasen, Phosphatasen, Lipasen und Proteasen zur Spaltung von Importsubstanzen, deren niedermolekulare Produkte ins Cytoplasma zur weiteren Verwendung entlassen werden (Ostrowicz *et al.* 2008).

Über welche Wege die zur Biotransformation angebotenen Substrate in die Zelle gelangen, ist nicht geklärt. Klar erscheint aber, dass das zugesetzte Substrat in die Vakuole der Hefezelle gelangen muss, da dort laut Literatur EXG1 lokalisiert sein soll. Dort wird dann

#### IV. Ergebnisse und Diskussion

---

möglicherweise der für die Zelle wertvolle Zucker abgespalten und metabolisiert oder gespeichert. Mit dem Knock-out Hefestamm Y05210 für EXG1 konnte aber ein System gefunden werden, in dem das zugefügte NAR-7-gluc nicht mehr metabolisiert wird. In diesem System sollte es zukünftig möglich sein Flavonoid-Glucoside zu produzieren.

Es wurden zwar in der Literatur Glucosidasen aus verschiedenen Organismen beschrieben, die in der Lage sind Flavonoidglucoside zu metabolisieren (Hsieh und Graham 2001, Hösel und Barz 1975, Kuo *et al.* 2008, Marotti *et al.* 2007, Yang *et al.* 2004) für Glucosidasen aus *S. cerevisiae* fehlten dagegen entsprechende Ergebnisse, die jetzt mit dieser Arbeit geliefert werden konnten. Aus einer Vielzahl an Glucosidasen konnten drei bestimmt werden, die fähig sind den Zuckerrest der Flavonoidglucoside *in vitro* abzuspalten. Daneben konnte die Glucosidase die NAR-7-O-gluc und vermutlich weitere Flavonoid-7-O-glucoside in *S. cerevisiae in vivo* metabolisiert, identifiziert werden.

### V. Zusammenfassung

Flavonoide sind eine im Sekundärstoffwechsel der Pflanze sehr bedeutende Stoffklasse und gewinnen zunehmend an Bedeutung in Pharmazie und Lebensmittelindustrie.

Diese Arbeit sollte dazu dienen, verschiedene Systeme zur Herstellung von Flavonoiden zu optimieren.

So sollte ein System zur Gewinnung glucuronidierter Flavonoide erstellt werden. Dazu schien die humane UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) geeignet, da sie in der Lage ist verschiedene Flavonoide zu metabolisieren (Tukey und Strassburg 2000). In dieser Arbeit konnte ein Test etabliert werden, mit dem mit (käuflicher) UGT1A1 die Flavonoide Kämpferol, Apigenin, Genistein und Daidzein teils zu mehreren verschiedenen Produkten glucuronidiert wurden. Zusätzlich wurde auch das künstliche Substrat Octylgallat und ein Chalkon (Xanthohumol) umgesetzt. Versuche, die *UGT1A1* in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) und *Nicotiana benthamiana* zu exprimieren, scheiterten. Erfolgreich war dagegen die Expression im *Pichia pastoris*-System. In anschließenden Tests war Aktivität der UGT1A1 nachweisbar, die aber nicht ausreichend für größere Synthesen war. Für künftige Expressionsversuche sollten die Bedingungen weiter optimiert werden.

Isoflavone werden in einer Zweischrittreaktion aus Flavanonen (z.B. Naringenin) gebildet (Steele *et al.* 1999, Akashi *et al.* 2005). Die beiden dafür benötigten Enzyme Isoflavonsynthase (IFS1) und 2-Hydroxyisoflavanondehydratase (HIDH) konnten in einem *S. cerevisiae*-Stamm funktionell exprimiert werden. Markiertes Genistein wurde dabei aus (2S)- [4a,6,8-  $^{14}\text{C}$ ]Naringenin in einem Reaktionsansatz gewonnen. In Biotransformationen, denen unmarkiertes Naringenin zugesetzt wurde, war nach anschließender Säurezugabe ebenfalls Genistein nachweisbar.

Zusätzlich wurden verschiedene wertvolle Flavonoide enzymatisch aus [ $^{14}\text{C}$ ]-2-Malonyl-CoA und Coumaroyl-CoA hergestellt. So gelang es radioaktiv markiertes Naringenin (3,24  $\mu\text{Ci}$ ), Eriodictyol (0,79  $\mu\text{Ci}$ ), Kämpferol (14  $\mu\text{Ci}$ ), Dihydroquercetin (0,46  $\mu\text{Ci}$ ) und Dihydrokämpferol (0,79  $\mu\text{Ci}$ ) im größeren Labormaßstab und hoher Reinheit zu gewinnen.

Für die Optimierung von Biotransformationen sollte ein *S. cerevisiae*-Stamm, in dem die Flavonsynthase I (FNS I) aus Petersilie erfolgreich exprimiert wird (Martens *et al.* 2001), genutzt werden. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenase, die die Umwandlung von Flavanonen zu Flavonen katalysiert. Dabei scheinen Hydroxylierungen an 5- und 4'-Position wichtig zu sein, da weder die Substrate 7-Hydroxyflavanon noch Pinocembrin-7-methylether, 2'- und 4'-Hydroxyflavanon oder

## V. Zusammenfassung

---

6-Hydroxyflavanon akzeptiert wurden. Andererseits stört die Dreifachhydroxylierung des B-Ringes wie in Pentahydroxyflavanon. Neben Naringenin erwiesen sich dagegen Hesperetin, Eriodictyol, Homoeriodictyol, Pinocembrin und Liquiritigenin als geeignete Substrate für die Bildung der jeweiligen Flavone. Neben den positiven Auswirkungen auf den relativen Umsatz von Luftzufuhr, Zugabe der für die FNS I benötigten Cofaktoren und Erhöhung der Temperatur auf 37 °C, zeigten sich im Standardansatz zusätzlich positive Effekte durch Lösen des Substrates in Aceton. Nach einer Inkubationsdauer von fünf Tagen konnte die größte relative Umsatzrate (85 %) bei einer Temperatur von 30 °C und Zugabe von Naringenin gelöst in DMSO erzielt werden. Das Produkt konnte dann mittels HSCCC zu 98 % gereinigt werden. So konnte ein System etabliert werden in dem relativ einfach und effizient Flavone synthetisiert werden können. Zusätzlich sind die Ergebnisse auch übertragbar auf andere Enzyme (z.B. CytP450-Monooxygenasen).

Beim Einsatz von glucosidierten Flavonoiden (Naringenin-7-*O*-glucosid) in Biotransformationen zeigte sich, dass die Hefe über endogene Glucosidasen verfügen muss. Da diese störend für Biotransformationen mit z.B. Glucosyltransferasen sein könnten, wurde nach diesen gesucht, um sie im besten Falle ausschalten zu können. Zehn putative Glucosidasen (*BGL2*, *EXG1*, *SPR1*, *YIR007W*, *SUC2*, *YGR287C*, *YJL216C*, *YIL172C*, *DSE 2* und *CWH41*), wurden ausgewählt und exprimiert. In anschließendem Enzymtest konnten drei den  $\alpha$ - (*YGR287C*, *YIL172C* und *YJL216C*) drei weitere den  $\beta$ -Glucosidasen (*EXG1*, *SPR1* und *YIR007W*) zugeordnet werden. Die relevanten  $\beta$ -Glucosidasen zeigten Präferenzen für die 7-*O* und 4'-*O*-Glucoside der Flavanone, Flavone, Flavonole und Isoflavone. Ähnliche Präferenzen zeigt eine humane cytosolische  $\beta$ -Glucosidase (hCBG, Berrin *et al.* 2002, 2003). Mutationen die in hCBG zur Verringerung der Aktivität führten, konnten aufgrund von Sequenzähnlichkeiten auch erfolgreich bei *EXG1* und *SPR1* eingeführt werden.

Beim Test der Mutantenstämme für *EXG1*, *SPR1* und *YIR007W* zeigte sich der Mutantenstamm *EXG1* (YO5210) nicht mehr fähig, das eingesetzte Substrat Naringenin-7-*O*-glucosid zu metabolisieren. Auch in Biotransformationen von Naringenin-7-*O*-glucosid in FNS I oder FHT transformierten knockout-Hefestamm YO5210 war keine Umwandlung mehr detektierbar. Somit war ein Hefesystem gefunden worden, in dem in der Zukunft Flavonoidglucoside hergestellt werden könnten, ohne dass die angehängte Glucose durch endogene Glucosidasen abgespalten wird.

### Summary

Flavonoids are an important and highly diverse class of secondary metabolites that is becoming increasingly significant for the food and drug industry. The major objective of this work was to optimize several systems for biotechnological flavonoid production.

One of the goals was to establish a method for the generation of flavonoid glucuronides. The human UDP-glucuronic acid transferase UGT1A1 is known to accept various flavonoids (Tukey and Strassburg 2000) and seemed therefore a suitable candidate for biotechnological applications. In an *in vitro* assay developed in this work, (commercial) UGT1A1 has been used to catalyze the glucuronidation of kaempferol, apigenin, genistein and daidzein. With some of the named substrates, the assay yielded multiple products whose structure requires elucidation. In addition, UGT1A1 produced glucuronides with a pseudosubstrate octylgallate and the chalcone xanthohumol. The attempted heterologous expression of UGT1A1 in *Saccharomyces cerevisiae* and *Nicotiana benthamiana* didn't result in detectable glucuronidation activity. Successful expression was achieved after choosing *Pichia pastoris* as a host. The UGT1A1 activity was measurable but insufficient to support large-scale synthesis. Optimization of expression procedure is necessary to increase the efficiency of the system.

Isoflavones, a pharmacologically relevant subclass of flavonoids, are derived from flavanones such as naringenin in a two-step reaction (Steele *et al.* 1999, Akashi *et al.* 2005). Co-expression of the two involved enzymes, IFS1 and HIDH, in one baker's yeast strain, isolation of the proteins followed by an *in vitro* reaction afforded radiolabelled genistein from (2S)- [4a,6,8- <sup>14</sup>C]naringenin as starting point. In biotransformation experiments with unlabelled naringenin, acidification of the yeast cell broth prior to product extraction was necessary to retrieve genistein.

A number of radiolabelled flavonoids were enzymatically synthesized using [<sup>14</sup>C]-2-Malonyl-CoA and pC-CoA as starter molecules. The optimized procedures lead to production of naringenin (3,24 μCi), eriodictyol (0,79 μCi), kaempferol (14 μCi), dihydroquercetin (0,46μCi) and dihydrokaempferol (0,46 μCi) in high yield and purity.

Optimization of the biotransformation methods was conducted utilizing the *S. cerevisiae* strain harbouring a construct for the expression of parsley FNS I that was demonstrated to be active previously (Martens *et al.* 2001). To explore the catalytic capacities of this 2-ODD, its substrate specificity was determined with a variety of flavonoids. Neither 7-OH-flavanone nor pinocembrin-7-methyl ether nor 2' - nor 4' - nor 6-hydroxyflavanone was converted, indicating

## V. Zusammenfassung

---

the 5- and 4'-OH residues are essential for the substrate recognition. A tri-hydroxylated B-ring as found in pentahydroxyflavanone appears to be bulky to fit into the binding site too. Of the compounds screened here, hesperetin, eriodictyol, homoeriodictyol, pinocembrin and liquiritigenin were accepted as substrates in addition to NAR. Variation of biotransformation procedure revealed that supplementing the media with oxygen and dioxygenase cofactors during incubation enhanced the turnover efficiency. Besides, using acetone as solvent for the substrate (NAR) and increasing the cultivation temperature to 37°C were beneficial for the overall yields. Maximal relative turnover of 85% was measured after a five-day incubation at 30°C, with NAR supplied in DMSO as solvent. Purification using HSCCC afforded 98% pure apigenin. Summarizing, the method established here allows for a relatively simple and efficient production of flavones. The findings and conclusions of the optimization process are applicable to further relevant enzymes, such as P450-monoxygenases. Hydrolysis of glucose-conjugated flavonoids (NAR-7-*O*-gluc) by transformed and wild-type yeast was observed in the course of biotransformation studies. It implied baker's yeast possesses endogenous glucosidases capable of cleaving the sugar off at least some flavonoid glucosides, thus limiting the range of potential biotransformation substrates, e.g. rendering the production or processing of glucosides impossible. In order to identify the responsible enzyme(s) and if possible, knock them out, ten putative *O*-glucosidases (*BGL2*, *EXG1*, *SPR1*, *YIR007W*, *SUC2*, *YGR287C*, *YJL216C*, *YIL172C*, *DSE 2* und *CWH41*), were selected, episomally expressed in yeast and their catalytic properties analyzed. While three of the studied enzymes were  $\alpha$ -glucosidases (*YGR287C*, *YIL172C* and *YJL216C*) and three other proteins (*EXG1*, *SPR1* and *YIR007W*) demonstrated  $\beta$ -glucosidase activity, preferring 7-*O*- and 4'-*O* glucosides of flavanones, flavones, flavonols and isoflavones. Similar regiospecificity has been reported for the human cytosolic  $\beta$ -glucosidase (hCBG, Berrin *et al.* 2002, 2003). Residues whose alteration negatively affected hCBG's affinity for flavonoid glucosides could be tentatively identified in glucosidases studied here. Subsequent site-directed mutagenesis of corresponding moieties revealed deleterious effect on their activity with flavonoid glucosides. Subsequent tests with yeast strains deficient in respective glucosidase genes disclosed one of the mutants, *EXG1* (YO5210), was unable to catabolise the fed substrate NAR-7-glc. After being transformed with expression constructs for FNSI and FHT, the YO5210 strain was again found to be incapable of cleaving the naringenin glucoside in a biotransformation experiment, as no apigenin being detectable. Hence, a yeast system suitable for the future production and manipulation of flavonoid glucosides has been identified.

## VI. Literaturverzeichnis

**Ahn JW, Verma R, Kim M, Lee JY, Kim YK, Bang JW, Reiter WD, Pai HS (2006)** Depletion of UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthases results in rhamnogalacturonan-II deficiency, cell wall thickening, and cell death in higher plants. *J. Biol. Chem.* 281:13708-13716.

**Akashi T, Aoki T, Ayabe S (1999)** Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in licorice. *Plant Physiol.* 121:821-828.

**Akashi T, Sawada Y, Shimada N, Sakurai N, Aoki T, Ayabe S (2003)** cDNA cloning and biochemical characterization of S-adenosyl-L-methionine: 2,7,4'-trihydroxyisoflavanone 4'-O-methyltransferase, a critical enzyme of the legume isoflavonoid phytoalexin pathway. *Plant Cell Physiol.* 44:103-112.

**Akashi T, Aoki T, Ayabe S (2005)** Molecular and biochemical characterization of 2 hydroxyisoflavanone dehydratase. Involvement of carboxylesterase-like proteins in leguminous isoflavone biosynthesis. *Plant Physiol.* 137:882-891.

**Andersen OM und Markham KR (2006)** Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. CRC, Boca Raton.

**Anzellotti D und Ibrahim RK (2000)** Novel flavonol 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase: affinity purification, characterization, and kinetic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 382:161-172.

**Anzellotti D und Ibrahim RK (2004)** Molecular characterization and functional expression of flavonol 6-hydroxylase. *BMC Plant Biol.* 4:20.

**Ayabe S und Akashi T (2006)** Cytochrome P450s in flavonoid metabolism. *Phytochem. Rev.* 5:271-282.

**Berim A (2007)** Aspekte des Lignan- und Monolignol-Stoffwechsels in *Linum*-Arten. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

**Berrin JG, McLauchlan WR, Needs P, Williamson G, Puigserver A, Kroon PA, Juge N (2002)** Functional expression of human liver cytosolic *beta*-glucosidase in *Pichia pastoris*. Insights into its role in the metabolism of dietary glucosides. *Eur. J. Biochem.* 269:249-258.

**Berrin JG, Czjzek M, Kroon PA, McLauchlan WR, Puigserver A, Williamson G, Juge N (2003)** Substrate (aglycone) specificity of human cytosolic *beta*-glucosidase. *Biochem. J.* 373:41-48.

## VI. Literaturverzeichnis

---

- Beutler E, Kuhl W, Trinidad F, Treplitz R, Nadler H (1971)** *Beta*-Glucosidase Activity in Fibroblasts from Homozygotes and Heterozygotes for Gaucher's Disease. *Am. J. Hum. Genet.* 23:62-66.
- Bhat MK (2000)** Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 18:355-383.
- Bhiri F, Chaabouni SE, Liman F, Ghrir R, Marzouki N (2008)** Purification and Biochemical Characterization of Extracellular *beta*-Glucosidases from the Hypercellulolytic Pol6 Mutant of *Penicillium occitanis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 149:169-182.
- Blount JW, Dixon RA, Paiva NL (1992)** Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.): XVI. Antifungal activity of medicarpin and its biosynthetic precursors; implications for the genetic manipulation of stress metabolites. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 41:333-349.
- Bock KW (2003)** Vertebrate UDP-glucuronosyltransferases: functional and evolutionary aspects. *Biochem. Pharmacol.* 66:691-696.
- Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B, Bakker C, Oude Elferink RP, Chowdhury JR, Chowdhury NR, Jansen PL (1994)** Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J. Biol. Chem.* 269:17960-17964.
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001)** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci.* 161:839-851.
- Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram protein quantities utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.
- Britsch L (1990)** Purification and characterisation of flavone synthase I, a 2-oxoglutarate-dependent desaturase. *Arch. Biochem. Biophys.* 282:152-160.
- Britsch L und Grisebach H (1986)** Purification and characterization of (2*S*)-flavanone 3-hydroxylase from *Petunia hybrida*. *Eur. J. Biochem.* 156:569-577.
- Britsch L, Ruhnau-Brich B, Forkmann G (1992)** Molecular cloning, sequence analysis, and in vitro expression of flavanone 3 *beta* hydroxylase from *Petunia hybrida*. *J. Biol. Chem.* 267: 5380-5387.
- Bugg TDH (2003)** Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron* 59:7075-7101.
- Burbulis IE und Winkel-Shirley B (1999)** Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway. *PNAS* 96:12929-12934.
- Cabrita L, Fossen T, Anderson RM (2000)** Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chem.* 68:101-107.

## VI. Literaturverzeichnis

---

- Cappellaro C, Mrsa V, Tanner W (1998)** New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *J. Bacteriol.* 180:5030-5037.
- Chambers RS, Broughton MJ, Cannon RD, Carne A, Emerson GW, Sullivan PA (1993)** An exo-*beta*-(1,3)-glucanase of *Candida albicans*: purification of the enzyme and molecular cloning of the gene. *J. Gen. Microbiol.* 139:325-334.
- Chen Y, Xie S, Chen S, Zeng S (2008)** Glucuronidation of flavonoids by recombinant UGT1A3 and UGT1A9. *Biochem. Pharmacol.* 76:416-425.
- Colman-Lerner A, Chin TE, Brent R (2001)** Yeast *Cbk1* and *Mob2* activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell* 107:739-750.
- Cornwell T, Cohick W, Raskin I (2004)** Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* 65:995-1016.
- Cutfield SM, Davies GJ, Murshudov G, Anderson BF, Moody PCE, Sullivan PA, Cutfield JF (1999)** The structure of the exo-*beta*-(1, 3)-glucanase from *Candida albicans* in native and bound forms: relationship between a pocket and groove in family 5 glycosyl hydrolases. *JMB* 294:771-783.
- Dabek M, McCrae SI, Stevens VJ, Duncan SH, Louis P (2008)** Distribution of *beta*-glucosidase and *beta*-glucuronidase activity and of *beta*-glucuronidase gene *gus* in human colonic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66:487-495.
- Dakora FD und Phillips DA (1996)** Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49:1-20.
- Davies G und Henrissat B (1995)** Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3:853-859.
- Davies KM und Schwinn KE (2006)** Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis. In: Andersen, O.M., Markham, K.R. (Eds.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*. CRC, Taylor & Francis, Boca Raton, FL, 143-218.
- Deavours BE und Dixon RA (2005)** Metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. *Plant Physiol.* 138:2245-2259.
- Deblaere R, Bytebier H, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J (1985)** Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* 13:4777-4788.
- de Vetten N, ter Horst J, van Schaik HP, de Boer A, Mol J, Koes R (1999)** A cytochrome b5 is required for full activity of flavonoid 3', 5'-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colors. *PNAS* 96:778-783.

## VI. Literaturverzeichnis

---

- Diesperger H, Müller CR, Sandermann H Jr. (1974)** Rapid isolation of a plant microsomal fraction by Mg<sup>2+</sup>-precipitation. *FEBS Lett.* 43:155-158.
- Dixon RA (2004)** Phytoestrogens. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:225-261.
- Dharmawardhana DP, Ellis BE, Carlson JE (1995)** A *beta*-glucosidase from lodgepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. *Plant Physiol.* 107:331-339.
- Donaldson RP und Luster DG (1991)** Multiple forms of plant cytochromes P-450. *Plant Physiol.* 96:669-674.
- Doolin MT, Johnson AL, Johnston LH, Butler G (2001)** Overlapping and distinct roles of the duplicated yeast transcription factors Ace2p and Swi5p. *Mol. Microbiol.* 40:422-432.
- Ebel J und Hahlbrock K (1977)** Enzymes of flavone and flavonol-glycoside biosynthesis. Coordinated and selective induction in cell-suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Eur. J. Biochem.* 75:201-209.
- Escamilla-Treviño LL, Chen W, Card ML, Shih MC, Cheng CL, Poulton JE (2006)** *Arabidopsis thaliana beta*-glucosidases BGLU45 and BGLU46 hydrolyse monolignol glucosides. *Phytochemistry* 67:1651-1660.
- Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM (2004)** Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7:152-158.
- Fleischer TC, Weaver CM, McAfee KJ, Jennings JL, Link AJ (2006)** Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes Dev.* 20:1294-1307.
- Fliegmann J, Schröder G, Schanz S, Britsch L, Schröder J (1992)** Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*), and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. *Plant Mol. Biol.* 18:489-503.
- Forkmann G (1991)** Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. *Plant Breeding* 106:1-26.
- Forkmann G und Heller W (1999)** Biosynthesis of flavonoids. *Comprehensive Natural Products Chemistry*. U. Sankawa. Amsterdam, Elsevier. 1:713-748.
- Fowler ZL und Koffas MAG (2009)** Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83:799-808.
- Frankel EN, German JB, Kinsella JE, Parks E, Kanner J (1993)** Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet* 341:454-457.

## VI. Literaturverzeichnis

---

- Galijatovic A, Otake Y, Walle UK, Walle T (2001)** Induction of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by the flavonoid chrysin in Caco-2 cells--potential role in carcinogen bioinactivation. *Pharm. Res.* 18:374-379.
- Ganry O (2002)** Phytoestrogen and breast cancer prevention. *Eur. J. Cancer Prev.* 11:519-522.
- Garcia-Arenal F, Frame A, Sagasta EM (1978)** The multiple phytoalexin response of bean (*Phaseolus vulgaris*) to infection by *Botrytis cinerea*. *Physiol Plant Path.* 13:151-156.
- Gargouri M, Smaali I, Maugard T, Legoy MD, Marzouki N (2004)** Fungus *beta*-glucosidases: immobilization and use in alkyl- *beta*-glycoside synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 29:89-94.
- Gascón S, Neumann NP, Lampen JO (1968)** Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. *J. Biol. Chem.* 243:1573-1577.
- Gebhardt YH (2007)** Molekularbiologische und Biochemische Untersuchungen zur Evolution der Flavonsynthese I in Apiaceae. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- Gelvin SB (2003)** *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:16-37.
- Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Véronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, André B, Arkin AP, Astromoff A, El-Bakkoury M, Bangham R, Benito R, Brachat S, Campanaro S, Curtiss M, Davis K, Deutschbauer A, Entian KD, Flaherty P, Foury F, Garfinkel DJ, Gerstein M, Gotte D, Güldener U, Hegemann JH, Hempel S, Herman Z, Jaramillo DF, Kelly DE, Kelly SL, Kötter P, LaBonte D, Lamb DC, Lan N, Liang H, Liao H, Liu L, Luo C, Lussier M, Mao R, Menard P, Ooi SL, Revuelta JL, Roberts CJ, Rose M, Ross-Macdonald P, Scherens B, Schimmack G, Shafer B, Shoemaker DD, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Strathern JN, Valle G, Voet M, Volckaert G, Wang CY, Ward TR, Wilhelmy J, Winzeler EA, Yang Y, Yen G, Youngman E, Yu K, Bussey H, Boeke JD, Snyder M, Philippsen P, Davis RW, Johnston M (2002)** Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418:387-391.
- Gilbert A und Lereboullet P (1901)** La cholamae simple familiale. *Sem. Med.* 21:241-48.
- Graham TL (1995)** Cellular biochemistry of phenylpropanoid responses of soybean to infection by *Phytophthora sojae*. In M Daniel, RP Purkayastha, eds, *Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action*. Marcel Dekker, New York 85-116.
- Gong QH, Cho JW, Huang T, Potter C, Gholami N, Basu NK, Kubota S, Carvalho S, Pennington MW, Owens IS, Popescu NC (2001)** Thirteen UDPglucuronosyltransferase genes are encoded at the human *UGT1* gene complex locus. *Pharmacogenetics* 11:357-368.

## VI. Literaturverzeichnis

---

- Hänsel R und Sticher O (2007)** Pharmakognosie-Phytopharmazie, 8. Auflage, Springer-Verlag, Berlin.
- Hahlbrock K, Knobloch KH, Kreuzaler F, Potts JR, Wellmann E (1976)** Coordinated induction and subsequent activity changes of two groups of metabolically interrelated enzymes. Light-induced synthesis of flavonoid glycosides in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. Eur. J. Biochem. 61:199-206.
- Hamilton CM, Frary A, Lewis C, Tanksley SD (1996)** Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. PNAS 93:9975-9979.
- Harborne JB und Williams CA (2000)** Advances in Flavonoid research since 1992. Phytochemistry 55:481-504.
- Hashikawa N, Yamamoto N, Sakurai H (2007)** Different mechanisms are involved in the transcriptional activation by yeast heat shock transcription factor through two different types of heat shock elements. J. Biol. Chem. 282:10333-10340.
- Havsteen BH (2002)** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol. Ther. 96:67-202.
- He XZ, Reddy JT, Dixon RA (1998)** Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). XXII. cDNA cloning and characterization of an elicitor-inducible isoflavone 7-O-methyltransferase. Plant Mol. Biol. 36:43-54.
- He F, Pan QH, Shi Y, Duan CQ (2008)** Chemical synthesis of proanthocyanidins *in vitro* and their reactions in aging wines. Molecules 13:3007-3032.
- Hempel J, Pforte H, Raab B, Engst W, Böhm H, Jacobasch G (1999)** Flavonols and flavones of parsley cell suspension culture change the antioxidative capacity of plasma in rats. Nahrung 43:201-204.
- Henrissat B und Davies G (1997)** Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. Curr. Opin. Struct. Biol. 7:637-44.
- Henstrand JM, McCue KF, Brink K, Handa AK, Herrmann KM, Conn EE (1992)** Light and fungal elicitor induce 3-deoxy-d-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase mRNA in suspension cultured cells of parsley (*Petroselinum crispum* L.). Plant Physiol. 98:761-763.
- Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D (1993)** Dietary antioxidant flavonoids and the risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. Lancet. 342:1007-1011.
- Hikkel I, Lucau-Danila A, Delaveau T, Marc P, Devaux F, Jacq C (2003)** A general strategy to uncover transcription factor properties identifies a new regulator of drug resistance in yeast. J. Biol. Chem. 278:11427-11432.

## VI. Literaturverzeichnis

---

- Hösel W und Barz W (1975)** *Beta*-glucosidases from *Cicer arietinum* L. Purification and properties of isoflavone-7-O-glucoside-specific *beta*-glucosidases. Eur. J. Biochem. 57:607-616.
- Hotze M, Schröder G, Schröder J (1995)** Cinnamate 4-hydroxylase from *Catharanthus roseus*, and a strategy for the functional expression of plant cytochrome P450 proteins as translational fusions with P450 reductase in *Escherichia coli*. FEBS Lett. 374:345-350.
- Hrazdina G (1992)** Compartmentation in aromatic metabolism. HA Stafford, RK Ibrahim, eds, Recent Advances in Phytochemistry. Plenum Press, New York 1-23.
- Hsieh MC und Graham TL (2001)** Partial purification and characterization of a soybean *beta*-glucosidase with high specific activity towards isoflavone conjugates. Phytochemistry 58:995-1005.
- Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK (2003)** Global analysis of protein localization in budding yeast. Nature 425:686-691.
- Ikushiro S, Sahara M, Emi Y, Yabusaki Y, Iyanagi T (2004)** Functional co-expression of xenobiotic metabolizing enzymes, rat cytochrome P4501A1 and UDP-glucuronosyltransferase 1A6, in yeast microsomes. Biochim. Biophys. Acta. 1672:86-92.
- Isayenkova J, Wray V, Nimtz M, Strack D, Vogt T (2006)** Cloning and functional characterisation of two regioselective flavonoid glucosyltransferases from *Beta vulgaris*. Phytochemistry 67:1598-1612.
- Ito Y (2005)** Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. J. Chromatogr. A. 1065:145-168.
- Iwai H, Masaoka N, Ishii T, Satoh S (2002)** A pectin glucuronyltransferase gene is essential for intercellular attachment in the plant meristem. PNAS 99:16319-16324.
- Jenkins J, Lo Leggio L, Harris G, Pickersgill R (1995)** *Beta*-glucosidase, *beta*-galactosidase, family A cellulases, family F xylanases and two barley glycanases form a superfamily of enzymes with 8-fold *betalalpha* architecture and with two conserved glutamates near the carboxy-terminal ends of *beta*-strands four and seven. FEBS Lett. 362:281-285.
- Jiang B, Sheraton J, Ram AF, Dijkgraaf GL, Klis FM, Bussey H (1996)** *CWH41* encodes a novel endoplasmic reticulum membrane N-glycoprotein involved in *beta* 1,6-glucan assembly. J. Bacteriol. 178:1162-1171.
- Jiang H und Morgan JA (2004)** Optimisation of an *in vivo* plant P450 monooxygenase system in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering 85:130-137.

## VI. Literaturverzeichnis

---

- Jiang H, Wood KV, Morgan JA (2005)** Metabolic engineering of the phenylpropanoid pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2962-2969.
- Johansen LK und Carrington JC (2001)** Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiol.* 126:930-938.
- Jung W, Yu O, Lau SM, O'Keefe DP, Odell J, Fader G, McGonigle B (2000)** Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nat. Biotechnol.* 18:208-213.
- Jung W, Chung I-M, Heo H-Y (2003)** Manipulating isoflavone levels in plants. *J. Plant Biotech.* 5:149-155.
- Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M, Angenon G (1997)** An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci.* 122:101-108.
- Katsuyama Y, Miyahisa I, Funa N, Horinouchi S (2007)** One-pot synthesis of genistein from tyrosine by coincubation of genetically engineered *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73:1143-1149.
- Kim BG, Kim SY, Song HS, Lee C, Hur HG, Kim SI, Ahn JH (2003)** Cloning and Expression of the Isoflavone Synthase gene (*IFS-Tp*) from *Trifolium pratense*. *Mol Cells* 15: 301-306.
- Kim DH, Kim BG, Lee Y, Ryu JY, Lim Y, Hur HG, Ahn JH (2005)** Regiospecific methylation of naringenin to ponciretin by soybean *O*-methyltransferase expressed in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 119:155-162.
- Klebl F und Tanner W (1989)** Molecular cloning of a cell wall *exo-beta*-1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 171:6259-6264.
- Koes R, Verweij W, Quattrocchio F (2005)** Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends Plant Sci.* 10:236-242.
- Koganov MM, Dueva OV, Tsorin BL (1999)** Activities of plant- derived phenols in a fibroblast cell culture model. *J. Nat. Prod.* 62:481-483.
- Kolewe ME, Gaurav V, Roberts SC (2008)** Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. *Mol Pharm.* 5:243-56.
- Kosman DJ (2003)** Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Mol. Microbiol.* 47:1185-1197.
- Kotaka A, Bando H, Kaya M, Kato-Murai M, Kuroda K, Sahara H, Hata Y, Kondo A, Ueda M (2008)** Direct ethanol production from barley *beta*-glucan by sake yeast displaying *Aspergillus oryzae beta*-glucosidase and endoglucanase. *J.Biosci. Bioeng.* 105:622-627.

## VI. Literaturverzeichnis

---

- Kraus M (2006)** Synthese von  $^{14}\text{C}$ -markierten Anthocyanidinen und Studien zur intestinalen Verfügbarkeit von Anthocyanen aus Heidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.). Dissertation der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Kreis W, Baron D, Stoll G (2001)** Biotechnologie der Arzneistoffe, Grundlagen und Anwendungen. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart.
- Kumar A und Ellis BE (2003)** A family of polyketide synthase genes expressed in ripening *Rubus* fruits. *Phytochemistry* 62:513-526.
- Kumarasamy Y, Nahar L, Byres M, Delazar A, Sarker SD (2005)** The assessment of biological activities associated with the major constituents of the methanol extract of 'wild carrot' (*Daucus carota* L.) seeds. *J. Herb. Pharmacother.* 5:61-72.
- Kuo LC und Lee KT (2008)** Cloning, expression and characterization of two  $\beta$ -glucosidases from isoflavone glycoside-hydrolyzing *Bacillus subtilis* natto. *J. Agric. Food Chem.* 56:119-125.
- Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 227:680-684.
- Lapčík O (2007)** Isoflavonoids in non-leguminous taxa: a rarity or a rule? *Phytochemistry* 68:2909-2916.
- Larriba G, Basco RD, Andaluz E, Luna-Arias JP (1993)** Yeast exoglucanases. Where redundancy implies necessity. *Arch. Med. Res.* 24:293-299.
- Larrick JW und Thomas DW (2001)** Producing proteins in transgenic plants and animals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:411-418.
- Latunde-Dada AO, Cabello-Hurtado F, Czittrich N, Didierjean L, Schopfer C, Hertkorn N, Werck-Reichhart D, Ebel J (2001)** Flavonoid 6-hydroxylase from soybean (*Glycine max* L.), a novel plant P-450 monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 276:1688-1695.
- Lee DS und Lee SH (2001)** Genistein, a soy isoflavone, is a potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. *FEBS Lett.* 501:84-86.
- Lee LY, Kononov ME, Bassuner B, Frame BR, Wang K, Gelvin SB (2007)** Novel plant transformation vectors containing the superpromoter. *Plant Physiol.* 145:1294-1300.
- Leonard E, Yan Y, Koffas MAG (2006)** Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 8:172-181.
- Leonard E, Lim KH, Saw PN, Koffas MAG (2007)** Engineering central metabolic pathways for high-level flavonoid production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3877-3886.

## VI. Literaturverzeichnis

---

- Leonard E, Yan Y, Fowler ZL, Li Z, Lim CG, Lim KH, Koffas MAG (2008)** Strain improvement of recombinant *Escherichia coli* for efficient production of plant flavonoids. *Mol. Pharm.* 5:257-265.
- Lindahl AL, Olsson ME, Mercke P, Tollbom Ö, Schelin J, Brodelius M, Brodelius PE (2006)** Production of the artemisin precursor amorpha-4,11-diene by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 28:571-580.
- Liou B und Grabowski GA (2009)** Participation of asparagine 370 and glutamine 235 in the catalysis by acid *beta*-glucosidase: The enzyme deficient in Gaucher disease. *Mol. Genet. Metab.* 97:65-74.
- Logemann E, Tavernaro A, Schulz W, Somssich IE, Hahlbrock K (2000)** UV light selectively coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. *PNAS.* 97:1903-1907.
- Lucau-Danila A, Delaveau T, Lelandais G, Devaux F, Jacq C (2003)** Competitive promoter occupancy by two yeast paralogous transcription factors controlling the multidrug resistance phenomenon. *J. Biol. Chem.* 278:52641-52650.
- Lukačín R und Britsch L (1997)** Identification of strictly conserved histidine and arginine residues as part of the active site in *Petunia hybrida* flavanone 3 *beta*-hydroxylase. *Eur. J. Biochem.* 249:748-757.
- Lukačín R und Matern U (2007)** Biosynthese pflanzlicher Sekundärstoffe. *Pharmakognosie-Phytopharmazie*, Hrsg. Hänsel R und Sticher O, Springer Verlag.
- Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Bélanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF, Nebert DW (1997)** The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 7:255-269.
- Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushuro S, Iyanagi T, Miners JO, Owens IS, Nebert DW (2005)** Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* 15:677-685.
- Marotti I, Bonetti A, Biavati B, Catizone P, Dinelli G (2007)** Biotransformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flavonoid glycosides by *bifidobacterium* species from human intestinal origin. *J. Agric. Food Chem.* 55:3913-3919.
- Martens S und Forkmann G (1999)** Cloning and expression of Flavone synthase II from *Gerbera* hybrids. *Plant J.* 20:611-618.

## VI. Literaturverzeichnis

---

- Martens S, Forkmann G, Matern U, Lukačín R (2001)** Cloning of parsley flavone synthase I. *Phytochemistry* 58:43-46.
- Martens S, Forkmann G, Britsch L, Wellmann F, Matern U, Lukačín R (2003)** Divergent evolution of flavonoid 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases in parsley. *FEBS Lett.* 544: 93-98.
- Martens S und Mithöfer A (2005)** Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry* 66:2399- 2407.
- Martens S, Preuss A, Matern U (2010)** Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. *Phytochemistry* 71:1040-1049.
- McMahon H, Zoecklein BW, Fugelsang K, Jasinski Y (1999)** Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23:198-203.
- Meech R und Mackenzie PI (1997)** Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 24:907-915.
- Meech R und Mackenzie PI (1998)** Determinants of UDP glucuronosyltransferase membrane association and residency in the endoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* 356:77-85.
- Menting JGT, Cornish E, Scopes RK (1994)** Purification and partial characterization of NADPH-cytochrome c reductase from *Petunia hybrida* flowers. *Plant Physiol.* 106:643-650.
- Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC (2000)** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52:673-751.
- Mishra P und Prasad R (1989)** Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30:294-298.
- Moehs CP, Allen PV, Friedman M, Belknap WR (1997)** Cloning and expression of solanidine UDP-glucose glucosyltransferase from potato. *Plant J.* 11:227-236.
- Mohnen D (2008)** Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 11:266-277.
- Morant AV, Jørgensen K, Jørgensen C, Paquette SM, Sánchez-Pérez R, Lindberg Møller B, Bak S (2008)** *Beta*-glucosidases as detonators of plant chemical defence. *Phytochemistry* 69:1795-1813.
- Mouyna I, Hartland RP, Fontaine T, Diaquin M, Simenel C, Delepierre M, Henrissat B, Latgé JP (1998)** A 1,3-*beta*-glucanosyltransferase isolated from the cell wall of *Aspergillus fumigatus* is a homologue of the yeast *Bgl2p*. *Microbiology* 144:3171-3180.

## VI. Literaturverzeichnis

---

- Mrsa V, Klebl F, Tanner W (1993)** Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *BGL2* gene product, a cell wall endo- *beta*-1,3-glucanase. J. Bacteriol. 175:2102-2106.
- Muthukumar G, Suhng SH, Magee PT, Jewell RD, Primerano DA (1993)** The *Saccharomyces cerevisiae* *SPR1* gene encodes a sporulation-specific exo-1,3-*beta*-glucanase which contributes to ascospore thermoresistance. J. Bacteriol. 175:386-394.
- Mumberg D, Müller R, Funk M (1995)** Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. Gene 156:119-122.
- Nagata T, Iizumi S, Satoh K, Kikuchi S (2008)** Comparative molecular biological analysis of membrane transport genes in organisms. Plant. Mol. Biol. 66:565-585.
- Noguchi A, Horikawa M, Fukui Y, Fukuchi-Mizutani M, Iuchi-Okada A, Ishiguro M, Kiso Y, Nakayama T, Onoa E (2009)** Local differentiation of sugar donor specificity of flavonoid glycosyltransferase in lamiales. The Plant Cell 21:1556-1572.
- Osada M, Imaoka S, Funae Y (2004)** Apigenin suppresses the expression of VEGF, an important factor for angiogenesis, in endothelial cells via degradation of HIF-1 *alpha* protein. FEBS Lett. 575:59-63.
- Osmani SA, Bak S, Imberty A, Olsen CE, Lindberg Møller B (2008)** Catalytic key amino acids and UDP-sugar donor specificity of a plant glucuronosyltransferase, UGT94B1: molecular modeling substantiated by site-specific mutagenesis and biochemical analyses. Plant Physiol. 148:1295-1308.
- Ostrowicz CW, Meiringer CTA, Ungermann C (2008)** Yeast vacuole fusion: a model system for eukaryotic endomembrane dynamics. Autophagy 4:5-19.
- Ouzzine M, Fournel-Gigleux S, Pillot T, Burchell B, Siest G, Magdalou J (1994).** Expression of the human UDP-glucuronosyltransferase UGT1\*6 in *Escherichia coli*. Influence of bacterial signal peptides on the production and localization of the recombinant protein. FEBS Lett. 339:195-199.
- Ouzzine M, Antonio L, Burchell B, Netter P, Fournel-Gigleux, Magdalou J (2000)** Importance of histidine residues for the function of the human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6: evidence for the catalytic role of histidine 370. Mol. Pharmacol. 58:1609-1615.
- Overkamp S, Hein F, Barz W (2000)** Cloning and characterization of eight cytochrome P450 cDNAs from chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures. Plant Sci. 155:101-108.

## VI. Literaturverzeichnis

---

- Pack SP, Park K, Yoo YJ (2002)** Enhancement of  $\beta$ -glucosidase stability and cellobiose-usage using surface-engineered recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in ethanol production. *Biotechn. Lett.* 24:1919-1925.
- Papagianni M, Boonpooh Y, Matthey M, Kristiansen B (2007)** Substrate inhibition kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in fed-batch cultures operated at constant glucose and maltose concentration levels. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34:301-309.
- Parry NJ, Beever DE, Owen E, Vandenberghe I, van Beeumen J, Bhat MK (2001)** Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable  $\beta$ -glucosidase purified from *Thermoascus auranticus*. *Biochem. J.* 353:117-127.
- Prescott AG und John P (1996)** Dioxygenases: molecular structure and role in plant metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:245-271.
- Prescott AG und Lloyd MD (2000)** The iron (II) and 2-oxoacid-dependent dioxygenases and their role in metabolism. *Nat. Prod. Rep.* 17:367-383.
- Pompon D, Louerat B, Bronine A, Urban P (1996)** Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol.* 272:51-64.
- Poppenberger B, Berthiller F, Bachmann H, Lucyshyn D, Peterbauer C, Mitterbauer R, Schuhmacher R, Krska R, Glössl J, Adam G (2006)** Heterologous expression of *Arabidopsis* UDP-glucosyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae* for production of zearalenone-4-*O*-glucoside. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4404-4410.
- Pueppke SG (1996)** The genetic and biochemical basis for nodulation of legumes by rhizobia. *Crit. Rev. Biotechnol.* 16:1-51.
- Radomska-Pandya A, Czernik PJ, Little JM, Battaglia E, Mackenzie PI (1999)** Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug. Metab. Rev.* 31:817-899.
- Radomska-Pandya A, Pokrovskaya ID, Xu J, Little JM, Jude AR, Kurten RC, Czernik PJ (2002)** Nuclear UDP-glucuronosyltransferases: identification of UGT2B7 and UGT1A6 in human liver nuclear membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 399:37-48.
- Radomska-Pandya A, Bratton S, Little JM (2005)** A historical overview of the heterologous expression of mammalian UDP-glucuronosyltransferase isoforms over the past twenty years. *Curr. Drug. Metab.* 6:141-160.
- Ralston L, Subramanian S, Matsuno M, Yu O (2005)** Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and type II chalcone isomerases. *Plant Physiol.* 137:1375-1388.

## VI. Literaturverzeichnis

---

- Reinders J, Zahedi RP, Pfanner N, Meisinger C, Sickmann A (2006)** Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J. Proteome Res.* 5:1543-1554.
- Ritter JK, Crawford JM, Owens IS (1991)** Cloning of two human liver bilirubin *UDP-glucuronosyltransferase* cDNAs with expression in COS-1 cells. *J. Biol. Chem.* 266:1043-1047.
- Ritter JK, Chen F, Sheen YY, Tran HM, Kimura S, Yeatman MT, Owens IS (1992)** A novel complex locus *UGT1* encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini. *J. Biol. Chem.* 267:3257-3261.
- Ritter JK, Yeatman MT, Kaiser C, Gridelli B, Owens IS (1993)** A phenylalanine codon deletion at the *UGT1* gene complex locus of a Crigler-Najjar type I patient generates a pH-sensitive bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 268:23573-23579.
- Rivera-Vargas LI, Schmitthenner AF and Graham TL (1993)** Soybean flavonoid effects on and metabolism by *Phytophthora sojae*. *Phytochemistry* 32:851-857.
- Roemer T, Delaney S, Bussey H (1993)** *SKN1* and *KRE6* define a pair of functional homologs encoding putative membrane proteins involved in *beta*-glucan synthesis. *Mol. Cell Biol.* 13:4039-4048.
- Saito A, Nakajima N, Tanaka A, Ubukata M (2003)** Synthetic studies of proanthocyanidins. Part 3: Stereoselective 3,4-*cis* catechin and catechin condensation by TMSOTf-catalyzed intramolecular coupling method. *Tetrahedron Lett.* 44:5449-5452.
- Santos del Blanco L (2006)** Optimization of protein production in plants by agroinfiltration. Masterarbeit, Department of Applied Biology, Faculty of Agriculture and Forestry, Universität Helsinki.
- Sarkar FH und Li Y (2002)** Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metastasis Rev.* 21:265-280.
- Sarthy AV, McGonigal T, Coen M, Frost DJ, Meulbroek JA, Goldman RC (1997)** Phenotype in *Candida albicans* of a disruption of the *BGL2* gene encoding a 1,3-*beta*-glucosyltransferase. *Microbiology* 143:367-376.
- Schijlen EG, Ric de Vos CH, van Tunen AJ, Bovy AG (2004)** Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* 65:2631-2648.
- Schröder J, Heller W, Hahlbrock K (1979)** Flavanone synthase: simple and rapid assay for the key enzyme of flavonoid biosynthesis. *Plant Sci. Lett.* 14:281-286.

## VI. Literaturverzeichnis

---

- Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Urbe C, Schmitz HH, Kelm M (2006)** (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *PNAS* 103:1024-1029.
- Seitz C, Eder C, Deiml B, Kellner S, Martens S, Forkmann G (2006)** Cloning, functional identification and sequence analysis of flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase cDNAs reveals independent evolution of flavonoid 3',5'-hydroxylase in the Asteraceae family. *Plant Mol Biol.* 61:365-381.
- Senafi SB, Clarke DJ, Burchell B (1994)** Investigation of the substrate specificity of a cloned expressed human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase: UDP-sugar specificity and involvement in steroid and xenobiotic glucuronidation. *Biochem. J.* 303:233-240.
- Shih CH, Chen Y, Wang M, Chu IK, Lo C (2008)** Accumulation of isoflavone genistin in transgenic tomato plants overexpressing a soybean isoflavone synthase gene. *J. Agric. Food Chem.* 56:5655-5661.
- Sickmann A, Reinders J, Wagner Y, Joppich C, Zahedi R, Meyer HE, Schönfisch B, Perschil I, Chacinska A, Guiard B, Rehling P, Pfanner N, Meisinger C (2003)** The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *PNAS* 100:13207-13212.
- Simons JF, Ebersold M, Helenius A (1998)** Cell wall 1,6-*beta*-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on ER glucosidases I and II, and the molecular chaperone BiP/Kar2p. *EMBO J.* 17:396-405.
- Singh A, Kaur N, Kosman DJ (2007)** The metalloredutase Fre6p in Fe-efflux from the yeast vacuole. *J. Biol. Chem.* 282:28619-28626.
- Skibola CF und Smith MT (2000)** Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic. Biol. Med.* 29:375-383.
- Smilović V, Hribar G, Zupan AL, Gaberc-Porekar V (2007)** A simple, rapid and inexpensive method for selection of high producing *P. pastoris* clones using *beta* -lactamase reporter system. Posterpräsentation Maribor.
- Spribille R und Forkmann G (1982)** Chalcone synthesis and hydroxylation of flavonoids in 3'-position with enzyme preparations from flowers of *Dianthus caryophyllus* L. (carnation), *Planta* 155:176-182.
- Springob K, Nakajima J, Yamazaki M, Saito K (2003)** Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat. Prod. Rep.* 20:288-303.
- Sreevidya VS, Srinivasa Rao C, Sullia SB, Ladha JK, Reddy PM (2006)** Metabolic engineering of rice with soybean isoflavone synthase for promoting nodulation gene expression in rhizobia. *J. Exp. Bot.* 57:1957-1969.

## VI. Literaturverzeichnis

---

- Stafford HA (1974)** Possible multi-enzyme complexes regulating the formation of C6-C3 phenolic compounds and lignins in higher plants. *Rec. Adv. Phytochem.* 8:53-79.
- Stafford HA und Lester HH (1982)** Enzymic and nonenzymic reduction of (+)-dihydroquercetin to its 3,4,-diol. *Plant Physiol.* 70:695-698.
- Steele CL, Gijzen M, Qutob D, Dixon RA (1999)** Molecular characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean. *Arch. Biochem. Biophys.* 367:146-150.
- Steynberg PL, Nel RJJ, van Rensburg H, Bezuidenhout BCB, Ferreira D (1998)** Oligomeric flavanoids. Part 27. Interflavanyl bond formation in procyanidins under neutral conditions. *Tetrahedron* 54:8153-8158.
- Stotz G, de Vlaming P, Wiering H, Schram AW, Forkmann G (1985)** Genetic and biochemical studies on flavonoid 3'-hydroxylation in flowers of *Petunia hybrida*. *Theor. Appl. Genet.* 70:300-305.
- Strassburg CP, Manns MP, Tukey RH (1997)** Differential down regulation of the *UDP-glucuronosyltransferase 1A* locus is an early event in human liver and biliary cancer. *Cancer Res.* 57:2979-2985.
- Strassburg CP, Nguyen N, Manns MP, Tukey RH (1998)** Polymorphic expression of the UDP-glucuronosyltransferase *UGT1A* gene locus in human gastric epithelium. *Mol. Pharmacol.* 54:647-654.
- Strassburg CP, Strassburg A, Nguyen N, Li Q, Manns MP, Tukey RH (1999)** Regulation and function of family 1 and family 2 UDP-glucuronosyltransferase genes (*UGT1A*, *UGT2B*) in human oesophagus. *Biochem. J.* 338:489-498.
- Strassburg CP, Lankisch TO, Manns MP, Ehmer U (2008)** Family 1 uridine-5-diphosphate glucuronosyltransferases (*UGT1A*): from Gilbert's syndrome to genetic organization and variability. *Arch. Toxicol.* 82:415-433.
- Suzuki K, Yabe T, Maruyama Y, Abe K, Nakajima T (2001)** Characterization of recombinant yeast *exo-beta* -1,3-glucanase (Exg 1p) expressed in *Escherichia coli* cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:1310-1314.
- Tadi D, Hasan RN, Bussereau F, Boy-Marcotte E, Jacquet M (1999)** Selection of genes repressed by cAMP that are induced by nutritional limitation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15:1733-1745.
- Tahara S (2007)** A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. *Biosci. Biotech. Biochem.* 71:1387-1404.

## VI. Literaturverzeichnis

---

- Tatusov RL, Galperin MY, Natale DA, Koonin EV (2000)** The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* 28:33-36.
- Taussig R und Carlson M (1983)** Nucleotide sequence of the yeast *SUC2* gene for invertase. *Nucleic Acids Res.* 11:1943-1954.
- Tribolo S, Berrin JG, Kroon PA, Czjzek M, Juge N (2007)** The crystal structure of human cytosolic *beta*-glucosidase unravels the substrate aglycone specificity of a family 1 glycoside hydrolase. *J. Mol. Biol.* 370:964-975.
- Tukey RH und Strassburg CP (2000)** Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:581-616
- Turnbull JJ, Nakajima J, Welford RW, Yamazaki M, Saito K, Schofield CJ (2004)** Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate-dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis: anthocyanidin synthase, flavonol synthase, and flavanone 3*beta*-hydroxylase *J. Biol. Chem.* 279:1206-1216.
- Vandenbol M, Durand P, Bolle PA, Dion C, Portetelle D, Hilger F (1994)** Sequence analysis of a 40.2 kb DNA fragment located near the left telomere of yeast chromosome X. *Yeast* 10:1657-1662.
- van de Laar T, Visser C, Holster M, López CG, Kreuning D, Sierkstra L, Lindner N, Verrips T (2007)** Increased heterologous protein production by *Saccharomyces cerevisiae* growing on ethanol as sole carbon source. *Biotechnol Bioeng.* 96:483-494.
- van Rhijn P und Vanderleyden J (1995)** The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* 59:124-142.
- Vazquez de Aldana CR, Correa J, San Segundo P, Bueno A, Nebreda AR, Mendez E, del Rey F (1991)** Nucleotide sequence of the *exo*-1,3-*beta*-glucanase-encoding gene, *EXG1*, of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Gene.* 97:173-182.
- Veitch NC (2007)** Isoflavonoids of the Leguminosae. *Nat. Prod. Rep.* 24:417-464.
- Verpoorte R, Contin A, Memelink J (2002)** Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem. Rev.* 1:13-25.
- Waldenström JL (1950)** Blutproteine und Nahrungseiweiss. *Dtsch. Ges. Verd. Soffw.* 15:113-119.
- Wang X, He X, Lin J, Shao H, Chang Z, Dixon RA (2006)** Crystal structure of isoflavone reductase from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J. Mol. Biol.* 358:1341-1352.
- Watts KT, Lee PC, Schmidt-Dannert C (2004)** Exploring recombinant flavonoid biosynthesis in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Chembiochem.* 5:500-507.

## VI. Literaturverzeichnis

---

- Werck-Reichart D und Feyereisen R (2000)** Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* 1:Reviews 3003.
- Weiss HM und Reiländer H (2002)** Das *Pichia pastoris* Expressionssystem, Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Schirmpf (Hrsg.), Spektrum Akad. Verlag.
- Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H (2000)** Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 60:3823–3831.
- Werner SR und Morgan JA (2009)** Expression of a *Dianthus* flavonoid glucosyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae* for whole-cell biocatalysis. *J. Biotechnol.* 142:233-241.
- Winkel-Shirley B (2001)** Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* 126:485-493.
- Wood DW, Setubal JC, Kaul R, Monks DE, Kitajima JP, Okura VK, Zhou Y, Chen L, Wood GE, Almeida NF, Woo L, Chen Y, Paulsen IT, Eisen JA, Karp PD, Bovee D, Chapman P, Clendenning J, Deatherage G, Gillet W, Grant C, Kutayavin T, Levy R, Li MJ, McClelland G, Palmieri A, Raymond C, Rouse G, Saenphimmachak C, Wu Z, Romero P, Gordon D, Zhang S, Yoo H, Tao Y, Biddle P, Jung M, Krespan W, Perry M, Gordon-Kamm B, Liao Li, Kim S, Hendrick C, Zhao ZY, Dolan M, Chumley F, Tingey SV, Tomb JF, Gordon MP, Olson MV Nester EW (2001)** The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294:2317-2323.
- Wooster R, Ebner T, Sutherland L, Clarke D, Burchell B (1993)** Drug and xenobiotic glucuronidation catalysed by cloned human liver UDP-glucuronosyltransferases stably expressed in tissue culture cell lines. *Toxicology* 82:119-129.
- Xie DY und Dixon RA (2005)** Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers? *Phytochemistry* 66:2127-2144.
- Yamaguchi M (2002)** Isoflavone and bone metabolism: its cellular mechanism and preventive role in bone loss. *J. Health Sci.* 48:209–222.
- Yamamoto N, Maeda Y, Ikeda A, Sakurai H (2008)** Regulation of thermotolerance by stress-induced transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eucaryot. Cell.* 7:783-790.
- Yan Y, Kohli A, Koffas MAG (2005)** Biosynthesis of natural flavanones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5610-5613.
- Yan Y, Li Z, Koffas MAG (2008)** High-yield anthocyanin biosynthesis in engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 100:126-140.

## VI. Literaturverzeichnis

---

**Yang L, Ning ZS, Shi CZ, Chang ZY, Huan LY (2004)** Purification and characterization of an isoflavone-conjugates-hydrolyzing *beta*-glucosidase from endophytic bacterium. J. Agric. Food Chem. 52:1940-1944.

**Yu O, Jung W, Shi J, Croes RA, Fader GM, McGonigle B, Odell JT (2000)** Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. Plant Physiol. 124:781-793.

**Zheng PW, Chiang LC, Lin CC (2005)** Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells. Life Sci. 76:1367-1379.

## VII. Anhang

**Tab. 8: Verwendete Primerkombinationen mit entsprechender Annealingtemperatur.**

Gen	forward und reverse Primer	Annealing temp
<i>BGL2</i>	BGL2_for ATAATGCGTTTCTCTACTAC BGL2_rev TGAAAAGTCACAGTCCAAG	55 °C
<i>EXG1</i>	EXG1_for ATAATGCTTTTCGCTTAAAAC EXG1_rev GTTAGAAATTGTGCCACATT	55 °C
<i>mEXG1</i>	mEXG1f: AACAGCTTGAATATTGGGTTGATTGTCATGG mEXG1r: CCATGCAAATCAACCAATATTTCAAGCTGTT	55 °C
<i>SPR1</i>	SPR1_for ATAATGGTTTTCGTTTCAGAGG SPR1_rev ATGACATTGGTTAGGATATTT	50 °C
<i>mSPR1</i>	mSPR1f: TATGGTTTGAATATTGGATTGATCTTCATGG mSPR1r: CCATGAAGATCAATCCAATATTTCAAACCATA	55 °C
<i>YIR007W</i>	YIR007W_for ATAATGCCTGCCAAAATACAC YIR007W_rev GCTGATAACGCATTCCGC	50 °C
<i>SUC2</i>	SUC2_for ATAATGCTTTTGCAAGCTT SUC2_rev TTTTACTTCCCTTACTTGGA	48 °C
<i>YGR287C</i>	YGR287CfH ATAATGGATGACTATTTCTTCTGCA YGR287CrH TTCGCTGATATATATTTCTTCC	55 °C
<i>YJL216C</i>	YJL216C_for ATAATGACGATCATCCATAAT YJL216C_rev CTTCAACAAGTAAAGTCTTC	50 °C
<i>YIL172 C</i>	YIL172 C_for ATGACTATTTCTTCTGCACAT YIL172 C_rev TCATTAGATATGTAAATTCT	52 °C
<i>DSE 2</i>	DSE2_f ATAATGAAATTTAATTTTTCTAC DSE2_r AATGGTAACCGTAGCATAAA	45 °C
<i>CWH41</i>	CWH41_H_f ATAATGCTTATTTCAAATC CWH41_H_r GAAGCGTCCAAGGATG	45 °C
<i>UGT1A1</i>	UGT1A1_Bamf AAAGGATCCACCATGCTGGGA UGT1A1_Smar AAACCCGGGTTCTCAATGGG für pYeDP60; UGT1A1_Bamf AAAGGATCCACCATGCTGGGA UGT1A1_Bamr CAAAGGATCCCTTCTCAATGGG für pPIC3BLA	57 °C 60 °C
<i>IFS1</i>	GMIFS1_H CGATGTTGCTGGAAGCTTGC GMIFS1_R ACATAAAAAGCAACTGCGATGG	60 °C

**Tab. 9: Hefegene mit Glucosidasenaktivität.**

Gen	Chromosom
<i>BGL2</i>	VII:1058731 -1057790
<i>EXG1</i>	XII:728957 - 730303
<i>SPR1</i>	XV:690696 - 692033
<i>YIR007W</i>	IX:370701- 372995
<i>SUC2</i>	IX:37385 - 38983
<i>YGR287C</i>	VII:1068998 - 1067229
<i>YJL216C</i>	X:26086 - 24341
<i>YIL172 C</i>	IX:18553 - 16784
<i>DSE 2</i>	VIII:385513 - 386490
<i>CWH41</i>	VII:446148 - 443647

## VII. Anhang

### Verwendete Vektoren:

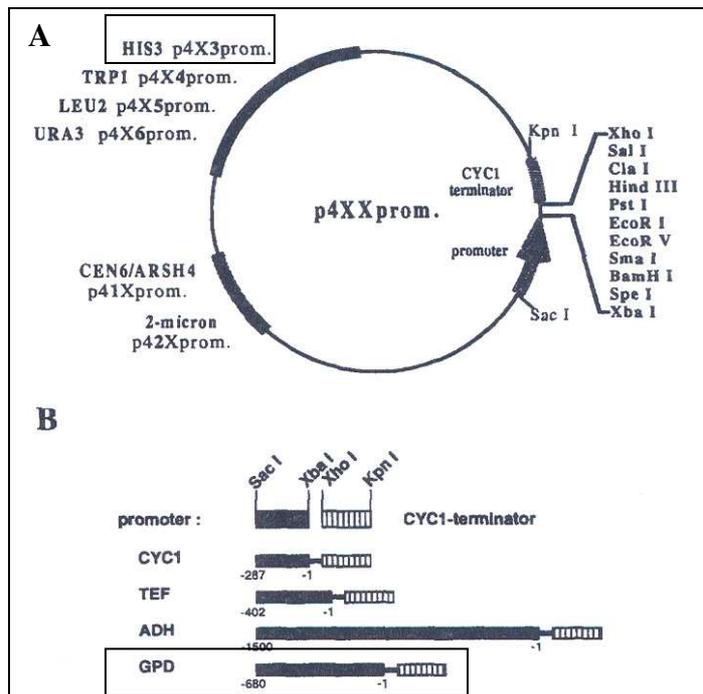


Abb. 55: p423GPD-Vektor (Mumberg *et al.* 1995), Selektionsmarker HIS3 und Promotor GPD sind markiert.

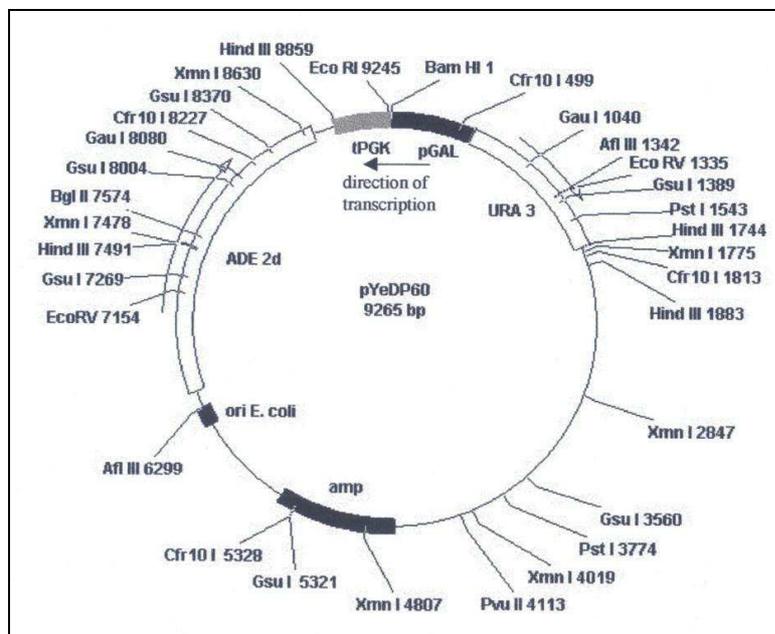


Abb. 56: Hefeexpressionsvektor pYeDP60 Vektor (Pompon *et al.* 1996).

## VII. Anhang

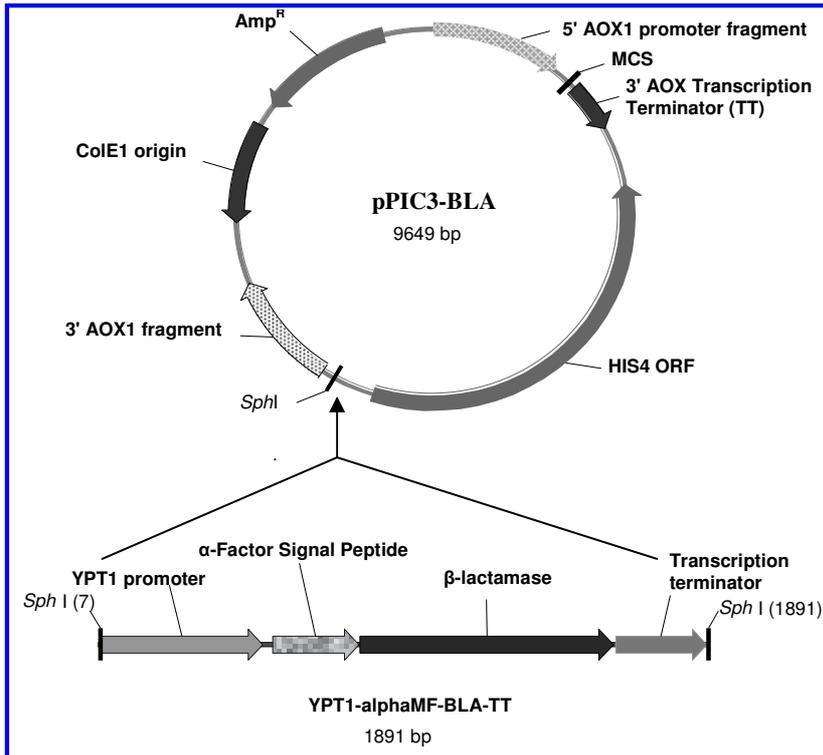


Abb. 57: *P. pastoris* Expressionsvektor pPIC3-BLA (Smilović *et al.* 2007).

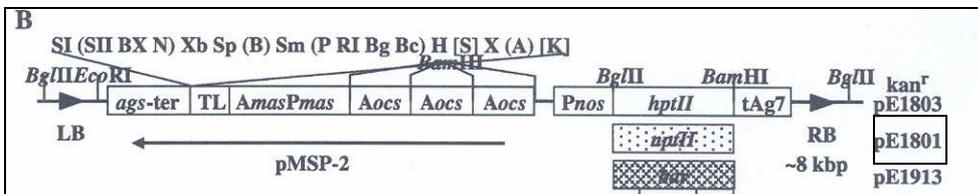


Abb. 58: pE1801- Vektor (Lee *et al.* 2007).

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

### **„Gewinnung und Modifikation von Flavonoiden in Mikroorganismen“**

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den.....

.....  
(Sabine Schmidt)

### Lebenslauf

#### Zur Person:

Name: Sabine Schmidt  
Geburtsdatum: 16.01.1977  
Geburtsort: Neustadt/Aisch  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

#### Beruf:

Okt. 2005 - Mai 2009: wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Biologie der Philipps-Universität Marburg  
Juli 2000 - Sept. 2000: Chemielaborantin bei Martin Bauer Managementservice/ Phytolab

#### Studium und Berufsausbildung:

Okt. 2000 - Sept. 2005: Studium der Biologie an der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg, Diplomarbeit am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Abschluss Diplom-Biologin  
Sept. 1997 - Juli 2000: Ausbildung zur Chemielaborantin bei Martin Bauer Managementservice/ Phytolab, Vestenbergsgreuth

#### Schulbildung:

1987-1997: Gymnasium Höchststadt/Aisch, Abitur Juni 1997  
1983-1987: Grundschule Wachenroth